

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



FACULTAD DE PSICOLOGÍA



Grado en Psicología

Trabajo de fin de grado

Convocatoria Junio 2017

COMPARACIÓN DE CLORPIRIFOS Y ÁCIDO VALPROICO Y SU
APROXIMACIÓN AL FENOTIPO AUTISTA

COMPARISON OF CHLORPYRYPHES AND VALPROIC ACID AND ITS
APPROXIMATION WITH AUTISTIC PHENOTYPES

Alumna: El omari, Saloua

Tutor: Sánchez-Santed, Luis Fernando

Cotutor: Perez fernandez, Cristian

Índice

1. Resumen.....	3
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	4
4. Método.....	7
a) <i>La prueba de la actividad locomotora.....</i>	<i>7</i>
b) <i>La prueba de las tres cámaras.....</i>	<i>8</i>
5. Resultados.....	9
a) <i>La prueba de la actividad locomotora.....</i>	<i>9</i>
b) <i>La prueba de las tres cámaras.....</i>	<i>12</i>
6. Conclusiones y discusión.....	13
7. Referencias bibliográficas.....	14

Resumen

El trastorno del espectro autista (TEA) es un trastorno generalizado del desarrollo con dos síntomas principales: déficit de comunicación social y comportamientos o intereses repetitivos. La exposición prenatal al ácido valproico (VPA) induce defectos en el tubo neural y deterioro de los comportamientos sociales, y el CPF provoca anomalías neurocomportamentales después de, aparentemente, subtóxicas exposiciones neonatales. Se llevó a cabo un estudio con un total de 30 ratas macho wistar distribuidas en tres grupos distintos de 10 sujetos: GCPF (1 mg/kg), GVPA (400 mg/kg), y Grupo Control (GC). La administración de las dos sustancias se llevará a cabo por vía subcutánea el día GD12.5; siendo una única administración para el GVPA y cuatro GCPF (GD12.5-15.5). Se realizaron pruebas conductuales como la prueba de la actividad motora y la prueba de las tres cámaras (prueba para medir la sociabilidad), con el objetivo de averiguar si los distintos grupos tratados muestran comportamientos similares acorde con lo esperado en los TEA.

Palabras clave: Comportamientos sociales, el ácido valproico, Clorpirifos, la actividad motora y la prueba de las tres cámaras.

Abstract

Autistic Spectrum Disorder (ASD) is a generalized developmental disorder with two main symptoms: social communication deficit and repetitive behaviors or interests. Prenatal exposure to valproic acid (VPA) induces defects in the neural tube and impairment of social behaviors, and CPF causes neurobehavioral abnormalities after subtoxic neonatal exposures. This study was carried out with a total of 30 male Wistar rats distributed in three different groups of 10 subjects: GCPF (1 mg/kg), GVPA (400 mg/kg), and control group (CG). A single administration for GVPA (GD12.5) and four GCPF (GD12.5-15.5). Behavioral tests were performed, such as the motor activity test and the three-chamber test (test for sociability). In order to find out if the different treated groups show similar behaviors in agreement with the expected ones in the TEA.

Key words: Social behaviors, Valproic Acid, Chlorpyrifos, Motor Activity and Three Chambers Test.

1. Introducción

Los trastornos del espectro autista (TEA) son considerados un grupo de desórdenes cuyo origen prenatal ocasionados por anomalías en el establecimiento y funcionamiento de los circuitos neuronales, que muestran diversidad clínica y etiológica. Sus manifestaciones más destacadas son los déficits en la capacidad de interacción social recíproca, principalmente con deficiencias en la comunicación verbal y no verbal, intereses anormales así como patrones de conducta repetitivos y restrictivos (Bravo Oro et al., 2012). El psiquiatra suizo Bleuler fue el primero en utilizar el término autismo en 1912 para denominar a pacientes diagnosticados con esquizofrenia. Así mismo, en 1943 Kanner y Asperger utilizaron el término para definir casos infantiles con problemas en el desarrollo de la comunicación (Bravo Oro et al., 2012).

