



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas
Centro de Investigación Príncipe Felipe

**ALTERACIONES NEUROLÓGICAS (COGNITIVAS Y
MOTORAS) EN RATAS EXPUESTAS
PERINATALMENTE A PESTICIDAS CONTAMINANTES
AMBIENTALES.
MECANISMOS MOLECULARES**

Tesis doctoral

Presentada por: **Belén Gómez Giménez**
Para la obtención del grado de Doctora en **Neurociencias**

Dirigida por: Dr. Vicente Felipo Orts y Dra. Marta Llansola Gil

Noviembre 2016



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

El Dr. Vicente Felipo Orts, investigador y director del laboratorio de Neurobiología del centro de investigación Príncipe Felipe y la Dra. Marta Llansola Gil, investigadora del laboratorio de Neurobiología del centro de investigación Príncipe Felipe

CERTIFICAN:

Como directores de la tesis doctoral realizada por D^a Belén Gómez Giménez, titulada **“Alteraciones neurológicas (cognitivas y motoras) en ratas expuestas perinatalmente a pesticidas contaminantes ambientales. Mecanismos moleculares”**. Que ha sido desarrollada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Valencia 2 Noviembre de 2016

Vicente Felipo Orts

Marta LlansolaGil

AGRADECIMIENTOS

En esta tesis han participado muchas personas, bien de forma directa o indirecta, por tanto no pueden faltar en el apartado más leído de las tesis.

En primer lloc a Marta, gràcies per tot, per traure temps d'on no tenies per corregir-me la tesi, per ajudar-me a organitzar la feina i donar-me consell cada vegada que tenia algun dubte. Has sigut la meua segona mare, gràcies per cuidar-me i preocupar-te per mi tant en el laboratori com en les nostres aventures per ciutats i aeroports d'Europa.

A Vicente Felipo per escollir el meu currículum i donar-me la oportunitat de poder realitzar la tesi al laboratori de neurobiologia, en el que he pogut aprendre dia a dia i el millor de tot, conèixer i treballar amb el I-06, que mes que companys han sigut amics.

A les tres tècnics del laboratori, que encara que no apareixen als articles sense elles moltes parts d'aquesta tesi no s'hagueren pogut realitzar: A Mar, por enseñarme a operar microdiálisis, nunca olvidaré el momento ghost que protagonizamos en la sala de autopsias, gracias por encargarte de que mis ratitas pasaran a mejor vida pero sobre todo gracias por todos los momentos de risas que hemos compartido tanto dentro como fuera del laboratorio. A Mari Carmen, gracias por ser la mami de las ratas, por cuidarlas, por darles cariño y gracias por ser mi compañera en los test de comportamiento, las horas pasaban mucho más rápido (fines incluidos) trabajando y charlando contigo en el inframundo. A Paquí, gràcies per cada blot que m'has ajudat a fer i que t'ha tocat fer per mi, per passar fred al HPLC carregant-me mostres mentre jo estava fent comportament...i gràcies per cada moment de risses i complicitat al laboratori.

A Raquel, la persona que más ganas tenía de que esta tesis viera la luz, lo hemos pasado mal, pero pensándolo ahora desde la distancia creo que no podría haber tenido una compañera de lloros mejor que tú, nunca olvidaré los días de esa pesadilla llamada Y-maze, la cual sacaba lo peor de nosotras, pero aun así le intentábamos ver el lado positivo y ahora nos reímos recordándolo. Pero sobretodo Raquel, muchas gracias por ser mi amiga, por apoyarme en cada momento y gracias por esas risas, cotilleos y viajes que hemos compartido.

A Alma, encara que estàs a l'altra punta del mon estàs molt present en aquesta tesi, gràcies per els moments compartits tant dins però

especialmente fora del laboratori, gràcies al igual que a Raquel per ser la meua amiga, per la teua ajuda, consells i per la teua forma de veure la vida.

Al I-06, los mejores compañeros de trabajo que he tenido la suerte de conocer, a Ana, gracias por los consejos, por enseñarme a pasar micro y ayudarme en momentos de pánico durante la operación, gracias por hacerme reír con tus locuras, a Andrea, gràcies per els consells i ajuda que m'has donat durant aquests tres anys, la llengua ens ha unit en diferents moments fora del laboratori però no em aconseguí encara poder fer una tesi en valencià. A Michele, he de agradecerte cada momento de risas. A Sherry, mi profesora particular de inglés, gracias por tu ayuda en cada uno de los correos y cada corrección que te he pedido que me revisaras, los primeros días de conocernos me daba vergüenza hablar contigo en inglés pero cuando me dijiste que en castellano me entendías supe que tu y yo nos íbamos a llevar muy bien, thanks for all my friend. A Vite, gracias por enseñarme como hacer comportamiento animal y analizar los datos después, gracias en mayúsculas por tus canciones que nos alegraban las mañanas.

Dentro del I-06, hay unas personitas que merecen mención aparte y son los predocs, gracias por cada congreso que hemos compartido, el de la SEN, los de predocs, pero sobretodo el de Granada en el que nos lo pasamos en grande. Gracias por cada cena, cada viaje, cada consejo. Gracias a Alba porque a pesar de estar en el clínico tú eras una más de los Felipo's predocs. A Lucas, por tu forma de ser, por los consejos, por cada comida-cena compartida, por dejarme tu libro de neurociencias, pero gracias por ser mi amigo. A Tiziano, gracias por cada momento y por tu ayuda con el italiano.

A Julia i Vero, dos personas que como tantas otras pasaron por el laboratorio para realizar prácticas y se convirtieron en amigas y confidentes.

A Carmina, gracias por escoger mi curriculum para pedir la beca de Conselleria, a pesar de que al final no pude trabajar en el hospital con pacientes me diste la oportunidad de conocer a estos compañeros increíbles nombrados antes. A Carla i Amparo, per l'ajuda si l'he necessitada.

Gràcies a la Conselleria d'educació per concedir-me la beca per poder realitzar la tesi.

Gracias a la IBRO por darme la oportunidad de poder realizar una estancia en el Instituto Mario Negri de Milán.

Vorrei ringraziare a Roberta Patorelli per tutto quello che ha fatto per me mentre ero al suo laboratorio a Milano: grazie per il tuo aiuto, il tuo sorriso e le tue parole di incoraggiamento; ogni volta che mi hai detto di essere stata brava o di aver fatto molto bene il lavoro mi sono sentita valutata, e anche se ero lontana dalla mia famiglia, amici e colleghi mi hai fatto sentire come a casa. A Laura Brunelli, grazie per il tuo aiuto al lavoro ma soprattutto grazie per avermi cercato per andare a pranzo alle dodici e per avermi presentato i tuoi amici che mi hanno trattato come se fossi una del gruppo e mi hanno aiutata in tutto quello che avevo bisogno

A Iria a pesar del poco tiempo, muchas gracias por tu ayuda los primeros días en Milán, por preocuparte por mí y muchas gracias por introducirme en tu grupo de amigos, fue un placer conocerte.

A Emma, gracias por toda la ayuda que me prestaste hasta el último momento los meses que estuve en Milán e incluso después de volver, por preocuparte por mí, por las cenas, el viajecito a Monza, ojalá pudiese haberme quedado más porque a pesar del poco tiempo disfruté muchísimo contigo y tus amigos italianos.

Fora del mon laboral he de agrair aquesta tesi als meus amics, per confiar en mí quan vos vaig dir que anava a treballar amb rates, gràcies per els vostres ànims, per creure en mí i estar segurs que aconseguiria treballar amb animals, però gràcies especialment per estar ahí quan vos he necessitat, per cadascun dels comiats i benvingudes quan me'n tenia que anar a Milán i vaig tornar, encara que no ens veiem tant com voldríem sabem que estem ahí i ja sabeu que aquest esdeveniment es mereix una gran festa.

I finalment i no menys important, a la meua família als que estan i als que no, gràcies a vosaltres he arribat fins ací i sóc com sóc, gràcies per confiar en mí, per donar-me ànims, consells i ajuda, se que esteu orgullosos de mí.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1- Pesticidas y neurotoxicidad | 1 |
| 2- Pesticidas y bioacumulación | 2 |
| 3- Tipos de pesticidas | 3 |
| 3.1- Organofosforados | 4 |
| 3.1.1- Clorpirifos | 4 |
| 3.1.2- Efectos de la exposición a clorpirifos | 5 |
| 3.2- Carbamatos | 7 |
| 3.2.1- Carbaril..... | 7 |
| 3.2.2- Efectos de la exposición a carbaril..... | 7 |
| 3.3- Organoclorados | 9 |
| 3.3.1- Endosulfán..... | 9 |
| 3.3.2- Efectos de la exposición a endosulfán..... | 10 |
| 3.4-Piretroides..... | 12 |
| 3.4.1- Cipermetrín..... | 13 |
| 3.4.2- Efectos de la exposición a cipermetrín..... | 13 |
| 3.5-Mezclas de pesticidas | 14 |
| 4- Aprendizaje y memoria espacial | 17 |
| 4.1- Diferencias de género en la memoria espacial | 19 |
| 5- Coordinación motora..... | 20 |
| 6- Actividad motora..... | 21 |
| 7- Aprendizaje asociativo | 22 |
| 8- Neurotransmisión | 23 |
| 8.1- Colinérgica | 23 |
| 8.2- GABAérgica..... | 24 |
| 8.3- Glutamatérgica | 26 |
| 8.4- Dopaminérgica y serotoninérgica..... | 28 |
| 9- Neuroinflamación..... | 29 |
| 9.1- Citocinas..... | 30 |
| II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 33 |

| | |
|---|----|
| III. MATERIAL Y MÉTODOS | 34 |
| 1-Animales | 34 |
| 1.1- Administración de pesticidas..... | 34 |
| 1.2- Curso temporal del estudio | 35 |
| 2- Tests de comportamiento | 36 |
| 2.1- Aprendizaje y memoria espacial | 36 |
| 2.1.1- Laberinto radial de ocho brazos | 36 |
| 2.1.2- Laberinto acuático de Morris | 37 |
| 2.2- Coordinación motora... .. | 38 |
| 2.2.1- Rotarod | 38 |
| 2.2.2- Beam walking..... | 39 |
| 2.3- Actividad motora | 39 |
| 2.4- Ritmos circadianos de actividad motora | 40 |
| 2.5- Aprendizaje asociativo: Evitación activa | 40 |
| 2.6- Test de ansiedad: <i>Hole board</i> | 41 |
| 3- Microdiálisis cerebral in vivo..... | 41 |
| 3.1- Implantación de la sonda de microdiálisis | 42 |
| 3.2- Microdiálisis cerebral in vivo..... | 42 |
| 4- Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) | 43 |
| 4.1- Determinación de aminoácidos por HPLC..... | 43 |
| 5- Sacrificio | 44 |
| 6- <i>Western blot</i> | 44 |
| 7- Análisis estadístico | 45 |
| | |
| IV. RESULTADOS | 46 |
| 1- Efecto de la exposición perinatal a pesticidas sobre la ansiedad | 46 |
| 2- Efecto de la exposición a pesticidas en el ritmo circadiano de la actividad motora..... | 46 |
| 3- Efecto de la exposición a pesticidas en la actividad motora | 48 |
| 3.1- Actividad ambulatoria | 48 |
| 3.2- Actividad vertical | 49 |
| 3.3- Movimientos estereotípicos..... | 49 |
| 4- Efecto de la exposición a pesticidas en el contenido de las subunidades del receptor NMDA y correlación con la actividad ambulatoria en machos y hembras | 50 |

| | |
|--|----|
| 5-Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en la coordinación motora en el Rotarod | 53 |
| 6-Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en la coordinación motora en el <i>beam walking</i> | 54 |
| 7- Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en los niveles extracelulares de GABA..... | 55 |
| 8- Correlación entre los niveles extracelulares de GABA en cerebelo y la coordinación motora | 56 |
| 8.1- Correlación entre los niveles extracelulares de GABA y el tiempo en el rotarod..... | 57 |
| 8.2- Correlación entre los niveles extracelulares de GABA y el número de resbalones en el <i>beam walking</i> | 57 |
| 9- Efecto de la exposición perinatal a pesticidas sobre el aprendizaje asociativo..... | 58 |
| 10- Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en el aprendizaje espacial y memoria de trabajo en el laberinto radial | 60 |
| 10.1- Índice de aprendizaje | 60 |
| 10.2- Errores de referencia | 61 |
| 10.3- Errores de trabajo | 63 |
| 11- Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en el aprendizaje y memoria espaciales en el laberinto acuático de Morris..... | 64 |
| 12- Diferencias de género en el aprendizaje espacial | 66 |
| 13- Efectos de la exposición a pesticidas sobre marcadores de neuroinflamación en hipocampo | 68 |
| 14- Correlación entre niveles de IL-1 β en hipocampo y memoria espacial | 71 |
| 15- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END en la ansiedad: Test <i>hole board</i> | 72 |
| 16- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END en el ritmo circadiano de la actividad motora..... | 73 |
| 17- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END en la actividad Motora | 74 |
| 17.1- Actividad ambulatoria | 74 |
| 17.2- Actividad vertical | 75 |
| 17.3- Actividad estereotípica..... | 76 |

| | |
|--|-----|
| 18- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END en la coordinación | |
| Motora | 77 |
| 18.1- Rotarod | 77 |
| 18.2- <i>Beam walking</i> | 78 |
| 19- Efectos de la exposición perinatal a CYP y END en los niveles extracelulares de GABA en el cerebelo..... | 78 |
| 20- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END en el aprendizaje asociativo: Tarea de evitación activa..... | 79 |
| 21- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END en aprendizaje espacial en el laberinto radial | 80 |
| 21.1- Índice de aprendizaje..... | 80 |
| 21.2- Errores de referencia | 81 |
| 21.3- Errores de trabajo | 82 |
| 22- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END en el aprendizaje y memoria espaciales en el laberinto acuático de Morris..... | 84 |
| 23- Efectos de la exposición a la mezcla de CYP y END en el contenido de marcadores de neuroinflamación y de las subunidades del receptor de NMDA en el hipocampo..... | 86 |
| V. DISCUSIÓN | 89 |
| 1- Alteraciones en el aprendizaje asociativo y ansiedad por exposición a pesticidas durante el desarrollo. Mecanismos implicados y diferencias de género.... | 89 |
| 2- Alteraciones del ritmo circadiano de la actividad motora por exposición a pesticidas durante el desarrollo. Mecanismos implicados y diferencias de género.... | 90 |
| 3- Alteraciones de la actividad motora por exposición a pesticidas durante el desarrollo. Mecanismos implicados y diferencias de género | 91 |
| 4- Alteraciones de la coordinación motora por exposición a los diferentes pesticidas durante el desarrollo. Mecanismos implicados y diferencias de género.... | 94 |
| 5- Alteraciones en el aprendizaje y memoria espaciales por exposición a diferentes pesticidas y mecanismos implicados. Diferencias entre sexos | 97 |
| 6- Interacción entre los pesticidas CYP+END en una mezcla | 101 |
| VI. CONCLUSIONES | 105 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 106 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| ACh | Acetilcolina |
| AChE | Acetilcolinesterasa |
| A | Adrenalina |
| AMPA | Ácido α - amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolpropiónico |
| CARB | Carbaril |
| CAT | Catalasa |
| CPF | Clorpirifos |
| CYP | Cipermetrín |
| DA | Dopamina |
| EEG | Electroencefalograma |
| END | Endosulfán |
| GABA | Ácido Gamma-aminobutírico |
| GSH | Glutación reducido |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta presión |
| HVA | Ácido homovalínico |
| IL | Interleucina |
| IL-1 β | Interleucina-1 β |
| LTD | Depresión a largo plazo |
| LTP | Potenciación a largo plazo |
| NMDA | Ácido N-metil-D-aspartico |
| MeHg | Metilmercurio |
| MWM | Laberinto acuático de Morris |
| NA | Noradrenalina |
| NAcc | Núcleo <i>accumbens</i> |
| PCBs | Bifenilos policlorurados |
| ROS | Especies reactivas del oxígeno |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SNP | Sistema nervioso periférico |
| TDAH | Síndrome del trastorno por déficit de atención con hiperactividad |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| 5-HT | Serotonina |

I. INTRODUCCIÓN

1- PESTICIDAS Y NEUROTOXICIDAD

El uso de sustancias químicas en agricultura y en el hogar para combatir una gran variedad de plagas ha sido generalizado durante todo el siglo pasado, ya que de lo contrario estas plagas menguarían la producción de las cosechas como fuente de alimento. Sin embargo estos beneficios vienen asociados con una serie de perjuicios ya no sólo a nivel de ecosistemas (pérdida de diversidad) sino que conllevan consecuencias para la salud humana.

Entre estas sustancias se encuentran los pesticidas o plaguicidas. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 1990) define los plaguicidas como «cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos». Los pesticidas son útiles no sólo en la industria agrícola, donde se los emplea para proteger cultivos y aumentar rendimientos de cosechas, sino también a nivel doméstico, donde son utilizados con frecuencia para eliminar insectos o roedores.

Debido a que la mayoría de los pesticidas actúan sobre el sistema nervioso de los insectos y los procesos neuroquímicos son similares a los del sistema nervioso de humanos, los hace especialmente peligrosos por su neurotoxicidad. Neurotoxicidad se define como un cambio estructural o una alteración funcional del sistema nervioso debido a una exposición a un agente químico, biológico o físico (Philbert et al, 2000).

En los últimos años existe una gran preocupación por el aumento de la incidencia de los trastornos del aprendizaje y del desarrollo en los niños. Por ejemplo las tasas de prevalencia del trastorno del espectro autista y del síndrome del trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) parecen ir en aumento en todo el mundo (Grandjean y Landrigan, 2014).

Durante el desarrollo, el cerebro humano es inherentemente mucho más vulnerable a las lesiones causadas por agentes tóxicos que el cerebro de los adultos. En parte esto es debido a que durante el desarrollo el cerebro carece de barrera hematoencefálica, la cual

se va formando en el periodo prenatal y se completa a los seis meses de edad en humanos (Rodier, 1995). Esta barrera es la encargada de proteger al cerebro de sustancias tóxicas y por ello la carencia de ésta durante el periodo perinatal hace que dichas sustancias puedan alcanzar el cerebro del feto y del neonato más fácilmente. El desarrollo cerebral se produce durante la gestación y continúa en el periodo neonatal. Por ejemplo, los procesos de proliferación y migración neuronal continúan en el período postnatal (Rodier, 1995). Las sustancias neurotóxicas llegan al cerebro del feto a través de la sangre de la placenta y al de los neonatos a través de la leche materna.

La exposición a contaminantes ambientales, incluyendo los pesticidas, durante el desarrollo temprano del cerebro puede conducir a déficits neurológicos (Costa et al, 2004). Se ha asociado a alteraciones neurológicas en los niños, incluyendo alteraciones de las funciones motoras, agudeza visual, memoria a corto plazo o atención (Landrigan, 2001; Bjørling-Poulsen et al, 2008).

2- PESTICIDAS Y BIOACUMULACIÓN

Los pesticidas se adhieren a los tejidos de las plantas y se acumulan en los suelos, en la atmósfera y en el entorno en general. Una vez volatilizados, se distribuyen por todo el mundo, contaminando áreas alejadas millones de kilómetros del lugar de partida. Algunos contaminantes ambientales, entre ellos algunos pesticidas, son muy persistentes y resistentes a la degradación biológica. Los organoclorados, por ejemplo, son muy poco solubles en agua y al ser lipófilos tienen la capacidad de bioacumularse en los tejidos grasos de organismos y biomagnificarse en la cadena trófica (Cerrillo et al, 2006). La bioacumulación es un proceso en el cual las sustancias, en este caso los pesticidas, penetran en la cadena alimentaria a través de los herbívoros o directamente a través de la piel de organismos acuáticos como los peces o diversos invertebrados y su concentración se va incrementando en los tejidos de aquellos animales que ocupan los eslabones más altos de la cadena trófica, siendo los más vulnerables los bebés y las mujeres embarazadas (Muckle et al, 2001).

Todos estamos expuestos indirectamente a plaguicidas y otros productos agroquímicos a través de los alimentos, el agua, la jardinería y el uso doméstico. Sin embargo, la mayoría de estudios epidemiológicos se han realizado en los agricultores y sus familias ya que éstos se exponen y están en contacto directo con grandes cantidades de pesticidas, a veces a diario, y por tanto son mucho más vulnerables (Harari et al, 2010).

Un estudio realizado en el sur de España evidencia que las mujeres de zonas agrícolas tienen una mayor concentración del pesticida endosulfán en su tejido adiposo con respecto a las de zonas no agrícolas (Cerrillo et al, 2006). Otro estudio realizado en mujeres embarazadas que residieron relativamente cerca de alguna explotación agrícola donde se usaron pesticidas, mostró que estos niños que habían estado expuestos a pesticidas tenían un mayor riesgo de sufrir trastornos del espectro autista y retrasos en el desarrollo (Shelton et al, 2014).

Estudios recientes apuntan a que el uso de insecticidas en hogares de zonas urbanas provoca una mayor exposición a éstos que en la población no urbana, debido a que se usan en interiores, por tanto lugares con escasa iluminación, lo cual retarda la degradación y se van acumulando mayores concentraciones en el ambiente (McKelvey et al, 2013).

Los efectos de exposiciones de la población normal a bajas concentraciones de pesticidas están todavía escasamente estudiados.

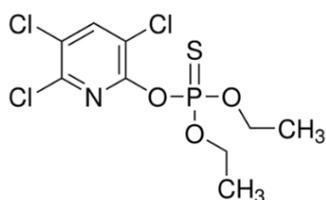
3- TIPOS DE PESTICIDAS

Existen diferentes tipos de pesticidas desde el punto de vista químico. Cuatro grandes familias químicas de pesticidas son: organofosforados, piretroides, organoclorados y N-metil-carbamatos. En la Figura 1 se muestra un compuesto representativo de cada una de estas familias, elegido para desarrollar el trabajo.

Figura 1: Fórmulas moleculares de los pesticidas utilizados.

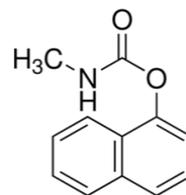
Organofosforados: Clorpirifos

(C₉H₁₁Cl₃NO₃PS)



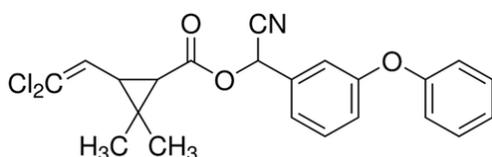
Carbamatos: Carbaril

(C₁₂H₁₁NO₂)



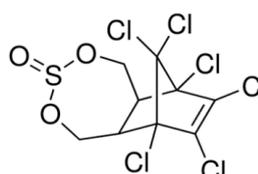
Piretroides: Cipermetrín

(C₂₂H₁₉Cl₂NO₃)



Organoclorados: Endosulfán

(C₉H₆Cl₆O₃S)



3.1- ORGANOFOSFORADOS

Estos pesticidas han sido utilizados masivamente en las últimas décadas para combatir diferentes plagas. Su principal acción es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Carr et al, 2001). El pesticida representativo de esta familia que hemos utilizado es el clorpirifos (CPF) (Figura 1).

3.1.1- CLORPIRIFOS

El clorpirifos (O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato, CPF) es moderadamente tóxico, con una dosis letal (DL50) oral de 135-163 mg/kg en ratas (Worthing y Walker, 1987).

El CPF ha sido uno de los pesticidas más utilizados de la última década, tanto a nivel doméstico como en la agricultura. Más del 60% del uso de CPF en los Estados Unidos se encuentra en 3 cultivos, maíz (39%), frutos secos (15%) y soja (9%). Su uso en árboles frutales representa un 10% adicional del total de uso. Hoy en día, los usos no agrícolas representan menos del 3% del total de solicitudes de CPF y se limitan al control de mosquitos para fines de salud pública y el control de insectos en campos de golf (Eaton et al, 2008). El uso de CPF como pesticida no agrícola para combatir plagas de insectos tales como cucarachas, termitas o pulgas y garrapatas en animales fue prohibido en EEUU en 2002 y en Europa en 2007 debido a su neurotoxicidad (Richardson y Chambers, 2005).

Aunque el CPF se degrada rápidamente en el medio ambiente, los niveles residuales pueden persistir largos periodos de tiempo. Es poco soluble en agua y rápidamente se une a partículas en el suelo o en las plantas. Si entra en un sistema de agua se volatiliza desde la superficie de ésta. El CPF y sus metabolitos son susceptibles a la fotodegradación, con una vida media de aproximadamente 3 días; en presencia de radicales hidroxilo en la atmósfera la vida media se reduce a alrededor de 6 horas. Sin embargo, en ambientes interiores, el CPF puede persistir varios meses debido a la relativa falta de luz solar, agua y/o microorganismos del suelo que contribuyen a su rápida degradación en exteriores. Debido a su alta lipofilidad tiende a acumularse en el tejido graso. También se une a la albúmina plasmática, por lo que los niveles libres en sangre son bajos.

El CPF *per se* tiene poca capacidad de inhibición de la AChE, pero cuando sufre desulfuración oxidativa da lugar a su metabolito activo **oxon-clorpirifos** que se une de forma irreversible a la AChE, inhibiéndola potentemente. Esto produce la acumulación de la acetilcolina en la hendidura sináptica lo cual sobre-estimula sus receptores tanto muscarínicos como nicotínicos (Betancourt y Carr, 2004; Eaton et al, 2008).

3.1.2- Efectos de la exposición a clorpirifos

El CPF es el organofosforado cuya neurotoxicidad en modelos animales ha sido más extensamente estudiada.

La exposición aguda a altos niveles de CPF induce convulsiones, insuficiencia respiratoria, coma y la muerte. Algunos estudios sugieren que la exposición a CPF en adultos puede estar relacionada con la depresión, pudiendo explicar la elevada asociación entre la exposición a CPF y el alto número de suicidios (London et al, 2012).

La exposición aguda a CPF en ratas adultas induce déficits en el aprendizaje de una tarea espacial en el test acuático de Morris (Cañadas et al, 2005). En el estriado de ratones adultos tratados durante siete días con CPF (30mg/kg) por vía subcutánea se alteró la expresión de genes implicados en el crecimiento y la diferenciación celular, la señalización por AMP cíclico, la síntesis y liberación de neurotransmisores y la función de receptores de neurotransmisores como la acetilcolina (ACh) y la dopamina (DA) (Torres-Altora et al, 2011).

Aunque la neurotoxicidad aguda del CPF está mediada por la inhibición de la acetilcolinesterasa, se ha observado deterioro cognitivo y motor en ratas mucho tiempo después de la última exposición al CPF, presumiblemente por mecanismos distintos de la inhibición de la AChE (Carr et al, 2001; Terry et al, 2012). Por ejemplo, en crías de 7 días, dosis por debajo de 2 mg/kg de CPF no inhiben la AChE, pero alteran la expresión de unos pocos genes (Ray et al, 2010).

Algunos mecanismos por los que el CPF produce efectos independientes de la inhibición de la AchE podrían ser la modificación covalente de proteínas a través de la unión a residuos de tirosina y lisina (Grigoryan et al, 2008), la peroxidación de lípidos en el cerebro en desarrollo (Slotkin et al, 2005), alteraciones en la expresión de factores neurotróficos durante el desarrollo (Slotkin et al, 2007) o la inducción de respuestas inflamatorias aumentando los niveles de citocinas (Rohlman et al, 2011; Singh y Jiang, 2003). En una línea celular, el CPF indujo estrés oxidativo, por aumento de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), una reducción en el contenido de las

principales defensas no enzimáticas del organismo como el glutatión reducido (GSH) intracelular y aumento de la enzima catalasa (CAT), sugiriendo que el CPF altera el equilibrio redox (Chiapella et al, 2013).

El CPF altera la neurotransmisión colinérgica, serotoninérgica y dopaminérgica en ratas expuestas tras el nacimiento (Slotkin et al, 2007; Carr et al, 2001) o durante el desarrollo del embrión, entre los días 17-20 de gestación (Eaton et al, 2008).

La exposición prenatal o neonatal a CPF causa diferentes alteraciones neurológicas en roedores, incluyendo cambios en las habilidades y rendimiento del aparato locomotor (Dam et al, 2000) y alteraciones cognitivas (Chen et al, 2014). Otros estudios demuestran que la exposición crónica a dosis subtóxicas de CPF en crías hembras, induce un aumento de la ansiedad (Braquenier et al, 2010), hiperactividad (Levin et al, 2002) y alteraciones en el aprendizaje y memoria cuando son adultas (Icenogle et al, 2004). La exposición durante el desarrollo cerebral a pesticidas organofosforados altera la neurogénesis. Esto podría explicar la persistencia de déficits en la función cognitiva a largo plazo, cuando los animales son adultos (Chen et al, 2014). Tras una única exposición oral a 5 mg/kg de CPF el día 10 postnatal, se observó una disminución de la actividad motora en ratones a los 2 y 5 meses de edad. El reconocimiento del lugar (capacidad cognitiva) no se afectó (Lee et al, 2015a).

Los efectos de la exposición a CPF son diferentes según el período, la duración, la dosis y la vía de exposición. Los estudios en animales evidencian que la exposición a CPF durante el desarrollo se asocia con alteraciones neurológicas, sugiriendo que este tipo de pesticidas representan un riesgo potencial durante el desarrollo del cerebro en humanos (Li et al, 2012; Braquenier et al, 2010).

Se ha demostrado una asociación entre la exposición a CPF y el TDAH en niños (Bouchard et al, 2010). La exposición prenatal a CPF se ha relacionado con alteraciones en el desarrollo neuroconductual, menor capacidad cognitiva en niños de 7 años y con problemas de conducta, déficits de memoria a corto plazo, déficits motores, déficits de atención y comportamientos hiperactivos en niños de 5 años (Bouchard et al, 2011).

Estas alteraciones neurológicas causadas por la exposición a CPF durante el desarrollo no están bien caracterizadas y los mecanismos responsables de las alteraciones cognitivas y motoras están poco estudiados.

3.2- CARBAMATOS

Los carbamatos son ésteres derivados de los ácidos N-metil o dimetil carbámico. Este grupo de pesticidas comprende más de 25 compuestos que se emplean como insecticidas y algunos como fungicidas, herbicidas o nematocidas (Ecobichon, 2001).

3.2.1- CARBARIL

El carbaril ((1-naftil N-metilcarbamato), CARB) (Figura 1) se usa hoy en día como pesticida y herbicida. Se considera un insecticida de amplio espectro ya que es utilizado para el control de más de cien especies de insectos. En la agricultura se utiliza en los cítricos y otras frutas, verduras, forraje, bosques, campos de cultivo, frutos secos, plantas ornamentales, pastizales, césped y árboles de sombra. En octubre de 2009 había 47 formulaciones que lo contenían, con concentraciones que oscilaban entre 0,126% y 99%. Tiene una vida media de 10 días y la ruta más probable de exposición es a través de la piel en un ámbito ocupacional. Su carácter lipófilo y el hecho de que la mayoría de las formulaciones contienen disolventes orgánicos y emulsionantes aseguran una penetración dérmica rápida y una absorción en la circulación sistémica (Ecobichon, 2001).

La dosis letal (LD50) en ratas está entre 233 y 840 mg/kg (Medical Toxicology Branch Department of Pesticide Regulation California Environmental Protection Agency, June, 2014). Su mecanismo de acción es la inhibición reversible de la AChE periférica y central (Moser et al, 2010). La carbamilación de la AChE es más efímera que la fosforilación de su centro activo (mecanismo de acción del CPF) y por tanto la actividad de la AChE vuelve a sus niveles normales en pocas horas (Padilla et al, 2007). A diferencia de los organofosforados los carbamatos no requieren bioactivación, por lo que su toxicidad se manifiesta rápidamente, generalmente tras la hora de su ingestión. Debido a su rápida reversibilidad y eliminación con la orina, se sigue usando ampliamente.

3.2.2- Efectos de la exposición a carbaril

Algunos estudios en animales con exposición aguda a CARB han mostrado alteraciones motoras como disminución de la actividad motora, principalmente la vertical, en ratas (McDaniel et al, 2007); problemas neuromusculares severos e incoordinación motora en cerdos (Smalley et al, 1969) o aumento de la actividad locomotora en un entorno familiar pero reducción de la actividad exploratoria en un nuevo entorno en ratas tras

una administración de 10 mg/kg de CARB (Singh, 1973). También se han descrito alteraciones cognitivas en ratas, como disminución en la memoria de trabajo, de manera dependiente de dosis, veinte minutos después del tratamiento con CARB (Heise y Hudson, 1985 a, b). La exposición a CARB produce alteraciones morfométricas en el cerebro de ratas (Robinson y Broxup, 1997) y también se han descrito cambios en el electroencefalograma (EEG) (Dési et al, 1974). Las ratas jóvenes expuestas a CARB son más susceptibles que las adultas, probablemente debido en parte a una menor capacidad de desintoxicación en los jóvenes, en particular con respecto a carboxilesterasas y A-esterasas, las cuales juegan un importante papel en la eliminación del CARB (Moser et al, 2010). Una única exposición oral a CARB (5 y 20 mg/kg) el día 10 postnatal disminuyó la actividad motora en ratones, a los 2 y 5 meses. Además, los ratones expuestos a la dosis más alta mostraron alteraciones en el reconocimiento de un entorno nuevo indicando déficits cognitivos (Lee et al, 2015a).

La administración aguda de CARB inhibe la AChE, mientras que la administración crónica no (Sachana et al, 2001). Otros mecanismos de neurotoxicidad podrían ser: acción como antagonista de los receptores de estrógenos (Lemaire et al, 2006); inhibición del crecimiento de neuritas (Sachana et al, 2003) y alteraciones de la función inmune (Jorsaraei et al, 2014).

Los estudios sobre los efectos del CARB en humanos son escasos. Branch y Jacqz (1986) describieron por primera vez el caso de un hombre de 75 años con una excesiva exposición a largo plazo al CARB. Los síntomas eran síndrome debilitante, incluyendo dolores de cabeza, pérdida de la memoria, debilidad muscular proximal o anorexia. En el momento del diagnóstico, los niveles de pseudocolinesterasa en suero eran bajos y sus principales síntomas se resolvieron tras la terminación de la exposición. Características clínicas tardías fueron apnea del sueño y el desarrollo progresivo de una neuropatía periférica. La exposición a carbamatos se ha asociado con un aumento del riesgo de retraso en el neurodesarrollo en niños residentes cerca de zonas de uso de carbamatos (Shelton et al, 2014) y la exposición fetal al carbamato propoxur se ha relacionado con desarrollo motor deficiente en niños de dos años (Ostrea et al, 2012).

3.3- ORGANOCLORADOS

Un organoclorado es un compuesto químico orgánico en el que algunos de los átomos de hidrógeno unidos al carbono han sido reemplazados por átomos de cloro. Los organoclorados son un grupo de pesticidas artificiales desarrollados principalmente para controlar las poblaciones de insectos plaga. La mayoría son subproductos de industrias y pueden llegar a ser cancerígenos.

3.3.1-ENDOSULFÁN

El endosulfán (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide) (END) (Figura 1), es un plaguicida ciclodieno clorado que contiene solamente un enlace doble y está clasificado en la categoría de contaminante orgánico persistente. Su preparación comercial consiste en una mezcla de dos isómeros de aproximadamente 64-67% α -endosulfán y 29-32% β -endosulfán. Fue utilizado de forma masiva en la agricultura para el control de plagas en los vegetales, algodón y frutas durante las décadas 70 y 80 del siglo pasado.

La organización mundial de la salud (OMS) ha clasificado este pesticida como moderadamente tóxico por su carácter genotóxico. El END es un disruptor endocrino. Por este motivo se prohibió su uso como pesticida en EEUU en 2002 y en 2005 la Unión Europea decidió excluirlo de la lista común de productos fitosanitarios autorizados (2005/396/CE). Dos años más tarde fue prohibido por completo en España. Sin embargo es un contaminante persistente que se sigue encontrando en cantidades significativas en el medio ambiente, animales y humanos. La vida media del END y sus metabolitos es de 0,7 a 6 años. Tiene la capacidad de bioacumularse y biomagnificarse en la cadena alimentaria, por lo que la población mundial hoy en día sigue expuesta a este xenobiótico. La biorremediación del END está recibiendo mucha atención como una alternativa a otros métodos para su eliminación (como la incineración). La biorremediación consiste en la degradación de compuestos orgánicos por microorganismos para conseguir derivados menos persistentes y tóxicos. Los principales metabolitos que se forman durante la degradación microbiana son el endosulfán diol, sulfato de endosulfán-éter, hidroxietér endosulfán, endosulfán-lactona y endosulfán dialdehído, entre los cuales el sulfato de endosulfán es el principal metabolito tóxico que persiste más tiempo en el suelo y tiene un potencial de bioacumulación. En un estudio realizado por Silambarasan y Abraham, (2013) se demostró que dos tipos de hongos, *Botryosphaeria laricina* JAS6 y *Aspergillus Tamarii*

JAS, llevan a cabo la degradación del END de forma sencilla, rápida y muy eficaz. Pero la característica más importante es que estas cepas fueron capaces de degradar el sulfato de END.