El autismo comienza normalmente en los 30 primeros meses de vida, los cuales se consideran un momento crucial de la maduración de los circuitos neuronales, y que afecta al desarrollo normal del cerebro en muchas de las habilidades sociales y de comunicación. Hay datos clínicos, neuroanatómicos, bioquímicos, neurofisiológicos, genéticos e inmunológicos que sugieren que el autismo es un trastorno del neurodesarrollo con una clara base neurobiológica (García Peñas, Domínguez Carral, & Pereira Bezanilla, 2012). Así pues, la unión de todos estos aspectos neurobiológicos muestra que el autismo es la última expresión de la alteración de los circuitos neuronales involucrados en el desarrollo y mantenimiento del nombrado 'cerebro social', que se considera básico en el neurodesarrollo normal del niño durante los primeros tres años de vida. Los últimos hallazgos de la biología neuronal y glial afirmaron una doble regulación entre el 'circuito social' y los factores genéticos y medioambientales (García Peñas, Domínguez Carral, & Pereira Bezanilla, 2012). Además, las funciones neurobiológicas más importantes para la génesis del cerebro autista son la presencia de anomalías en la sinaptogénesis y la existencia del desequilibrio entre los circuitos excitadores e inhibidores en un cerebro que está creciendo.

La proporción de hombres y mujeres con autismo es de 4 a 1 y existe una diferencia significativa en las estimaciones de la prevalencia de los TEA, que

van de 0,7 a 1,8 en 1.000 personas, pero las últimas comunicaciones sugieren que hasta el 2,64% de los niños de 7-12 años podría tener un TEA. Y la quinta edición del *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales* propone el uso de un fenotipo más amplio además de algunos cambios en los criterios diagnósticos (Díaz Anzaldúa, & Díaz Martínez, 2017).

Estudios hechos con ratas sobre el déficit de neuropéptidos proponen que los neuropéptidos que se relacionan estructuralmente con la oxitocina y la vasopresina, quizás desempeñan un papel importante en el procesamiento de las señales sociales y la formación de los enlaces sociales en los seres humanos y ratas. Sustancias que dan lugar a probables modificaciones epigenéticas como por ejemplo el ácido valproico y el clorpirifos que también generan modelos de autismo.

El ácido valproico (VPA) es un medicamento que se utiliza para tratar o prevenir la epilepsia, la migraña y el trastorno bipolar (Kim et al., 2011), y exponerse a este medicamento durante un período de embarazo específico causa varias anomalías en el feto, incluyendo las malformaciones esqueléticas y trastornos del comportamiento, así mismo el ácido valproico se relaciona con el defecto de cerrar el tubo neural durante el proceso de desarrollo neurológico (Kim et al., 2011). La exposición al valproato durante el embarazo se propuso como un modelo animal útil del autismo, ya que el deterioro cognitivo en los recién nacidos se observa al tomar valproato durante el embarazo. La organización estructural y funcional del cerebro sigue de manera estricta los órdenes del desarrollo, y está claro que el momento en que este último se desequilibra, afectará al resultado final, como por ejemplo alterar la interacción social y aumentar la actividad convulsiva tal y como se observa en pacientes con autismo. Además hay que tener en cuenta que este trastorno es producido por defectos en las funciones cerebrales ejecutivas superiores. No obstante, aún no está del todo claro qué período exactamente de exposición al valproato es decisivo para provocar comportamientos semejantes al autismo.

El Clorpirifos es un insecticida organofosforado compuesto por residuos que se asocian con una disminución en los niveles de la Hormona Tiroxina y con un aumento en los niveles del Estradiol en ovejas. Además, se ha relacionado con bajo peso a la hora de nacer y con menor circunferencia craneal en niños que sus madres estuvieron expuestas de forma habitual al pesticida. Así mismo,

el Clorpirifos provoca anomalías neurocomportamentales después de supuestas exposiciones neonatales subtóxicas, ya que el cerebro inmaduro es muy susceptible a las alteraciones provocadas por CPF. Teniendo en cuenta que los efectos tóxicos del CPF suponen hiperestimulación colinérgica consecuente a la inhibición de la acetilcolinesterasa, los efectos desfavorables sobre el desarrollo del cerebro abarcan una mezcla de mecanismos que inciden en la proliferación y diferenciación de las células neurales, la axonogénesis y la sinaptogénesis y la función sináptica (Icenogle et al., 2004). Estudios recientes, realizados sobre los marcadores neuroquímicos y los resultados de comportamiento después de la exposición al CPF en días de gestación (17-20), en días postnatal (1-4) o en un período neonatal tardío (11 - 14), y se encontraron patrones de alteraciones parcialmente similares, por ejemplo, la aparición de déficits en la función sináptica, asociada con alteraciones locomotoras y cognitivas.