3.3.2- Efectos de la exposición a endosulfán

El END se une y bloquea el canal del cloro (Cl⁻) del receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA) tipo A. Es un antagonista no competitivo. Los receptores GABA son los principales neuroreceptores inhibitorios en el cerebro de mamíferos. Cuando el GABA se une a su receptor, el canal se abre y entra el Cl⁻ a través de un gradiente electroquímico produciendo hiperpolarización de la membrana celular e inhibición del disparo de las neuronas. El END impide que el Cl⁻ entre en las neuronas, lo que resulta en una excitación incontrolada.

Además de la neurotransmisión GABAérgica, el END también afecta a otros neurotransmisores como la dopamina (DA). En ratas adultas expuestas durante 10 días a 3 mg/kg de END se alteró el transporte de DA (Anand et al, 1985). La exposición repetida a dosis bajas de END produce hiperexcitabilidad asociada con estimulación de receptores muscarínicos de acetilcolina, produce comportamiento agresivo, deteriora el aprendizaje activando el sistema serotoninérgico e induce hiperactividad y movimientos circulares a través de la modulación del sistema dopaminérgico (Anand et al, 1985 y revisado por Paul y Balasubramaniam, 1997). Otros efectos del END son el aumento de algunas citocinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-1 β (IL-1 β), en el plasma de ratas adultas tras exposición oral durante cinco días (Omurtag et al, 2008).

Paul et al, (1995) estudiaron los efectos neuroconductuales y hepáticos 30 días después de la administración crónica de END (3,0 y 6,0 mg/kg/día) por vía oral en ratas adultas, comparando los efectos en machos y hembras. La coordinación motora y la actividad AChE no se alteraban en ninguno de los dos sexos. Los procesos de aprendizaje y memoria estaban empeorados igual en machos que en hembras. En hembras expuestas a 6 mg/kg se produjo un 30% de mortalidad. El END estimuló la actividad motora espontánea más notablemente en machos que en hembras. Estos hallazgos sugieren que existen diferencias de género en los efectos de la exposición repetida a dosis subletales de END en ratas (Paul et al, 1995).

Durante el desarrollo cerebral el GABA juega un papel importante en procesos como la migración, la maduración morfológica y la diferenciación neuronal (Deidda et al. 2014).

La exposición a END durante el desarrollo también altera otros sistemas de neurotransmisores. La exposición a END 0,6 o 6,1 mg/kg/día desde el inicio de la gestación hasta el destete inhibe los sistemas aminérgicos estriatales en ratas macho adultas (60 días postnatal), disminuyendo la concentración de serotonina (5-HT) y norepinefrina. Sin embargo, en hembras disminuye el contenido de norepinefrina y aumenta la DA y 5-HT por exposición a la dosis más alta, 6.12 mg/kg/día, pero no a la dosis baja. Esto sugiere que los efectos del END sobre la neurotransmisión monoaminérgica son diferentes en machos y hembras (Lafuente y Pereiro, 2013). En crías cuyas madres fueron expuestas a END durante la gestación y la lactancia está alterado el metabolismo de la DA y la 5-HT y aumentado el contenido de aminoácidos y de 5-HT en la corteza prefrontal (Cabaleiro et al, 2008).

La exposición prenatal y durante la lactancia a END también altera la función de la glándula pituitaria, afectando a la secreción de la hormona luteinizante (LH), de la prolactina y de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) implicada en el desarrollo del cerebro. A nivel hipofisario el END modifica la expresión y liberación del ARNm que codifica para los genes NOS1 y NOS2 sugiriendo que el estrés nitrosativo puede estar implicado en la toxicidad endocrina del END (Caride et al, 2010).

En ratones, una única exposición oral a END (0.5 mg/kg) el día 10 postnatal, disminuyó la actividad motora y la capacidad de habituación a un ambiente nuevo, incluso meses después de la exposición, indicando que los efectos pueden ser persistentes (Lee et al, 2015b). La administración oral de END (2 mg/kg/día) durante 90 días en ratas macho inmaduras inhibió la respuesta de escape y de evitación, aumentó la concentración de 5-HT en las regiones del cerebro medio y estimuló la actividad motora espontánea. La coordinación motora en el rotarod no se vio afectada. Los autores concluyeron que el END inducía déficits de motivación pero no motores y sugerían que podía producir déficits de aprendizaje y memoria (Paul et al, 1994).

Estudios epidemiológicos en humanos sugieren que la exposición a END puede estar relacionada con casos de autismo y toxicidad en la reproducción masculina (Silva y Gammon, 2009; Rastogi et al, 2014; Saeedi y Dehpour, 2015). Roberts et al. 2007 y revisado por Silva y Gammon, 2009, ponen de manifiesto que hay una relación entre la exposición a END y un aumento de casos de autismo en niños cuyas madres vivían en zonas agrícolas donde se usaba el pesticida. Sin embargo la dosis a la que habían sido expuestos, el tiempo de exposición, etc., no pudo ser determinado y por tanto son necesarios estudios más exhaustivos para confirmar la hipótesis.

3.4- PIRETROIDES

Los piretroides se clasifican en dos grupos: los del grupo I no tienen un grupo ciano en el carboxilo alfa y los de tipo II sí lo tienen. Todos los piretroides comparten varias características en común, como tener un resto ácido, un enlace éster central y un resto de alcohol.

Insecticidas piretroides han sido utilizados en formulaciones agrícolas y caseras durante más de 30 años y representan aproximadamente una cuarta parte del mercado de los insecticidas en todo el mundo (Casida y Quistad, 1998). Actualmente, 16 piretroides están registrados para su uso en Estados Unidos en una gran variedad de productos agrícolas o de consumo. A menudo los piretroides son vendidos y/o utilizados en forma de mezclas que contienen una combinación de dos o más compuestos (Shafer et al, 2005). Los piretroides se han convertido en la clase predominante de insecticidas para combatir plagas de insectos y sobretodo de mosquitos, utilizándose para combatir enfermedades transmitidas por los mosquitos como la malaria, la enfermedad de Chagas o la leishmaniasis. Debido a su baja persistencia ambiental y al desarrollo de una lenta resistencia son un ingrediente común en los insecticidas domésticos y en los productos usados para el control de ectoparásitos en animales de compañía (Walters et al, 2009).

La abundancia y variedad de usos de los piretroides contribuyen al riesgo de exposición y sus efectos adversos en la población general (Soderlund, 2012). La sustitución de productos que contienen organofosforados por piretroides se ha relacionado con un aumento de las tasas de incidencia de intoxicaciones agudas por plaguicidas de piretrinas y piretroides entre 2001-2005 (Walters et al, 2009).

La exposición a los piretroides ha sido ampliamente documentada en los seres humanos, incluyendo la exposición de las mujeres embarazadas, bebés y niños, midiendo los niveles de metabolitos de estos pesticidas en la orina. Estos estudios ponen de manifiesto que los humanos estamos expuestos a los piretroides a través de la dieta y aunque los niveles están por debajo de los considerados peligrosos es un dato preocupante (Berkowitz et al, 2003; Heudorf et al, 2004; Schettgen et al, 2002; Whyatt et al, 2002).

El principal modo de acción de los piretroides, tanto en insectos como en mamíferos, es alterando la actividad del canal de sodio dependiente de voltaje (VSSC), prolongando su apertura y provocando una hiperpolarización del potencial de membrana (Narahashi, 1996). Los pesticidas de tipo I prolongan la apertura del canal sólo el tiempo suficiente para causar un nuevo disparo, mientras que los de tipo II mantienen abiertos los canales

largos períodos de tiempo provocando que el potencial de membrana se despolarice en última instancia hasta el punto de que la generación de nuevos potenciales de acción no es posible (Rinkevich et al, 2013).

Los piretroides se han relacionado con diferentes trastornos neurológicos como el Parkinson (Tripathi et al, 2014; Costa, 2015).

3.4.1- CIPERMETRÍN

El cipermetrín ((R, S)-a-ciano-3-fenoxibencil-2,2-dimetil (1, R, S)-cis, trans-3-(2,2-diclorovinil ciclopropano-carboxilato, CYP) (Figura 1) pertenece al tipo II de insecticidas piretroides.

El CYP es metabolizado y excretado rápidamente, principalmente en la orina en forma de metabolitos polares. Sin embargo, un estudio detectó concentraciones entre 4.9-33.3 ng/mL en el líquido amniótico, en el suero del cordón umbilical y en el suero materno en las mujeres embarazadas y los recién nacidos. Una posible explicación es que el compuesto puede ser liberado a la circulación de la sangre materna y entrar en el ambiente fetal. Debido a su carácter lipofílico, el CYP puede ser retenido por los tejidos adiposos (Bossi et al, 2013).

3.4.2- Efectos de la exposición a cipermetrín

La neurotoxicidad del CYP ha sido revisada por Singh et al (2012). El CYP, además de potenciar la actividad de canales de sodio, modula la función de canales de cloro, calcio y potasio dependientes de voltaje, altera la función de receptores de glutamato y acetilcolina, induce estrés oxidativo y daño en el DNA en neuronas. También modula el nivel de neurotransmisores como GABA y DA. Puede ser un posible causante de la enfermedad de Parkinson esporádica, asociada a la influencia de contaminantes ambientales neurotóxicos, ya que induce neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Sin embargo, los efectos son diferentes según la dosis, el tipo de exposición, la edad, etc, lo cual dificulta sacar conclusiones más claras (Singh et al, 2012).

La exposición prenatal a CYP altera la neurotransmisión monoaminérgica. Disminuye los niveles de DA y aumenta el ácido homovalínico (HVA), producto de la degradación de la DA en el estriado. Aumenta la actividad motora modulada por el sistema dopaminérgico y produce estrés oxidativo (Nasuti et al, 2007). También aumenta las

concentraciones plasmáticas de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) en ratas (Santoni et al, 1999).

El CYP produce alteraciones morfológicas evidentes en las neuronas de la corteza somatosensorial, evidenciando una degeneración neuronal en ratones (Jiménez et al, 2008). La administración de CYP (10 o 25 mg/kg) a ratas macho a partir del día 24 postnatal y durante 2, 3 o 6 semanas induce un aumento de mediadores inflamatorios como la interleucina 1 alfa (IL1- α), beta (IL1- β) y su receptor (IL-1R1) en la corteza prefrontal y en el hipocampo (Maurya et al, 2016).

La administración de una única dosis oral de CYP (0.1 o 0.5 mg/kg) el día 10 postnatal reduce la actividad motora en ratones y la dosis mayor altera también la capacidad de adaptación a un entorno nuevo indicando déficit cognitivo. Estos efectos se observaron meses después de la exposición a los pesticidas, indicando que los efectos pueden ser persistentes (Lee et al, 2015b).

3.5- MEZCLAS DE PESTICIDAS

Las formulaciones de los pesticidas no están compuestas por un solo pesticida sino que son casi siempre mezclas de varios compuestos. Además, en el medio ambiente la falta de desintegración de algunos de ellos hace que los seres vivos estén expuestos a una mezcla de compuestos. La mayoría de estudios sobre los efectos neurotóxicos de los pesticidas se han realizado con exposición a pesticidas individuales, no a mezclas de distintos compuestos. Por tanto los efectos tóxicos de mezclas de plaguicidas a bajas dosis en la salud humana son en gran parte desconocidos.

Hay dos principios fundamentales que describen cómo se afectan mutuamente los compuestos individuales en una mezcla. La aditividad (no interacción) y la interacción. En el caso de la no interacción o aditividad, la toxicidad de la mezcla se asemeja a los efectos sumados de cada pesticida por separado, sin aumentar o disminuir sus efectos. Por el contrario, si se produce interacción, los efectos de la mezcla se desvían de lo esperado si existiera aditividad.

Uno o varios pesticidas pueden haber interactuado entre sí, por ejemplo, facilitando o disminuyendo su absorción, transporte, metabolismo o excreción (Hernández et al, 2013). Pero además, se puede producir interacción entre sus mecanismos de acción o sus efectos. Según Hernández et al, (2013) los efectos de dos o más componentes en una mezcla pueden ser:

- a) **Acción independiente:** los efectos de los compuestos individuales en una mezcla tienen diferentes mecanismos o modos de acción. Los efectos de tal combinación serán la suma de los efectos de cada compuesto cuando se administran solos y la acción de cada uno no influye en la acción de los demás (aditividad).
- b) **Adición por dosis:** los compuestos actúan a través de un mecanismo común de toxicidad, causan el mismo efecto, actúan sobre la misma diana molecular o tejido o con el mismo mecanismo bioquímico de acción (aditividad).
- c) **Interacción:** los efectos combinados de dos o más pesticidas pueden ser mayores (supra-aditivo, potenciador, sinérgico) o menores (infraaditivo, inhibidor, antagonista) que los de los compuestos por separado. La potenciación se observa cuando el efecto de un compuesto se ve reforzado por la presencia de otros productos químicos. El sinergismo se observa cuando el efecto de la exposición a una mezcla de pesticidas es mucho mayor que la esperada, según la adición de los efectos de los compuestos solos. El antagonismo se produce cuando dos pesticidas interfieren entre sí resultando en una reducción en el efecto predicho para los compuestos individuales.

En los estudios sobre exposición a mezclas de compuestos contaminantes neurotóxicos se han encontrado ejemplos de las anteriores situaciones. La desviación de la aditividad se ha demostrado en mezclas de pesticidas inhibidores de AChE, carbamatos y organofosforados, ya que se encontró un efecto antagónico en la inhibición de la AChE plasmática (Gordon et al, 2006). Sin embargo se encontró potenciación por exposición a CPF+CARB en la inhibición de la enzima en el sistema nervioso periférico en ratas macho adultas, mientras que en el sistema nervioso central (SNC), la exposición a CPF inhibe la AChE pero el CARB no y la exposición a la mezcla produce el mismo efecto que el CPF solo, sugiriendo que no hay interacción entre estos dos pesticidas (Wang et al, 2014). También se encontró adición y sinergismo en la inhibición de la AChE, a dosis más elevadas en salmón, por mezclas binarias de organofosforados y carbamatos (Laetz et al, 2009). La administración de CPF o abamectina (biocida) produce el mismo efecto tóxico en cerebro y riñón y cuando se administra una mezcla de ambos compuestos se produce una interacción sinérgica, produciéndose un efecto mayor que la suma de los efectos de cada compuesto por separado (Nasr et al, 2015). En otras ocasiones no se ha encontrado interacción, en mezclas de bifenilos policlorurados

(PCBs) y organoclorados, se observa el mismo efecto que tienen los PCBs solos sobre el metabolismo de los estrógenos, siendo ambos tipos de compuestos disruptores endocrinos (Desaulniers et al, 2012). También se ha visto que mezclas de piretroides tienen un efecto de adición por dosis sobre la actividad motora en ratas (Starr et al, 2014)

Se han realizado algunos estudios para analizar el efecto de mezclas de compuestos contaminantes, reflejando situaciones reales de exposición, pero sin analizar el efecto de cada compuesto individual. Por ejemplo, la exposición perinatal de ratas a una mezcla química de 27 constituyentes formada por PCBs, organoclorados y metilmercurio (MeHg) y basada en perfiles de exposición materna en el Ártico a concentraciones cercanas a los niveles de exposición humana, altera los niveles cerebrales de varias citocinas inflamatorias, induce cambios en la conformación de la alfa-sinucleína y produce estrés oxidativo llegando a producir neurodegeneración (Hayley et al, 2011).

Un caso en humanos puso de manifiesto que la exposición a una mezcla de CYP y CPF es más tóxica que la exposición a cada pesticida por separado: solo los individuos expuestos a la mezcla necesitaron ventilación y 4 de estos pacientes murieron, mientras que no se produjeron muertes entre los pacientes expuestos a los pesticidas individuales (Iyyadurai et al, 2014).

Las evidencias acumuladas hasta el momento sugieren que, aunque la combinación de diferentes pesticidas es idónea para combatir la creciente resistencia a parásitos, también puede resultar más tóxica para el ser humano (Laetz et al, 2009; Iyyadurai et al, 2014).

4- APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL

Aprendizaje se define como el proceso por el que el sistema nervioso adquiere nueva información que se pone de manifiesto mediante cambios en el comportamiento. La memoria es la codificación, almacenamiento y recuperación de la información aprendida (Purves et al, 2012)

Los humanos tenemos por lo menos dos sistemas de almacenamiento de la información: 1) la **memoria declarativa**, encargada de almacenar el material que está presente para la conciencia y que puede expresarse mediante el lenguaje, (un ejemplo sería la capacidad para recordar un número de teléfono) y 2) la memoria **no declarativa o de procedimientos** en la que están implicadas habilidades y asociaciones que son en su mayor parte adquiridas y recuperadas en un nivel inconsciente (por ejemplo, montar en bicicleta) (Purves et al, 2012).

En otra clasificación de los tipos de memoria se distingue entre 1) **memoria inmediata**, que es aquella que dura fracciones de segundo, 2) **memoria de trabajo**, que permite recordar la información incluso minutos después del suceso (memoria a corto plazo) y por ejemplo permite buscar un objeto evitando lugares que ya se inspeccionaron y 3) **memoria a largo plazo**, la cual permite retener la información de forma más permanente (Purves et al, 2012).

La capacidad de aprender es adaptativa y confiere a los individuos mecanismos para afrontar situaciones a las que ya han sido expuestos, favorables o no.

Uno de los procesos cerebrales implicados en el aprendizaje y la memoria es la **plasticidad**, la cual se puede definir como modificaciones en la estructura y función de las neuronas sobre todo a nivel de las interconexiones entre ellas, es decir, en las sinapsis. Muchas sinapsis en el SNC de mamíferos muestran formas duraderas de plasticidad. La plasticidad se considera el mecanismo celular del aprendizaje y la memoria. Algunos patrones de actividad sináptica producen un aumento prolongado en los potenciales postsinápticos conocido como potenciación a largo plazo (LTP). Es un fenómeno de plasticidad sináptica que consiste en un aumento persistente en el tiempo de la magnitud del componente excitador de la respuesta sináptica registrada, que se traduce en un aumento de la eficacia sináptica duradero en el tiempo (Purves et al, 2012).

La memoria espacial es la habilidad para recordar información acerca del entorno en el que se navega. Los animales necesitan de esta habilidad para poder sobrevivir, por ejemplo para encontrar la localización de la comida, evitar a los depredadores, encontrar

el camino de regreso. Además los humanos necesitan esta habilidad también para navegar en medios complejos como son una gran ciudad, encontrar el camino de regreso a casa o encontrar el coche en el aparcamiento.

Una de las principales regiones cerebrales implicadas en el aprendizaje y la memoria espacial es el hipocampo, encargado de poder orientarnos en ambientes espaciales complejos. Animales con daño en el hipocampo realizan peor tareas espaciales (Olton y Feustle, 1981; Morris, 1982; Hawley, 2012). También en humanos, individuos con una lesión en el hipocampo realizaban peor tareas espaciales en un laberinto virtual (Astur, 2002).

El hipocampo es una región cerebral que se curva a lo largo del ventrículo lateral y forma parte del sistema límbico. Se divide en giro dentado, complejo subicular y el hipocampo propiamente dicho. En éste el cuerpo de las neuronas piramidales se localiza en una capa de fácil visibilidad, dividida en tres regiones: CA1, CA2 y CA3. Las dendritas de las neuronas en CA1 forman sinapsis con los axones de las que se encuentran en la región CA3. En estas sinapsis se produce LTP, la cual ha sido ampliamente utilizada como modelo experimental para conocer los mecanismos de la LTP (Purves et al, 2012). La LTP en el hipocampo se considera la base de algunas formas de aprendizaje y memoria espaciales (Bliss y Collingridge, 1993; Cooke y Bliss, 2006). La inducción de LTP en el hipocampo requiere la activación de los receptores NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) postsinápticos, que aumenta la expresión en membrana de los receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico).

Se han propuesto dos estrategias a la hora de navegar, la **alocéntrica** donde el animal sigue las pistas del entorno usando principalmente el hipocampo y la **egocéntrica**, en la cual el animal navega según pistas propioceptivas tales como las propias señales de movimiento del cuerpo, estando el estriado también implicado en este caso (Devan, 1996).

Algunos estudios han demostrado que la exposición a algunos pesticidas, tanto en adultos como durante el desarrollo, altera el aprendizaje o memoria espaciales. Ratas macho adultas expuestas a CPF 250 mg/kg mostraban disminuido el rendimiento a la hora de alcanzar la plataforma en el laberinto acuático de Morris (MWM), meses después de la administración del pesticida (Cañadas et al, 2005). Castillo et al, (2002), administraron END (25 mg/kg) y metilparation (2 mg/kg) a ratas adultas. Éstas mostraron un aumento del tiempo de latencia y un mayor número de fallos para

encontrar la plataforma en el MWM. La exposición a CPF (1 o 5mg/kg/día), en los días 9-12 de gestación, aumenta los errores de referencia y de memoria en el laberinto radial de 16 brazos cuando las crías ya son adultas (Icenogle et al, 2004).

4.1- Diferencias de género en la memoria espacial

La memoria espacial está influenciada por factores como el estrés, la alimentación o las hormonas gonadales y el género (Takase et al, 2008; Hawley et al, 2012).

El volumen y área del hipocampo son sexualmente dimórficos (Keeley et al, 2013; Méndez-López et al, 2009a). Diferentes estudios revelan que los machos se orientan mejor que las hembras y realizan mejor tareas de aprendizaje espacial en diferentes especies animales incluidos los humanos (Persson et al, 2013; Andersen et al, 2012; Méndez-López et al, 2009a; Monfort et al, 2015). Resultados previos de nuestro grupo demuestran que las ratas macho aprenden más rápidamente que las hembras una tarea de aprendizaje espacial en el MWM. Demostramos también que esto está asociado a una disminución de la LTP en hipocampo, debida a una menor fosforilación de la subunidad GLUR1 del receptor AMPA que conduce a menor expresión de receptores AMPA en la membrana, en las hembras (Monfort et al, 2015).

Méndez-López et al, (2009b) utilizaron una tarea de memoria de trabajo espacial en el MWM para analizar las diferencias de sexo. Las hembras jóvenes (1 mes) realizan peor que los machos esta tarea, mientras que las hembras adultas mejoran y presentan igual memoria de trabajo espacial que los machos adultos (3 meses). Se activan diferentes estructuras cerebrales del sistema límbico en machos (hipocampo principalmente) que en hembras (otras estructuras, incluido el núcleo accumbens del estriado), incluso en los adultos donde no encontraron diferencia en el aprendizaje en la tarea de memoria de trabajo espacial. Esto pone de manifiesto la importancia del periodo de desarrollo postnatal en el aprendizaje espacial. Según la idea de la existencia de dos estrategias diferentes: aloécéntrica y egocéntrica; los machos utilizarían para navegar preferentemente estrategias dependientes del hipocampo, aloécéntricas, mientras que las ratas hembra utilizarían preferentemente una estrategia egocéntrica (Méndez-López et al, 2009a).

En estudios de realidad virtual con humanos, las mujeres cometen más errores que los hombres para encontrar el camino correcto y miran más veces las pistas visuales utilizadas para orientarse (Andersen et al, 2012).

5- COORDINACIÓN MOTORA

El cerebelo es la principal área cerebral que regula la coordinación motora. Lesiones y enfermedades cerebelosas alteran la coordinación de los movimientos (Purves et al, 2012). La coordinación motora está modulada por el GABA extracelular en cerebelo. La activación excesiva de receptores GABA reduce la coordinación motora (Hancher et al, 2005). Además, los ratones que carecen del transportador de GABA 1 (GAT1) tienen aumentado el GABA extracelular y una reducción de la coordinación motora cuando se evalúa en el rotarod (Chiu et al, 2005). La exposición perinatal a algunos PCBs, pero no a otros, redujo la coordinación motora al aumentar el GABA extracelular en cerebelo (Boix et al, 2010).

Algunos estudios han mostrado alteraciones en la coordinación motora asociadas a exposición a pesticidas, tanto en humanos como en animales. En 1979, Aleksandrowicz mostró un caso de envenenamiento por END, en el cual tests psicológicos revelaron un deterioro en la coordinación visuo-motora. Harari et al, (2010) evaluaron funciones neuroconductuales en niños de 6-8 años en el norte de Ecuador, donde el empleo femenino está basado en la floricultura. Aquellos niños con exposición a pesticidas directa de la madre presentaban déficits en la coordinación motora y en la velocidad motriz, mientras que los niños con exposición indirecta del padre o independiente del trabajo parental no mostraron alteraciones. En un estudio se detectó una mezcla de diferentes organohalogenados en madres en la semana 35 de gestación. En sus hijos se detectaron problemas de coordinación, de habilidades manipulativas y temblores leves cuando tenían 5-6 años de edad (Roze et al, 2009). Godinho et al, (2014) demostraron que la exposición a permetrín (piretroide de tipo I) en ratas macho adultas provocaba incoordinación motora de manera dosis-dependiente. En roedores adultos, la exposición aguda oral a dosis bajas de diferentes piretroides disminuye la actividad motora y la exposición a α -cipermetrina y deltametrina producen incoordinación motora en el rotarod (Wolansky y Harril, 2008).

6- ACTIVIDAD MOTORA

Un área cerebral importante en el control de la actividad motora es el estriado. El estriado se divide en el estriado dorsal, que incluye el caudado y el putamen, y el estriado ventral, que está formado principalmente por el núcleo *accumbens* (NAcc) (David et al, 2005). El NAcc recibe las principales proyecciones dopaminérgicas ascendentes desde el área tegmental ventral (VTA) y las principales proyecciones glutamatérgicas descendientes desde la corteza prefrontal y otras estructuras límbicas (incluido el hipocampo). Por tanto, la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica en el NAcc son los principales moduladores de la actividad motora (David et al, 2005; Kim y Vezina, 1997), aunque otros sistemas de neurotransmisión como el GABA y la acetilcolina también juegan un papel importante, aumentando o disminuyendo la liberación de DA. Las proyecciones glutamatérgicas están implicadas en la regulación de la actividad locomotora, seguramente a través de la regulación de la neurotransmisión dopaminérgica (Kim y Vezina, 1997).

La estimulación de los receptores NMDA en el hipocampo ventral induce liberación de DA en el NAcc, con el subsecuente aumento de actividad motora (Brudzynski y Gibson, 1997; Peleg-Raibstein y Feldon, 2006). Cambios en la expresión de las subunidades de los receptores NMDA alteran la comunicación entre el hipocampo ventral y el NAcc (Barr et al, 2014).

La exposición a algunos PCBs altera la actividad motora espontánea (Boix et al, 2011). También existen diferentes estudios que muestran que la exposición a algunos tipos de pesticidas altera la actividad motora en animales. Por ejemplo, en el caso de los piretroides, la actividad motora está disminuida en ratas expuestas a deltametrín durante el desarrollo postnatal temprano (PD 0-7 o PD 9-13) y esto se asocia a una alteración de la dendritogénesis y la proliferación de las células de Purkinje en el cerebelo (Patro et al, 2009). La exposición a dosis subtóxicas de CYP y otros piretroides también reduce la actividad ambulatoria espontánea (Nieradko-Iwanicka y Borzêcki, 2008; Wolansky y Harril, 2008). Alteraciones de la locomoción en ratones expuestos neonatalmente a CPF también se han descrito (Dam et al, 2000). Como se ha descrito anteriormente en *la introducción* (págs. 6, 8, 11,14), Lee et al, 2015 a-b, demostraron una disminución de la actividad motora en ratones expuestos a una sola inyección de CPF, CARB, END o CYP el día 10 postnatal.

7- APRENDIZAJE ASOCIATIVO

Los animales, al igual que los humanos, presentan un comportamiento de respuesta típico de su especie (reacciones Pavlovianas), como la huida, la congelación o el ataque, frente a situaciones de peligro. Esta respuesta aumenta la supervivencia. Los animales generalmente aprenden a asociar estímulos que son relevantes para su supervivencia y así presentan una respuesta de evitación condicionada que permite al sujeto anticiparse a un evento amenazante (Blanchard y Blanchard, 1989; Martínez et al, 2008 y Wendler et al, 2014). La evitación activa se define como un aprendizaje por el cual un sujeto adquiere conocimiento acerca de las relaciones o asociaciones entre eventos. El organismo debe asociar un estímulo o señal (evento condicionado) con otro en calidad de consecuencia adversa o desagradable (evento incondicionado), debiendo éste realizar una respuesta a fin de evitar de manera activa el estímulo desagradable (Gómez, 2005). Estas reacciones defensivas se modulan, entre otras regiones cerebrales, en la amígdala. El núcleo lateral de la amígdala recibe información sensorial sobre estímulos condicionados desde sus entradas corticales y talámicas. Esta información es procesada a través de la amígdala basal y envía proyecciones a regiones efectoras del tronco cerebral, provocando las reacciones innatas como la congelación. En las respuestas defensivas como el escape y la evitación participa también la amígdala pero en este caso a través de sus proyecciones al NAcc (Ramirez et al, 2015). Así, las acciones defensivas desencadenadas por un estímulo aversivo dependen de un circuito funcional que incluye la amígdala basal y la corteza del NAcc. Mediante el uso de imágenes de resonancia magnética funcional se vio activación hemodinámica del NAcc durante un test de evitación activa en humanos, lo que apoya la idea de que las alteraciones el NAcc pueden contribuir a la etiología y el mantenimiento de conductas de evitación aberrantes en los trastornos de ansiedad (Levita et al, 2012).

Algunos trabajos sugieren que la exposición a pesticidas puede afectar este tipo de aprendizaje o comportamiento. Las respuestas de evitación condicionada están reducidas en ratones expuestos prenatalmente al organoclorado clordano (Al-Hachim y Al-Baker, 1973). La exposición neonatal a otro organoclorado, clordecone, empeoró el aprendizaje en la tarea de evitación activa, de manera dependiente del sexo, siendo mayor el efecto en machos que en hembras (Mactutus y Tilson, 1984). Sin embargo, otro organoclorado, el aldrín, mejoró la tarea de evitación activa en ratas adultas expuestas durante el periodo de lactancia (Castro y Palermo-Neto, 1988). También los piretroides, como el fenvalerato (Tipo II), empeoran las respuestas en la tarea de

evitación activa (Moniz et al, 1994). La exposición a CPF durante el desarrollo postnatal también disminuyó el número de evitaciones pero produjo los mismos escapes y aumento de no-respuesta, sugiriendo cierto comportamiento depresivo, cuando los ratones ya eran adultos. Estos ratones también mostraban exacerbación del miedo condicionado, asociado a un aumento de la expresión de mRNA de la AChE en el hipocampo y la amígdala. Esto sugiere que aunque la AChE ya no está inhibida, tras una breve exposición durante el desarrollo cerebral se producen cambios a largo plazo, que perduran en los adultos y alteran el comportamiento mucho tiempo después de la exposición a los pesticidas. La exposición a organofosforados puede aumentar la vulnerabilidad de los niños a reacciones emocionales patológicas de cara de los acontecimientos vitales adversos (Oriol y Kofman, 2015). Resultados similares se obtuvieron por exposición a otro organofosforado, el Diisopropyl fluorophosphate (DFP) (Oriol et al, 2014). Por otra parte, la exposición crónica de ratas adultas a bajas dosis del organofosforado paratión no alteró el aprendizaje en la tarea de evitación activa (Ivens et al, 1998) reforzando la idea de que la exposición durante el desarrollo tiene mayores consecuencias adversas que la exposición en adultos.

8- NEUROTRANSMISIÓN

Las neuronas están comunicadas entre sí formando una red en el sistema nervioso. El sitio donde se produce la comunicación entre las diferentes neuronas se conoce como sinapsis y en ella se produce la neurotransmisión. La neurona presináptica libera uno o varios neurotransmisores a la hendidura sináptica que se unen a los receptores localizados en la neurona postsináptica.

8.1- Colinérgica

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor excitador del SNC. Se encuentra en las uniones neuromusculares y en las sinapsis de los ganglios del sistema motor visceral. La ACh se sintetiza en las terminales nerviosas a partir de la acetil coenzima A (acetil CoA) y de colina, en una reacción catalizada por la colina acetiltransferasa (CAT). Inmediatamente después de su liberación a la hendidura sináptica la ACh es hidrolizada en acetato y colina por una enzima hidrolítica, la AChE. Esta enzima se concentra en la hendidura sináptica, lo que garantiza una rápida disminución en la concentración de ACh después de su liberación desde la terminal presináptica, regulándose así la

concentración del neurotransmisor y permitiendo que la neurona vuelva a su estado de reposo después de la excitación (Purves et al, 2012).

El sistema colinérgico está involucrado en procesos cognitivos. Juega un papel crítico en la atención, en el aprendizaje de discriminación sensorial (Levi et al, 2008) y en respuestas específicas de comportamiento como por ejemplo en el aprendizaje de tareas de evitación activa (García-Ayllón et al, 2008).

Como se ha comentado anteriormente, los organofosforados y los carbamatos inhiben la AChE, lo cual conduce a la acumulación de ACh en las sinapsis colinérgicas, produciendo una hiperestimulación de los receptores nicotínicos y muscarínicos. La neurona postsináptica continua despolarizada lo cual la hace refractaria a la liberación de ACh posterior, alterando la neurotransmisión y pudiendo incluso causar efectos como parálisis neuromuscular (Colović et al, 2013). Chiappa et al, (1995) administraron CPF en forma de inyecciones (15, 30 o 60 mg/kg) una vez a la semana durante 4 semanas a ratas macho de 60-70 días. Observaron una correlación positiva entre la dosis de CPF y el grado de inhibición de la AChE, el cual dependía del tejido, ya que era mayor en el prosencéfalo, menor en el hipocampo y mucho menor en el cerebelo, diafragma e hígado.

La exposición a CPF produce muerte de neuronas colinérgicas derivadas del prosencéfalo, a la vez que inhibe la AChE y aumenta los niveles de colina en cultivos (Pino et al, 2015 a, b). Los piretroides también pueden modular la transmisión colinérgica. Por ejemplo potencian la transmisión colinérgica entérica (Tonini et al, 1989).

La ACh juega un papel en la regulación de los movimientos morfogénicos celulares, en la proliferación, crecimiento y diferenciación celular en diferentes especies como insectos, roedores y humanos. Disruptores colinérgicos como alcohol, nicotina o algunos pesticidas (CPF, por ejemplo) alteran la sinaptogénesis y morfogénesis cuando ejercen su efecto en momentos críticos del desarrollo (Lauder y Schambra, 1999).

8.2- GABAérgica

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC y se encuentra ampliamente distribuido en éste. Se sintetiza a partir del glutamato, mediante la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) (Deidda et al, 2014). La recaptación del GABA después de su liberación en la sinapsis se produce en las terminales nerviosas y en los astrocitos a través de transportadores de GABA (GATs)

localizados en la membrana. Finalmente el catabolismo del GABA depende de la enzima GABA transaminasa (GABA-T) y de la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH), las cuales convierten el GABA en intermediarios del ciclo de Krebs y sustratos para la nueva producción de glutamato.

Receptores de GABA se han identificado electrofisiológica y farmacológicamente en todas las regiones del cerebro (Siegel et al, 1999). Se clasifican en tres tipos de receptores, GABA-A, GABA-C y GABA-B, los cuales difieren en sus propiedades farmacológicas, electrofisiológicas y bioquímicas.

- Receptores GABA-A: son ionotrópicos, permeables al ión Cl^- . Pertenecen a una superfamilia pentamérica de canales de iones que se activan por la unión a ligando (Miller y Aricescu, 2014). La unión del ligando abre los canales de Cl^- y el flujo de iones con carga negativa hacia el interior de la membrana provoca una hiperpolarización de la membrana, lo que resulta en un aumento del umbral de disparo y en consecuencia se produce una reducción en la probabilidad de iniciación de un nuevo potencial de acción, causando una inhibición de la neurotransmisión (Purves et al, 2012). Sin embargo, en condiciones particulares como por ejemplo durante la maduración cerebral, la concentración intracelular del Cl^- está aumentada, de tal manera que se produce un flujo de salida de este ión y una despolarización de la membrana, lo cual permite alcanzar de nuevo el umbral para la generación de nuevos potenciales de acción (Cellot y Cherubini, 2014).

-Receptores GABA-B: son metabotrópicos, tienen una alta similitud con los receptores de glutamato y están acoplados a proteínas G que modulan la producción de segundos mensajeros intracelulares (Purves et al, 2012).

- Receptores GABA-C: se expresan predominantemente en la retina y se pueden considerar de la misma familia que los GABA-A aunque son insensibles al antagonista de éstos, como bicuculina.

Los pesticidas organoclorados actúan sobre el receptor del GABA-A, impidiendo la apertura del canal de Cl^- y provocando así una excitabilidad incontrolada, hasta producir convulsiones (Treiman, 2001). La transmisión GABAérgica está implicada en la modulación de funciones cognitivas, emocionales o coordinación motora. Alteraciones en la función de receptores GABA-A se han asociado con diferentes trastornos neurológicos como ansiedad, depresión, deterioro cognitivo en esquizofrenia, síndrome de Down o autismo. También el GABA está implicado en el dolor y en el comportamiento adictivo (Engin et al, 2012; Rudolph y Möhler, 2014). La activación de

receptores GABA facilita el sueño (Vieira et al, 2005) pero a largo plazo puede producir depresión (Möhler, 2012).

El END inhibe el receptor GABA, pero además produce otros efectos en el sistema GABAérgico como aumentar la expresión del gen que codifica para el transportador de GABA (Preud'homme et al, 2015). También la exposición *in útero* a otros organoclorados, como el dieldrin, altera la expresión de los receptores GABA (Liu et al, 1997). La administración sistémica de diferentes piretroides modula los niveles extracelulares de GABA en el hipocampo, aunque unos compuestos aumentan y otros disminuyen los niveles de GABA (Hossain et al, 2008). La exposición durante el desarrollo a pesticidas como el mancozeb y el paraquod retrasa la ontogénesis de GABA y glicina mientras que su mezcla disminuye los niveles de GABA, glicina y taurina en cerebelo de ratones (Miranda-Contreras et al, 2005). La exposición de ratones a END durante la gestación y lactancia altera la expresión del transportador de GABA (GAT-1), del receptor de GABA-A o del transportador vesicular de GABA (VGAT) (Wilson et al, 2014a).

8.3- Glutamatérgica

El glutamato es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica. El principal precursor de glutamato es la glutamina que es liberada por las células gliales y metabolizada a glutamato por la enzima glutaminasa en las neuronas. También se puede sintetizar a partir de la transaminación de 2-oxoglutarato (intermediario del ciclo de los ácidos tricarbóxicos) (Purves et al, 2012).

El glutamato media la mayoría de la transmisión sináptica excitatoria. Contribuye además a cambios duraderos en la eficacia sináptica como son la LTP y la depresión a largo plazo (LTD), considerados como el sustrato molecular de procesos de aprendizaje y memoria. El glutamato juega un papel vital durante el desarrollo del SNC, donde participa en procesos fisiológicos tan diversos como la proliferación, maduración, migración y supervivencia neuronal, así como la formación, remodelación y eliminación de sinapsis.

Se han identificado varios tipos de receptores del glutamato:

Los **receptores ionotrópicos** de glutamato (iGlu) son complejos tetraméricos de subunidades que se ensamblan formando un canal central por donde fluyen los cationes, provocando una despolarización de la neurona. Están implicados en la neurotransmisión

rápida en el SNC y se clasifican en tres tipos en función del agonista que los activa: receptores NMDA receptores AMPA y receptores de kainato.

Los **receptores metabotrópicos** de glutamato (mGlu) no forman canales iónicos, sino que están acoplados a proteínas G y regulan la actividad de enzimas de membrana y canales iónicos. Median la actividad sináptica excitadora lenta, pero prolongada y tienen un papel modulador.

Los receptores NMDA son abundantes en el SNC y están implicados en procesos de aprendizaje y memoria (Ozawa, 1998). La principal diferencia con el resto de receptores ionotrópicos es que permiten la entrada de Ca^{2+} , además de cationes monovalentes tales como Na^+ y K^+ . Como resultado, los potenciales de acción excitatorios producidos por los receptores de NMDA aumentan la concentración de Ca^{2+} dentro de la neurona postsináptica; este aumento de Ca^{2+} actúa como un segundo mensajero intracelular para activar cascadas de señalización. Otras propiedades únicas de los receptores de NMDA son que la apertura del canal requiere la presencia de un co-agonista (el aminoácido glicina), y que el Mg^{2+} extracelular bloquea el canal cuando está hiperpolarizado, por lo tanto, los receptores de NMDA permiten el paso de cationes sólo cuando se retira el bloqueo de Mg^{2+} por la despolarización de la célula postsináptica, ya sea por un gran número de entradas excitadoras o por el disparo repetitivo de la célula presináptica (Siegel et al, 1999).

El receptor NMDA puede estar formado por al menos 5 subunidades (NR1, NR2A, NR2B, NR2C y NR2D) no homólogas, las cuales forman el canal por el que pasan los iones cuando es activado por glutamato y glicina. La subunidad NR1 es ubicua. NR2C se encuentra solamente en el cerebelo. NR2A y NR2B se encuentran en todas las regiones del cerebro (Ozawa, 1998; Mori y Mishina, 1995).

La administración de END durante la gestación y la lactancia altera la expresión del receptor vesicular de glutamato (vGlut) y de la subunidad NR2B del receptor NMDA de glutamato en la corteza prefrontal en ratones (Wilson et al, 2014a). En estudios *in vitro* se ha visto que pesticidas organoclorados que inhiben el receptor GABA alteran también la neurotransmisión glutamatérgica, alterando la función del receptor NMDA, aumentando su internalización y disminuyendo la expresión del mGluR5 (Babot et al, 2007; Briz et al, 2010). La administración oral de CYP disminuye los niveles de glutamato y de glutamina sintetasa en la corteza prefrontal cuatro horas después de la administración (Cao et al, 2015). Zhang et al, (2012), administraron CYP (6.25 y 25 mg/kg/día) durante el periodo perinatal y esto disminuyó el contenido de la subunidad

NR1 del receptor de NMDA en hipocampo, asociado con alteración de la memoria y el aprendizaje. La administración de CPF en ratas macho jóvenes y adultas, aumenta el contenido de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA de glutamato en el hipocampo (Gultekin et al, 2007).

8.4- Dopaminérgica y serotoninérgica

Las monoaminas se pueden clasificar en catecolaminas y serotonina (5-HT). Las primeras contienen un grupo catecol (ortodihidroxibenceno) y una cadena lateral con un grupo amino. Entre ellas encontramos la DA, la NA y la A.

Las catecolaminas son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina mediante la enzima Tirosina hidroxilasa (TH). Ésta convierte la L-tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA), que se transforma en DA, por una reacción de descarboxilación mediante la enzima Descarboxilasa de L-Aminoácidos Aromáticos. La DA puede activar varios receptores postsinápticos que están acoplados a diferentes mecanismos de señalización celular. La transmisión de DA se inactiva por la recaptación de DA a través del transportador de DA (DAT) en la neurona presináptica donde es metabolizada por la transferasa catecol-O-metiltransferasa (COMT) y la monoamino oxidasa (MAO) encargada de la desaminación oxidativa (Jones y Miller, 2008).

La DA es un neurotransmisor implicado en diferentes procesos del SNC, incluyendo actividad motora, motivación y recompensa, estado de ánimo, atención y aprendizaje. Cualquier alteración en la transmisión de DA puede por lo tanto afectar negativamente a una variedad de procesos neurológicos y conducir a trastornos de la conducta (Jones y Miller, 2008). Como se ha apuntado anteriormente, la neurotransmisión dopaminérgica en el NAcc modula la actividad motora. El aumento de DA en el NAcc estimula la locomoción.

La 5-HT se sintetiza a partir del triptófano, por hidroxilación mediante la enzima triptófano-5-hidroxilasa. Se han identificado diferentes receptores serotoninérgicos, la mayoría metabotrópicos. Los receptores de 5-HT se relacionan con determinados comportamientos, como las emociones, el ritmo circadiano, la conducta motora y el estado de alerta mental. La alteración de su función es responsable de trastornos psiquiátricos como depresión, ansiedad o esquizofrenia (Purves et al, 2012).

En el trabajo de Wilson et al, (2014b) también se muestra que la exposición durante el desarrollo a END altera la expresión de receptores (D2) y transportadores (DAT, TH, VMAT2) de DA en la corteza prefrontal, área afectada en patologías como el espectro

autista y esquizofrenia (Fatemi et al, 2010; Gaspar et al, 2009). La administración de 3mg/kg de END a ratas adultas durante 10 días aumenta la concentración de DA en la amígdala, en el septo y en la sustancia nigra (Anand et al, 1985). Otros organohalogenados como el lindano aumentan los niveles extracelulares de DA en estriado *in vivo* (Faro et al, 2009). El piretroide deltametrín disminuye el transportador de DA en hipocampo y estriado, sugiriendo un posible mecanismo para su probable contribución al riesgo de sufrir Parkinson (Tayebati et al, 2009). Cabaleiro et al, (2008) administraron CYP a ratas madre observando una disminución de la relación DOPAC/DA en la descendencia expuesta durante el desarrollo, cuando ya eran jóvenes. Nasuti et al, (2007) observaron una disminución de DA en el estriado de ratas de 35 días, tras exposición a CYP en el periodo 6 a 15 días postnatal. Muchos organofosforados también alteran la transmisión dopaminérgica: la administración intraestriatal de pesticidas aumenta los niveles extracelulares de DA en estriado *in vivo* y modula los niveles de otros metabolitos como DOPAC y HVA (Faro et al, 2009). El organofosforado paratión produce hiperactividad de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico y un aumento del receptor de 5HT en el periodo neonatal (Slotkin et al, 2009). El CPF también altera la transmisión dopaminérgica a nivel de señalización intracelular ya que altera la fosforilación de la proteína DARP32 en el estriado (Torres-Altoro et al, 2011).

9- NEUROINFLAMACIÓN

Diferentes situaciones como daño cerebral agudo, isquemia, infecciones o determinados compuestos neurotóxicos producen una respuesta inflamatoria activando el sistema inmunológico en el SNC, proceso conocido como neuroinflamación. La barrera hematoencefálica, compuesta por uniones estrechas entre las células endoteliales que conforman los vasos que circulan por el SNC, impide el paso de gran cantidad de moléculas y sustancias circulantes, aislando al sistema nervioso de la circulación periférica. Sin embargo, si se deteriora esta barrera histológica se produce una entrada de los agentes circundantes en el SNC, incluyendo células y moléculas del sistema inmune. Esto contribuye a la inducción de neuroinflamación.

La neuroinflamación está mediada por la activación de la microglía, considerada como los macrófagos residentes del SNC (Bentivoglio et al, 2011). Las células de la microglía activadas son las encargadas de la respuesta inflamatoria y se encargan de eliminar células dañadas por fagocitosis. La microglía activada produce liberación de moléculas,

potencialmente citotóxicas, como citocinas pro-inflamatorias, intermediarios reactivos del oxígeno, proteasas y proteínas del complemento (Dheen et al, 2007). Las principales moléculas mediadoras de la inflamación son las citocinas, moléculas bioactivas solubles, liberadas por macrófagos y linfocitos en el sistema nervioso periférico (SNP) y astrocitos y microglía en el SNC, las cuales participan en la respuesta inmune innata y la adaptativa (Farina et al, 2007). El proceso inflamatorio en el cerebro se cree que juega un papel importante en la muerte neuronal característica de enfermedades como Parkinson, Alzheimer y esclerosis múltiple entre otras (Dheen et al, 2007).

9.1- Citocinas

Son proteínas producidas por distintos tipos celulares del sistema inmune, siendo los principales los linfocitos T. Su función principal es la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Tienen bajo peso molecular (<80kD) y funcionan a bajas concentraciones a través de receptores específicos. Las citocinas pueden ser pro-inflamatorias, como las interleucinas (IL), IL-1, IL-6, IL-17 o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y el interferón- γ , encargadas de activar otros tipos celulares que participan en el proceso inflamatorio o anti-inflamatorias, como la IL-4 y la IL-10 o el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), que suprimen la actividad de las pro-inflamatorias (Arnaiz et al, 1995; Rubio-Perez y Morillas-Ruiz, 2012).

En condiciones fisiológicas, la **IL-1** es sintetizada en el SNC por varios tipos celulares como la microglía, astrocitos, neuronas y células endoteliales en niveles bajos o indetectables. Sin embargo, la expresión del ARNm de IL-1 β (isoforma de la IL-1) aumenta rápidamente después de diferentes estímulos neurotóxicos (Patel et al, 2003).

La IL-1 β modula la LTP en hipocampo y el aprendizaje espacial. Existe una correlación negativa entre la concentración IL-1 β y LTP en hipocampo en ratas (Lynch, 1999). Además, los niveles elevados de IL-1 β afectan a la memoria que depende directamente del hipocampo. Sin embargo, también son necesarios determinados niveles de IL-1 β para que se produzca la LTP (Goshen y Yirmiya, 2007). Por ello, se considera que toda desviación en los niveles fisiológicos de IL-1 β , ya sea por exceso o por defecto, conduce a la aparición de déficits en la LTP y, por consiguiente, en la memoria dependiente del hipocampo (Goshen y Yirmiya, 2007).

El TNF- α en el SNC induce una cascada de eventos celulares que puede culminar con la muerte neuronal (Cuenca-López et al, 2010; Olmos y Lladó, 2014). El TNF- α induce

la iniciación o amplificación de la liberación de IL-1 e IL-6, de quimiocinas y moléculas de adhesión, acelerando la atracción de leucocitos inflamatorios al lugar del daño y produciéndose una retroalimentación que hace que se libere más TNF- α (Olmos y Lladó, 2014).

La **IL-10** es una citocina anti-inflamatoria que actúa inhibiendo la expresión de las citocinas pro-inflamatorias como IL-1, TNF- α o quimiocinas (Rubio-Perez y Morillas-Ruiz, 2012). La presencia de la IL-10/Ceftriaxone reduce la activación del sistema inmune (reduce los niveles de IL-1 β) y aumenta la memoria espacial y el aprendizaje sensorimotor en ratas con infección de E.coli (Wallace et al, 2010). Se ha demostrado una correlación negativa de las citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-6) y positiva de la IL-10 anti-inflamatoria con la LTP (Huang et al, 2013).

La **IL-4**, anti-inflamatoria, tiene un importante papel en el control de la inflamación del cerebro, (Gadani et al, 2012). Reduce la producción de mediadores inflamatorios como TNF- α e IL-1 β por la microglía activa *in vivo* e *in vitro* (Furlan et al, 2000). Ratones *knock out* de IL-4 presentan deterioro grave de la función cognitiva en el MWM. Además, la IL-4 contribuye al mantenimiento de la función cognitiva mediante dos mecanismos distintos, por una parte antagoniza los efectos deletéreos de las citocinas pro-inflamatorias en los astrocitos y neuronas y por otro aumenta la producción de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) por los astrocitos (Derecki et al, 2010). Literatura reciente muestra que diversos tipos de pesticidas inducen inflamación y neuroinflamación. Por ejemplo, la exposición a gases del aire contaminado altera la barrera hematoencefálica, la respuesta inmune innata y produce neuroinflamación por infiltración de linfocitos en diferentes áreas cerebrales en humanos (Calderón-Garcidueñas et al, 2008). También la exposición a los gases de las emisiones de diesel aumentan los niveles de TNF- α en diferentes áreas cerebrales en ratas (Levesque et al, 2011). Binukumar et al, (2011) demostraron que ratas expuestas a diclorvos, un pesticida organofosforado durante 12 semanas, se activaba un porcentaje mayor de células de la microglía en la sustancia *nigra* y en el cuerpo del estriado. También se observó un aumento de sustancias reactivas del oxígeno (ROS) tras la activación de la NADPH oxidasa de la microglía y un aumento de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), lo cual se traduce en una mayor vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas de estas áreas cerebrales a sufrir neurodegeneración.

La exposición prenatal a gases contaminantes también induce activación de microglía de manera dependiente del sexo (Bolton et al, 2012). La exposición perinatal a mezclas de contaminantes, incluidos organofosforados, produce una respuesta pro-inflamatoria (aumento del TNF- α , IL- β , IL-6) en ratas (Hayley et al, 2011; Terry et al, 2012). Los niveles del piretroide permetrín y del organofosforado clordano en el cordón umbilical se han relacionado con alteraciones en los niveles de citocinas en el feto (Neta et al, 2011).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cerebro en desarrollo es más susceptible a los efectos de compuestos neurotóxicos. La exposición a pesticidas, durante el desarrollo temprano del cerebro se ha asociado con alteraciones neurológicas en los niños. Existen evidencias de que algunas alteraciones cognitivas y motoras pueden persistir en adultos y aumentar el riesgo de algunas enfermedades como el Parkinson. Sin embargo no se conocen bien los mecanismos por los que la exposición a diferentes pesticidas durante el desarrollo lleva a diferentes alteraciones cognitivas, motoras o de conducta.

El objetivo general de la tesis ha sido analizar las alteraciones neurológicas en ratas expuestas durante el desarrollo a diferentes pesticidas, individuales y en mezcla y analizar los mecanismos implicados.

Los objetivos concretos han sido:

1- Identificar las alteraciones neurológicas inducidas por la exposición perinatal de ratas a un compuesto representativo de cada una de las cuatro grandes familias de pesticidas; un organofosforado: Clorpirifos, un carbamato: Carbaril, un organoclorado: Endosulfán y un piretroide: Cipermetrín. Para ello se han analizado los efectos de la exposición a los pesticidas durante el desarrollo sobre:

1.1- Ansiedad y ritmos circadianos

1.2- Actividad y coordinación motoras

1.3- El aprendizaje y memoria espaciales y el aprendizaje asociativo.

2- Analizar posibles mecanismos moleculares que pueden contribuir a las alteraciones neurológicas encontradas. Para ello se ha analizado:

2.1 La neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica en cerebelo e hipocampo, respectivamente.

2.2 La posible inducción de neuroinflamación.

3- Analizar si existe interacción entre dos pesticidas diferentes (Endosulfán+Cipermetrín) en una mezcla, de modo que se modifican (potencian o inhiben) los efectos neurológicos y/o neuroquímicos de la exposición durante el desarrollo a los pesticidas individuales.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1- ANIMALES

Se utilizaron ratas albinas de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*), suministradas por Charles River. Tras 10 días en cuarentena las ratas se estabularon en jaulas en un ambiente controlado: ciclo de 12 horas de luz (8h-20h) y 12 h de oscuridad (20h-8h), $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura y una humedad del $55\pm 5\%$, y acceso a agua y comida *ad libitum*, en el estabulario del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF).

Con el fin de exponer las ratas durante el desarrollo se cruzaron hembras y machos para tener ratas preñadas. Los cruces se realizaron en el estabulario. Una rata macho se pone con 1-2 hembras en la misma jaula durante la noche. La mañana siguiente se realizan lavados vaginales. Los lavados (fluido vaginal) se observan al microscopio. Aquellas ratas en las cuales se observa la presencia de espermatozoides se considera que están preñadas y se cuenta como día 0 de la gestación (GD0). Las hembras preñadas se estabulan en jaulas separadas individualmente durante toda la gestación y lactancia de las crías.

Todos los procedimientos con animales fueron supervisados y aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal del CIPF, siguiendo la legislación española “Protección de los Animales Utilizados para Experimentos y Otros Propósitos Científicos” y de acuerdo con las normas de la Unión Europea para la protección de animales utilizados con fines científicos, Directiva 2010/63/EU.

1.1- Administración de pesticidas

El día 7 de gestación (GD7), momento en el que se produce la implantación del embrión, empezamos a administrar los pesticidas una vez al día a las madres gestantes de forma oral. El pesticida se introduce en una gelatina dulce (MediGel® Sucralose de ClearH2O) que la madre se come sin ningún problema, asegurándonos por tanto que reciben la dosis diaria de pesticida. Los pesticidas fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Refs.: Endosulfan ($\alpha+\beta=2+1$) PESTANAL® 32015; alpha-Cypermethrin PESTANAL®, 45806; Chlorpyrifos PESTANAL®, 45395 y Carbaryl PESTANAL®, 32055). Se disolvieron en aceite de maíz (Sigma, C8267) a la concentración adecuada para que el volumen de administración estuviera entre 50 y 300 microlitros. Basándonos en la bibliografía que hay al respecto se eligieron las dosis más bajas para las que se había descrito algún efecto. Las siguientes fueron las dosis elegidas

de cada pesticida: Endosulfán: 0.5 mg/kg/día, α -cipermetrín: 1,5 mg/kg/día, carbaril: 15 mg/kg/día, clorpirifos: 0.1-0.3-1 mg/kg/día. Las ratas control reciben el vehículo, es decir la gelatina con aceite de maíz. La administración de pesticidas se realizó diariamente hasta el día 21 postnatal (PND21), momento en el que las crías son destetadas y separadas por sexo. A partir de ese momento las crías no se exponen más a los pesticidas.

1.2- Curso temporal del estudio

Las crías se pesaron cada dos días tras el nacimiento hasta el destete. A partir de ese momento se pesaron semanalmente hasta el momento del sacrificio.

Los estudios de comportamiento se llevaron a cabo cuando las crías expuestas a los pesticidas eran adultos jóvenes (2-3 meses). Se analizaron separadamente machos y hembras. Para minimizar el efecto de la camada, en todos los experimentos se mezclaron crías de al menos dos o tres madres, de cada grupo de tratamiento. Tras los estudios de comportamiento, algunos grupos de ratas se sometieron a microdiálisis cerebral, otros se utilizaron para realizar electroencefalograma y otros fueron sacrificados directamente para la obtención de muestras para estudios de proteómica, metabolómica y transcryptómica.

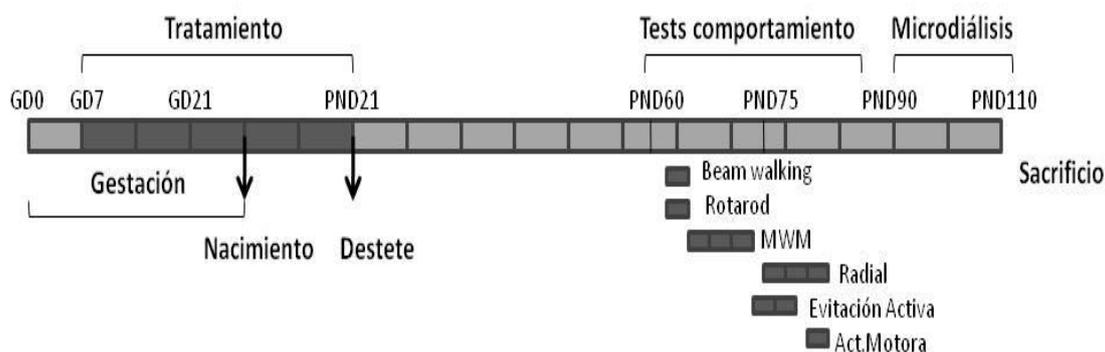


Figura 2. Esquema de la progresión temporal del estudio.

En total se han realizado seis experimentos y se ha incluido la descendencia de un total de 4-10 madres para cada parámetro y grupo de tratamiento.

2-TESTS DE COMPORTAMIENTO

2.1- Aprendizaje y memoria espacial

Se han utilizado dos tests diferentes: 1) el laberinto radial de 8 brazos, en el cual se ha analizado el aprendizaje espacial y la memoria de trabajo y 2) el laberinto acuático de Morris (MWM) con el que se analiza el aprendizaje y memoria espaciales.

2.1.1- Laberinto radial de ocho brazos

Consiste en un laberinto de plexiglás negro con ocho brazos equidistantes de una longitud de 70 cm y una anchura de 10 cm, unidos por un área central de 30 cm (Figura 3). La altura en la parte proximal a la zona central es de 30 cm, siendo en la zona más distal de 5 cm. Al final de cada brazo se encuentra un comedero donde se introduce la comida que es la recompensa. El laberinto está situado sobre una plataforma a 1 m del nivel del suelo para facilitar el trabajo del experimentador. La comida consiste en unos pellets dulces (BioServ).

Cuatro días antes de empezar el test se reduce la ingesta de comida diaria. La restricción se mantiene hasta la finalización del test. De esta manera nos aseguramos que las ratas tengan una motivación para buscar la recompensa y por tanto explorar durante el test. Las ratas se pesan cada dos días para controlar el peso que pierden, el cual debe mantenerse entre un 10-12% del peso inicial.

Antes de empezar el test las ratas se habitúan al laberinto. La habituación se divide en dos sesiones. En la primera se ponen a las ratas de dos en dos, para reducir el estrés, en el laberinto con comida esparcida a lo largo de todos los brazos durante 5 min. En la segunda sesión se ponen las ratas de una en una y la comida en los comederos que hay al final de los brazos durante 5 minutos. El test se realiza durante los siguientes 5 días, y se realizan 5 ensayos por día. La comida se sitúa en cuatro de los ocho brazos. Cada rata tiene establecido en qué cuatro brazos tiene la comida, siempre los mismos y siempre dos brazos consecutivos y dos no consecutivos. Para cada rata los brazos con comida son diferentes. La distribución se realiza al azar (Figura 3).

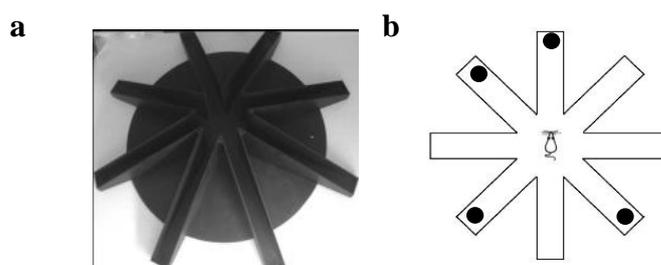


Figura 3. Laberinto radial (a) y plantilla del test (b).

El objetivo de este test es que la rata aprenda, guiándose por las pistas visuo-espaciales que se localizan en la habitación, en qué brazos tiene la comida. En cada ensayo se pone la rata en el centro del laberinto, dentro de un espacio con paredes para que no vea aún el laberinto ni la comida. Se quitan las paredes y se empieza a contar el tiempo. Se va anotando en qué brazos entra (Figura 3b). El tiempo máximo que se deja la rata en el laberinto son 3 minutos. Si la rata entra en los 4 brazos con comida antes de 3 minutos, se saca del laberinto y se anota el tiempo. Se calculan diferentes parámetros:

- Errores de referencia (*reference errors*), son el número de veces que visita un brazo sin comida durante cada sesión.
- Errores de trabajo (*working errors*), es el número de veces que visita un brazo en el que ya ha entrado previamente en un mismo ensayo.
- El índice de aprendizaje (*learning index*) diario se calcula como el número de aciertos menos el número de errores, es decir, el número de veces que la rata entra en un brazo en el cual tiene comida, menos el número de veces que se equivoca y entra a un brazo en el cual no tiene comida, por primera vez (Hernández-Rabaza et al, 2016).

2.1.2- Laberinto acuático de Morris (MWM)

Consiste en una piscina circular de 190 cm de diámetro y 80 cm de altura dividida en cuatro cuadrantes imaginarios. En uno de ellos, siempre el mismo, se sitúa una plataforma sumergida, oculta. La rata debe orientarse a partir de las pistas visuales de la habitación para aprender la localización de dicha plataforma. Para que la rata se habitúe a la piscina, el día anterior al comienzo del test se la deja 90 segundos nadando en la piscina sin plataforma. El entrenamiento se realiza durante 3 días, 3 ensayos cada día. Cada día la rata se introduce en la piscina en un cuadrante diferente. En cada ensayo se mide el tiempo que tarda en encontrar la plataforma (*escape latency*). El tiempo máximo que se le deja intentarlo son 120 segundos.

El cuarto día se realiza el test de memoria espacial. Se quita la plataforma y se introduce a la rata desde un punto cualquiera de la piscina, permitiéndole nadar durante 90 segundos y se mide el tiempo que permanece nadando en el cuadrante en el que previamente había estado la plataforma. Cuanto mejor es la memoria espacial, más tiempo permanecerá la rata en el cuadrante correcto.

Los movimientos de la rata son captados por una videocámara y analizados con un programa de View Point (Lyon, France) que cuantifica la velocidad, el porcentaje de tiempo en cada cuadrante o la distancia recorrida. También muestra la trayectoria realizada por cada rata (Figura 4).

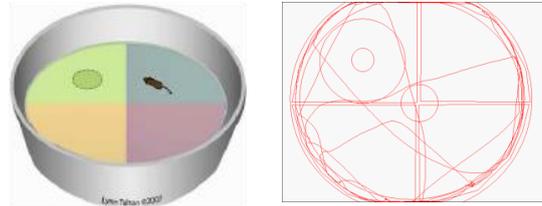


Figura 4. Laberinto acuático de Morris y representación de la trayectoria de una rata

2.2- Coordinación motora

2.2.1- Rotarod

El Rotarod (Ugo Basile) es un cilindro de 8.5 cm de largo x 5 cm de diámetro que gira con una determinada aceleración (Figura 5). Antes de efectuar el test se colocan los animales sobre el cilindro a una velocidad mínima continua para que se habitúen. Cuando ya se observa una disminución del estrés ocasionado (intentar escapar, darse la vuelta, etc), se devuelven a sus jaulas y se espera 1 ó 2 minutos. Se vuelven a poner sobre el cilindro en el sentido opuesto al movimiento de éste. La velocidad se va acelerando desde 4 a 40 rpm, hasta un máximo de 5 min. Se mide el tiempo de permanencia de cada animal en el rotarod antes de caerse. Cuanto más tiempo permanecen las ratas sobre el rotarod mejor coordinación motora presentan (Hamm et al, 1994).



Figura 5. Rotarod

2.2.2- Beam walking

Se utiliza un listón de 1 metro de largo situado a 1 metro del suelo. La rata deberá llegar al final del listón donde hay situada una caja negra de madera, la cual le proporciona un ambiente agradable (Figura 6). Primero se habitúan las ratas para que pierdan el miedo a cruzar en un listón más ancho que el utilizado después en el test. Las primeras veces se la acompaña y se repite hasta que cada rata pase sin miedo ella sola. El test consiste en hacer pasar a la rata por un listón de madera de 20 mm de ancho (cuadrado). Contamos los resbalones que se producen mientras está cruzando y el tiempo que tarda en cruzar. Se repite tres veces y se calcula la media de resbalones de los tres ensayos. Cuanto mayor es el número de resbalones, mayor es la incoordinación motora.



Figura 6. Beam walking

2.3- Actividad motora

Analizamos la actividad motora espontánea en las ratas cuando exploran un nuevo entorno, utilizando un actímetro (MED Associates). Las jaulas, de dimensiones 43×43×30.5cm, se disponen entre una serie de células infrarrojas que detectan el movimiento del animal. El equipo dispone de dos filas de células infrarrojas a 1 y 6 cm del suelo de la jaula respectivamente (Figura 7). Cuando el animal interrumpe tres detectores infrarrojos consecutivamente el programa registra un movimiento ambulatorio. Un movimiento vertical se registra cuando el animal interrumpe la célula infrarroja situada a 6 cm del suelo. Se registran datos de actividad los primeros 60 minutos tras poner el animal en la jaula, con una frecuencia de 1 dato cada 5 minutos con el programa 'Activity Monitor' (MED Associates) (Cauli et al, 2009). El programa proporciona diferentes datos de actividad (ambulatoria, vertical, velocidad, saltos, etc). En este estudio se ha analizado el número total de movimientos ambulatorios, verticales y movimientos estereotípicos.



Figura 7. Actímetro

2.4 Ritmos circadianos de actividad motora

El ritmo circadiano de actividad motora se analizó durante un periodo de tres días. Las ratas se dejaron durante 3 días consecutivos en las jaulas del actímetro en condiciones de 12h de luz y 12h de oscuridad. Los datos se registraron en intervalos de 5 min. Se analizaron los movimientos horizontales y verticales (Felipo et al, 2015). Se ha calculado por separado la suma de actividad diaria y la velocidad media en la fase de luz (12 h) y en la de oscuridad (12 h).

2.5- Aprendizaje asociativo: Evitación activa

La tarea de evitación activa está diseñada para analizar la capacidad de las ratas para aprender a evitar un evento aversivo asociado a un estímulo. Se ha seguido el protocolo descrito en Aguilar et al, 2000. Se utilizó una caja con paredes de acrílico y el suelo barras de acero (Shuttle box Ratas, Panlab) de 44x20x19 cm dividida en dos compartimentos por una pared vertical con una apertura en la parte central que permite al animal moverse con libertad de un compartimento a otro (Figura 8). El equipo se controla con el programa Shutavoid (shutt 8) de Panlab. En primer lugar se habitúa la rata durante 10 minutos en la caja, con libre movimiento, sin ningún estímulo. Entonces comienza el test. Durante 20 segundos se produce un estímulo condicionado sonoro, al cual se superpone, los últimos 10 segundos un estímulo incondicionado, que consiste en una descarga eléctrica en las patas de 0.2 mA con una duración máxima de 10 segundos. La descarga continúa hasta que la rata se cambia de compartimento evitándola. Si se cambia durante el período con estímulo condicionado, pero antes de la descarga, es una evitación. Si la rata responde mientras se produce la descarga, no es una evitación sino una respuesta de escape. Si la rata no se cambia de compartimento se considera falta de respuesta. Se realizan 50 ensayos consecutivos con tiempos inter-ensayos variables y determinados aleatoriamente por el programa. Cuantificamos las veces que la rata evita

la descarga. Cuantas más evitaciones, antes y mejor han aprendido a asociar el estímulo condicionado con la posterior descarga y por tanto tienen mejor aprendizaje asociativo.



Figura 8. Evitación activa

2.6- Test de ansiedad: *Hole board*

Para medir la ansiedad se ha utilizado el test del *hole board*. Se utiliza el actímetro, pero en este caso el suelo de las jaulas está provisto de 16 agujeros equidistantes de unos 4 cm de diámetro (Figura 9). La tendencia natural de las ratas cuando se les expone a un ambiente nuevo es explorar, pero si un animal sufre ansiedad esta tendencia se reduce. Por ello, existe una relación inversa entre el número de veces que el animal introduce la cabeza en los agujeros y el grado de ansiedad (Kong et al, 2006; Chen et al, 2007). Las células infrarrojas del actímetro detectan el movimiento de las ratas cuando introducen la cabeza en los agujeros y el programa contabiliza estos datos. Se registra durante 5 minutos.



Figura 9. Hole board

3- MICRODIÁLISIS CEREBRAL IN VIVO

La técnica de microdiálisis cerebral in vivo se utiliza para analizar la concentración de neurotransmisores y otras moléculas en el espacio extracelular. La posibilidad de obtener muestras *in vivo*, del sujeto experimental despierto y en libre movimiento supone una ventaja en el estudio de la señalización molecular (Bourne, 2003). Permite llevar a cabo estudios farmacocinéticos y correlacionar el comportamiento del animal con cambios en la neurotransmisión y metabolismo (Di Chiara, 1990; Joukhadar y Müller, 2005). Así, una vez realizados todos los tests de comportamiento se realiza la

microdialísis cerebral *in vivo* para obtener muestras de líquido extracelular en un área cerebral concreta, mientras la rata está despierta y con libertad de movimiento. En las muestras de líquido extracelular se analizarán posteriormente diferentes neurotransmisores y metabolitos.

3.1- Implantación de la sonda de microdialísis

Se anestesian las ratas con isoflurano (5% en 100% de oxígeno para inducir la anestesia y 2% para mantenerla). Se coloca la cabeza del animal en un sistema de estereotaxia para implantar la guía de microdialísis (MD-2251, Omega-ring Intracerebral Guide Cannula and Stylet, 6/pkg. BASi) en el área cerebral elegida. Se realiza una incisión sagital de aproximadamente 2.5 cm para dejar la superficie del cráneo al descubierto y con ayuda de una espátula, suavemente, se raspa para quitar el tejido conectivo y de este modo permitir posteriormente una buena adhesión del cemento dental a la superficie del cráneo. A continuación, se marcan las coordenadas en las que queremos introducir la guía de microdialísis. Para el cerebelo utilizamos las siguientes coordenadas: -10.5 mm anteroposterior, -1.6 mm medio lateral y 0.8 mm dorsoventral respecto al bregma (Paxinos y Watson, 1997; Hermenegildo et al, 1998). Se realizan dos perforaciones de 1 mm de diámetro para insertar dos tornillos de sujeción al cráneo y un agujero de 1 mm de diámetro que permite el acceso vertical de la guía al cráneo. Se introduce la guía y se sujeta al cráneo mediante los tornillos y cemento dental. Después se sutura la piel y las ratas se estabulan individualmente en jaulas limpias durante un periodo de al menos 48 horas hasta el momento de realizar la microdialísis cerebral.

3.2- Microdialísis cerebral *in vivo*

Cuando se va a realizar la microdialísis se retira el estilete y se coloca la sonda (MD-2200, Brain Microdialysis Probes) en la guía de forma cuidadosa y con el animal despierto. Se perfunde continuamente a través de la sonda líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) (NaCl 145 mM, KCl 3.0 mM, CaCl₂ 2.26 mM, tampón fosfato 2 mM, pH 7.4) filtrado con filtros de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore), a un flujo de 3 µL/minuto, utilizando una bomba de microperfusión (BAS, Analytical Systems, Inc, USA) (Hermenegildo et al, 1998). La Figura 10 muestra un esquema del funcionamiento de la sonda de microdialísis. El dializado recogido durante la primera hora y media tras la inserción de la sonda se desecha ya que los niveles de metabolitos necesitan al menos ese tiempo para estabilizarse. Transcurrido ese tiempo se recogen

muestras cada 30 minutos (90 μL de dializado en cada muestra). Las muestras se conservan en nitrógeno líquido durante la microdialísis y después se almacenan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis.