En el presente estudio, se realizaron pruebas cuyo objetivo es averiguar si los distintos grupos tratados con el ácido valproico (VPA) y el Clorpirifos (CPF), muestran comportamientos similares acorde con lo esperado en los TEA.

Por otra parte, las teorías explicativas que hay sobre el autismo caracterizan a los niños autistas por una gran falta de interés en las relaciones sociales. Así que teniendo en cuenta que las ratas son una especie muy social, la investigación social muestra estudios, como por ejemplo, con congéneres desconocidos, la anidación comunal, dormir en grupos, la agresión dirigida hacia intrusos, el acercamiento sexual y patrones de comportamiento de apareamiento, el cuidado de las crías y el juego juvenil (Crawley, 2004). Así pues, los neurocientíficos usan métodos de puntuación estandarizados para evaluar las distintas maneras de interacción social de las ratas. Una de las pruebas se basaba en el diseño un aparato automatizado que detecta los niveles bajos de sociabilidad en las ratas, cuyos resultados se asemejan a los déficits observados en la interacción social de muchos casos con autismo.

Varios estudios confirman que las crías inyectadas con VPA en el 12,5º día de gestación muestran anormalidades cerebrales semejantes a las encontradas en la autopsia y en el estudio de imágenes cerebrales de pacientes autistas (Olexová, Senko, Štefánik, Talarovičová, & Kršková, 2013), como por ejemplo la disminución del número de neuronas motoras en el oculomotor, el acortamiento de la región caudal al núcleo facial, el tamaño pequeño del cerebelo

y un núcleo interplanetario cerebeloso reducido (Olexová, Senko, Štefánik, Talarovičová, & Kršková, 2013). Así pues, nuestro estudio incluye la prueba de la actividad locomotora, exploratoria y repetitiva / estereotípica, ya que, índices bajos en la hiperactividad y la exploración han sido descritas en pacientes autistas.

Este artículo presenta los fundamentos de las dos tareas realizadas: la prueba de la actividad locomotora y la prueba de las tres cámaras, con diseño y descripción de los métodos y resultados obtenidos hasta la fecha.

2. Método

La investigación realizada se llevó a cabo con ratas cuya raza es la Wistar, 25 ratas embarazadas y se alejaron individualmente en sus jaulas de plástico con agua y Purina Rat Chow disponible ad libitum. El animalario se mantuvo a 22°C y con un ciclo luz-oscuridad de 12h (oscuridad de 8 a.m. a 8 p.m). Se llevaron a cabo las inyecciones subcutáneas en tres días a los 3 grupos de ratas: I (GC), vehículo; II (GCP), 1 mg/kg CPF disuelto en dimetilsulfóxido desde el GD9 hasta el GD12. Lo que hace un total de 4 administraciones; III (VPA), 400 mg/kg en una única administración disuelto en salino. Las ratas parieron casi todas el mismo día (232 crías), y el día 1 se identificó el sexo de todas las crías y se sacrificaron un total de 23 crías (11 crías GC, 4 GCP, Y 8 VPA) para registrar 209 crías sujetos. Se estudiaron 10 crías de cada camada, de las cuales 5 eran hembras y 5 eran machos. El control de peso de las ratas madre y de las crías se llevó a cabo todos los días, y todos los experimentos se realizaron en la fase de luz entre las 09:00 y las 19:00. Finalmente, el proyecto financiado (código PS2014-55785-C2-1-R) y aprobado por el Comité Local de Bioética.

a) La prueba de la actividad locomotora

La actividad locomotora fue medida por el sistema VersaMax (AccuScan Instruments, Inc., Canadá) (López-Granero et al., 2012), compuesto por ocho cajas de Plexiglás transparentes que van equipadas con un conjunto de 16×16×16 fotocélulas espaciadas 2,5 cm y a diferentes alturas dentro de la caja (López-Granero et al., 2012). Estas características permiten determinar tanto la

actividad horizontal como la actividad vertical. Las cajas de las ratas sujeto fueron colocadas en una habitación a 22 ° C y a oscuras, puesto que corresponde al ciclo utilizado en la casa de animales durante el día.

La actividad se registró durante 5 min en el caso de las ratas infantiles (J-11), y 30 min (5 min/bloque) en el caso de las ratas adolescentes (J-21).

b) La prueba de las tres cámaras

En la prueba de tres cámaras, se ha trabajado con 52 ratas (24 ratas hembras y 28 machos) adolescentes (40 días) elegidas al azar. Así pues la prueba consistió en diseñar un aparato de tres cámaras automatizado para detectar los bajos niveles de sociabilidad (comportamientos de aproximación social) en ratas.

La cámara central donde se coloca el sujeto está completamente vacía y sirve como un control de la actividad locomotora; En la cámara lateral se coloca la rata extraña (sin tener contacto físico ninguno con la rata sujeto) en una jaula de alambre que permite contacto visual, olfativo, auditivo y táctil. La otra cámara lateral contiene la jaula de la segunda rata extraña. Los emisores de fotocélulas introducidos en los paneles envían señales infrarrojas a través de las aberturas entre las cámaras y los detectores de fotocélulas situados en el sitio opuesto de las aberturas son detectores de movimiento. Un sistema de interfaz de software detecta y registra automáticamente los movimientos realizados por la rata, incluso el número de veces y el tiempo que pasa explorando cada parte de la cámara (Crawley, 2004). Además un detector de ultrasonidos colocado en la cámara del medio para grabar los ultrasonidos emitidos por las ratas.

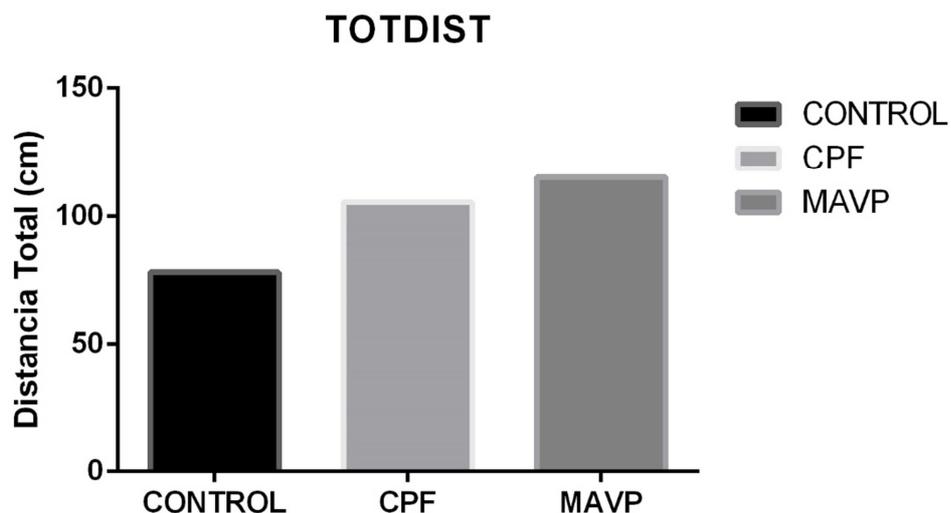
Se comenzó con un periodo de habituación con todos los sujetos (10 min por rata) con el objetivo de evitar el estrés. El experimento compuesto por tres partes (10 min/parte), en la primera parte de la prueba se cerró las dos puertas de la cámara del medio, se dejó a la rata sujeto en la cámara central y se grabaron sus movimientos locomotores y sus ultrasonidos. En la segunda parte se sacó a la rata sujeto, se quitaron las dos paredes para que la rata pueda distribuirse en las tres cámaras, se colocó el primer extraño en su jaula y se colocó a la rata sujeto. En la tercera parte se hace lo mismo que en la segunda parte, con diferencia de añadir al segundo extraño.

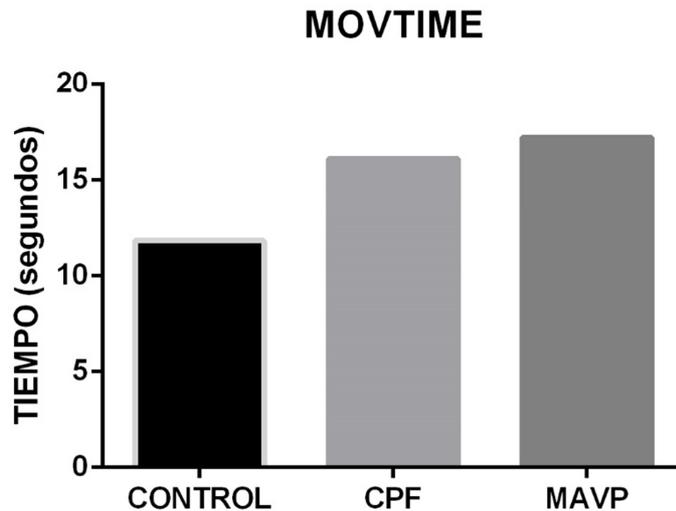
Se registraron el número de entradas de la rata sujeto en cada cámara ya que proporciona un control de la actividad locomotora y comportamientos que se asimilan a la ansiedad, el tiempo pasado en cada cámara, el tiempo pasado por el sujeto olfateando la jaula de la rata extraña y el tiempo que pasó olisqueando la jaula vacía (Crawley, 2004). De esta manera se midió la preferencia de la rata sujeto a pasar tiempo con una rata extraña en comparación con el tiempo que pasa en las otras dos cámaras (Crawley, 2004).