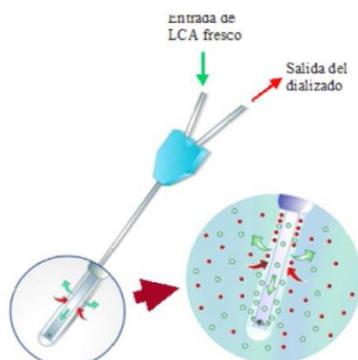


Figura 10: Esquema de funcionamiento de una sonda de microdialísis

4- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC)

El sistema de HPLC (High-performance liquid chromatography) consiste en una columna con un material cromatográfico (fase estacionaria) y una fase móvil impulsada por bombas. Estas dos partes permiten separar compuestos diferentes presentes en la muestra; las muestras se inyectan en el sistema mediante inyector manual o automático y una vez separados los compuestos pasan a los detectores. El programa de control y análisis muestra el cromatograma, en el cual podemos determinar el tiempo de retención y el área del pico de cada compuesto, que será proporcional a su concentración en la muestra.

4.1- Determinación de aminoácidos por HPLC

Para la separación de aminoácidos se utilizó una columna de fase reversa C18, de 150 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro y con partículas de 5 μm de diámetro (Resolve, Waters). La fase móvil consiste en un gradiente de dos soluciones (A y B) durante 55 minutos. La solución A es una mezcla 95/5 (vol/vol) de tampón acetato sódico 50 mM (pH 5.67) y metanol más alcohol isopropílico. La solución B es metanol/agua 70/30 (vol/vol). Se utilizó un flujo de 1 ml/min. Se utilizó un detector de fluorescencia (Waters 474). Para hacer los aminoácidos fluorescentes se derivatizan con OPA (dialdehído ftálico), inmediatamente antes de la inyección, programado en un inyector automático. Se derivatizaron 50 μL de dializado de cada fracción de microdialísis con 50 μL de OPA. Las longitudes de onda son: excitación 340 nm y emisión 460 nm (Canales et al, 2003). Como estándares para la cuantificación se pasaron, cada 6 muestras, una

mezcla de 10 aminoácidos, incluido el GABA, (5 μ M), para los cuales se evaluó primero el tiempo de retención al cual eluye cada uno, pasando estándares individuales. Se utilizó el programa EMPOWER II (Waters) para el control del HPLC y el análisis y cuantificación de los cromatogramas.

5- SACRIFICIO

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Se extrajeron el hígado y la grasa perirrenal. También se recogió sangre del cuello, de la que se obtuvo plasma. Estos tejidos y muestras se almacenaron a -80°C para el posterior análisis de niveles de pesticidas. El cerebro se diseccionó en cuatro áreas: cerebelo, hipocampo, corteza y estriado, las cuales se introdujeron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C .

6- WESTERN BLOT

Se utilizó medio cerebelo o medio hipocampo (un hemisferio) para la preparación de homogenados para realizar western blot. Cada muestra de tejido se pesa y se homogeniza en frío en el “Ultraturax” con 5 volúmenes (p/v) de tampón de homogenización (Tris-HCl 1M a pH=8; NaCl 250mM; EGTA 100mM, EDTA 200mM a pH= 7,4 pNPP 200mM, pirofosfato sódico 100mM, ortovanadato sódico 100mM, NaF 100mM, Leupeptina 10mg/ml, Aprotinina 10mg/ml y PMSF 200mM). Se sonica y se determina la concentración de proteína en una alícuota con el método colorimétrico BCA (bicinchonic acid method) (BCA Protein Assay Kit, Thermo) utilizando el lector de absorbancia Multiskan FC a 570nm.

Las muestras se diluyen en tampón de carga 2X (Tris- HCl 0,5M a pH 6.8, Glicerol, SDS 10 %, 2-Mercaptoetanol 10%, Bromofenol 1%) y se cargan 75 μ g de proteína de cada muestra en geles de poliacrilamida, de porcentajes de entre 8 y 15% de acrilamida, en función de la masa molecular de cada proteína (Felipo et al, 1988).

Tras la electroforesis se transfieren las proteínas a membranas de PVDF a 250 mA durante 2 horas. A continuación se bloquean las membranas con BSA al 5% en TBS-Tween (NaCl 0.15 M, Tris Base 50 mM, Tween-20 0.05%, pH 7.5) durante 45-60 minutos y se incuban con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C . Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-Iba-1 (1:500), anti-IL-4 y anti-IL-10 (1:1000) de Abcam (Cambridge, MA); anti-IL-1 β y anti-TNF- α (1:500) de R&D SYSTEMS, (Minneapolis, USA); anti-NR1 (1:1000) de

BD Biosciences (New Jersey, USA); anti-NR2A y NR2B (1:1000) de Upstate-Millipore (Billerica, MA, USA). Anti-actina (1: 5000) de Abcam (Cambridge, MA) se utilizó como control de carga. Los anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma, St. Louis, MO) se utilizaron a 1:4000, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Las membranas se lavaron tres veces (10 minutos cada vez) con TBS-T y se hizo un último lavado con tampón sustrato (NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 100 mM a pH= 9.5). Se revela por colorimetría con el sustrato de la fosfatasa alcalina Nitro blue tetrazolium (NBT) más 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine salt (BCIP) (ThermoFisher Scientific).

Las imágenes de las bandas se capturan con un escáner (Hewlett Packard Scanjet 5300C) y su intensidad se cuantifica con el programa AlphaImager 2200 (AlphaEaseFC 2200 para Windows, Cambridge, UK).

7- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha utilizado *el test t de Student* cuando se comparan solamente dos grupos y análisis de varianza ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnet o Tukey. Para los resultados de aprendizaje espacial durante varios días se utilizó ANOVA de dos vías (las dos variables son pesticida y tiempo) con repetición de las medidas, seguido del post-test de Bonferroni. Un valor p menor de 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron con el software GraphPad Prism v4 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA).

IV- RESULTADOS

1- Efecto de la exposición perinatal a pesticidas sobre la ansiedad.

Se analizó la ansiedad con el test *hole board*. El único pesticida que induce ansiedad es el END, solamente en ratas macho. Se reduce el número de veces que el animal introduce la cabeza en los agujeros (18 ± 2.2 , $p < 0.01$) comparado con los controles (28 ± 6), $F(6,111) = 3.08$, $p < 0.05$ (Fig. 11A).

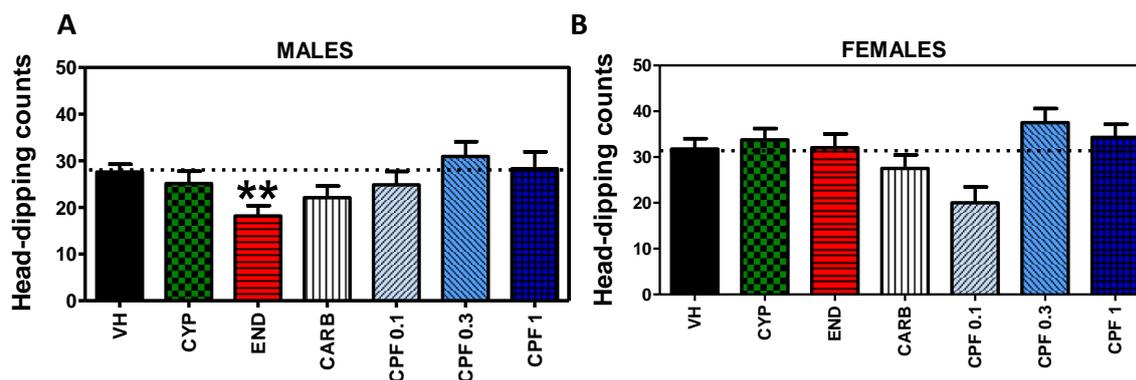


Figura 11: Efecto de la exposición perinatal a pesticidas sobre la ansiedad en el *hole board* en machos y hembras. Se representa el número de veces que el animal introduce la cabeza en los agujeros durante 5 minutos, en machos (A) y hembras (B). Los valores representan la media \pm SEM del siguiente número de animales: VH=37, CYP=16, END=10, CARB=10, CPF0.1=6, CPF0.3=16, CPF1=10 para los machos y VH=26, CYP=16, END=15, CARB=14, CPF0.1=3, CPF0.3=16, CPF1=10 para las hembras. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos ** $p < 0.01$. VH, vehículo; CYP, cipermetrín; END, endosulfán, CARB, carbaril y CPF, clorpirifos.

2- Efecto de la exposición a pesticidas en el ritmo circadiano de la actividad motora

Las ratas son animales nocturnos y por tanto presentan mayor actividad durante la fase de oscuridad (noche) que durante la fase de luz (día) (Fig. 12). No se observan diferencias entre las ratas expuestas a los diferentes pesticidas y las ratas control en la actividad ambulatoria (m.a) o vertical (m.v) durante la noche. Sin embargo durante el día (fase de sueño) las ratas macho expuestas a END (1560 ± 124 m.a, $p < 0.001$ y 462 ± 52 m.v, $p < 0.01$), CYP (428 ± 40 m.v, $p < 0.05$) o CPF 1mg/kg/día (1332 ± 100 m.a, $p < 0.05$ y 427 ± 47 m.v, $p < 0.05$) presentan una mayor actividad ambulatoria ($F(6,107) = 3.74$, $p < 0.05$) y/o vertical ($F(6,107) = 2.07$, $p < 0.05$) respecto a las controles (993 ± 79 m.a y 308 ± 26 m.v) (Fig. 12A y B). Estos resultados sugieren que se reduce el tiempo de sueño. En las hembras, sin embargo, no se observan efectos de los pesticidas sobre la actividad ambulatoria o vertical durante las fases de sueño o vigilia, indicando que el

ritmo circadiano de la actividad motora no se ve alterado por la exposición a pesticidas en hembras (Fig. 12 C y D).

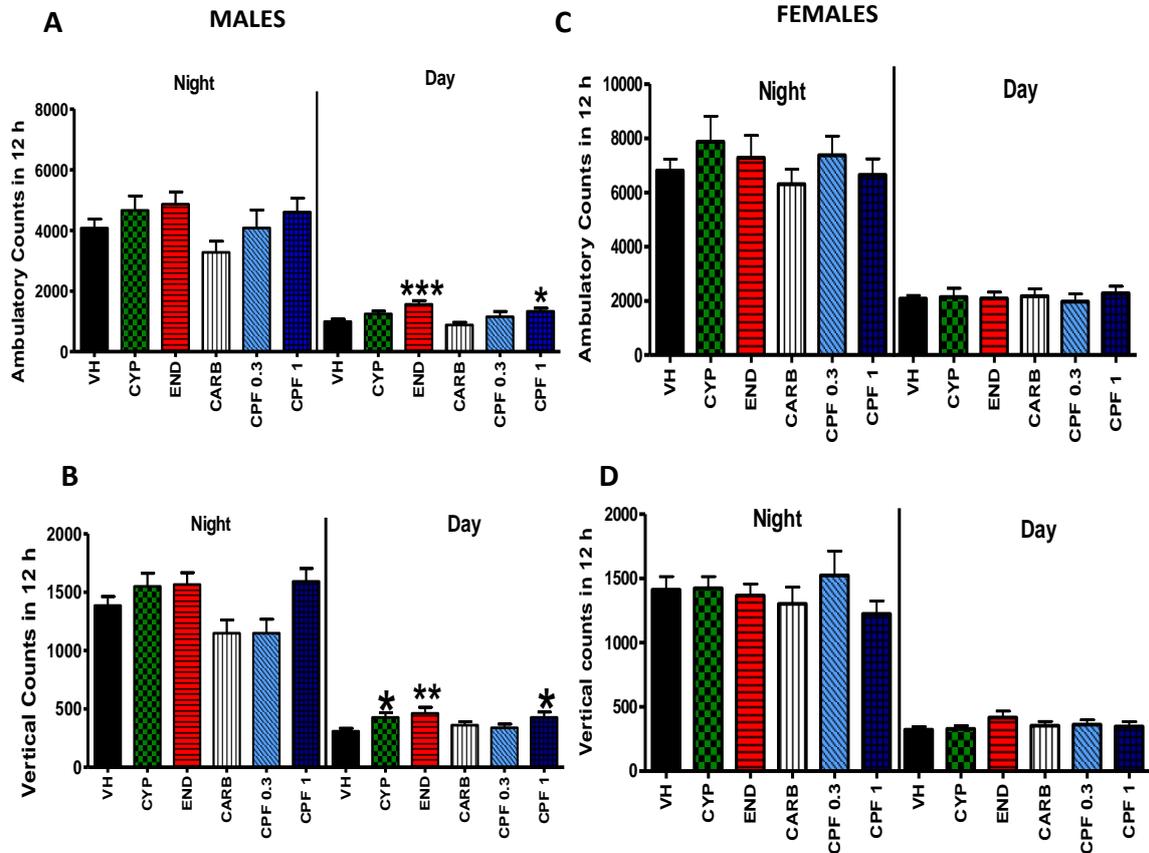


Figura 12. Efecto de la exposición a pesticidas en el ritmo circadiano de la actividad motora en machos y hembras. Los valores representan la media±SEM de VH=27, CYP=20, END=15, CARB=10, CPF0.3=12, CPF1=14 para los machos (A, B), y para las hembras (C, D) VH=26, CYP=13, END=11, CARB=11, CPF0.3=10, CPF1=9. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, *p<0.05; **p<0.01 y ***p<0.001.

Como se puede apreciar en las Figs. 12A y C, la actividad ambulatoria espontánea, tanto durante el día como por la noche, es mayor en las hembras que en los machos. Sin embargo no hay diferencias en la actividad vertical.

3- Efecto de la exposición a pesticidas en la actividad motora.

3.1- Actividad ambulatoria.

La exposición a la concentración más baja de CPF (0,1 mg/kg/día) aumenta la actividad ambulatoria (m.a) en ratas macho expuestas a un ambiente nuevo (1471 ± 114 m.a, $p < 0.001$), respecto a las ratas control (1000 m.a ± 56), ($F(7,132)=5.85$, $p < 0.001$). Los machos expuestos a CYP tienen menor actividad ambulatoria (785 ± 62 m.a, $p < 0.05$) comparado con los controles (Fig. 13A).

En el caso de las hembras también se observa un aumento de la actividad ambulatoria en aquellas ratas expuestas a CPF 0.1 mg/kg/día (2491 m.a ± 158 , $p < 0.05$) respecto a las ratas control (1978 m.a ± 103), $F(6,114)=3.26$, $p < 0.01$ y ninguno de los otros pesticidas altera significativamente la actividad ambulatoria (Fig. 13B).

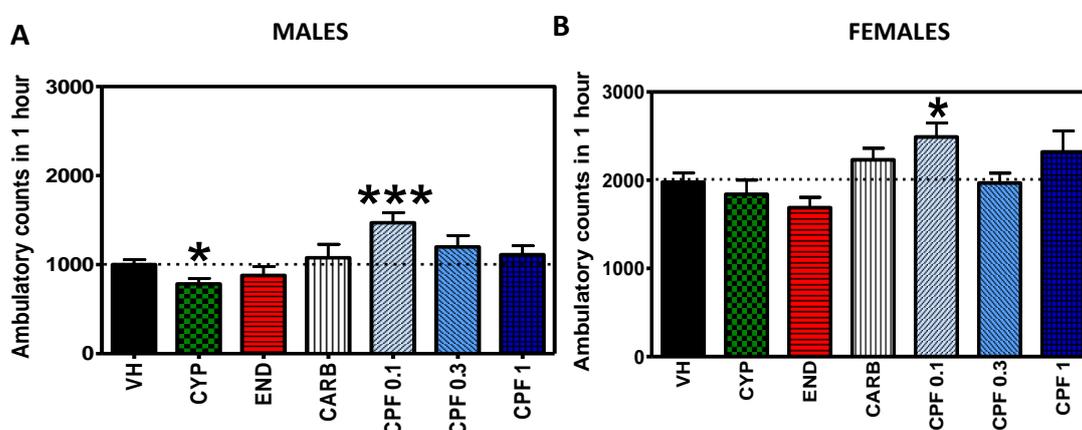


Figura 13. Efecto de la exposición a pesticidas en la actividad motora ambulatoria en machos y hembras. La actividad motora se registró durante la primera hora en un ambiente nuevo. Los valores representan la media \pm SEM de VH=31, CYP=19, END=20, CARB=11, CPF0.1=8, CPF0.3=20, CPF1=17 para los machos (A) y para las hembras (B) VH=35, CYP=17, END=25, CARB=16, CPF0.1=5, CPF0.3=20, CPF1=14. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, * $p < 0.05$; *** $P < 0.001$.

Si se comparan las gráficas A y B se observa que las hembras controles realizan aproximadamente el doble de movimientos ambulatorios que los machos control.

3.2- Actividad vertical

La exposición a CARB (324 ± 35 m.v) o a la concentración más alta de CPF (1 mg/kg/día) (305 ± 23 m.v) aumentan ($p < 0.05$) la actividad vertical comparado con los controles (248 ± 14 m.v) en ratas macho, ($F(6,128) = 2.46$, $p < 0.05$) (Fig. 14A). En las hembras ningún pesticida alteró la actividad vertical (Fig. 14B).

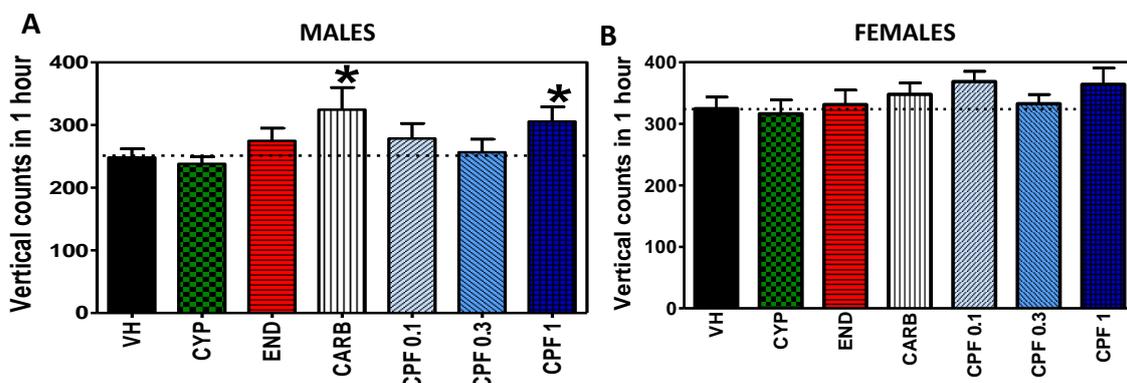


Figura 14. Efecto de la exposición a pesticidas en la actividad motora: actividad vertical en machos y hembras. Los valores representan la media \pm SEM del siguiente número de animales: machos (A) VH=29, CYP=18, END=21, CARB= 10, CPF0.1=8, CPF0.3=20, CPF1=17; hembras (B) VH=36, CYP=19, END=25, CARB=17, CPF0.1=5, CPF0.3=20, CPF1=14. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, $*p < 0.05$.

3.3- Movimientos estereotípicos

Solamente las ratas macho expuestas a CPF (0.1 ó 1 mg/kg/día) presentan un mayor número de movimientos estereotípicos (m.e.) (6558 ± 341 m.e. y 6270 ± 221 m.e., respectivamente, $p < 0.05$) comparado con las ratas control (5650 ± 169 m.e.), ($F(7,128) = 1.53$, $p > 0.05$). Ningún otro pesticida afectó estos movimientos en los machos y ningún pesticida tuvo efecto en las hembras (Figs. 15A y B).

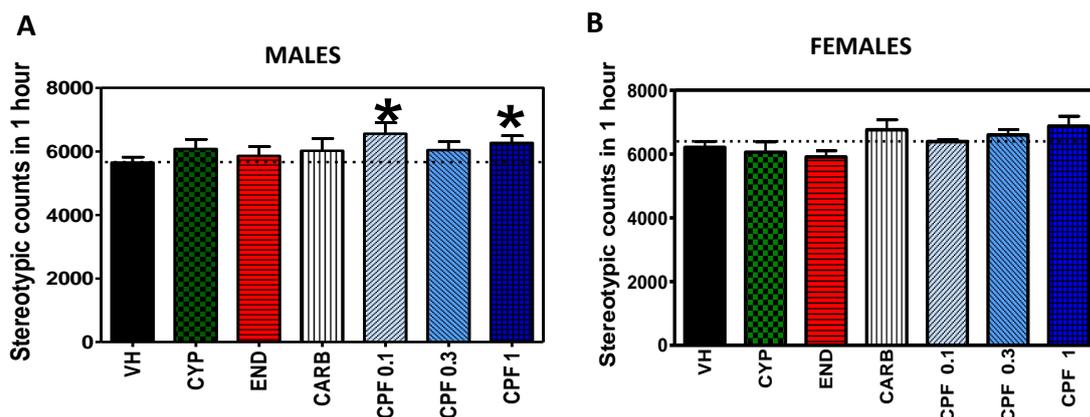


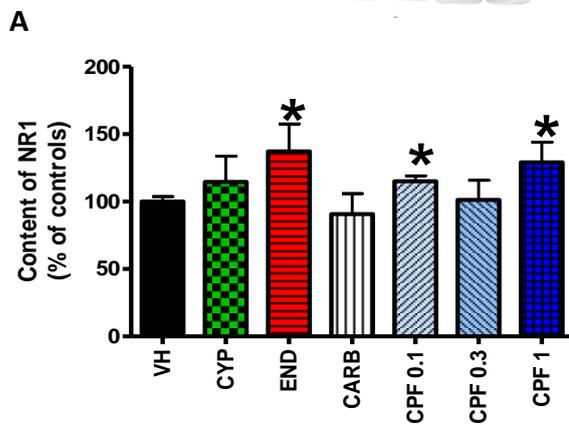
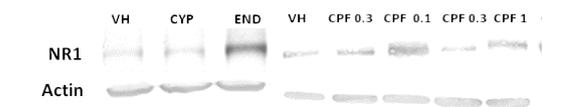
Figura 15. Efecto de la exposición a pesticidas en la actividad motora: movimientos estereotípicos en machos y hembras. Los valores representan la media±SEM de machos (A) VH=29, CYP=18, END=21, CARB= 10, CPF0.1=8, CPF0.3=20, CPF1=17; hembras (B) VH=36, CYP=19, END=25, CARB=17, CPF0.1=5, CPF0.3=20, CPF1=14. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, * $p < 0.05$.

El análisis de la actividad motora en machos y hembras muestra que las hembras control tienen mayor actividad motora que los machos control, ya que muestran mayor número de movimientos ambulatorios, verticales y estereotípicos. En general el CPF y el CARB, que comparten un mecanismo de acción común, aumentan la actividad motora, mientras que el CYP la disminuye (Figs. 13, 14 y 15).

4- Efecto de la exposición a pesticidas en el contenido de las subunidades del receptor NMDA en hipocampo y correlación con la actividad ambulatoria en machos y hembras.

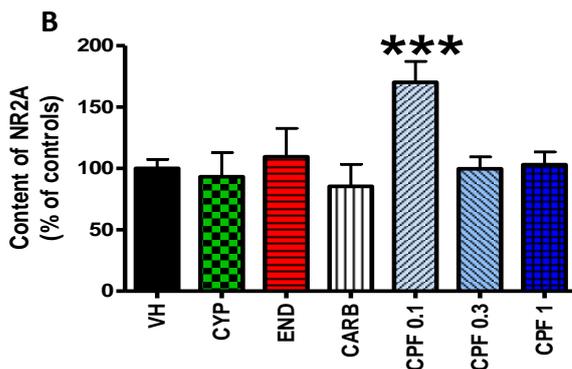
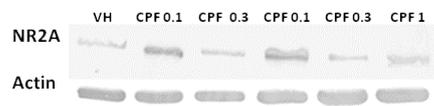
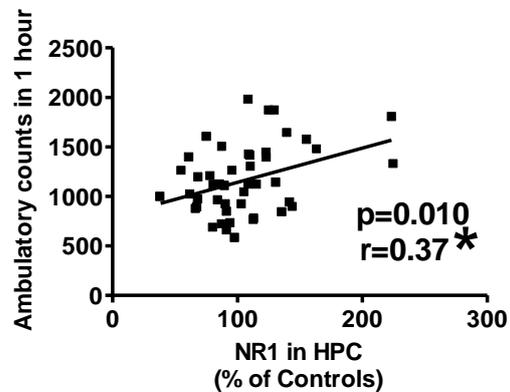
La neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica en el estriado modula la actividad motora. La activación de receptores NMDA en el hipocampo induce liberación de dopamina en el estriado y aumento de la actividad motora. Por ello analizamos el contenido de las diferentes subunidades del receptor NMDA en el hipocampo. El contenido de la subunidad NR1 del receptor NMDA está aumentado en ratas macho expuestas a END ($137 \pm 20\%$, $p < 0.05$), CPF 0.1 ($115 \pm 4\%$, $p < 0.05$) o 1 mg/kg/día ($129 \pm 15\%$, $p < 0.05$) si se compara con las ratas control, $F(6,65)=1.88$, $p < 0.05$ (Fig. 16A). El contenido de NR2A está significativamente aumentado por exposición a CPF (0.1 mg/kg/día) ($170 \pm 17\%$ de los controles, $p < 0.001$) ($F(6,55)=4.2$, $p < 0.01$) (Fig. 16B) y la subunidad NR2B está también aumentada en machos expuestos a 0.1 mg/kg/día de CPF ($175 \pm 21\%$ de los controles, $p < 0.001$), mientras que está reducida en los machos expuestos a CYP ($72 \pm 14\%$ de los controles, $p < 0.05$) o END ($79 \pm 5\%$ de los controles,

$p < 0.05$) ($F(6,55)=5.8$, $p < 0.0001$) (Fig. 16C). En hembras, el contenido de NR1 no se ve alterado por exposición a los pesticidas (Fig. 16 G). El contenido de NR2A está disminuido en ratas expuestas a CYP ($64 \pm 10\%$ del control $p < 0.05$) o END ($67 \pm 11\%$ de los controles, $p < 0.05$) ($F(6,43)=2.5$, $p < 0.05$) (Fig. 16 H). La exposición a CPF 0.1 mg/kg/día ($65 \pm 14\%$ de los controles, $p < 0.05$) disminuye el contenido de NR2B ($F(6,43)=2.4$, $p < 0.05$) y la exposición a CARB aumenta su contenido en hembras respecto a las controles ($144 \pm 24\%$ de los controles, $p < 0.05$) ($F(6,43)=2.4$, $p < 0.05$) (Fig. 16 I). Analizamos si existe correlación entre el contenido de las diferentes subunidades del receptor NMDA en el hipocampo y la actividad ambulatoria. Existe una correlación positiva entre el contenido de cada subunidad del receptor NMDA en hipocampo y la actividad ambulatoria en los machos: NR1 $r=0.37$, $p < 0.05$; NR2A $r=0.37$, $p < 0.05$ y NR2B $r=0.45$, $p < 0.01$ (Figs. 16D-F). Sin embargo, en las hembras no se encontró correlación con ninguna de las subunidades del receptor NMDA (Figs. 16J-L).

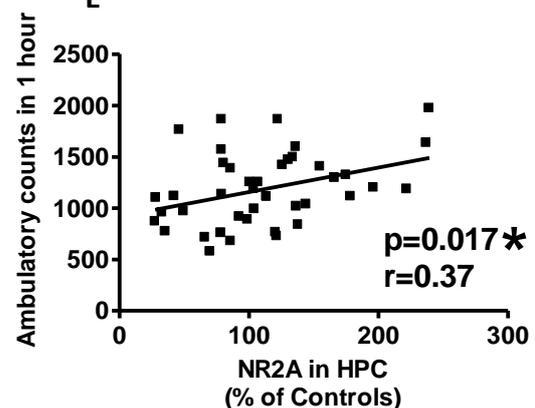


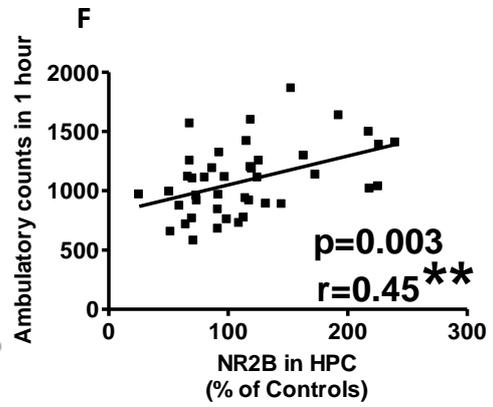
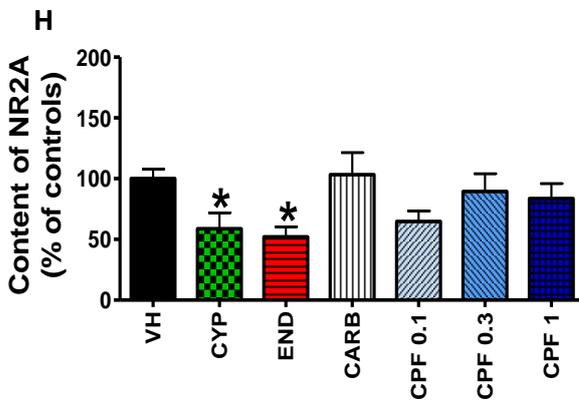
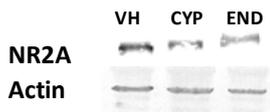
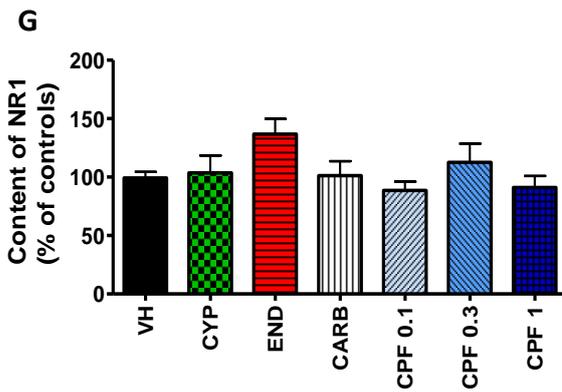
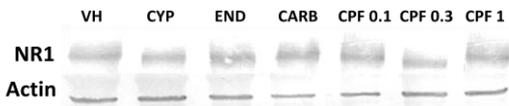
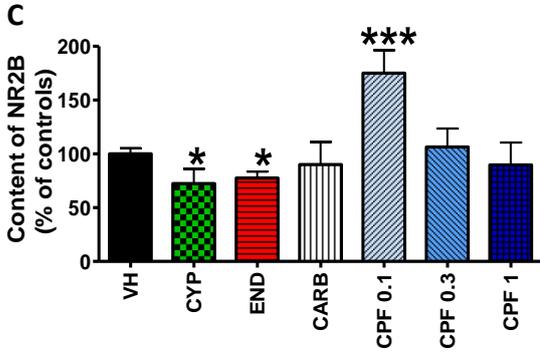
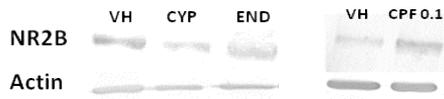
MALES

D

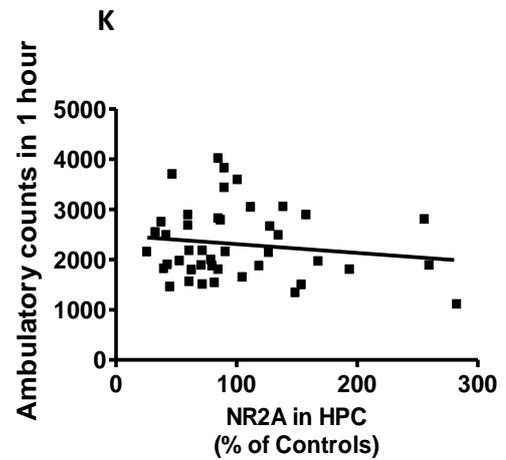
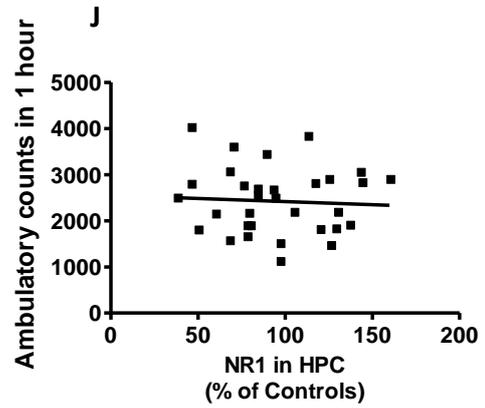


E





FEMALES



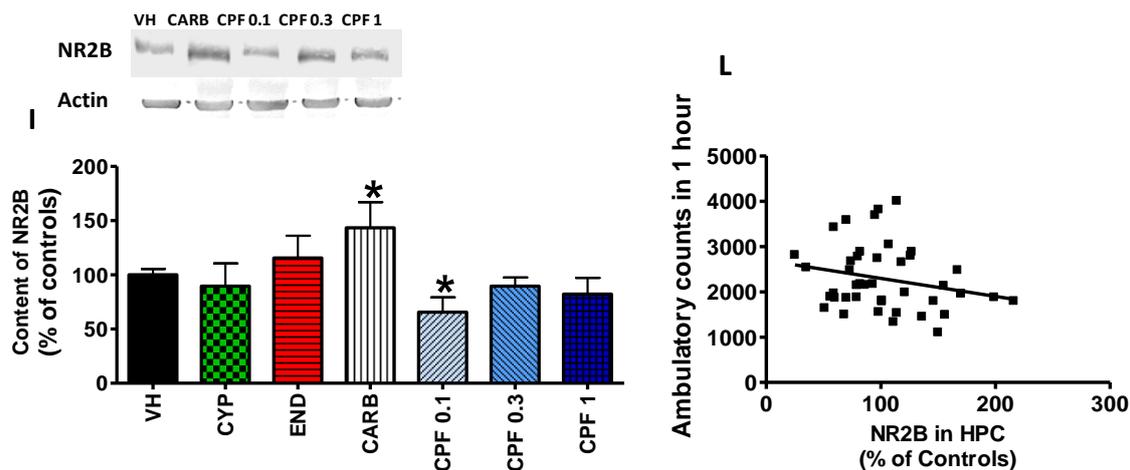


Figura 16. Efecto de la exposición a pesticidas en el contenido de las subunidades del receptor NMDA en el hipocampo y correlación con la actividad ambulatoria. El contenido de las subunidades del receptor NMDA se analizó en homogenizados de hipocampo de machos (A-C) y hembras (G-I) por western blot. Los valores representan la media±SEM de VH=20, CYP=7, END=7, CARB=9, CPF 0.1=6, CPF0.3=10, CPF1=7, para los machos y VH=12, CYP=6, END=6, CARB=8, CPF 0.1=6, CPF0.3=6, CPF1=6, para las hembras. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, * $p < 0.05$; *** $P < 0.001$. Correlación entre el contenido de las subunidades NR1 (D), NR2A (E) y NR2B (F) del receptor NMDA y la actividad ambulatoria en machos. Cada punto representa el contenido de la subunidad y la actividad ambulatoria durante la primera hora en un ambiente nuevo para cada rata. El número de animales es el mismo que en las figuras A-C. J-L gráficas de correlación en las hembras.

5- Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en la coordinación motora en el rotarod

El tiempo que permanecen en el rotarod las ratas macho expuestas a cualquier pesticida no varía significativamente comparado con el tiempo de los machos control (Fig. 17A). Por tanto, la exposición perinatal a pesticidas en machos no altera la coordinación motora en el rotarod.

En cuanto a las hembras, la exposición a CYP, END o CPF 0.3mg/kg/día reduce el tiempo de permanencia en el rotarod. Las ratas control permanecen una media de 185 ± 11 s en el rotarod, las hembras expuestas a CYP, 136 ± 17 s ($p < 0.05$), las expuestas a END 145 ± 11 s ($p < 0.05$), y las expuestas a 0.3 mg/kg/día de CPF 146 ± 15 s ($p < 0.05$) (Fig. 17B). Por tanto, estos pesticidas empeoran la coordinación motora de las hembras en el rotarod. El análisis con ANOVA de una vía dio los siguientes resultados: $F(6,108)=3.13$, $p < 0.01$. Estos resultados sugieren que las ratas hembra parecen ser más sensibles que los machos a los efectos de los pesticidas sobre la coordinación motora en

el rotarod. También se ha observado que las hembras control permanecen más tiempo en el rotarod que los machos control (Figs. 17 A y B).