3. Resultados

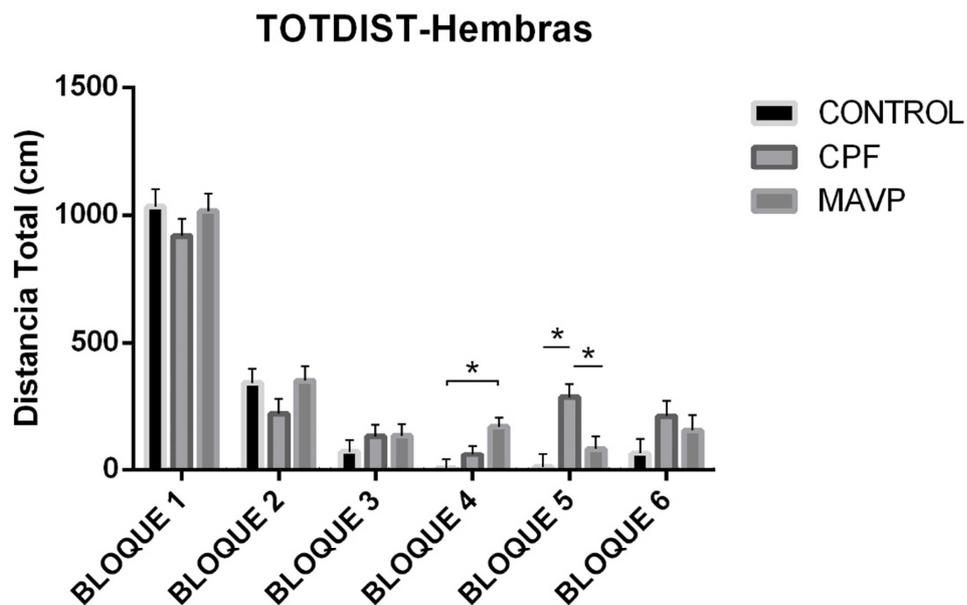
a) *La prueba de la actividad locomotora*

Por una parte, los datos de la prueba realizada a las ratas infantiles durante 5 min, se analizaron mediante el SPS, calculando el ANOVA de un factor (tratamiento), y se observó que los resultados no revelaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, tanto en el análisis de la distancia total como en el análisis del tiempo del movimiento, ya que, $F_{(2,2)} = 2,301$, $P < 0,113$.

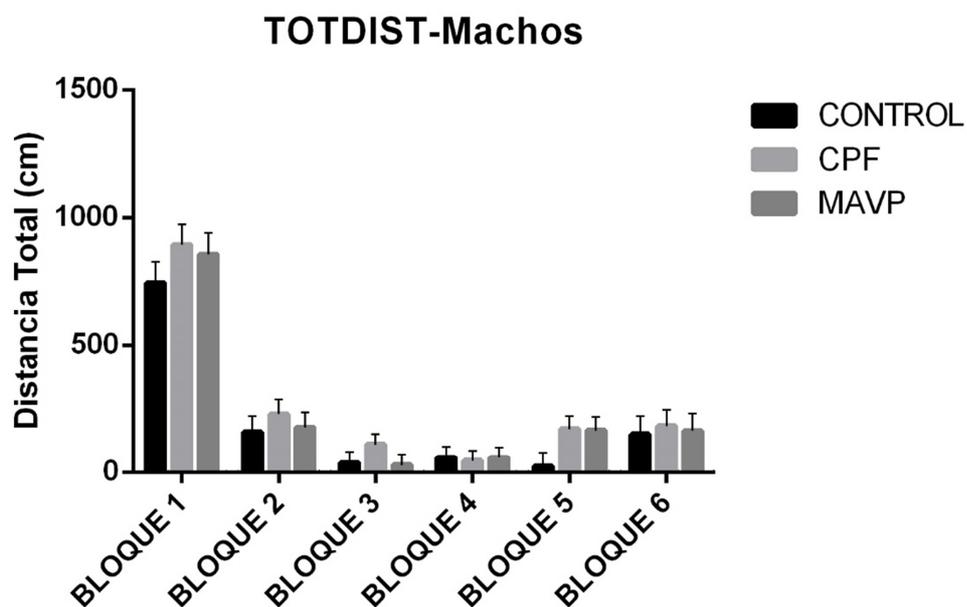


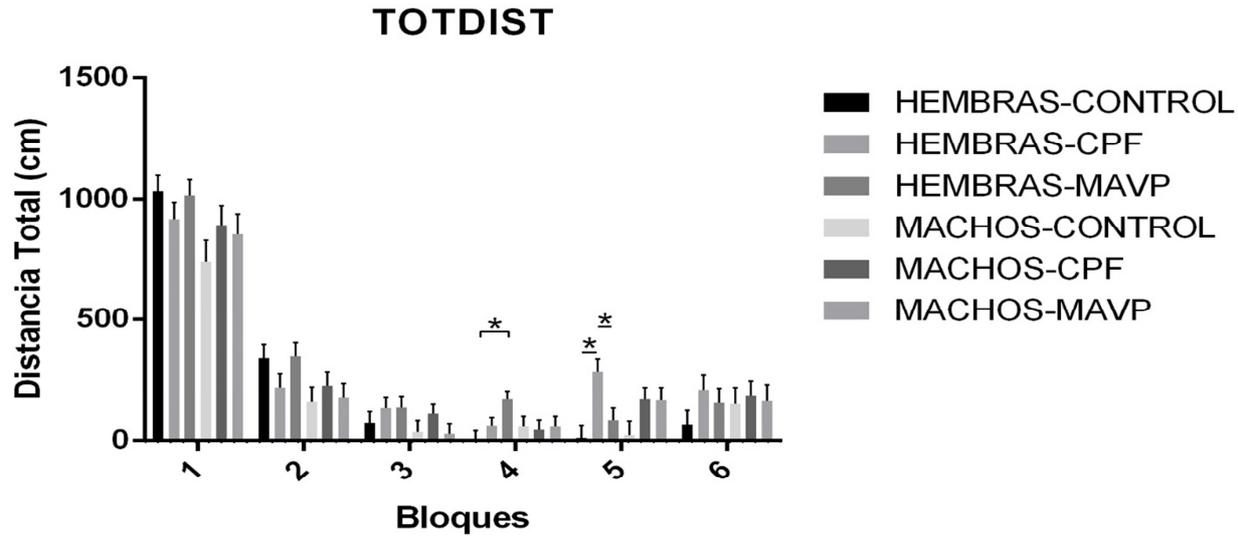


Por otra parte, para la medida de la tarea realizada a las ratas adolescentes (10 min/rata), se han calculado los datos mediante el MODELO LINEAL, ANOVA de medidas repetidas, con seis niveles que corresponden a fases de la prueba (bloques) y revelaron diferencias significativas en las tablas de las pruebas de efectos dentro de sujetos para los factores sexo y tratamiento, en caso de las hembras en cuanto a las distancias totales $F_{(5,10)} = 135,11$, $P < 0,001$. En cuanto a las distancias totales en función del tratamiento se ha obtenido $F = 2,646$, $P < 0,006$. La significación se observaba sobre todo en el bloque 4, ya que las ratas tratadas con el AVP recorrieron más distancia comparadas con las ratas control, y en el bloque 5, las ratas tratadas con CPF recorrieron más distancia que las ratas AVP y control.



Sin embargo, en los resultados de las ratas machos, no hubo diferencias significativas ya que $F(5, 135) = 76, 598$, $P < 0,00$ (en función de las distancias totales), $F = 0,445$ y $P < 0,992$ (en función de las distancias/tratamiento).