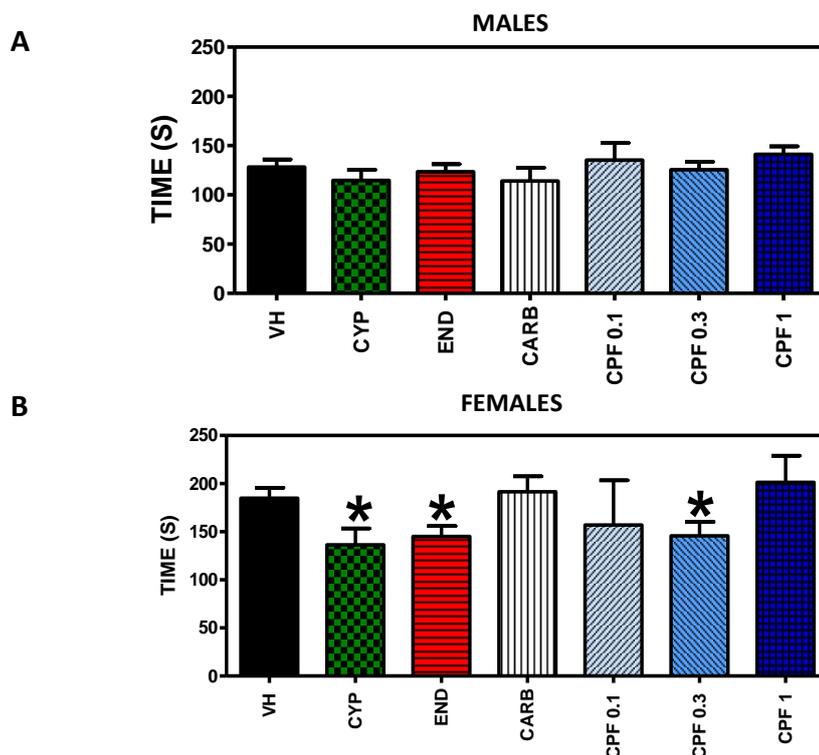


Figura 17. Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en la coordinación motora en el rotarod en machos y hembras. Se representa el tiempo de permanencia en el rotarod, antes de caerse. Los valores representan la media \pm SEM del siguiente número de machos (A) VH=22, CYP=12, END=14, CARB=12, CPF0.1=7, CPF0.3=21, CPF1=21 y hembras (B) VH=25, CYP=13, END=19, CARB=11, CPF0.1=3, CPF0.3=17, CPF1=12. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, * p <0.05.

6-Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en la coordinación motora en el *beam walking*

Además del rotarod hemos utilizado el test *beam walking* para analizar la coordinación motora. Este test permite detectar alteraciones más sutiles de coordinación motora, mide movimientos más finos. En ratas macho la exposición a CARB o CPF 0.3 mg/kg/día aumenta el número de resbalones en el *beam walking* (1.7 ± 0.36 , $p < 0.01$ y 1.3 ± 0.21 , $p < 0.05$ respectivamente) respecto a los controles (0.8 ± 0.12), ($F(6,129)=2.55$, $p < 0.01$), lo cual indica que tienen deteriorada la coordinación motora (Fig. 18A).

En cuanto a las hembras, únicamente la exposición a END aumenta el número de resbalones (1.1 ± 0.17 , $p < 0.01$) comparado con las ratas control (0.68 ± 0.09) ($F(6,126)=1.09$, $p > 0.05$) (Fig. 18B). Por tanto, el END deteriora la coordinación motora en hembras, tanto en el rotarod como en el *beam walking*.

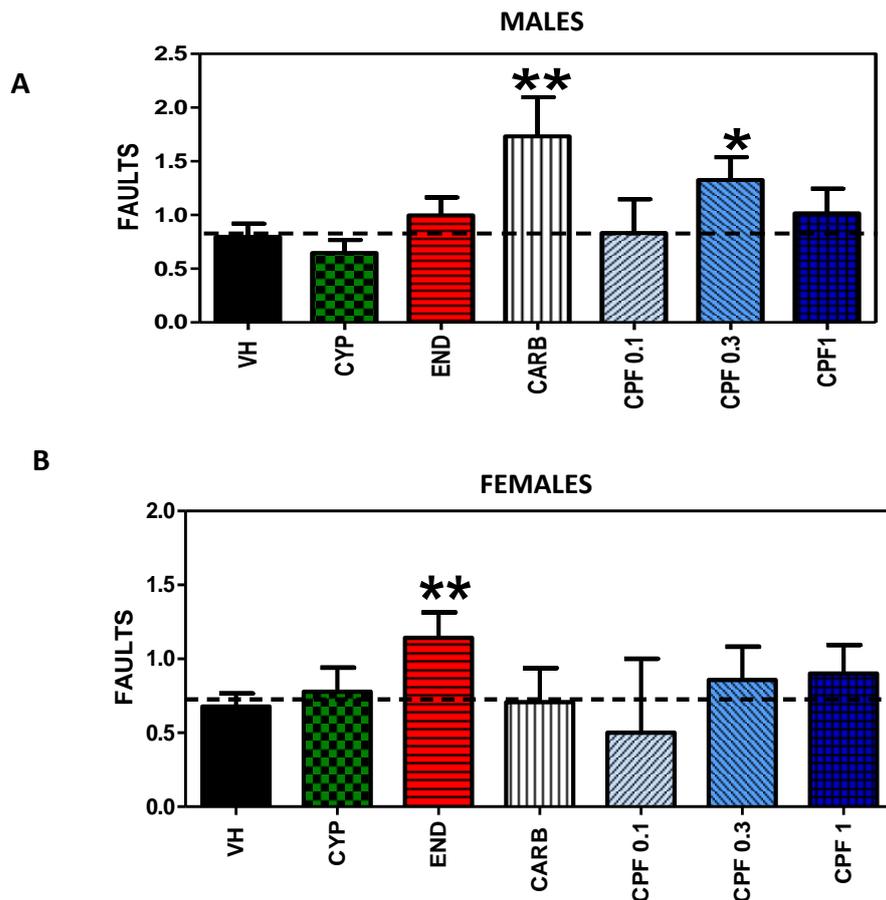


Figura 18. Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en la coordinación motora en el *beam walking* en machos y hembras. Se representan el número de resbalones mientras atraviesan el listón. Los valores representan la media \pm SEM del siguiente número de animales: machos (A), VH=32, CYP=16, END=19, CARB=15, CPF0.1=6, CPF0.3=13, CPF1=15; hembras (B), VH=36, CYP=20, END=22, CARB=12, CPF0.1=3, CPF0.3=14, CPF1=14. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, * p <0.05; ** p <0.01.

7- Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en los niveles extracelulares de GABA

Puesto que la neurotransmisión GABAérgica en el cerebelo modula la coordinación motora hemos analizado si la exposición a los pesticidas altera el contenido de GABA extracelular en cerebelo y esto podría contribuir a la incoordinación motora en las ratas expuestas a los pesticidas. En las ratas macho expuestas a CPF 0.3 mg/kg/día está aumentada significativamente la concentración basal extracelular de GABA en el cerebelo (9.5 ± 2.6 nM en ratas control y 30 ± 6.7 nM en las ratas expuestas a CPF, $p < 0.01$), ($F(5,37)=4.6$, $p < 0.01$). Ningún otro pesticida altera significativamente la concentración extracelular de GABA en los machos (Fig. 19A).

En ratas hembra la exposición a CYP o END aumenta los niveles basales extracelulares de GABA: (24 ± 8.9 nM, $p < 0.05$ y 22 ± 4.5 nM, $p < 0.01$ respectivamente), respecto a las hembras control (9 ± 2.1 nM), ($F(5,39)=3.5$, $p < 0.05$) (Fig. 19B).

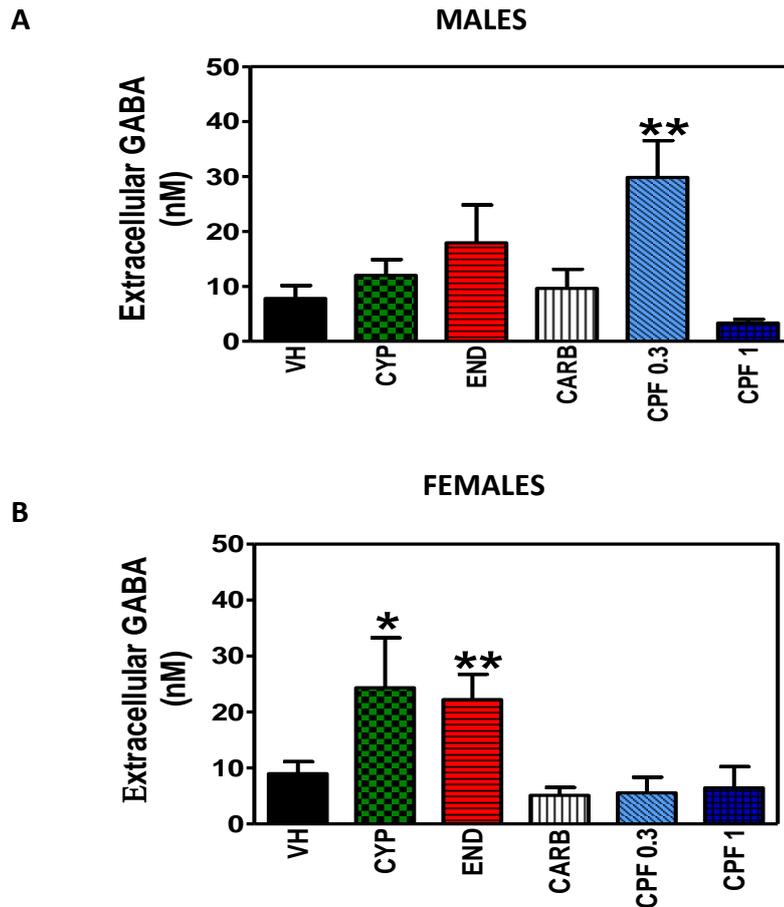


Figura 19. Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en los niveles extracelulares de GABA en el cerebelo de machos y hembras. Se obtuvo líquido extracelular del cerebelo por microdiálisis cerebral in vivo y en él se analizó el contenido de GABA por HPLC. Los valores representan la media \pm SEM del siguiente número de animales: machos (A) VH=10, CYP=9, END=6, CARB=3, CPF0.3=5, CPF1=6; hembras (B) VH=14, CYP=7, END=9, CARB=6, CPF0.3=5, CPF=4. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

8- Correlación entre los niveles extracelulares de GABA y la coordinación motora.

En las hembras se ve claramente que el CYP y el END aumentan los niveles de GABA e inducen incoordinación motora (Figs. 17B y 19B). Sin embargo, en el caso de la exposición a CPF 0.3 mg/kg/día, el aumento del GABA extracelular en el cerebelo de los machos (Fig. 19A) no se traduce en una incoordinación motora en el rotarod (Fig. 17A), aunque sí en el *beam walking* (Fig. 18A). En el caso de las hembras ocurre al revés, las ratas expuestas a CPF permanecen menos tiempo en el rotarod y sin embargo no observamos un aumento del GABA extracelular (Figs.17B y 19B).

8.1 Correlación entre la concentración extracelular de GABA en cerebelo y el tiempo en el rotarod.

Para determinar si las alteraciones en los niveles de GABA extracelular en el cerebelo están implicadas en la incoordinación motora inducida por los pesticidas, se ha analizado si existe correlación entre la concentración extracelular de GABA en cerebelo y el tiempo de permanencia en el rotarod. Como se puede observar en la figura 20, hay una correlación inversa significativa, tanto en machos ($r=-0.44$, $p<0.01$, Fig. 20A) como en hembras ($r=-0.42$, $p<0.05$, Fig. 20B).

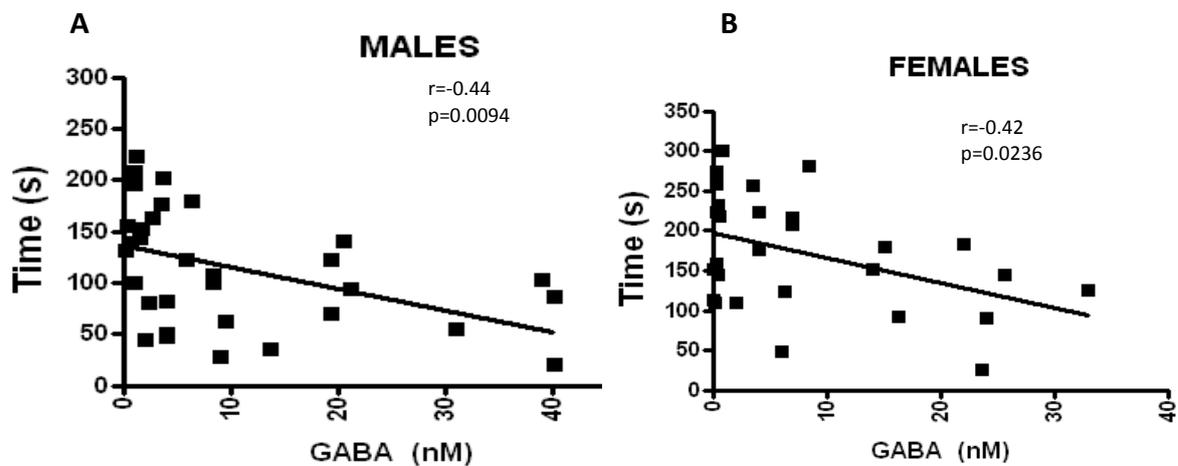


Figura 20. Correlación entre los niveles extracelulares de GABA y el tiempo en el rotarod en machos y hembras. Cada punto representa la concentración de GABA y el tiempo en el rotarod para cada rata. Los valores son la media \pm SEM de 30 machos (A) y 29 hembras (B).

8.2- Correlación entre los niveles extracelulares de GABA y el número de resbalones en el *beam walking*.

También analizamos si existe correlación entre los niveles extracelulares de GABA en cerebelo y el número de resbalones en el *beam walking*. Hay una correlación positiva significativa en las hembras ($r=0.30$, $p<0.05$, Fig. 21B) pero no en los machos ($r=0.07$, $p>0.05$, Fig. 21A).

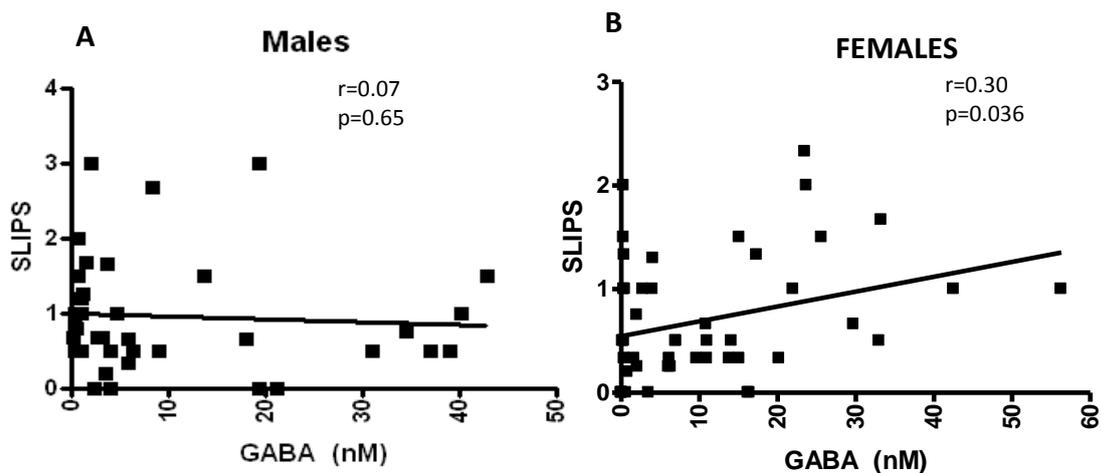


Figura 21. Correlación entre los niveles extracelulares basales de GABA en el cerebelo y el número de resbalones en el *beam walking* en machos (A) y hembras (B). Cada punto representa la concentración extracelular de GABA y los resbalones para cada rata. Los valores son la media \pm SEM de 30 machos y 29 hembras.

9- Efecto de la exposición perinatal a pesticidas sobre el aprendizaje asociativo.

Utilizamos el test de evitación activa para analizar si la exposición durante el desarrollo a los diferentes pesticidas altera el aprendizaje asociativo. Las ratas macho expuestas a END evitan menos veces la descarga (20 ± 1.8 evitaciones, $p<0.05$) respecto a las controles (26.5 ± 1.5 evitaciones), indicando que tienen un deterioro en el aprendizaje asociativo, ya que necesitan más ensayos para aprender a asociar el estímulo condicionado sonoro con el posterior estímulo incondicionado (descarga eléctrica) (Fig. 22A). Sin embargo aquellas ratas expuestas a las concentraciones más altas de CPF ($0.3-1\text{mg/kg/día}$) evitan un mayor número de descargas (36.7 ± 2.5 y 36.2 ± 2.5 evitaciones, respectivamente, $p<0.01$) respecto a las control, indicando mejor aprendizaje asociativo, ($F(6,72)=4.3$, $p<0.001$) (Fig. 22A).

Las hembras expuestas a CARB (21 ± 2.5 evitaciones, $p<0.001$) o CPF 0.3 o 1mg/kg/día (23 ± 2.3 evitaciones, $p<0.01$ y 21 ± 1.1 evitaciones, $p<0.05$, respectivamente) tienen dificultades para asociar el estímulo con la posterior descarga y la evitan menos veces comparado con las ratas control (32 ± 1.8 evitaciones), ($F(6,89)=4.72$, $p<0,001$) (Fig. 22B).

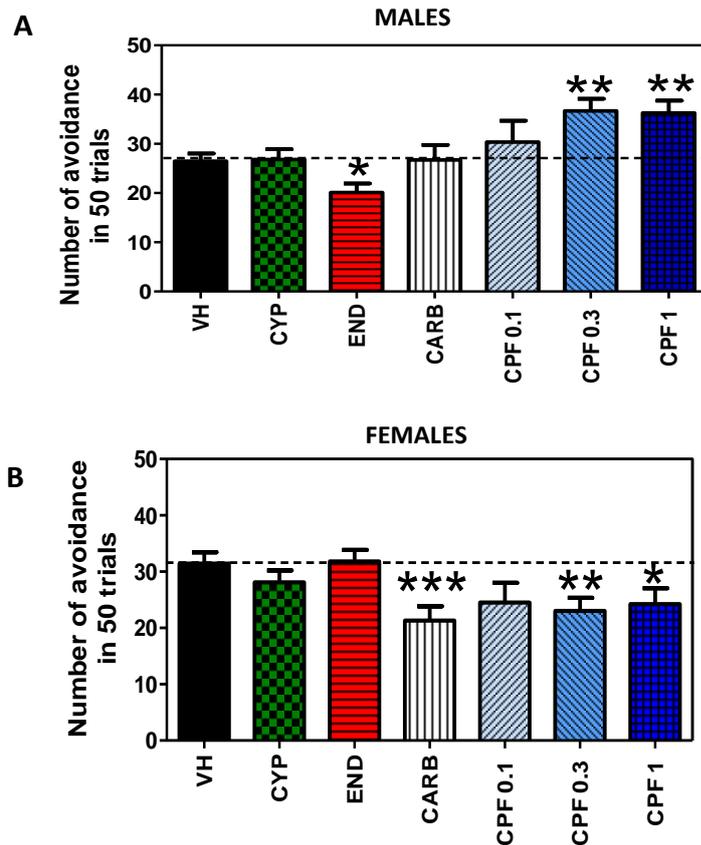


Figura 22. Efecto de la exposición perinatal a pesticidas en la tarea de evitación activa. Se representa el número de evitaciones en 50 ensayos, en machos (A) y hembras (B). Los valores representan la media±SEM del siguiente número de animales: machos VH=25, CYP=17, END=9, CARB=7, CPF0.1=3, CPF0.3=6, CPF1=8; hembras VH=22, CYP=12, END=20, CARB=13, CPF0.1=2, CPF0.3=10, CPF1=9. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $P<0.001$.

Las ratas hembra controles evitan un número significativamente ($p<0.05$) mayor de veces la descarga que las ratas macho control (Fig. 23). Esto sugiere que las hembras tienen mejor aprendizaje asociativo que los machos.

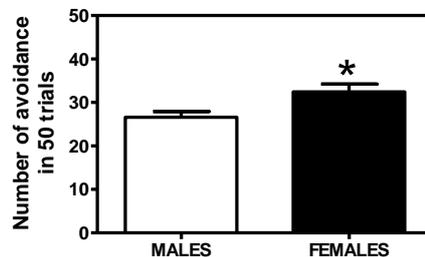


Figura 23. Diferencias de género en el aprendizaje asociativo en ratas controles. Se representa el número de evitaciones en 50 ensayos. Los valores son la media±SEM de 34 machos y 21 hembras. Los valores significativamente diferentes de los machos se indican con asteriscos, * $p<0.05$.

10- Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en el aprendizaje espacial y memoria de trabajo en el laberinto radial

10.1- Índice de aprendizaje

A lo largo de los cinco días que dura el entrenamiento las ratas aprenden en que brazos tienen la comida, lo cual se traduce con un aumento del índice de aprendizaje tanto en machos como en hembras (Figs. 24 A y C). Las ratas macho expuestas a CYP, END y CPF muestran un aumento menor del índice de aprendizaje a lo largo del tiempo, es decir, tardan más en aprender (Fig. 24 A). El análisis estadístico, en todas las gráficas de aprendizaje a lo largo de los días de entrenamiento, consistió en una ANOVA de dos vías, en la cual las variables fueron el tiempo y el pesticida. En el índice de aprendizaje, el efecto del tiempo es significativo tanto en machos $F(4,252)=58$, $p<0.0001$ como en hembras $F(4,272)=68$, $p<0.0001$. El efecto de los pesticidas es significativo, $F(6,252)=4.3$, $p<0.01$ en los machos, pero no hay interacción significativa entre ambas variables ni en machos ni en hembras.

El día cuatro de entrenamiento se observan las mayores diferencias entre las ratas macho control y las expuestas a pesticidas (Fig. 24B). El índice de aprendizaje es significativamente menor en machos expuestos a CYP (7.6 ± 1 , $p<0.01$), END (7.2 ± 0.8 , $p<0.001$), CPF 0,3 o 1 mg/kg/día (5.2 ± 0.8 y 7.1 ± 0.8 , $p<0.001$) respecto a los controles (12 ± 0.9) (Fig. 24B). La ANOVA de una vía indica un efecto significativo de los pesticidas: $F(7,73)=7.6$, $p<0.0001$. En hembras la exposición a CPF 1mg/kg/día incrementa el índice de aprendizaje significativamente (11 ± 1 , $p<0.05$) respecto a las ratas hembras control (7.3 ± 0.8), el día cuatro de entrenamiento (Fig. 24D). Los datos estadísticos para la ANOVA de una vía son $F(7,73)=2.4$, $p<0.05$.

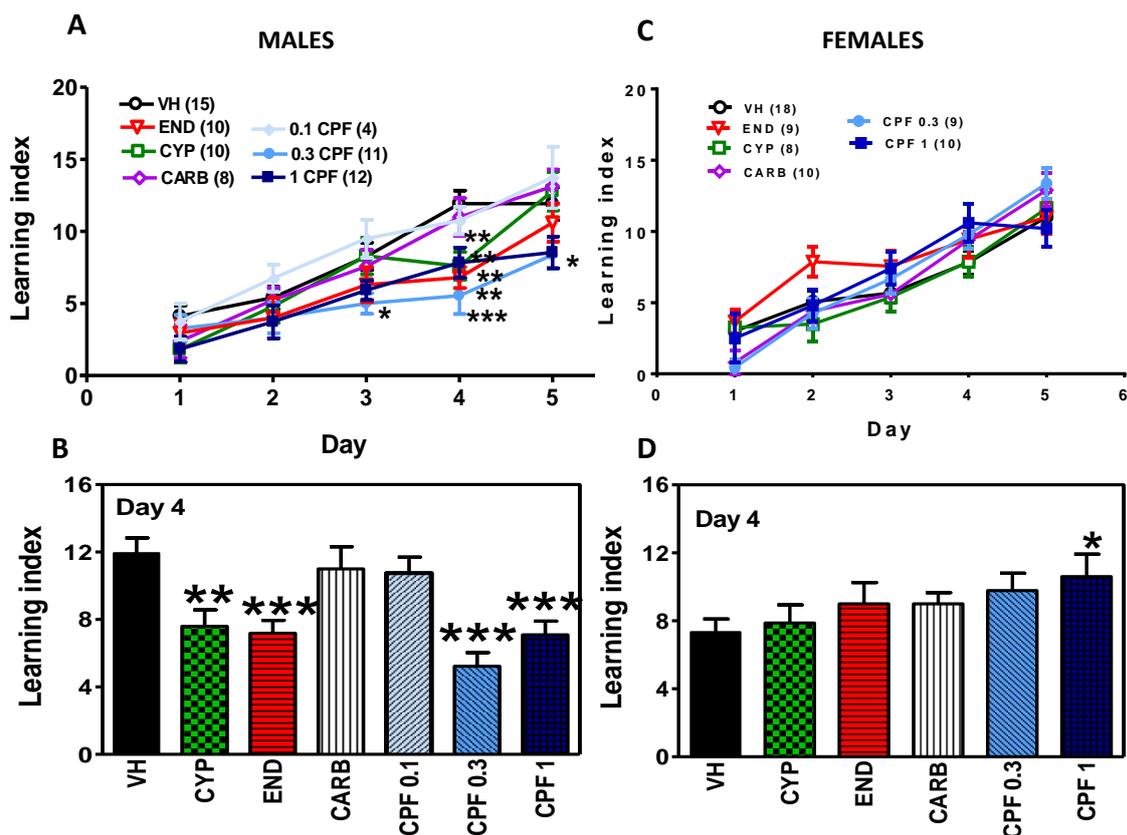


Figura 24: Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en el índice de aprendizaje en el laberinto radial en machos (A, B) y hembras (C, D). Se representa el índice de aprendizaje a lo largo del entrenamiento (A, C) y el día 4 (B, D). Los valores son la media±SEM del número de animales indicado entre paréntesis en cada grupo. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos, *p<0.05; **p<0.01 y ***p<0.001.

10.2- Errores de referencia

Se cuantificaron los errores de referencia (entradas en brazos sin comida por primera vez). Estos se reducen a lo largo de los cinco días de entrenamiento, en concordancia con el aumento del índice de aprendizaje (Fig. 25A y C). El tiempo tiene un efecto significativo tanto en machos $F(4,232)=31$, $p<0.0001$, como en hembras $F(4,252)=37$, $p<0.0001$. Los machos, pero no las hembras, expuestos a CYP, END y CPF cometen más errores a lo largo del entrenamiento (Fig.25A). El efecto de la exposición a los pesticidas es significativo en machos $F(6,232)=3.6$, $p<0.01$. La interacción entre el tiempo y los pesticidas en este caso también es significativa $F(24,232)=1.57$, $p<0.05$ en los machos. En las hembras la interacción no es significativa ($F(24,252)=9.96$, $p>0.05$), pero sí el efecto de los pesticidas ($F(6,252)=1.7$, $p<0.05$), debido a que la exposición a la concentración más alta de CPF (1mg/kg/día) reduce significativamente los errores de referencia (Fig. 25C). El día 4 se observa el mayor efecto de los pesticidas, pero la

exposición a la dosis más alta de CPF también aumenta los errores de referencia los días 3 y 5, indicando que el efecto es mayor que el de otros pesticidas o la dosis más baja de CPF en machos (Fig. 25A).

Los machos expuestos a CYP (12 ± 1 , $p < 0.01$), END (12 ± 1 , $p < 0.01$) o CPF 0.3 (14 ± 1 , $p < 0.001$) y CPF 1mg/kg/día (12 ± 1 , $p < 0.01$), cometen más errores de referencia que los machos control (8 ± 1) el día cuatro de entrenamiento. ANOVA: $F(6,61) = 6.1$, $p < 0.0001$ (Fig. 25B). En las hembras la exposición a la concentración más alta de CPF (1mg/kg/día) reduce significativamente los errores de referencia el día cuatro del entrenamiento (9 ± 1 , $p < 0.05$) respecto a las controles (12 ± 1), ANOVA: $F(6,60) = 2.6$, $p < 0.05$ (Fig. 25D). Esto indica que ninguno de los pesticidas usados perjudica el aprendizaje espacial en el laberinto radial en hembras sino que incluso la dosis más alta de CPF lo mejora.

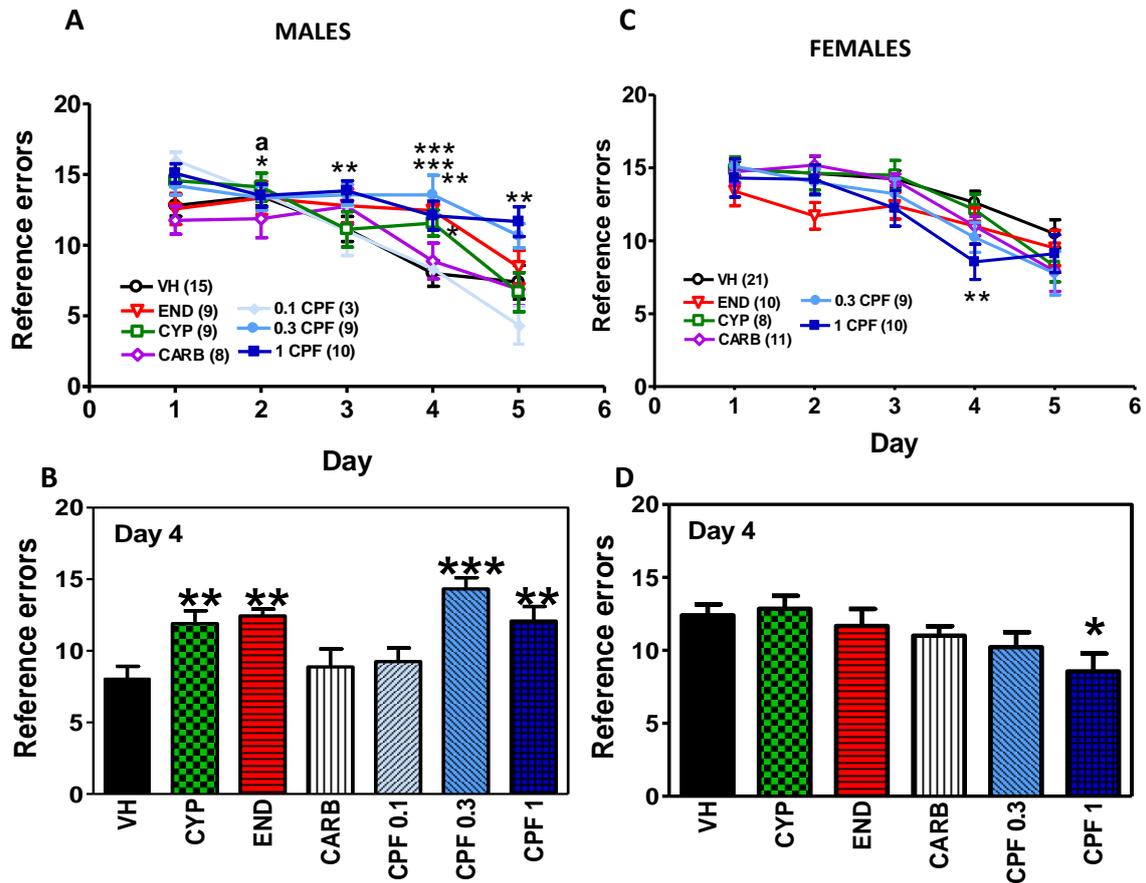


Figura 25: Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en los errores de referencia en el laberinto radial en machos (A,B) y hembras (C,D). Se representan los errores a lo largo del entrenamiento (A,C) y el día 4 (B,D). Los valores son la media \pm SEM del número de animales indicados entre paréntesis para cada grupo. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

10.3- Errores de trabajo

En el mismo test se ha analizado también la memoria de trabajo cuantificando los errores de trabajo como el número de re-entradas en brazos visitados anteriormente en el mismo ensayo. Al igual que los parámetros anteriores los errores de trabajo también se reducen a lo largo del entrenamiento, siendo el efecto del tiempo significativo tanto en machos $F(4,296)=16$, $p<0.0001$ como en hembras $F(4,284)=18$, $p<0.0001$ (Figs. 26A y C). La exposición a CPF (0.3 y 1 mg/kg/día) aumenta significativamente el número de errores de trabajo en los machos (Fig.26A). El efecto de los pesticidas es significativo $F(6,296)=3.8$, $p<0.01$, pero no hay interacción con el tiempo, $F(24,296)=0.9$, $p>0.05$. Al contrario que en los machos, los errores de trabajo no aumentan por exposición a ningún pesticida en ratas hembra (Fig.26C). No hay efecto significativo de los pesticidas: $F(7,284)=1.2$, $p>0.05$ y la interacción tampoco es significativa: $F(24,284)=24.30$, $p>0.05$.

El número total de errores de trabajo es significativamente mayor en las ratas macho expuestas a CPF 0.3 mg/kg/día (39 ± 7 , $p<0.05$) o 1 mg/kg/día (41 ± 6 , $p<0.01$) que en las ratas control (24 ± 3), lo cual indica deterioro de la memoria de trabajo (ANOVA de una vía: $F(7,78)=3.8$, $p<0.01$) (Fig. 26B). En hembras, la exposición a CYP reduce (23 ± 3 , $p<0.05$) los errores de trabajo totales comparado con las hembras control (36 ± 4), $F(7,66)=2.2$, $p<0.05$ (Fig.26D), sugiriendo que el CYP mejora la memoria de trabajo en las hembras.

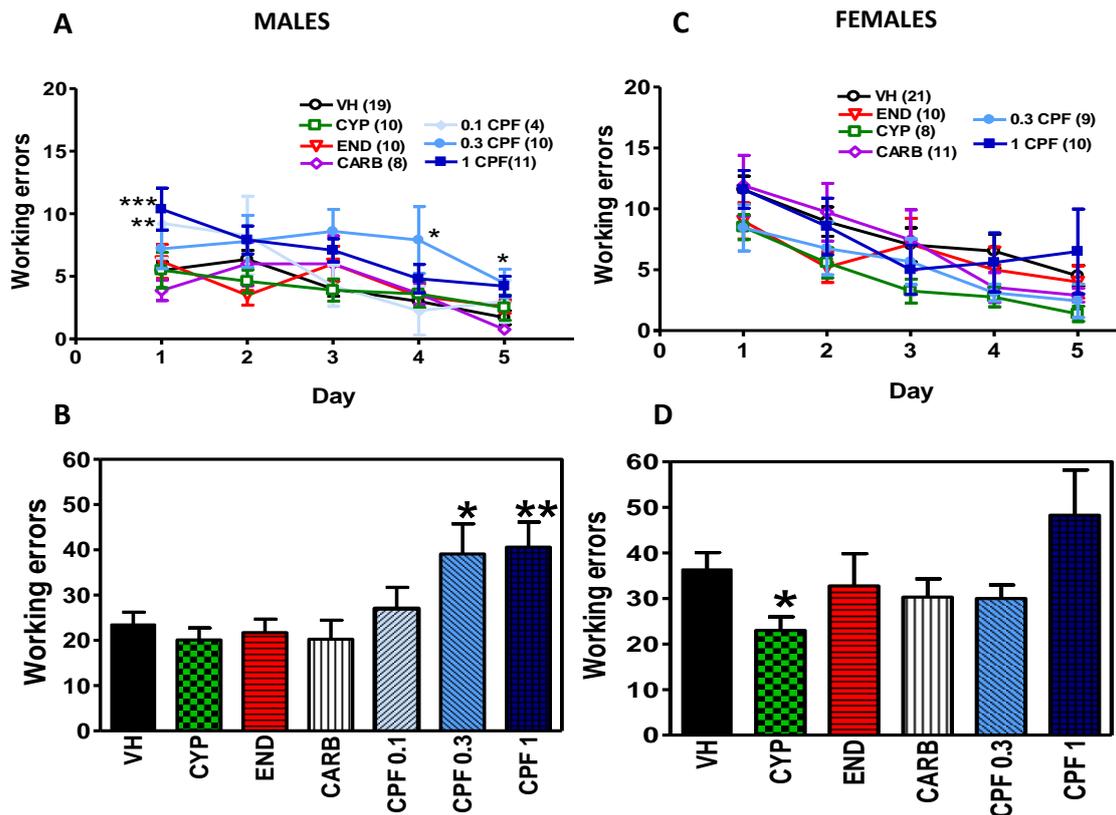


Figura 26: Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en los errores de trabajo en el laberinto radial en machos (A, B) y hembras (C, D). Se representan los errores a lo largo del entrenamiento (A, C) y los errores totales (B, D). Los valores son la media±SEM del número de animales indicados entre paréntesis para cada grupo. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

11- Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en el aprendizaje y memoria espaciales en el laberinto acuático de Morris.

El parámetro que se ha medido es el tiempo en alcanzar la plataforma. A lo largo de los días que dura el entrenamiento las ratas aprenden donde está la plataforma y esto se traduce en una disminución del tiempo que tardan en alcanzarla (Figs. 27 A y C). Como en el laberinto radial, se ha realizado una ANOVA de dos vías (tiempo y pesticida) para el análisis estadístico de estos datos.

El efecto del tiempo es significativo tanto en machos $F(2,120)=80$, $p < 0.0001$ como en hembras $F(2,122)=64$, $p < 0.0001$. En los machos la exposición a algunos pesticidas aumenta el tiempo en alcanzar la plataforma. El efecto de los pesticidas es significativo en machos ($F(6,120)=2.5$, $p < 0.05$). En cuanto a las hembras, ningún pesticida deteriora el aprendizaje espacial. El CYP mejora el aprendizaje, tanto en machos como en hembras. Así, también hay un efecto significativo de la variable pesticida en las

hembras ($F(6,122)=2.6$, $p<0.05$). La interacción no es significativa ni en machos $F(12,120)=1.54$, $p>0.05$ ni en hembras $F(12,122)=0.70$, $p>0.05$ (Figs. 27A y C).