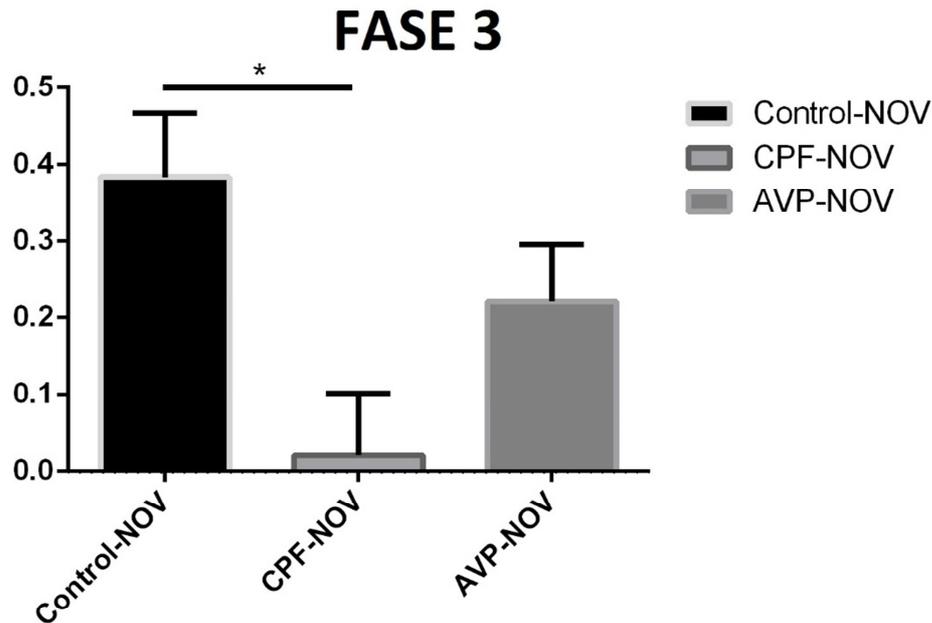




b) *La prueba de las tres cámaras*

La prueba conductual de *Crawly* realizada para estudiar la sociabilidad y la preferencia por la novedad se analizó mediante el SPSS, se analizaron las tres variables, la duración, frecuencia y latencia, usando como modelo, el modelo lineal, Anova de las medidas repetidas, y se calcularon los efectos intra-sujetos que mostraron los siguientes resultados, $F(5,2) = 2,096$, $P = 0,084$

Sin embargo, el cálculo de los índices de las zonas del extraño 1 y extraño 2 en la tercera fase (fase 3), reveló interesantes diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Puesto que las ratas CPF mostraron tendencia a evitar el extraño 2 (la rata novedosa) comparadas con las ratas control $P = 0,011$.



4. Conclusiones y discusión

La exposición prenatal al CPF y al VPA causó distintas alteraciones de comportamiento en las ratas adolescentes, ya que se observó una diferencia significativa entre los distintos tratamientos aplicados. Los datos indicaron una clara diferencia entre los dos sexos (hembras y machos), puesto que las hembras reflejaban más actividad locomotora en la prueba. Según la explicación de varios estudios, estos resultados podrían ser causados por los efectos selectivos del sexo en el desarrollo del comportamiento, que quizás el CPF provoca, pero también podría ser debido a los factores hormonales y la diferenciación de las regiones cerebrales implicadas en el dimorfismo sexual.

Por una parte, las gráficas mostraron un aumento a distintos niveles del tratamiento en el primer bloque, cosa que podría ser debida al estrés ante la exposición novedosa al entorno dentro del aparato de la actividad motora. Por otra parte, las mismas gráficas mostraron una disminución en los siguientes bloques (II, III, IV, V, VI), puesto que las ratas se habituaron fácilmente a la actividad, mostrándose más relajadas y tranquilas.

Además, no debemos olvidar que los datos de la actividad locomotora de las ratas infantiles no revelaron diferencias a pesar de pasar el tiempo suficiente

(5min) dentro del aparato, lo que podría indicar que los efectos de la exposición prenatal a los distintos tratamientos no muestran cambios a nivel cerebral a una edad tan temprana (J-11).

Nuestra hipótesis no se ha cumplido, con lo cual en estudios futuros se necesitaría concentrarse en las diferencias locomotoras entre los distintos sexos a distintas edades, ya que interesaría estudiar las causas de la hiperactividad de las hembras en las actividades. También, se podría evitar la influencia de las variables extrañas, tales como la separación de algunas ratas infantiles de sus madres, el estrés, y el cambio del ciclo (luz-oscuridad).