Puesto que el día tres de entrenamiento se observan los efectos más claros, se compararon los datos a este tiempo. La exposición a END ($64\pm 11s$, $p<0.05$) o CPF 0,1 mg/kg/día ($81\pm 14s$, $p<0.01$), CPF 0.3 ($62\pm 7s$, $p<0.05$) y CPF 1 ($63\pm 10s$, $p<0.05$) aumenta el tiempo en alcanzar la plataforma en los machos, respecto a los controles ($38\pm 6s$) el día tres de entrenamiento, lo que indica que tienen menor capacidad de aprendizaje espacial. Sin embargo la exposición a CYP mejora la capacidad de aprendizaje espacial, ya que estas ratas alcanzan la plataforma más rápidamente ($19\pm 3s$, $p<0.05$) que las controles ($38\pm 6s$) el día tres de entrenamiento (Fig. 27B). Los datos estadísticos con ANOVA de una vía fueron $F(6,58)=4.8$, $p<0.001$.

Las hembras expuestas a CYP alcanzan antes la plataforma ($25\pm 4s$, $p<0.01$) que las hembras control ($57\pm 7s$) el día tres, indicando mejor aprendizaje espacial (ANOVA: $F(6,57)=1.9$, $p>0.05$) (Fig. 27D).

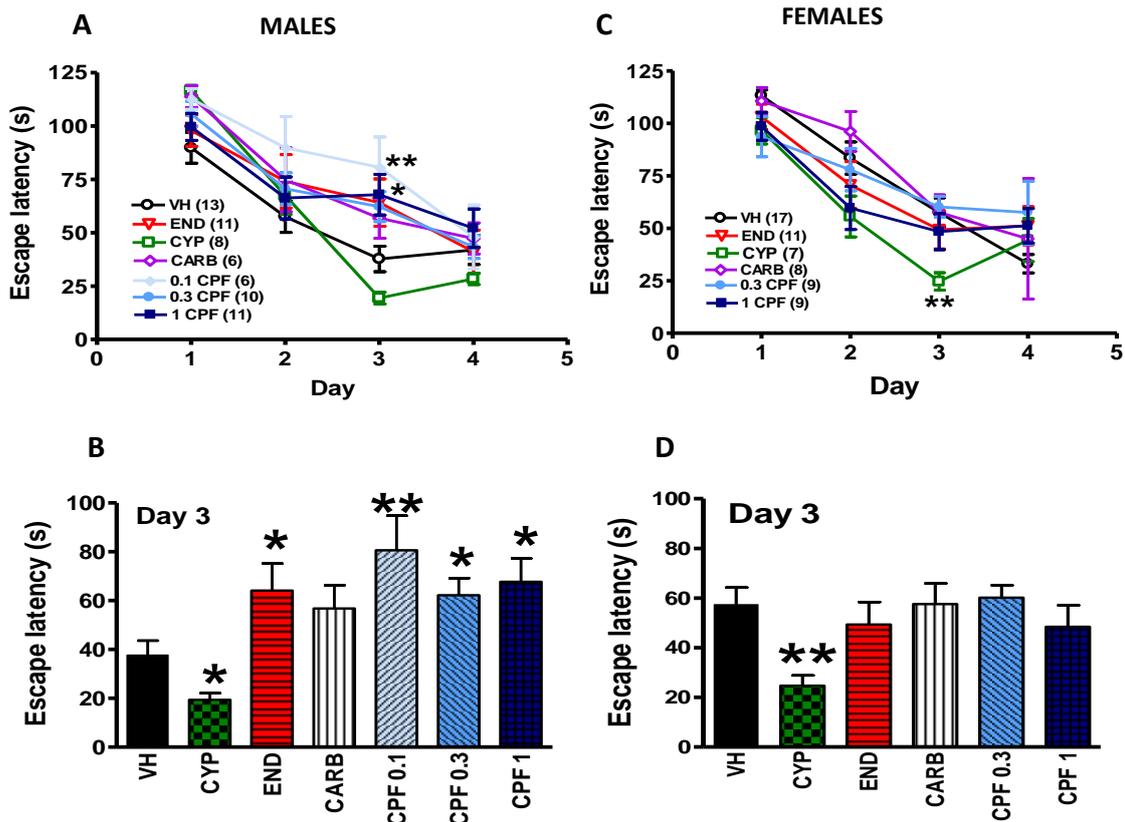


Figura 27: Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en el aprendizaje espacial en el MWM en machos (A,B) y hembras (C,D). Se representa el tiempo en alcanzar la plataforma a lo largo del entrenamiento (A y C) y el día 3 (B y D). Los valores son la media±SEM del número de animales indicado entre paréntesis para cada grupo. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos, * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

Para analizar la memoria espacial, 24h horas después del último ensayo, se quita la plataforma y se mide el tiempo que permanecen las ratas en el cuadrante en el que estaba previamente. Las ratas macho expuestas a la dosis más alta de CPF (1 mg/kg/día) permanecen menos tiempo en el cuadrante correcto ($21 \pm 3s$, $p < 0.05$) comparado con los machos control ($35 \pm 5s$) ($F(6,120)=1,976$, $p > 0.05$) (Fig. 28A), indicando que la memoria espacial está deteriorada. En cuanto a las hembras, ningún pesticida alteró la memoria espacial en este test (Fig. 28B).

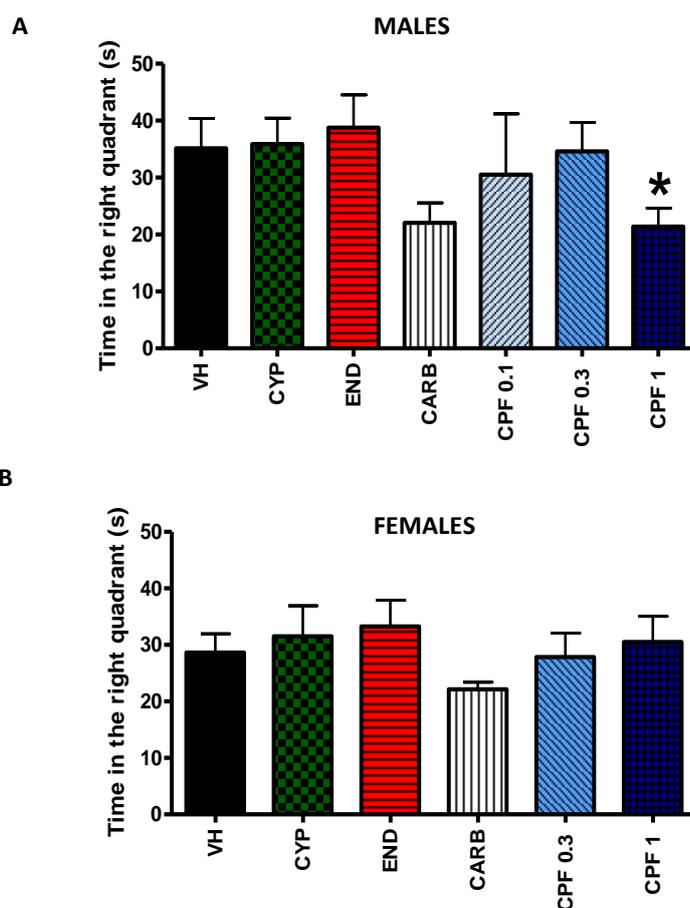


Figura 28: Efectos de la exposición perinatal a pesticidas en la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris en machos y hembras. Se representa el tiempo que permanecen las ratas en el cuadrante correcto, machos (A), hembras (B). Los valores son la media \pm SEM del mismo número de animales que en la Figura 27. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos, $*p < 0.05$.

12- Diferencias de género en el aprendizaje espacial

En el laberinto radial, las hembras control cometen significativamente más errores, tanto de trabajo como de referencia (Figs. 29A y B), que los machos control, lo cual se traduce en que tienen peor índice de aprendizaje (Fig. 29C). Estos resultados indican que las ratas hembra controles tienen peor aprendizaje espacial y memoria de trabajo

que las ratas macho controles. Tras el análisis de ANOVA de dos vías con el sexo y el tiempo como variables se observa que el efecto del sexo es significativo ($F(1,128)=4.8$, $p<0.05$), pero no hay interacción significativa ($F(4,128)=1.4$, $p>0.05$), en el índice de aprendizaje. Lo mismo ocurre para los errores de referencia: el efecto del género ($F(1,136)=14$, $p<0.01$) y el efecto del tiempo ($F(4,136)=19$, $p<0.0001$) son significativos, pero no hay interacción significativa ($F(4,136)=1.7$, $p>0.05$). Por lo que respecta a los errores de trabajo, el efecto del género es significativo ($F(1,144)=9.9$, $p<0.01$) y el efecto del tiempo también ($F(4,144)=12$, $p<0.0001$) y no hay interacción significativa ($F(4,144)=1.8$, $p>0.05$) entre ambos parámetros.

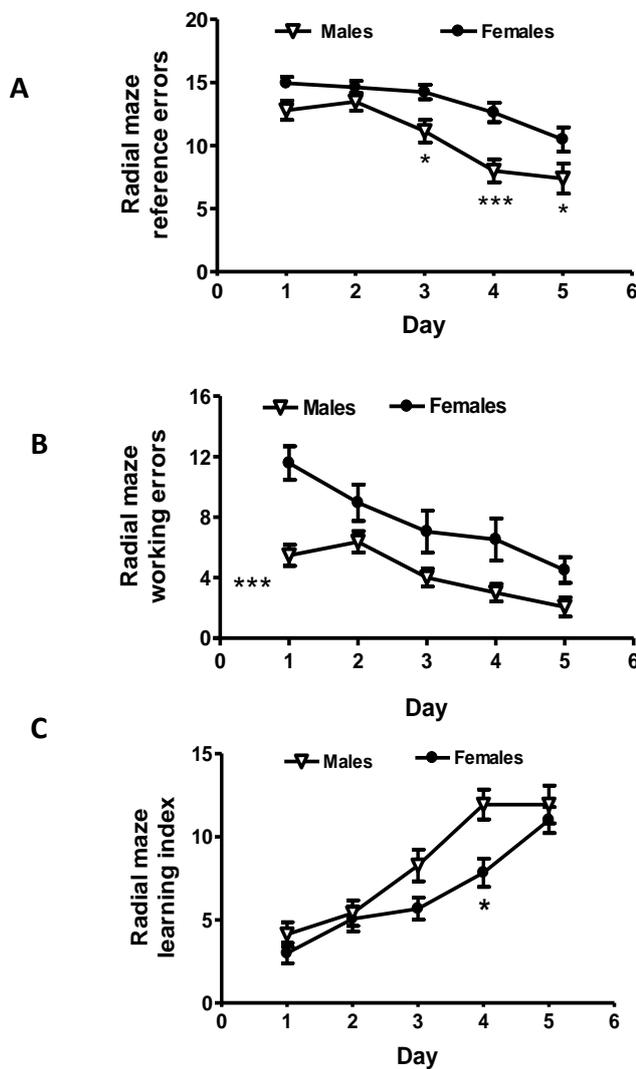


Figura 29: Diferencias de género en el aprendizaje y memoria espaciales en el laberinto radial en ratas controles. Se representan los errores de referencia (A), de trabajo (B) y el índice de aprendizaje (C) a lo largo de los cinco días que dura el entrenamiento. Los valores son la media±SEM de 15 machos y 21 hembras. Los valores significativamente diferentes entre machos y hembras se indican con asteriscos, * $p<0.05$ y *** $p<0.001$.

En el MWM, las hembras control tardan significativamente más tiempo en alcanzar la plataforma que los machos control (Fig. 30). Por tanto, como en el laberinto radial, las hembras muestran peor aprendizaje espacial en comparación con los machos. Tanto el efecto del tiempo ($F(2,99)=25.40$, $p<0.0001$) como del género ($F(1,99)=21.94$, $p<0.0001$) son significativos, pero no hay interacción significativa ($F(2,99)=0.0002066$, $p>0.05$).

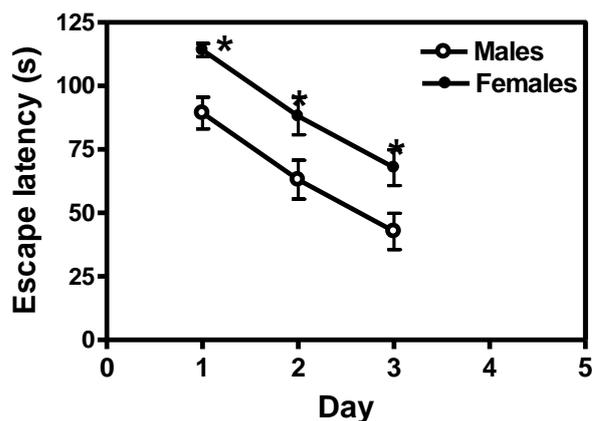


Figura 30. Aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris en ratas control, machos y hembras. Se representa el tiempo en alcanzar la plataforma. Los valores son la media \pm SEM de 16 machos y 19 hembras. Los valores significativamente diferentes entre machos y hembras se indican con asteriscos, * $p<0.05$.

13- Efectos de la exposición a pesticidas sobre marcadores de neuroinflamación en el hipocampo

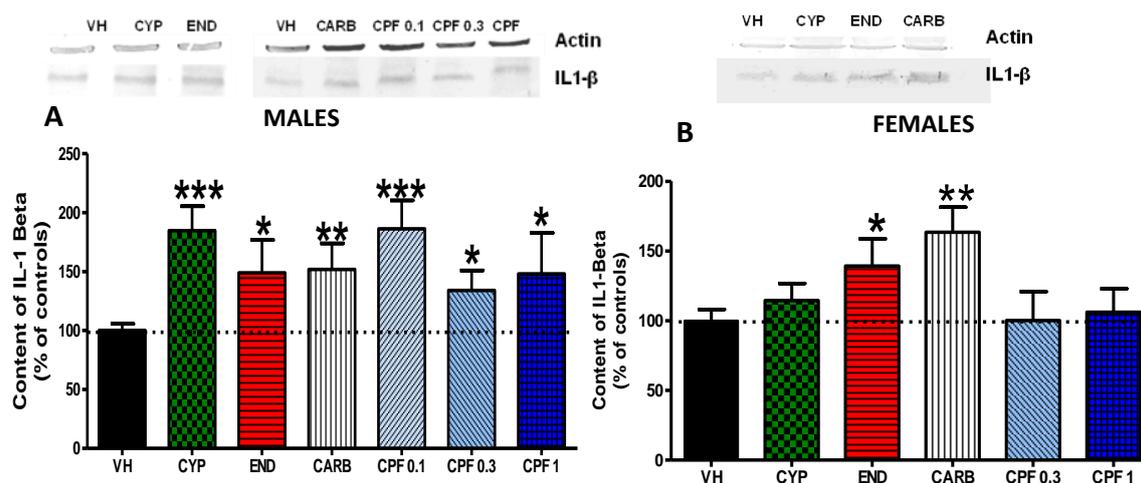
Para estudiar si la exposición perinatal a los pesticidas induce neuroinflamación, la cual podría contribuir al deterioro del aprendizaje y memoria espaciales, se han analizado los principales marcadores de neuroinflamación en el hipocampo, ya que es la principal área implicada en el aprendizaje y memoria espaciales.

En ratas macho, todos los pesticidas aumentan el contenido de la Interleucina (IL)-1 β pro-inflamatoria entre un 34 y un 86%. Los resultados se analizaron con ANOVA de una vía: $F(6,54)=2.61$, $p<0.05$ (Fig. 31A). Los niveles de la IL-10 anti-inflamatoria están disminuidos por exposición a END ($65\pm 9\%$ del control, $p<0.01$) o CPF 1 mg/kg/día ($74\pm 8\%$ del control, $p<0.05$), $F(6,75)=2.49$, $p<0.05$ (Fig. 31G). Los niveles de TNF- α no se ven afectados por la exposición a estos pesticidas. Por lo que respecta a la IL-4, anti-inflamatoria, únicamente el CARB reduce los niveles significativamente ($59\pm 7\%$ del control, $p<0.05$) respecto a los controles, $F(6,68)=1.77$, $p>0.05$ (Fig. 31E).

El contenido del marcador de microglía Iba-1 está disminuido por exposición a CYP (74±9% del control, $p<0.05$), $F(6,62)=1.54$, $p>0.05$ (Fig. 31C).

En las ratas hembra control, los niveles de las citocinas son más elevados que en los machos, tanto las pro-inflamatorias: IL-1 β (178±13% del valor en machos, $p<0.01$), y TNF- α (136±15% del valor en machos, $p<0.05$), como las anti-inflamatorias: IL-10 (156±21% del valor en machos, $p<0.05$) e IL-4 (160±21% del valor en machos, $p<0.01$). También el contenido de Iba-1 en las hembras controles es más elevado que en machos controles (156±22% del valor en machos, $p<0.01$).

En las ratas hembra expuestas a END y CARB está aumentado el contenido de IL-1 β en hipocampo (139±19% de los controles, $p<0.05$ y 164±18% de los controles, $p<0.01$, respectivamente), $F(5,37)=2.394$, $p>0.05$ (Fig. 31B). Los niveles de la IL-10 anti-inflamatoria están aumentados en las hembras expuestas a CYP (183±30% de los controles, $p<0.001$), END (165±21% de los controles, $p<0.01$) o CARB (181±15% de los controles, $p<0.001$). En cambio la exposición a CPF 0.3 o 1mg/kg/día reduce el contenido de IL-10: 70±12% ($p<0.05$) y 71±11% ($p<0.05$) de los controles, $F(6,36)=6.2$, $p<0.0001$ (Fig. 31H). La exposición a END también aumentó los niveles de la IL-4 anti-inflamatoria (140±12% de los controles, $p<0.05$), $F(5,35)=2.2$, $p<0.05$ (Fig. 31F). El contenido de Iba-1 está reducido en hembras expuestas a la dosis más elevada de CPF (1mg/kg/día): 70±15% de los controles ($p<0.05$), $F(5,31)=2.0$, $p>0.05$ (Fig. 31D). Al igual que en machos, ningún pesticida alteró el contenido de TNF- α en hembras.



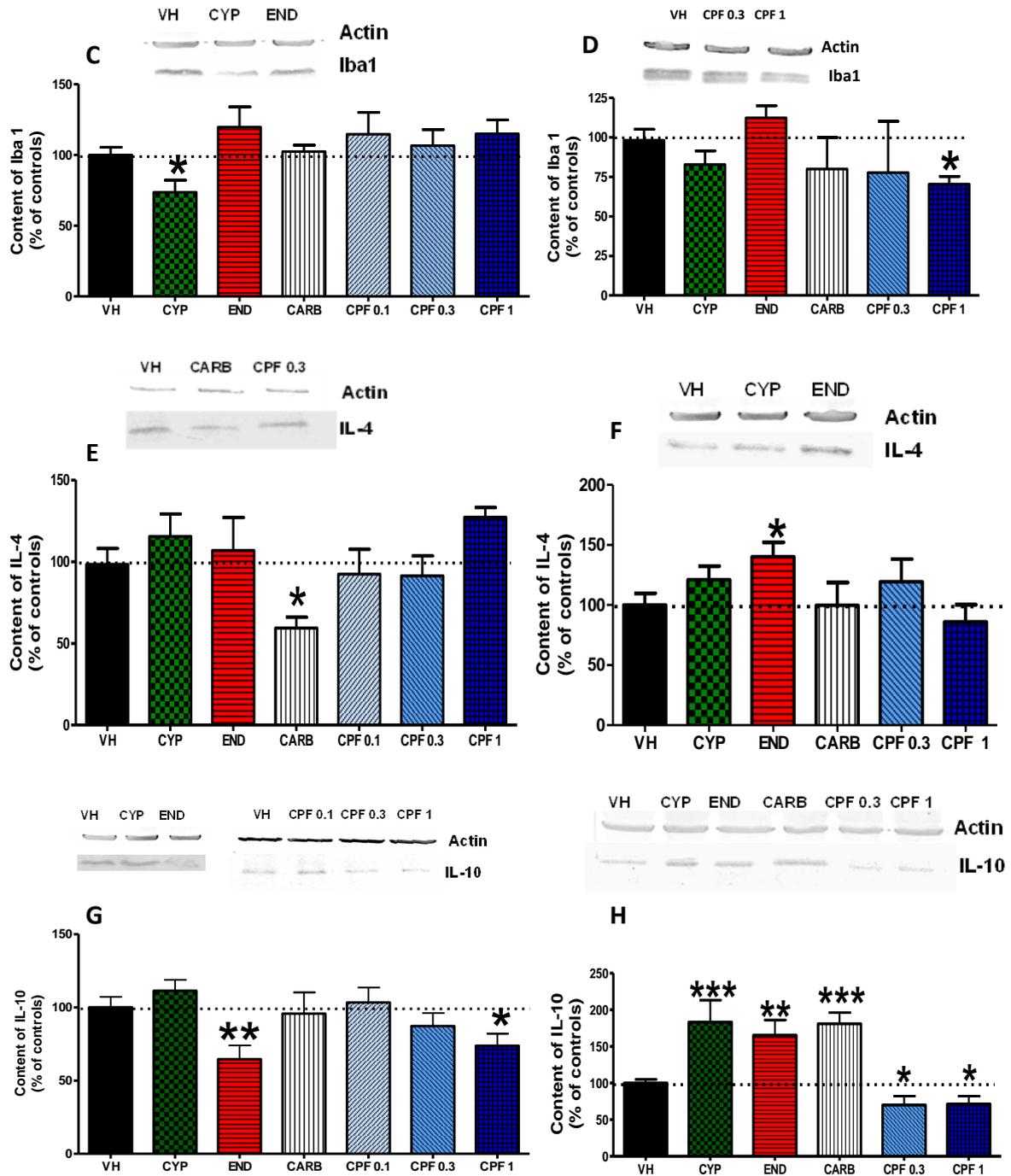


Figura 31: Efecto de la exposición a pesticidas sobre el contenido de citocinas e Iba1 en hipocampo de machos y hembras. Se muestran imágenes representativas y cuantificación de los western blot. IL-1 β machos (A) hembras (B), Iba1 machos (C) hembras (D), IL-4 machos (E) hembras (F), IL-10 machos (G) hembras (H). Los datos se expresan como porcentaje de las ratas control. Los valores son la media \pm SEM de 6-10 ratas. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001.

14- Correlación entre niveles de IL-1 β en hipocampo y memoria espacial

Puesto que los resultados muestran que hay un aumento de interleucinas pro-inflamatorias, en concreto IL-1 β por exposición a los pesticidas, produciéndose por tanto, un estado pro-inflamatorio, se ha analizado si existe correlación entre los niveles de citocinas en hipocampo y el aprendizaje y memoria espacial en el laberinto radial, con el fin de confirmar si la neuroinflamación en hipocampo contribuye al deterioro del aprendizaje y memoria espaciales por exposición a los distintos pesticidas. Como se puede observar en las figuras 32A y B hay una correlación inversa significativa entre los niveles de la IL-1 β y el índice de aprendizaje en el laberinto radial, indicando que a mayores niveles de ésta, la capacidad de aprendizaje espacial disminuye, tanto en machos ($r=-0.45$, $p<0.05$) como en hembras ($r=-0.43$, $p<0.01$) por separado, así como si juntamos ambos sexos ($r=-0.42$, $p<0.05$) (Fig. 32A).

También existe correlación positiva significativa entre el contenido de IL-1 β en el hipocampo y los errores de trabajo, en ambos sexos por separado ($r=0.46$, $p<0.05$ para machos y $r=0.56$, $p<0.01$ para las hembras) y juntos ($r=0.51$, $p<0.01$) (Fig. 32B), lo que sugiere que el contenido de IL-1 β en hipocampo también deteriora la memoria de trabajo espacial.

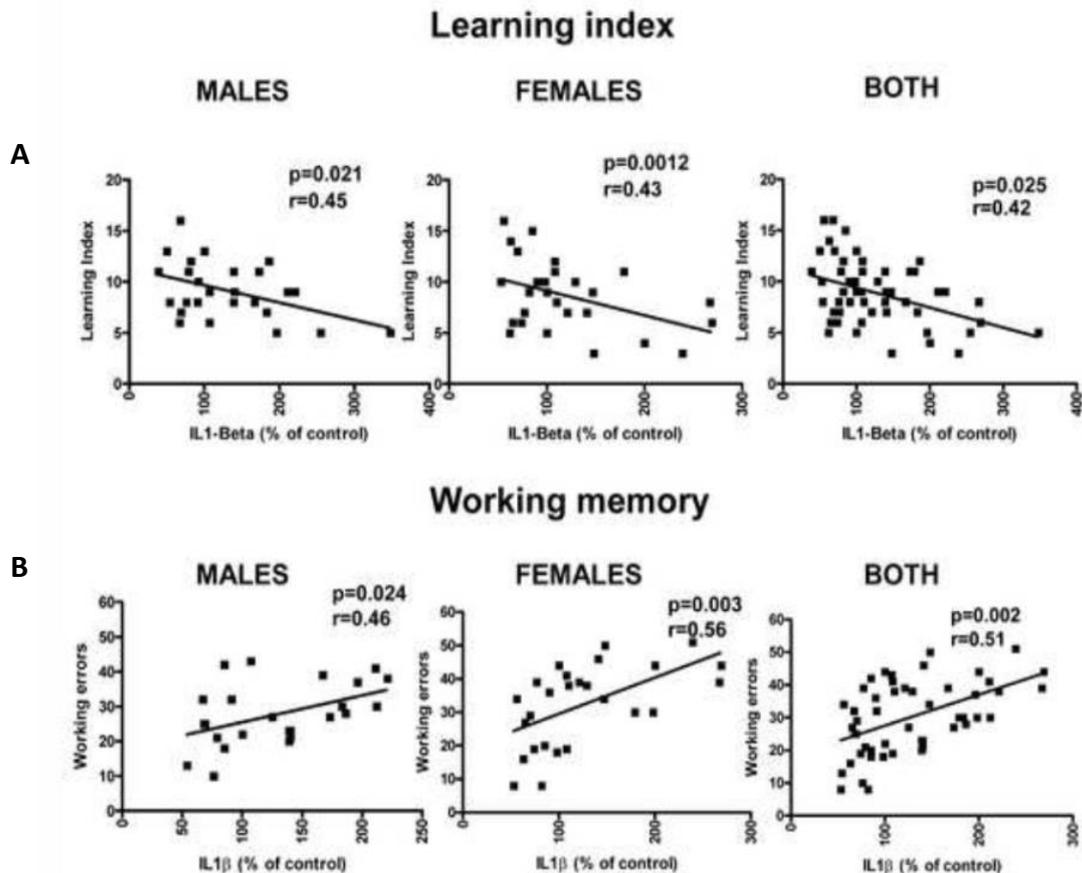


Figura 32. Correlación entre el contenido de IL-1 β en hipocampo y el índice de aprendizaje o los errores de trabajo en el laberinto radial. Cada punto representa el valor para IL-1 β y el índice de aprendizaje (A) o errores de trabajo (B) para cada rata. Los valores son la media \pm SEM de 26 machos y 27 hembras.

15- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END sobre la ansiedad: Test *hole board*

La exposición a END en ratas macho induce ansiedad, mientras que la exposición a la mezcla previene el efecto del END y aumenta significativamente el número de veces que las ratas exploran (36 ± 3.5 , $p<0.05$) comparado con las ratas control (28 ± 6), con CYP solo (25.1 ± 2.6 , $p<0.05$) o con END solo (18 ± 2.2 , $p<0.001$), $F(3,73)=6.108$, $p<0.001$ (Fig. 33A). Por tanto la ansiedad producida por la exposición a END se previene por co-exposición con el CYP. En el caso de las hembras ni la exposición a CYP o END solos, ni a la mezcla de ambos induce ansiedad (Fig. 33B).

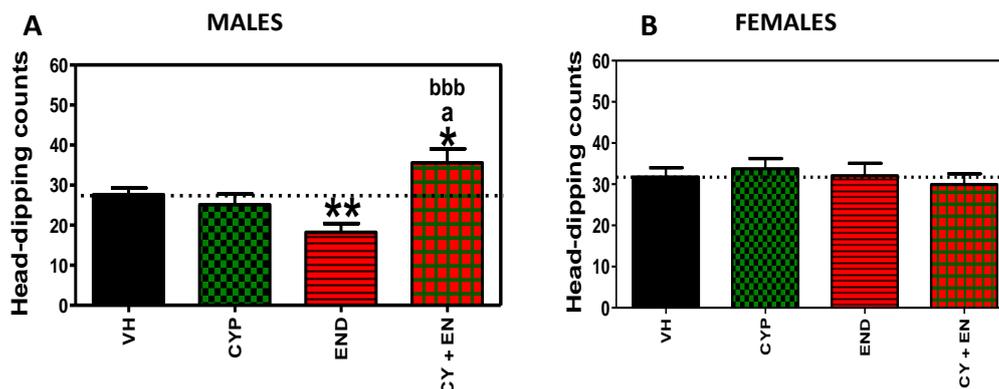


Figura 33. Efecto de la exposición a CYP+END en el *hole board* en machos y hembras. Los valores representan la media±SEM de (A) machos VH=37, CYP=16, END=10, CYP+END=14, (B) hembras VH=26, CYP=16, END=15, CYP+END=15. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; a, significativamente diferente de CYP solo a $p<0.05$ y b, significativamente diferente de END solo $bbb\ p<0.001$.

16- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END en el ritmo circadiano de la actividad motora

Durante el día (fase de sueño) las ratas macho expuestas a END (1560 ± 124 m.a, $p<0.001$) y a la mezcla de CYP+END (1338 ± 163 m.a, $p<0.05$) presentan una mayor actividad ambulatoria (m.a) respecto a las control (993 ± 79 m.a), $F(3,73)=4.950$, $p<0.01$. Por tanto, no hay una interacción entre los pesticidas en la mezcla, ya que se observa el mismo efecto que tras la exposición a END solamente (Fig. 34A). El ritmo circadiano de la actividad ambulatoria no se afecta por la exposición a la mezcla ni a los pesticidas solos en las hembras (Fig. 34B).

Durante el día los machos expuestos a CYP (428 ± 40 m.v, $p<0.05$) o END (462 ± 52 m.v, $p<0.01$) presentan una mayor actividad vertical (m.v) que los controles (308 ± 26 m.v). En las ratas expuestas a la mezcla este aumento no se produce, $F(3,68)=3.533$, $p<0.05$ (Fig. 34C), lo cual indica que hay una interacción entre los dos pesticidas que previene el efecto de los pesticidas por separado.

En cuanto a las hembras, durante la fase de luz aumenta la actividad vertical en las ratas expuestas a la mezcla (399 ± 27 m.v, $p<0.05$) respecto a las control (323 ± 23 m.v). Este efecto no se observa en los pesticidas por separado, $F(3,73)=2,536$, $p<0.05$ (Fig. 34D), indicando que se produce sinergismo entre ambos pesticidas. Las hembras expuestas a la mezcla, pero no expuestas a cada pesticida individual, deben tener alterado el sueño.

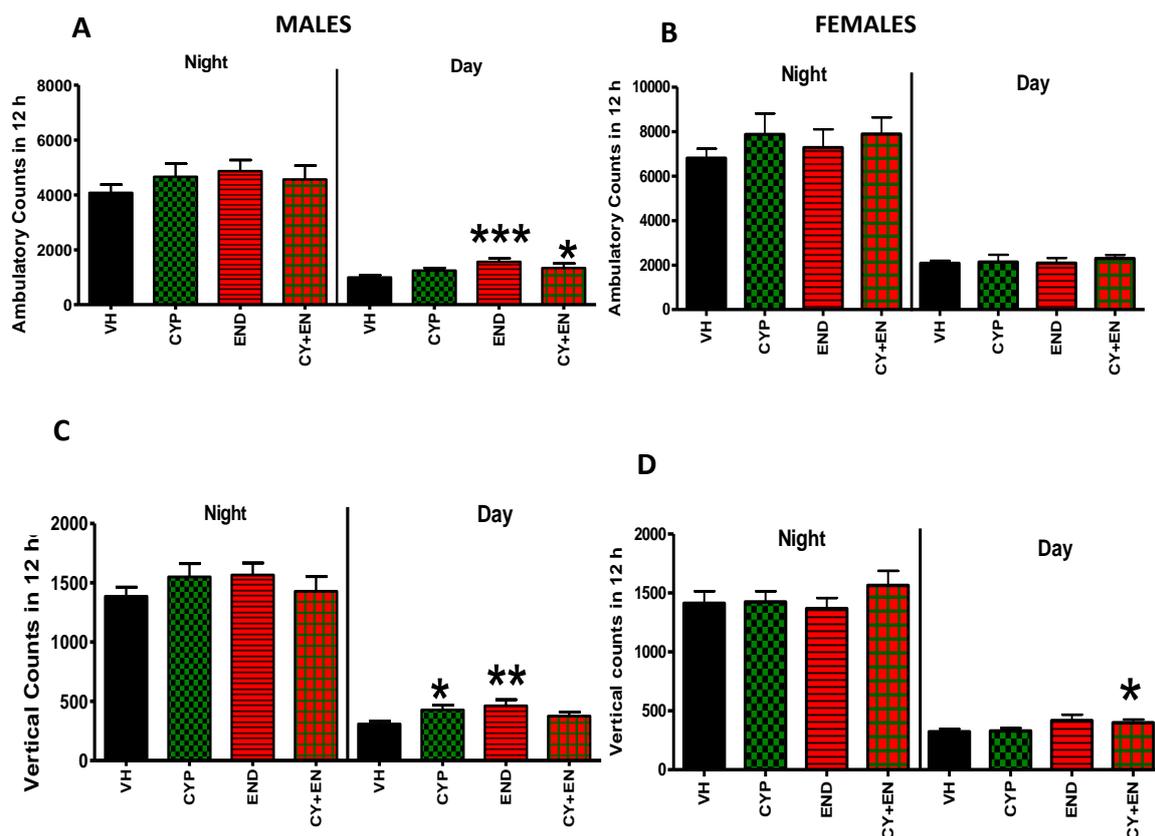


Figura 34. Efecto de la exposición a CYP+END en el ritmo circadiano de la actividad motora en machos y hembras. Los valores representan la media±SEM de: machos (A y C), VH=27, CYP=24, END=15, CYP+END=14; y hembras (B y D), VH=26, CYP=13, END=11, CYP+END=16. (A y B) actividad ambulatoria; (C y D) actividad vertical. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, *p<0.05; **p<0.01 y ***p<0.001.

17- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END en la actividad motora

17.1- Actividad ambulatoria

La exposición a la mezcla de CYP+END aumenta la actividad ambulatoria (m.a) en ratas macho en un ambiente nuevo (1570 ± 148 m.a, $p < 0.001$ comparado con el control o con END o CYP solos). Sin embargo los machos expuestos a CYP tienen una menor actividad ambulatoria (785 ± 62). La interacción entre los dos pesticidas no solo revierte el efecto del CYP sino que induce el efecto opuesto, $F(3,80) = 12.58$, $p < 0.001$ (Fig.35 A). En el caso de las hembras disminuye la actividad ambulatoria en ratas expuestas a END pero no en las ratas expuestas a la mezcla, indicando que la co-exposición con CYP previene el efecto del END, $F(3,86) = 4.675$, $p < 0.05$ (Fig.35B).

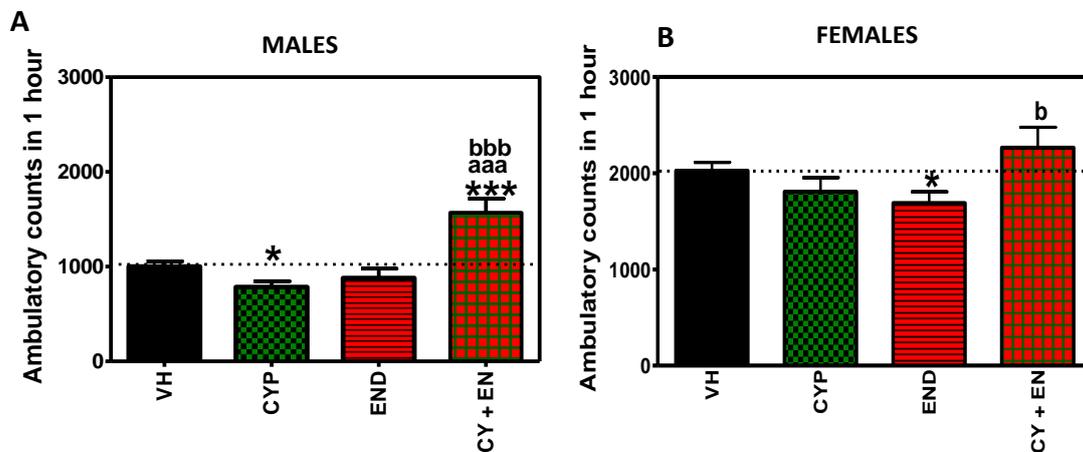


Figura 35. Efecto de la exposición a CYP+END en la actividad ambulatoria en machos y hembras. Los movimientos ambulatorios se registraron durante 1h en un ambiente nuevo. Los valores representan la media±SEM de: machos (A) VH=31, CYP=19, END=20, CYP+END=14; hembras (B) VH=34, CYP=17, END=25, CYP+END=14. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; a significativamente diferente de CYP aaa $p < 0.001$ y b significativamente diferente de END b $p < 0.05$; bbb $p < 0.001$.