Las conductas sociales y la preferencia por la novedad social podrían ser tareas fáciles de medir y simples a la hora de compararlas con conductas similares al trastorno del espectro autista. Así pues en la prueba de las tres cámaras, el número de entradas de la rata hacia los laterales donde se encuentran los extraños, podría reflejar un déficit relacionado con la ansiedad. Por lo cual, las diferencias significativas encontradas en los resultados obtenidos de la tercera fase (fase 3), en las ratas tratadas con el Clorpirifos, podría afirmar nuestra hipótesis, ya que la no preferencia de las ratas CPF a la rata novedosa, indica una disminución en sociabilidad.

Pero debemos tener en cuenta que el bajo nivel del enfoque social es insuficiente a la hora de explicar la gran complejidad y variabilidad del trastorno generalizado del desarrollo. Por lo que se recomienda hacer unos análisis más profundos de las interacciones sociales.

Además, la habituación es una variable importante en las pruebas de la exploración del entorno para evitar posibles errores generados por el estrés, por lo que se debe aumentar el tiempo que pasa la rata en el aparato de las tres cámaras.

Finalmente, sería importante e interesante hacer más pruebas locomotoras a las mismas ratas para observar el efecto de los tratamientos aplicados a largo plazo.

5. Referencias bibliográficas

Bravo Oro, A., Vázquez Briseño, J., Cuello García, C., Calderón Sepúlveda, R., Hernández Villalobos, A., & Esmer Sánchez, C. (2012). Manifestaciones iniciales de los trastornos del espectro autista. Experiencia en 393 casos atendidos en un centro neurológico infantil. *Neurología*, 27(7), 414-420. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2011.09.011>

García Peñas, J., Domínguez Carral, J., & Pereira Bezanilla, E. (2012). *Abnormalities of synaptogenesis in autism. Pathogenic and therapeutic implications.* *researchgate.net*. Retrieved 20 March 2017, from https://www.researchgate.net/publication/298279132_Abnormalities_of_synaptogenesis_in_autism_Pathogenic_and_therapeutic_implications

Díaz Anzaldúa, A., & Díaz Martínez, A. (2017). *Genetic, environmental, and epigenetic contribution to the susceptibility to autism spectrum disorders.* *researchgate.net*. Retrieved 20 March 2017, from https://www.researchgate.net/publication/259003655_Genetic_environmental_and_epigenetic_contribution_to_the_susceptibility_to_autism_spectrum_disorders

Icenogle, L., Channelle Christopher, N., Paul Blackwelder, W., Patrick Caldwell, D., Qiao, D., & Seidler, F. et al. (2004). Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicology And Teratology*, 26(2), 95–101. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ntt.2003.09.001>

Brudzynski, S., Kehoe, P., & Callahan, M. (1999). Sonographic structure of isolation-induced ultrasonic calls of rat pups. *Developmental Psychobiology*, 34(3), 195-204. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2302\(199904\)34:3<195::aid-dev4>3.0.co;2-s](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1098-2302(199904)34:3<195::aid-dev4>3.0.co;2-s)

Crawley, J. (2004). Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Mental Retardation And Developmental Disabilities Research Reviews*, 10(4), 248-258. <http://dx.doi.org/10.1002/mrdd.20039>

Olexová, L., Senko, T., Štefánik, P., Talarovičová, A., & Kršková, L. (2013). Habituation of exploratory behaviour in VPA rats: animal model of autism. *Interdisciplinary Toxicology*, 6(4). <http://dx.doi.org/10.2478/intox-2013-0033>

López-Granero, C., Ruiz-Muñoz, A., Nieto-Escámez, F., Colomina, M., Aschner, M., & Sánchez-Santed, F. (2016). Chronic dietary chlorpyrifos causes long-term spatial memory impairment and thigmotaxic behavior. *Neurotoxicology*, 53, 85-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.016>

Braquenier, J., Quertemont, E., Tirelli, E., & Plumier, J. (2010). Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. *Neurotoxicology And Teratology*, 32(2), 234-239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2009.08.008>

López-Granero, C., Cañadas, F., Cardona, D., Yu, Y., Giménez, E., & Lozano, R. et al. (2012). Chlorpyrifos-, Diisopropylphosphorofluoridate-, and Parathion-Induced Behavioral and Oxidative Stress Effects: Are They Mediated by Analogous Mechanisms of Action?. *Toxicological Sciences*, 131(1), 206-216. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfs280>