17.2- Actividad vertical

La exposición a la mezcla aumenta la actividad vertical (m.v) en ratas macho expuestas a un ambiente nuevo (324 ± 25 m.v, $p < 0.05$ comparado con las ratas control o expuestas a CYP solo), aunque en las ratas expuestas a CYP o END solos no se altera la actividad vertical, $F(3,77)=3.839$, $p < 0.05$ (Fig. 36A). Estos resultados indican que hay una interacción sinérgica entre ambos pesticidas.

En las hembras no se altera la actividad vertical por exposición a CYP, END o a su mezcla (Fig. 36B).

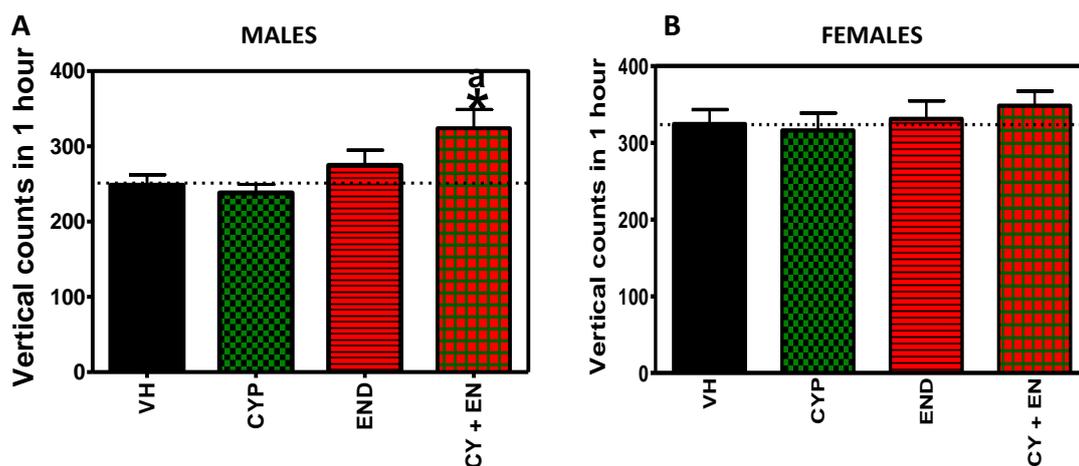


Figura 36. Efecto de la exposición a CYP+END en los movimientos verticales en machos y hembras. (A) Machos y (B) Hembras. Los valores representan la media \pm SEM de VH= 29, CYP=18, END=21, CYP+END=13, para los machos y VH=36, CYP=19, END=25, CYP+END=16 para las hembras. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, *p<0.05; a significativamente diferente de CYP a p<0.05.

17.3- Actividad estereotípica

La exposición a la mezcla aumenta los movimientos estereotípicos en ratas macho (6696 ± 263 m.e, $p<0.01$) respecto a las ratas control (5650 ± 169 m.e), $F(3,79)=2.521$, $p<0.01$. Sin embargo, las ratas expuestas a CYP o END por separado no tienen alterados los movimientos estereotípicos (Fig. 37A). Se produce una interacción sinérgica entre ambos pesticidas.

En las hembras se observan los mismos efectos que en los machos: la exposición a la mezcla, pero no a los pesticidas por separado, incrementa el número de movimientos estereotípicos (6981 ± 399 m.e, $p<0.05$), respecto a las ratas control (6207 ± 178 m.e), $F(3,89)=2.742$, $p<0.05$ (Fig. 37B).

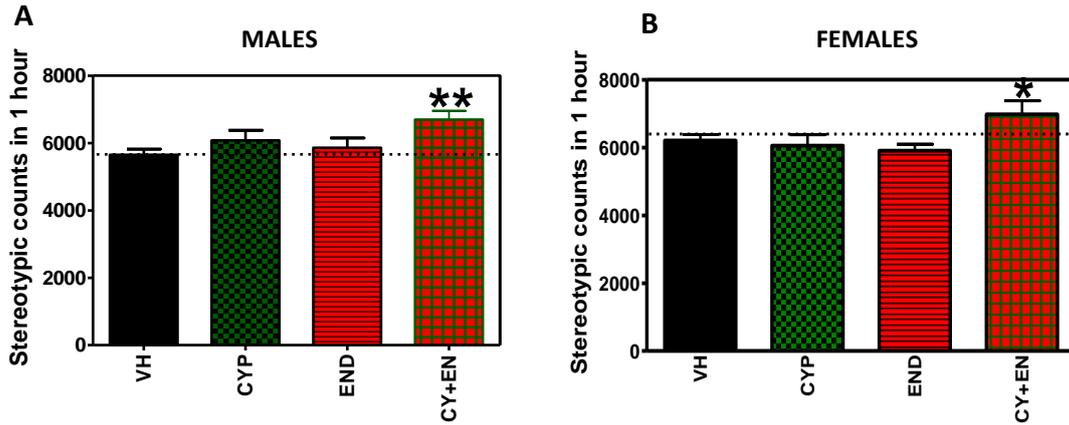


Figura 37. Efecto de la exposición a CYP+END en los movimientos estereotípicos en machos y hembras. Los valores representan la media±SEM de machos (A) VH=30, CYP=19, END=22, CYP+END=12 y hembras (B) VH=34, CYP=19, END=25, CYP+END=15. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, *p<0.05; **p<0.01.

18- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END en la coordinación motora

18.1- Rotarod

La exposición perinatal a CYP o END solos o en la mezcla en ratas macho no altera la coordinación motora en el rotarod (Fig. 38A). En cuanto a las hembras, tanto el CYP como el END empeoran la coordinación motora en el rotarod, pero la exposición a la mezcla de ambos pesticidas no la altera (184±11s, p<0.05 comparado con las ratas control, CYP o END solos), F(3,72)=5.961, p<0.01, (Fig. 38B). Por tanto la exposición a estos pesticidas mezclados anula el efecto de cada uno por separado.

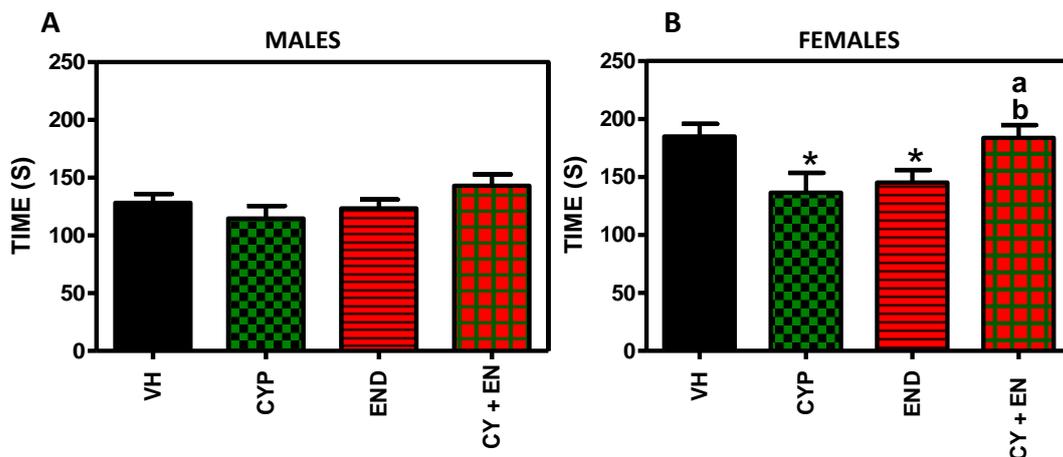


Figura 38. Efecto de la exposición perinatal a CYP+END en la coordinación motora en el rotarod en machos y hembras. Los valores representan la media±SEM del siguiente número de animales: A, machos VH=22, CYP=12, END=14, CYP+END=15; B, hembras VH=28, CYP=13, END=19, CYP+END=16. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, *p<0.05; a significativamente diferente de CYP, a p<0.05 y b significativamente diferente de END b p<0.05.

18.2- *Beam walking*

En los machos expuestos a la mezcla de CYP+END se observa un aumento del número de resbalones (1.7 ± 0.28 , $p < 0.001$ comparado con el control o con CYP solo), $F(3,77) = 5.72$, $p < 0.001$, (Fig. 39A). La co-exposición con CYP y END produce un efecto sinérgico.

La exposición a END aumenta el número de resbalones en las hembras y la exposición a la mezcla tiene igual efecto (1.2 ± 0.22 resbalones, $p < 0.05$ comparado con los controles), $F(3,79) = 3.626$, $p < 0.05$ (Fig. 39B). Por tanto en las hembras no hay interacción entre los pesticidas.

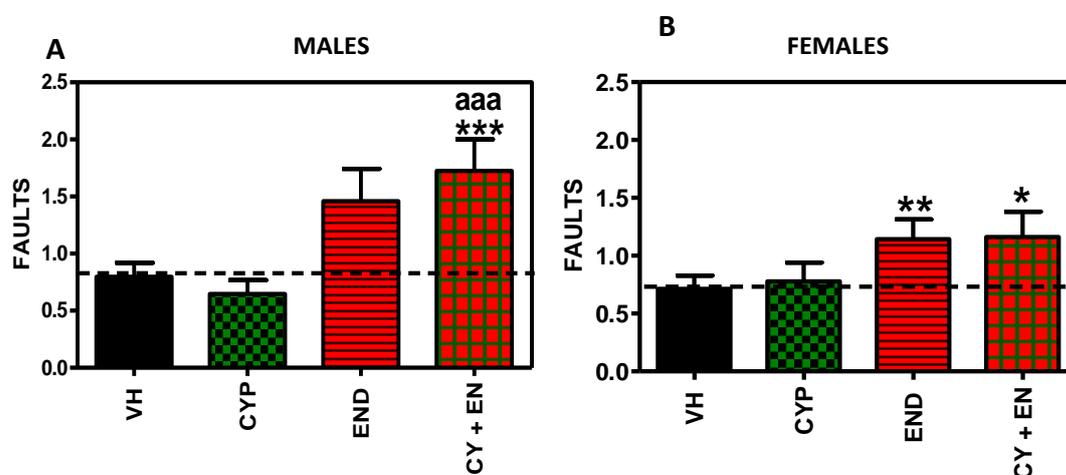


Figura 39: Efecto de la exposición perinatal a CYP+END en la coordinación motora en el *beam walking* en machos y hembras. Los valores representan la media \pm SEM de: VH=32, CYP=18, END=18, CYP+END=13 para los machos (A) y VH=30, CYP=20, END=22, CYP+END=11 para las hembras (B). Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. a significativamente diferente de CYP, aaa $p < 0.001$.

19- Efectos de la exposición perinatal a CYP y END en los niveles extracelulares de GABA en el cerebelo.

En las ratas macho no se alteran significativamente los niveles de GABA extracelular en cerebelo, ni por exposición a CYP o END por separado ni por exposición a la mezcla de ambos pesticidas, aunque se observa un ligero aumento en machos expuestos a END y la exposición a CYP+END tiende a disminuir el GABA (Fig. 40A).

En las hembras la exposición a CYP o END aumenta los niveles basales extracelulares de GABA. Sin embargo la exposición a la mezcla de CYP+END no altera los niveles de GABA (9 ± 3 nM, $p < 0.05$ comparado con END solo), lo cual sugiere un efecto compensatorio entre ambos pesticidas, el cual previene el efecto de los pesticidas individuales, $F(3,35) = 3.584$, $p < 0.05$ (Fig. 40B). Corroborando la correlación existente

entre GABA extracelular en cerebelo y coordinación motora en el rotarod, en las hembras se deteriora la coordinación motora en el rotarod cuando aumenta el GABA, pero en las ratas expuestas a la mezcla en las que el GABA extracelular en cerebelo no aumenta, no se deteriora la coordinación motora.

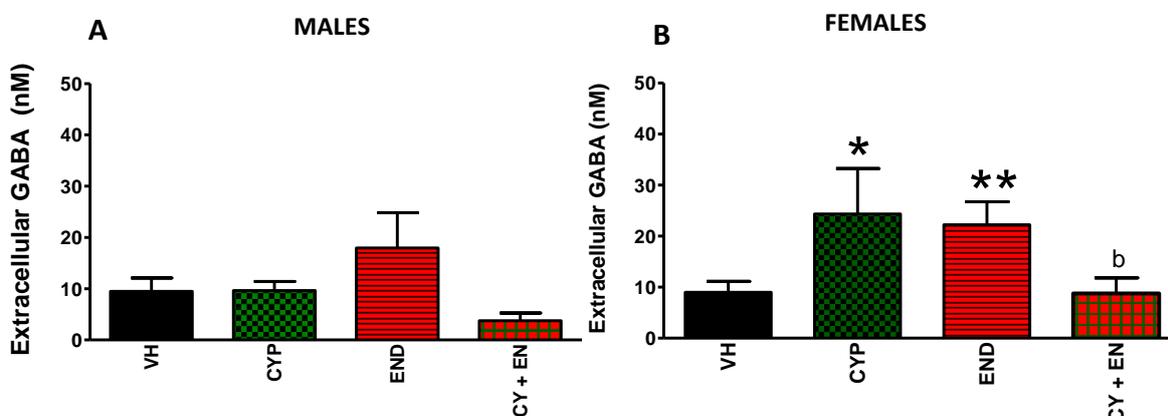


Figura 40: Efecto de la exposición perinatal a CYP+END en los niveles extracelulares de GABA en cerebelo de machos y hembras. Se obtuvo líquido extracelular por microdialísis cerebral in vivo en el cerebelo y se analizó el GABA en estas muestras por HPLC. Los valores representan la media±SEM del siguiente número de animales: machos (A) VH=8, CYP=8, END=6, CYP+END=3; hembras (B) VH=14, CYP=7, END=9, CYP+END=9. Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, *p<0.05; **p<0.01; b diferencias significativas con END solo b p<0.05.

20- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END el aprendizaje asociativo:

Tarea de evitación activa

Las ratas macho expuestas a END realizan menos evitaciones (20 ± 1.8 , $p < 0.05$) respecto a las control (26.5 ± 1.5), es decir, tienen empeorado el aprendizaje asociativo. Sin embargo la exposición a la mezcla no induce este efecto, $F(3,52)=3.024$, $p < 0.05$ (Fig. 41A). La interacción entre los dos pesticidas previene este efecto.

En las hembras por el contrario, se produce una interacción sinérgica, ya que las ratas expuestas a la mezcla, pero no las expuestas a los pesticidas individuales, tienen más dificultades para asociar el estímulo con la posterior descarga y realizan menos evitaciones: 21 ± 1.1 evitaciones, $p < 0.001$, respecto a las control (32 ± 1.8 evitaciones $p < 0.001$) y, respecto a END solo, $F(3,54)=6.845$, $p=0.001$ (Fig. 41B).

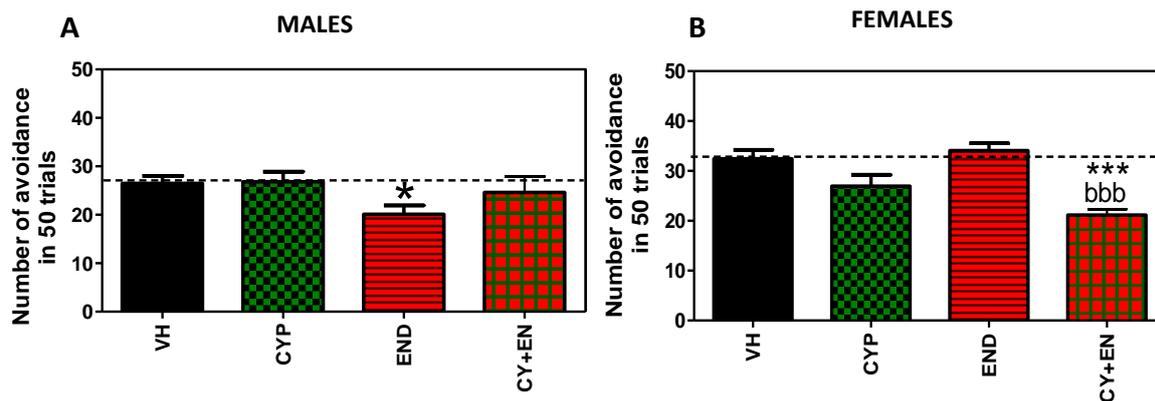


Figura 41. Efecto de la exposición a CYP+END en la evitación activa en machos y hembras. Los valores representan la media±SEM de (A), machos: VH=27, CYP=17, END=9, CYP+END=5; (B), hembras VH=21, CY=13, EN=18, CYP+END=6). Los valores significativamente diferentes de las ratas control se indican con asteriscos, * $p<0.05$; *** $p<0.001$; b significativamente diferente de END solo, bbb $p<0.001$.

21- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END en aprendizaje y memoria espaciales en el laberinto radial

21.1- Índice de aprendizaje

Las ratas macho expuestas a CYP (7.6 ± 1 , $p<0.01$), END (7.2 ± 0.8 , $p<0.001$) y a la mezcla (6.2 ± 0.6 , $p<0.001$) muestran un aumento menor del índice de aprendizaje el día cuatro de entrenamiento comparado con las ratas control (12 ± 0.9) (Fig. 42B). Además los días 3 y 5, los machos expuestos a la mezcla también presentan un índice menor de aprendizaje comparado con las ratas expuestas a CYP ($p<0.05$) (Fig.42A). Estos resultados sugieren que la exposición a la mezcla de los dos pesticidas induce un efecto mayor que cada uno por sí solo. La ANOVA de dos vías indica un efecto de los pesticidas ($F(3,221)=10.2$, $p<0.0001$) y del tiempo ($F(4,221)=33.8$, $p<0.0001$) significativos, mientras que la interacción no es significativa ($F(12,221)=1.6$, $p>0.05$).

En las hembras ni el END o el CYP solos, ni su mezcla, alteran el índice de aprendizaje, por lo que no hay interacción de los dos pesticidas en la mezcla (Figs. 42C y D).

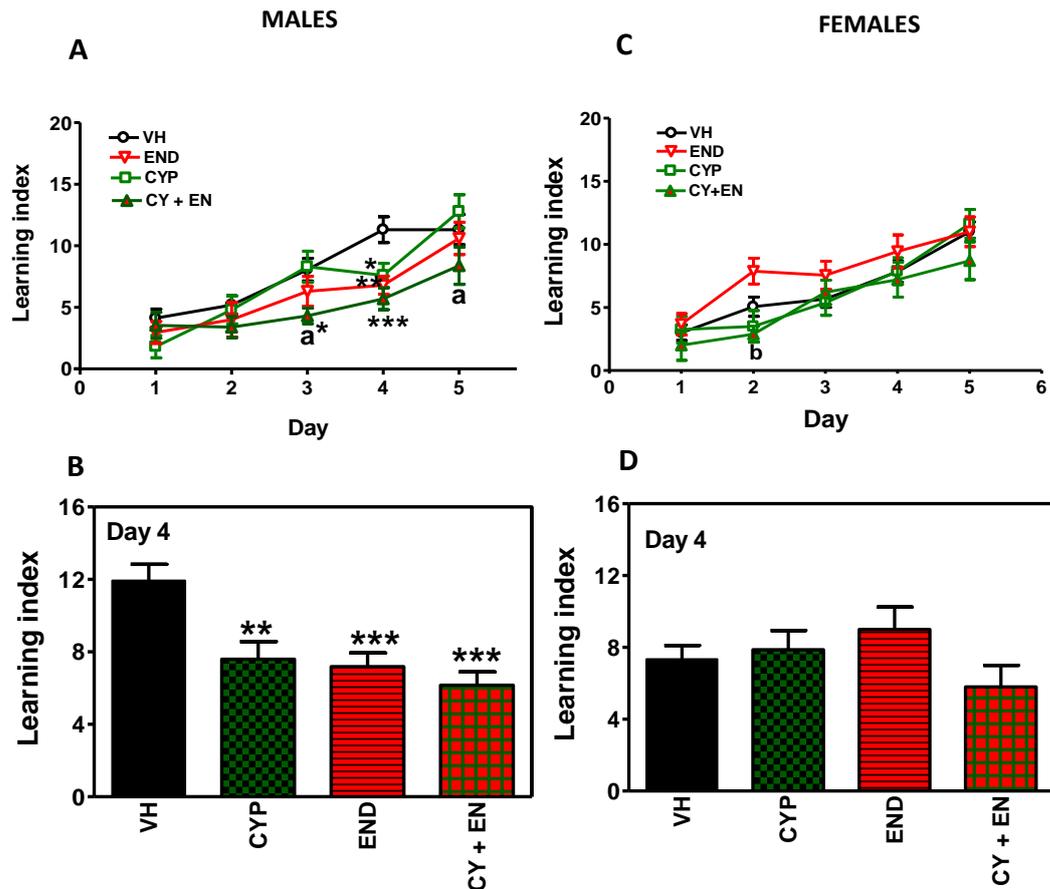


Figura 42. Efectos de la exposición perinatal a la mezcla de CYP+END en el índice de aprendizaje en el laberinto radial en machos y hembras. Se representa el índice de aprendizaje a lo largo del entrenamiento (A, Machos y C Hembras) y el día 4 (B Machos y D Hembras). Los valores son la media±SEM de VH=7, CYP=10, END=10, CYP+END=13. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$; a, diferente de CYP solo, a $p < 0.05$.

21.2- Errores de referencia

Los errores de referencia en machos expuestos a CYP o END son mayores que en las ratas control el día cuatro de entrenamiento. En machos expuestos a la mezcla de CYP+END, también están aumentados los errores de referencia el día cuatro (14 ± 1 , $p < 0.001$), comparado con los controles (8 ± 1) (Fig. 43B), pero además los días 3 y 5 también cometen más errores ($p < 0.05$ y $p < 0.01$) que los controles o los machos expuestos a cada pesticida individualmente (Fig. 43A). La ANOVA de dos vías indica un efecto de los pesticidas ($F(3,207)=11$, $p < 0.0001$) y del tiempo ($F(4,207)=18$, $p < 0.0001$) significativos, mientras que la interacción no es significativa ($F(12,207)=1.8$, $p > 0.05$). Estos resultados sugieren que la exposición a la mezcla de los dos pesticidas induce un efecto mayor que cada uno por sí solo.

En las hembras ni el END o el CYP solos, ni su mezcla, alteran los errores de referencia (Figs. 43C y D). En este caso no hay interacción entre END y CYP.

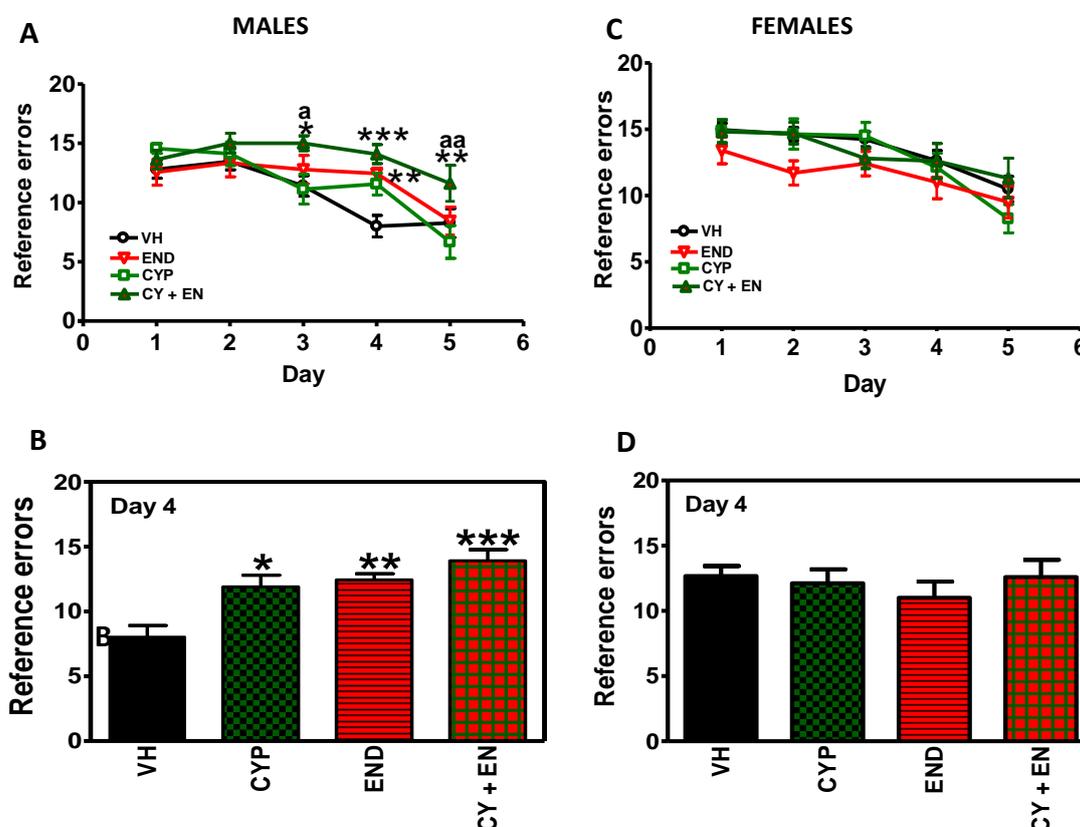


Figura 43. Efectos de la exposición perinatal a la mezcla de CYP+END sobre los errores de referencia en el laberinto radial en machos y hembras. Se representan los errores a lo largo del entrenamiento (A Machos y C Hembras) y el día 4 (B Machos y D Hembras). Los valores son la media±SEM del mismo número de animales que en el índice de aprendizaje. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$; a, diferente de CYP solo, a $p < 0.05$ y aa $p < 0.01$.

21.3-Errores de trabajo.

La exposición a CYP o END por separado no afecta a la memoria de trabajo en ratas macho (Fig.44B), sin embargo la mezcla de CYP+END aumenta significativamente el número de errores de trabajo a lo largo de los cinco días que dura el entrenamiento respecto a las ratas control, produciéndose un efecto de sinergismo (Fig. 44A). El efecto de los pesticidas, $F(3,225)=10.1$, $p < 0.0001$ y el del tiempo, $F(4,225)=10.31$, $p < 0.0001$ son significativos pero la interacción no ($F(12,225)=1.33$, $p > 0.05$). El número total de errores de trabajo en las ratas control es 24 ± 3 , mientras que en las ratas expuestas a la mezcla es significativamente mayor (36 ± 5 errores, $p < 0.05$) (Fig. 44B). Los errores totales en los machos expuestos a la mezcla también son significativamente mayores que los de machos expuestos a CYP ($p < 0.05$) o END ($p < 0.05$) solos (Fig. 44B).

La exposición a CYP reduce los errores de trabajo en las hembras (23 ± 3 , $p < 0.05$) comparado con las hembras control (36 ± 4). Sin embargo, las ratas expuestas a la mezcla cometen errores de trabajo equiparables a los de las ratas control (44 ± 4 errores, $p < 0.001$ comparado con CYP) (Fig.44D). El efecto del pesticida ($F(3,220)=6.6$, $p < 0.001$) y el efecto del tiempo ($F(4,220)=11$, $p < 0.0001$) son significativos, pero no hay interacción significativa ($F(12,220)=0.35$, $p > 0.05$) (Fig. 44C). Por tanto la co-exposición con END previene el efecto del CYP.

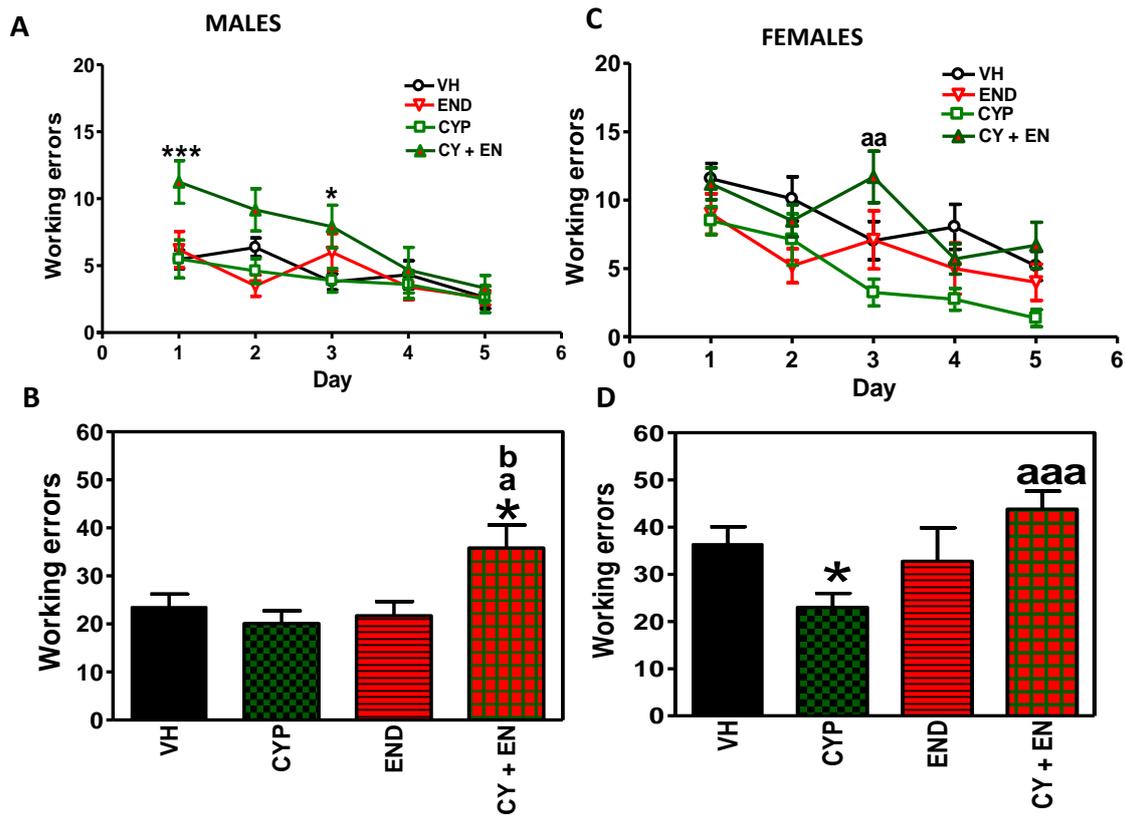


Figura 44. Efectos de la exposición perinatal a la mezcla de CYP+END en la memoria de trabajo en el laberinto radial en machos y hembras. Se representan los errores de trabajo a lo largo del entrenamiento (A Machos y C Hembras) y los errores totales (B Machos y D Hembras). Los valores son la media \pm SEM del mismo número de animales que en el índice de aprendizaje. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; a diferente significativamente de CYP a $p < 0.05$, aa $p < 0.01$, aaa $p < 0.001$ y b significativamente diferente de END b $p < 0.05$.

22- Efecto de la exposición a la mezcla de CYP y END en el aprendizaje y memoria espaciales en el MWM

La exposición a END aumenta el tiempo en alcanzar la plataforma respecto a las ratas control el día tres de entrenamiento en ratas macho, mientras que los machos expuestos a CYP alcanzan la plataforma en menor tiempo que los controles. La exposición a la mezcla CYP+END aumenta el tiempo que necesitan para encontrar la plataforma ($60\pm 9s$, $p<0.05$ comparado con los controles, $p<0.01$ comparado con CYP). Por tanto el efecto beneficioso del CYP es suprimido por la co-exposición con el END (Fig. 45B). La ANOVA de dos vías muestra que hay una interacción significativa entre el tiempo y los pesticidas ($F(4,90)=3.22$, $p<0.05$). El efecto de los pesticidas también es significativo ($F(4,90)=3.89$, $p<0.05$) y el del tiempo ($F(2,90)=40.08$, $p<0.0001$) (Fig. 45A).

En el caso de las hembras ocurre lo mismo que en los machos, la exposición a CYP mejora el aprendizaje espacial, pero en las ratas expuestas a la mezcla se revierte este efecto beneficioso (40 ± 4.6 s, $p<0.05$ comparado con CYP) (Fig. 45D). La interacción no es significativa ($F(4,105)=0.4911$, $p>0.05$), pero el efecto del pesticida ($F(2,105)=7.64$, $p<0.001$) y del tiempo ($F(2,105)=33.32$, $p<0.0001$) son significativos (Figs. 45C).

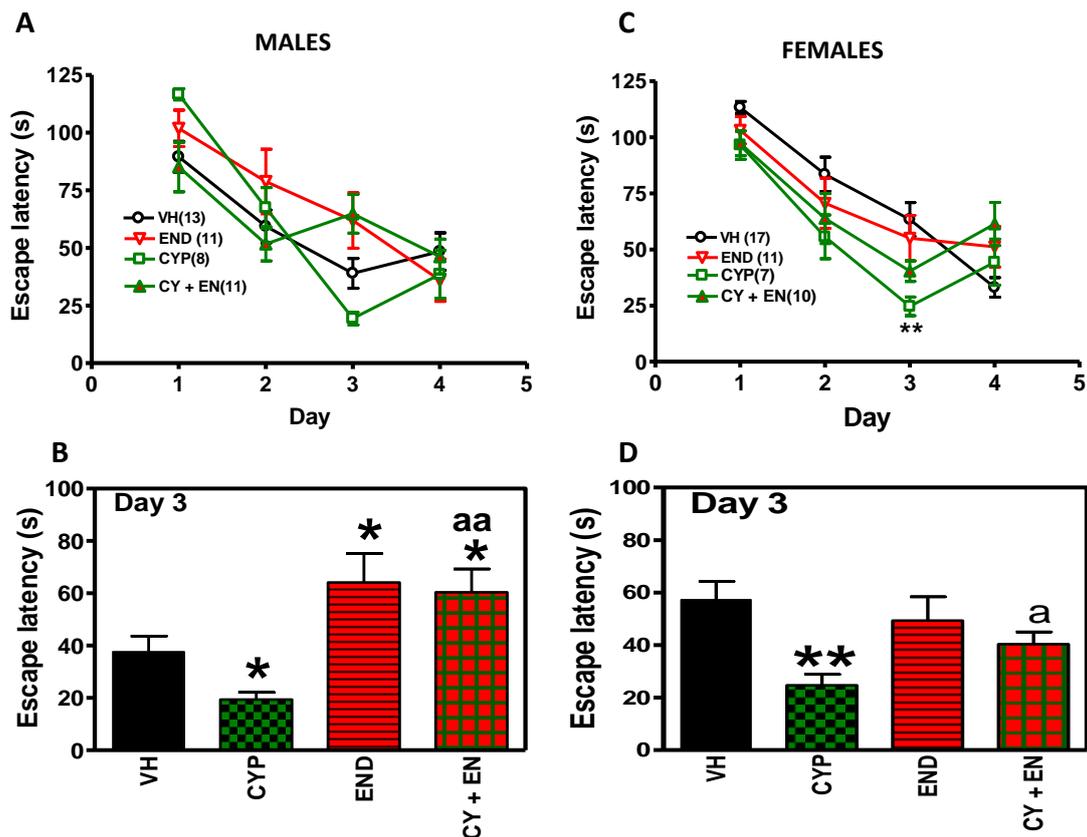


Figura 45. Efecto de la exposición perinatal a la mezcla de CYP+END en el aprendizaje espacial en el MWM en machos y hembras. En A (Machos) y C (Hembras) se representa el tiempo en alcanzar la plataforma a lo largo de los días de entrenamiento, y en B (Machos) y D (Hembras), el día 3 de entrenamiento. Los valores son la media±SEM del número de animales indicados en cada grupo, entre paréntesis. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; a significativamente diferente de CYP a $p < 0.05$; aa $p < 0.01$.

La exposición a CYP o END no afecta a la memoria espacial en el MWM ni en machos ni hembras. Las ratas macho expuestas a la mezcla permanecen menos tiempo en el cuadrante donde estaba la plataforma ($23 \pm 2.4s$, $p < 0.05$ comparado con CYP ($36 \pm 4.5s$) o END ($39 \pm 5.7s$) solos, $F(3,36) = 2.295$, $p > 0.05$, (Fig. 46A). Esto indica que hay una interacción sinérgica entre los dos pesticidas en la mezcla, la cual empeora la memoria espacial en el MWM, en los machos, pero no en las hembras (Fig. 46A-B).

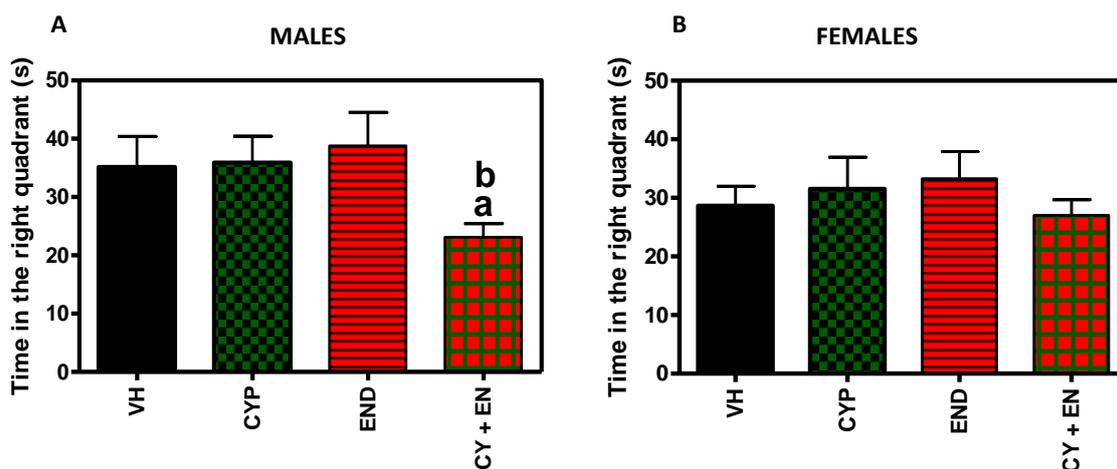


Figura 46. Efecto de la exposición perinatal a la mezcla de CYP+END en la memoria espacial en el MWM en machos y hembras. Se representa el tiempo que permanecen las ratas en el cuadrante correcto, machos (A), hembras (B). Los valores son la media \pm SEM del mismo número de animales que en la Fig. 45. a significativamente diferente de CYP a $p<0.05$ y b significativamente diferente de END b $p<0.05$.

23- Efectos de la exposición a la mezcla de CYP y END en el contenido de marcadores de neuroinflamación y de las subunidades del receptor de NMDA en el hipocampo.

Analizamos si la interacción entre los dos pesticidas modifica los efectos de los pesticidas individuales sobre la neuroinflamación en el hipocampo. En ratas macho, tanto el CYP como el END por separado, aumentan el contenido de la IL-1 β , sin embargo la exposición a la mezcla CYP+END no induce este aumento ($p<0.01$ comparado con CYP solo) y los niveles de IL-1 β (87% del control) son equiparables a los de las ratas control (Tabla 1). El contenido de Iba-1 se reduce por exposición a CYP, mientras que la exposición a la mezcla no induce cambios en el contenido de Iba-1, comparado con los controles (Tabla 1). Por tanto la interacción también previene el efecto del CYP solo sobre el contenido de Iba1. Los niveles de IL-10 se reducen por exposición a END mientras que la exposición a la mezcla no produce tal efecto, por lo que otra vez los pesticidas en la mezcla interaccionan para prevenir el efecto de END solo (Tabla 1). Estos resultados sugieren que, en general, los pesticidas en la mezcla interaccionan de manera que producen un efecto menor que los pesticidas solos sobre los factores inflamatorios en el hipocampo.

En las ratas hembra el contenido de IL-1 β aumenta tras la exposición a END (139 \pm 19 % de los controles) y también en hembras expuestas a la mezcla CYP+END (147 \pm 22 % de los controles, $p<0.05$ comparado con el control) (Tabla 1). Por tanto no se produce

interacción entre los dos pesticidas. Los niveles de IL-10 están aumentados en ratas expuestas a CYP, END o a la mezcla de ambos ($164 \pm 21\%$ de los controles, $p < 0.01$ comparado con los controles) (Tabla 1). Tampoco en este caso hay interacción entre los pesticidas en la mezcla. En cuanto a los niveles de IL-4 aumentan por exposición a END y la mezcla también induce aumento de IL-4 ($175 \pm 40\%$ de los controles, $p < 0.05$ comparado con el control) (Tabla 1). Ya que observamos el mismo efecto en hembras expuestas a END solo, que en las expuestas a CYP+END, no se produce interacción entre los dos pesticidas en ninguno de los factores inflamatorios analizados en el hipocampo, al contrario de lo que ocurría en los machos, sugiriendo también que la interacción entre los pesticidas es diferente en machos y hembras, o bien los mecanismos por los que inducen neuroinflamación son diferentes.

Por otra parte el contenido de la subunidad NR1 del receptor NMDA está aumentado significativamente en machos y hembras ($132 \pm 14\%$ y $137 \pm 13\%$ de los controles, respectivamente $p < 0.01$) expuestos a END, pero este efecto se previene por la co-exposición con CYP, tanto en machos como en hembras ($76 \pm 7\%$ y $82 \pm 11\%$ de los controles, respectivamente). El contenido de NR2A está disminuido en hembras, pero no en machos, por exposición a CYP ($64 \pm 10\%$ de los controles, $p < 0.05$) o END ($67 \pm 11\%$ de los controles) y este efecto se previene en hembras expuestas a la mezcla ($87 \pm 13\%$ de los controles). Finalmente, el contenido de NR2B está disminuido en machos expuestos a CYP ($72 \pm 14\%$ de los controles, $p < 0.05$), END ($79 \pm 5\%$, $p < 0.05$) o la mezcla ($71 \pm 11\%$ de los controles, $p < 0.05$), por tanto no se observa interacción. En las hembras, el CYP también disminuye el contenido de NR2B ($67 \pm 12\%$ de los controles, $p < 0.05$), pero no el END. La exposición a la mezcla aumenta el contenido de NR2B ($130 \pm 14\%$ de los controles) indicando que hay una interacción entre ambos pesticidas, produciendo un efecto opuesto al del CYP solo (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de proteínas en el hipocampo de machos y hembras expuestos a END, CYP o CYP+EN

| Protein | Amount of protein in hippocampus (% of control rats) | | | |
|---------|--|--------------|-------------|-------------------------|
| | | CYP | END | CY + EN |
| IL-β | Males | 185 ± 21 *** | 149 ± 28 * | 87 ± 22 ^{aa} |
| | Females | 115 ± 12 | 139 ± 19 * | 147 ± 22 * |
| Iba1 | Males | 74 ± 9 * | 108 ± 9 | 96 ± 9 |
| | Females | 83 ± 9 | 112 ± 8 | 93 ± 8 |
| IL-10 | Males | 111 ± 7 | 65 ± 9 ** | 80 ± 9 ^a |
| | Females | 183 ± 30 *** | 165 ± 21 ** | 164 ± 22 ** |
| IL-4 | Males | 115 ± 14 | 107 ± 20 | 108 ± 11 |
| | Females | 121 ± 11 | 140 ± 12 * | 175 ± 40 * |
| NR1 | Males | 104 ± 19 | 132 ± 14** | 76 ± 7 ^{*b} |
| | Females | 104 ± 15 | 137 ± 13** | 82 ± 11 ^{bb} |
| NR2A | Males | 91 ± 13 | 110 ± 23 | 85 ± 18 |
| | Females | 64 ± 10 * | 67 ± 11* | 87 ± 13 |
| NR2B | Males | 72 ± 14 * | 79 ± 5* | 71 ± 11 * |
| | Females | 67 ± 12 ** | 107 ± 14 | 130 ± 14 ^{*aa} |

Los datos se expresan como porcentaje de las ratas control. Los valores son la media±SEM de 6-10 ratas. Los valores significativamente diferentes de los controles se indican con asteriscos *p<0.05; **p<0.01 y ***p<0.001; a significativamente diferente de CYP a p<0.05, aa p<0.01, b p<0.05 y bb p<0.01.

DISCUSIÓN

1. Alteraciones en el aprendizaje asociativo y ansiedad por exposición a pesticidas durante el desarrollo. Mecanismos implicados y diferencias de género.

Según nuestros resultados, las hembras control aprenden más rápido la tarea de evitación activa que los machos control. Otros autores encontraron esto mismo y además si a las hembras se les administraba en edad temprana testosterona, realizaban la tarea peor incluso que los machos controles (Beatty y Beatty, 1970). También en ratones adolescentes se ha descrito un mejor aprendizaje de evitación por parte de las hembras (Spröwitz et al, 2013). Las diferencias de sexo en los procesos de aprendizaje condicionado, incluyendo la evitación activa, han sido revisadas por Dalla y Shors, (2009). La mejor capacidad de las hembras para aprender esta tarea puede deberse a diferentes comportamientos entre machos y hembras, ya que los machos tienden a quedarse más quietos ante un estímulo adverso, mientras que las hembras son más activas, como también se demuestra en los tests de actividad tal y como hemos comprobado en los resultados de esta tesis. La diferencia de comportamiento parece deberse a que la testosterona tiene propiedades ansiolíticas e induce una inhibición del comportamiento, es decir, la inactividad ante el estímulo adverso (Dalla y Shors, 2009). Las diferencias de sexo en el aprendizaje asociativo condicionado deben contribuir a las diferencias observadas por la exposición a los pesticidas en machos y hembras en la tarea de evitación activa. El CPF deteriora el aprendizaje asociativo en hembras, mientras que lo mejora en machos. Oriel y Kofman, (2015) describieron una disminución del número de evitaciones en la tarea de evitación activa en ratones macho adultos expuestos a CPF 1 mg/kg/día durante los días 4 a 10 postnatal. Sin embargo este efecto se produjo en una de las dos cepas utilizadas en el estudio pero no en la otra. Por tanto la discrepancia con nuestros resultados puede ser debida a que es un efecto muy específico, que debe ser diferente en ratas y ratones. El END únicamente deteriora el aprendizaje asociativo en los machos mientras que el CARB lo deteriora únicamente en hembras. El tratamiento crónico con END (2 mg/kg/día) en adultos, también deteriora la respuesta de evitación condicionada (Balasubramaniam et al, 1995). La exposición neonatal a otros pesticidas organoclorados como el clordecone también deteriora el aprendizaje de la evitación en ratas (Mactutus and Tilson, 1984). Aunque no hay literatura sobre el CARB, otros carbamatos como el carbofurano disminuyen la

respuesta de evitación tras la exposición crónica en ratas adultas (Kamboj y Sandhir, 2007).

La exposición a END también produce ansiedad en ratas macho pero no en hembras (Fig.11). Tanto el aprendizaje asociativo como la ansiedad se modulan por un circuito que implica la amígdala y el NAcc, formando parte del circuito de las emociones y la recompensa (Ramirez et al, 2015). Esto sugiere que la exposición a END debe estar afectando este circuito neuronal. Además, se ha propuesto una relación entre las diferencias en la respuesta a estímulos aversivos (evitación activa) entre hembras y machos y la mayor vulnerabilidad de las hembras a sufrir trastornos de ansiedad, la cual se debería a que el hecho de aprender mejor la asociación entre estímulo y respuesta hace más difícil de extinguir esta asociación y por tanto conduce a estados de ansiedad (Catuzzi y Beck, 2014).

2- Alteraciones del ritmo circadiano de la actividad motora por exposición a pesticidas durante el desarrollo. Mecanismos implicados y diferencias de género.

En ratas, puesto que son animales nocturnos, el ciclo sueño-vigilia corresponde con la fase de sueño durante el día (fase de luz) y la vigilia durante la noche (fase de oscuridad), momento en el cual las ratas están más activas. La exposición a algunos pesticidas altera el ciclo del sueño de las ratas. Las ratas macho expuestas a END presentan mayor número de movimientos ambulatorios y verticales que las ratas control durante la fase de luz, sugiriendo que estas ratas pueden tener alterado el ciclo del sueño. El aumento de ansiedad podría contribuir al aumento de actividad en la fase de sueño y ser responsable de posibles alteraciones del sueño. El END actúa sobre el receptor GABA. El GABA juega un papel importante en la regulación de la síntesis de melatonina (Buijs et al, 2003; Vieira et al, 2005).

El receptor GABA-A en el núcleo supraquiasmático regula la sincronización de los ritmos circadianos, tanto *in vitro* (Gribkoff et al, 2003) como *in vivo* (Pinto y Golombek, 1999; Shirakawa et al, 2001). Delpuech et al, (2015) ponen de manifiesto que la exposición a bajas dosis de END en dos especies de insectos parásitos de las larvas de *Drosophila* altera el ritmo circadiano de actividad motora, aumentando la actividad nocturna.

La exposición a CPF o CYP también aumenta la actividad durante la fase de sueño, pero no induce ansiedad. Otros autores han descrito que la exposición a CPF altera el ritmo

circadiano de la temperatura corporal incluso a bajas dosis y el de actividad motora a dosis más elevadas en ratas macho (Gordon y Padnos, 2002). Al igual que el END, la exposición durante el desarrollo a CPF o CYP debe de estar alterando el sueño. Sin embargo ningún pesticida altera el ritmo de actividad en las hembras. Por tanto existen también diferencias de sexo en el efecto de los diferentes pesticidas sobre los ritmos circadianos de actividad, siendo los machos más sensibles.

Se ha visto que existe una relación entre el TDAH y alteraciones en el ritmo circadiano y la estacionalidad (trastorno afectivo estacional) en humanos adultos (Wynchank et al, 2016). Además se sabe que alteraciones en el sueño son características de los síndromes del espectro autista (Kotagal y Broomall, 2012; Hundley et al, 2016) o del TDAH (Gregory et al, 2016; Vélez-Galarraga et al, 2016).

3- Alteraciones de la actividad motora por exposición a pesticidas durante el desarrollo. Mecanismos implicados y diferencias de género.

La exposición a CPF 0.1 mg/kg/día aumenta la actividad motora, tanto en machos como en hembras, mientras que concentraciones más elevadas no la alteran. La actividad motora se modula por complejas interacciones entre los sistemas glutamatérgico, GABAérgico, dopaminérgico y colinérgico, estando implicados diferentes circuitos neuronales y áreas cerebrales. Uno de los receptores de neurotransmisores que modula la actividad motora son los receptores de NMDA en el hipocampo ventral, cuya activación induce liberación de DA en el NAcc, la cual aumenta la actividad motora (Brudzynski y Gibson, 1997; Peleg-Raibstein y Feldon, 2006; Barr et al, 2014). Cambios en la expresión de las subunidades del receptor NMDA en el hipocampo alteran la comunicación entre el hipocampo ventral y el NAcc, de manera que se altera la neurotransmisión dopaminérgica en el núcleo accumbens, induciendo alteraciones en la actividad motora (Barr et al, 2014). Nosotros encontramos que el contenido de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA está incrementado tras la exposición a CPF 0.1 mg/kg/día pero no tras la exposición a dosis más elevadas en ratas machos. Además, el CYP disminuye la actividad motora y el contenido de la subunidad NR2B en el hipocampo de machos. Estos resultados muestran una clara asociación entre el contenido de la subunidad NR2B de los receptores NMDA en el hipocampo y la actividad motora en machos. El CPF 0.1 aumenta y el CYP disminuye, tanto el contenido de NR2B como la actividad motora. El END, CARB y dosis mayores de CPF no alteran ni el contenido de NR2B ni la actividad motora. Por tanto cambios en el

contenido de NR2B en hipocampo deben contribuir a las alteraciones de la actividad motora en machos. La ausencia de efectos de las dosis más elevadas de CPF sobre la actividad motora puede deberse a la ausencia de efectos sobre el contenido de subunidades del receptor NMDA en el hipocampo. Este hecho se podría explicar si dosis más elevadas de CPF indujeran otros efectos que anularan el aumento de subunidades del receptor NMDA inducido por dosis menores de CPF. En la literatura se han descrito otras situaciones en las que no se encuentra una respuesta dependiente de dosis por exposición a CPF. Se han descrito efectos adversos sobre el comportamiento mayores para 1 mg/kg/día que para 5 mg/kg/día de CPF, tanto en rata (Levin et al, 2002) como en ratón (Braquenier et al, 2010). La exposición a 0.1 o 0.3 mg/kg/día de CPF no inhibe la AChE mientras que dosis de 1 mg/kg/día sí induce cierto grado de inhibición (Zheng et al, 2000; Mattson et al, 2000). Se ha sugerido que las alteraciones inducidas por inhibición de la AChE por dosis más altas de CPF pueden compensar alteraciones inducidas a través de otros mecanismos durante el desarrollo por dosis menores de CPF (Levin et al, 2002). Carr et al (2001) describieron que la exposición a CPF a dosis que inhiben la AChE reducen la actividad motora. Es posible que en nuestro estudio las dosis más altas de CPF inhiban la AChE induciendo una disminución de la actividad motora que compensa el aumento inducido por dosis más bajas de CPF por mecanismos independientes de la inhibición de la AChE.

En hembras el contenido de las subunidades del receptor NMDA en hipocampo no aumenta por exposición a CPF lo cual indicaría que otros mecanismos podrían ser los responsables del aumento de la actividad motora. De hecho, existe una correlación positiva entre el contenido de las subunidades del receptor NMDA en hipocampo y la actividad motora en machos, pero no en hembras. Esto sugiere que, aunque la actividad motora espontánea esté afectada de manera similar en machos y hembras, existen diferencias de género en los mecanismos moleculares subyacentes a estas alteraciones.

Otros autores han descrito diferencias de género en la modulación de la actividad locomotora por receptores de NMDA. Las hembras son más sensibles a los efectos del bloqueo de receptores NMDA con MK-801 que los machos. Efectos motores como hiperlocomoción o ataxia se inducen en hembras a una dosis de MK-801 de 0.1 mg/kg, mientras que en machos es necesaria una dosis mayor (0.3 mg/kg) para inducir estos efectos, lo cual sugiere diferencias de género en la modulación endógena de los receptores NMDA (Hönack y Löscher, 1993). La administración aguda de MK-801 en ratas adultas es más efectiva en hembras que en machos sobre la estimulación de ataxia

y locomoción y sobre la inhibición del comportamiento estacionario, mientras que en machos es más potente sobre la estimulación de los movimientos estereotípicos y la tigmotaxis y sobre la inhibición de los movimientos verticales y el acicalamiento (Feinstein y Kritzer, 2013). Diferencias en la expresión de las subunidades del receptor NMDA durante el desarrollo en machos y hembras han sido descritas por Damborsky y Winzer-Serhan, (2012), los cuales encontraron que los machos tienen mayor expresión de NR2A y menor expresión de NR2B, comparado con las hembras, el día postnatal 5, pero las diferencias ya no se observan el día 8. Estas diferencias en la función del receptor NMDA y en la expresión de las diferentes subunidades durante el desarrollo entre machos y hembras deben contribuir a las diferencias de género que hemos encontrado en los efectos de los pesticidas sobre la expresión de las subunidades del receptor NMDA en hipocampo.

La exposición durante el desarrollo a metales como el mercurio y el plomo inducen alteraciones en la expresión de NR2A en hipocampo de forma diferente en machos y hembras (Newman et al, 2002). También se han descrito previamente en la literatura efectos de la exposición a CPF o CYP sobre los receptores NMDA. El CPF aumenta el contenido de NR2A y NR2B en el hipocampo de ratas jóvenes y adultas (Gultekin et al, 2007). Antagonistas del receptor NMDA previenen la neurotoxicidad del CPF in vitro (Rush et al, 2010). La exposición a CYP durante el desarrollo disminuye la expresión de la subunidad NR1 en hipocampo en ratones (Zhang et al, 2012).

Como ya se ha dicho en la introducción el número de casos de niños con hiperactividad en los últimos años ha aumentado y se ha relacionado con el aumento de la exposición a nuevos compuestos con efectos neurotóxicos durante el desarrollo cerebral, entre ellos el CPF (Grandjean y Landrigan, 2014). Niños de hasta tres años expuestos a CPF obtienen baja puntuación en el índice de desarrollo psicomotor de Bayler (Rauh et al, 2006). Se han descrito alteraciones en la función del receptor NMDA en modelos animales de TDHA (Jensen et al, 2009; Udvardi et al, 2013). La hiperactividad inducida por exposición a CPF durante el desarrollo puede contribuir a la aparición de TDAH en niños y nuestros resultados sugieren que alteraciones de los receptores de NMDA pueden ser la base de la hiperactividad inducida por CPF. El aumento de movimientos estereotípicos por exposición prenatal a CPF indica que el sistema dopaminérgico debe estar alterado ya que este comportamiento se induce por activación de receptores de DA (Orzi et al, 1993; Dwyer y Leslie, 2016). Este comportamiento, presente en esquizofrenia, adicción y en niños con TDAH o trastornos del espectro autista, ha sido

previamente encontrado en ratas tratadas prenatalmente con CPF (Grabovska y Salyha, 2015). Además se ha descrito recientemente que inflamación crónica de bajo grado induce movimientos estereotípicos y altera el metabolismo de la DA (Erbaş et al, 2015). Nosotros hemos encontrado neuroinflamación en hipocampo y otros autores han demostrado inflamación inducida por exposición a CPF (Zhang et al, 2015). Por tanto este podría ser un mecanismo que contribuya al aumento de movimientos estereotípicos por exposición a CPF. Por tanto, el CPF parece inducir comportamientos anormales típicos de trastornos como la esquizofrenia, el comportamiento adictivo o el TDAH o trastornos del espectro autista, siendo los machos más susceptibles a su efecto que las hembras, mientras que no hemos observado alteraciones en los movimientos estereotípicos en ratas expuestas a los otros pesticidas.

4- Alteraciones de la coordinación motora por exposición a los diferentes pesticidas durante el desarrollo. Mecanismos implicados y diferencias de género.

El efecto de los pesticidas sobre la coordinación motora depende del género y del test que se utilice. El *beam walking* mide coordinación en los movimientos más finos y es más sensible a efectos leves, que el rotarod (Stanley et al, 2005; Luong et al, 2011). La coordinación motora en el rotarod está deteriorada en las hembras expuestas a CYP, END o CPF pero no en los machos. El END también indujo incoordinación motora en el *beam walking*. Sin embargo el CYP y el CPF no afectan a la coordinación motora en el *beam walking* en hembras. Hamm et al, (1994), observaron que ratas con lesiones leves y moderadas muestran déficits significativos en el rotarod, mientras que solo se observaron déficits significativos en el *beam walking* en las ratas con lesiones moderadas, no leves. Estos autores sugieren que el rotarod mide aspectos del deterioro motor diferentes de los que evalúa el *beam walking*. En machos, aunque ningún pesticida altera la coordinación en el rotarod, la exposición a CPF o CARB sí empeora la coordinación motora en el *beam walking*, lo cual sugiere que estos pesticidas inducen alteraciones moderadas de la coordinación motora en los machos, detectables con el *beam walking*, pero no con el rotarod.

Diferencias de género en las alteraciones de la coordinación motora inducidas por diferentes agentes o alteraciones moleculares han sido descritas previamente. Un ratón mutante sin la subunidad NR1 del receptor NMDA en corteza mostró diferencias de género en el deterioro de la coordinación motora (Quintero et al, 2008). También se han

descrito diferencias de género en las alteraciones de la coordinación motora inducidas por diazepam (Olvera-Hernández y Fernández-Guasti, 2011) un agonista de la serotonina y fluoxetina (Olvera-Hernández et al. 2013) o por tóxicos como el toxoplasma (Xiao et al, 2012), etanol (Koirala et al, 2008) o plomo (Mansouri et al, 2013). Parsania et al, (2014), administraron Vinblastina (tratamiento común en algunos tipos de tumores) desde el día postnatal 23 al 52 y observaron que los machos permanecían menos tiempo sobre el rotarod que las hembras tratadas con el mismo compuesto. Estos autores sugieren que es debido al dimorfismo sexual en la organización y función del cerebro.

Las hembras control, como se puede observar en la Fig.17, permanecen más tiempo sobre el rotarod que los machos control. Esto puede deberse simplemente al menor tamaño de las hembras comparado con los machos. Kova'cs y Pearcel, (2013) describieron la influencia del peso corporal en el tiempo de permanencia en el rotarod. Los pesticidas utilizados en este estudio no afectan al peso corporal pero el peso de machos y hembras es muy diferente en el momento en el que se llevan a cabo las pruebas de coordinación motora. Por este motivo no podemos comparar directamente la coordinación motora entre machos y hembras.

Ratas expuestas durante el desarrollo a contaminantes ambientales persistentes, como algunos PCBs, muestran incoordinación motora en el rotarod, asociada con aumento del GABA extracelular en el cerebelo (Boix et al, 2010). Puesto que la exposición a END o CYP incrementa el contenido del GABA extracelular en cerebelo en hembras pero no en machos y existe una correlación significativa entre el contenido del GABA y el tiempo en el rotarod, éste podría ser el mecanismo por el que estos pesticidas inducen incoordinación motora en las hembras. La exposición a CPF (0.3 mg/kg/día) induce incoordinación motora en machos, en el *beam walking*, pero no en el rotarod. El GABA extracelular en el cerebelo está aumentado en machos, indicando que éste debe ser también el mecanismo, aunque no se ha encontrado correlación significativa entre el resultado en el *beam walking* y el GABA extracelular en el cerebelo en machos. Una posible explicación sería que el mayor tamaño de los machos, comparados con las hembras, hace que sea más difícil observar la incoordinación motora en el rotarod.

La exposición a CPF 0.3 mg/kg/día no incrementa los niveles extracelulares de GABA en el cerebelo de las hembras pero deteriora la coordinación motora en el rotarod. Estos resultados sugieren que otra alteración diferente al aumento del GABA extracelular en cerebelo sería responsable de la incoordinación motora inducida por CPF. Podría ser,

por ejemplo, que en este caso aumentara el tono GABAérgico por otras causas como aumento de la actividad de los receptores GABA-A.

Únicamente la dosis de 0.3 mg/kg/día de CPF altera la coordinación motora, tanto en machos como en hembras, mientras que la exposición a la dosis más elevada no tiene efecto, lo cual sugiere que la dosis de 1 mg/kg/día debe inducir efectos adicionales que compensan las alteraciones inducidas por exposición a CPF 0.3 mg/kg/día. Se observa el mismo efecto ya discutido en el apartado de actividad motora donde también observamos un efecto a dosis bajas y no a las dosis mayores. Levin et al (2003) describieron efectos opuestos de dos dosis de CPF en un modelo de pez cebra. Los efectos adversos sobre el comportamiento eran más fuertes en las ratas expuestas perinatalmente a 1 que a 5 mg/kg/día. También se observó en ratas (Levin et al, 2002) y ratones (Braquenier et al, 2010). La exposición a 0.1 o 0.3 mg/kg/día de CPF no inhibe la AChE mientras que la exposición a 1 mg/kg/día si la inhibe (Zheng et al, 2000; Mattson et al, 2000). Como se sugiere por Levin et al (2002), cambios en las acciones colinérgicas inducidas por las dosis más altas de CPF podrían compensar daños en el desarrollo inducido por bajas dosis del CPF a través de otros mecanismos no colinérgicos.

Los resultados también sugieren que el aumento de GABA extracelular no es suficiente para inducir incoordinación motora en los machos expuestos a CPF. El aumento de GABA extracelular podría ser compensado por otros efectos del CPF 0.3 mg/kg/día en los machos (por ejemplo reducción de la función del receptor GABA). Efectos de CPF sobre los receptores GABA se han sugerido en la literatura. Cardona et al, (2006) encontró efectos diferentes del diazepam (derivado de benzodiazepina que potencia la activación del receptor GABA) en ratas con polidipsia (aumento anormal de la sed) tratadas crónicamente con CPF que en ratas control. El tratamiento agudo con CPF disminuye los niveles de GABA en el cuerpo estriado (Montes de Oca et al, 2013). Sin embargo, el presente trabajo es el primero que muestra los efectos a largo plazo de la exposición durante el desarrollo a CPF en el sistema GABAérgico.

5- Alteraciones en el aprendizaje y memoria espaciales por exposición a diferentes pesticidas y mecanismos implicados. Diferencias entre sexos.

Al igual que ocurre con la coordinación motora, los efectos de los pesticidas en el aprendizaje espacial dependen del género. Todos los pesticidas, excepto el CARB empeoran el aprendizaje espacial en machos, pero no en hembras. Para poder explicar este efecto hay que tener en cuenta que la habilidad para aprender tareas de aprendizaje espacial es diferente entre los machos y las hembras. Los machos control realizan mejor que las hembras control las tareas de aprendizaje espacial en el laberinto radial como muestran los resultados de la tesis y otros trabajos (Roof et al, 1993) y en MWM (Roof et al, 1993; Méndez-Lopez et al, 2009a; Monfort et al, 2015).

Los mecanismos responsables de estas diferencias en la habilidad para orientarse y aprender tareas espaciales están empezando a entenderse. Monfort et al, (2015) mostraron que el mejor rendimiento de los machos estaba relacionado con una mayor LTP en machos que en hembras. Además se demostró que la expresión del receptor AMPA en la membrana es menor en las hembras debido a las diferencias en el grado de fosforilación de las subunidades de este receptor. La LTP depende de la cantidad de receptor AMPA en la membrana y por esto la LTP es menor en las hembras que en los machos (Monfort et al, 2015).

Se ha demostrado que la neuroinflamación en hipocampo perjudica la LTP y el aprendizaje espacial. Un prolongado aumento de los niveles de IL-1 β en el hipocampo empeora el aprendizaje y memoria espaciales (Moore et al, 2009; Wang et al, 2012; Hernandez-Rabaza et al, 2015). Ratas con encefalopatía hepática presentan neuroinflamación en hipocampo con aumento de los niveles de IL-1 β y deterioro del aprendizaje espacial. En estas ratas, tratamientos que reducen la expresión de IL-1 β en el hipocampo normalizan la capacidad de aprender tareas espaciales (Hernández-Rabaza et al, 2015 y 2016). Esto indica que el aumento de IL-1 β juega un papel importante en la alteración del aprendizaje espacial.

Los resultados descritos en la tesis también apoyan el papel de la IL-1 β en el aprendizaje espacial ya que hay una correlación inversa entre los niveles de IL-1 β en hipocampo y el índice de aprendizaje o la memoria de trabajo espacial en el laberinto radial. Además, hemos encontrado que en ratas controles hembra el contenido de IL-1 β es mayor que en machos controles y esto podría contribuir a la peor ejecución de los tests de aprendizaje espacial de las hembras. Por tanto estos resultados respaldan la idea

de que el aumento del contenido de IL-1 β en hipocampo contribuye a las dificultades en el aprendizaje espacial en las hembras, comparadas con los machos.

La exposición a todos los pesticidas y dosis utilizados en este trabajo aumentan la expresión de IL-1 β , aunque el CARB y el CPF a 0.1 mg/kg/día no alteran significativamente el aprendizaje espacial. Esto sugiere que un aumento de IL-1 β no es suficiente para empeorar el aprendizaje espacial. El aumento de IL-1 β podría ser compensado (en el caso del CARB o el CPF 0.1 mg/kg/día) o potenciado (en las ratas expuestas al resto de pesticidas de este trabajo) por alteraciones en otras citocinas. Sin embargo, ni el CARB ni el CPF (0.1 mg/kg/día) alteran el contenido de las otras citocinas estudiadas, ni modulan la activación de la microglía, al menos, no alteran el contenido del marcador Iba-1, al contrario el CARB disminuye el contenido de la IL-4, anti-inflamatoria, lo cual contribuiría a aumentar el estado pro-inflamatorio. El END y el CPF (1 mg/kg/día) disminuyen el contenido de la IL anti-inflamatoria IL-10, lo que podría potenciar el efecto pro-inflamatorio de la IL-1 β en el hipocampo, sin embargo, ni el CYP ni la dosis intermedia de CPF, que empeoran el aprendizaje espacial en el laberinto radial, inducen otro efecto pro-inflamatorio. Hay que tener en cuenta que los pesticidas podrían afectar otros factores inflamatorios que no hemos analizado en este trabajo.

En las hembras el END y el CARB aumentan el contenido de IL-1 β , pero no deterioran el aprendizaje espacial. Una posible explicación de porqué los pesticidas no afectan al aprendizaje espacial en las hembras podría ser porque las ratas hembra controles tienen elevado el contenido de IL-1 β en hipocampo, comparado con los machos y un aumento adicional del contenido de IL- β tras la exposición a pesticidas no se traduce en un deterioro mayor del rendimiento espacial que ya es peor en las hembras que en los machos. Dalui y Bhattacharyya, (2014) observaron que el contenido de TNF- α era mayor en hembras controles de *Drosophila melanogaster* que en machos controles y que tras la exposición al pesticida paraquat el aumento del contenido de TNF- α era mayor en machos que en hembras.

Por otro lado, en hembras expuestas a CYP, END o CARB, pero no en machos, hay un aumento del contenido de la IL-10 antiinflamatoria. La IL-10 bloquea el efecto inhibitorio de la IL-1 β en la LTP (Kelly et al, 2001), por lo que este incremento podría contribuir a reducir los efectos deletéreos del aumento de IL-1 β en ratas hembra.

Por tanto, nuestros resultados muestran que no siempre un aumento de neuroinflamación (IL- β) se traduce en un deterioro en el aprendizaje espacial, ya que la

exposición a CARB en ratas macho induce neuroinflamación, pero no deteriora el aprendizaje o memoria espaciales.

Para explicar por qué el CARB aunque aumenta IL-1 β , no empeora el aprendizaje espacial se necesitaría ampliar el análisis, por ejemplo analizar los mecanismos por los que la IL-1 β induce el deterioro del aprendizaje: la expresión en membrana de receptores, la actividad de la MAK-P38, etc. También podría anularse el efecto de la IL-1 β por un aumento paralelo del antagonista endógeno del receptor de IL-1, IL1Ra.

Otros trabajos han mostrado que la exposición prenatal a compuestos contaminantes induce neuroinflamación en adultos (Bolton et al, 2012). La exposición de astrocitos humanos fetales a CPF produce un aumento de la IL-6 pro-inflamatoria (Mense et al, 2006). El CPF induce apoptosis a través de la activación de NF-kB y de la proteína quinasa activada por mitógenos 38 (MAPK-P38) que activan una respuesta inflamatoria, tanto *in vitro* (Ki et al, 2013) como *in vivo* por exposición neonatal (Zhang et al, 2015; Tian et al, 2015), encontrándose aumentos de IL-6 y de TNF- α . La exposición a CPF aumenta la expresión de IL-1 β en peces (Wang et al, 2011) y los niveles del ARNm de IL-1 β aumentan tras la exposición a CYP en *xenopus* (Martini et al, 2010) y en ratas (Maurya et al, 2016).

A pesar de encontrar alteraciones en la expresión de citocinas en hipocampo, no hemos encontrado aumento del marcador de microglía Iba-1. Esto puede deberse a que no aumenta el contenido pero cambia la morfología de la microglía cuando se activa, o también a que el aumento de IL-1 β se produce en astrocitos o neuronas. El CYP reduce el contenido de Iba-1, lo cual podría indicar que induce apoptosis o migración de células de la microglía. Esto podría producir mayor vulnerabilidad a posibles infecciones, ya que la microglía es el principal componente de la respuesta inmune innata en el SNC. Las alteraciones en la expresión de distintas interleucinas por exposición perinatal a diferentes pesticidas deben alterar la respuesta inmune y por tanto cambiar la susceptibilidad a posibles daños que requieran la respuesta inmune como mecanismo de defensa.

Efectos opuestos en machos y hembras, como el del CPF 1 mg/kg/día, el cual aumenta los errores de referencia en los machos y los disminuye en las hembras se han descrito en otros trabajos. La exposición a CPF 1 mg/kg/día durante los días 1-4 postnatal disminuyó los errores de trabajo y de referencia en ratas hembra pero los aumentó en machos (Levin et al, 2001). Además, también hemos encontrado este efecto opuesto del CPF en el aprendizaje de la tarea de evitación activa, empeorada en hembras y mejorada

en los machos. Estos resultados juntos sugieren que la exposición durante el desarrollo a CPF tiende a igualar los perfiles de aprendizaje entre machos y hembras, ya que mejora el aprendizaje espacial que es peor en las hembras y mejora el aprendizaje asociativo en los machos, que es mejor en las hembras.

Lai et al, (2006) mostraron que la exposición a IL-1 β reduce la fosforilación en la Ser831 y la expresión en membrana de la subunidad GluR1 del receptor AMPA en neuronas del hipocampo y este efecto se previene con IL-1Ra, un antagonista endógeno de los receptores de IL-1. Los cambios en la expresión en membrana de GluR1 están mediados por receptores NMDA. Bloqueando los receptores NMDA se previene el efecto de IL-1 β sobre la expresión en superficie de GluR1. Hernandez-Rabaza et al, (2015 y 2016) demostraron que ratas con encefalopatía hepática presentan un aumento del contenido de IL-1 β en hipocampo asociado con alteraciones en la expresión en membrana de los receptores de glutamato AMPA y NMDA y con un deterioro en el aprendizaje espacial. Tratamientos que reducen el contenido de IL-1 β restauran la expresión en membrana de estos receptores y el aprendizaje espacial. Alteraciones en la expresión o función de receptores de glutamato en el hipocampo podrían también contribuir al deterioro del aprendizaje espacial por exposición a pesticidas durante el desarrollo.

La subunidad NR1, presente en todos los receptores NMDA, no está disminuida por exposición a los pesticidas, aunque está aumentada en machos expuestos a END o CPF. Tampoco disminuye la subunidad NR2A y la NR2B está disminuida por exposición a END o CYP. Por tanto, no parece que alteraciones en el contenido de las subunidades de los receptores NMDA estén asociadas al deterioro en el aprendizaje y memoria espaciales por exposición a los pesticidas. Hay que anotar que podría estar alterada la expresión en membrana de los receptores y no el contenido total, que es lo que hemos medido en este trabajo. Además, aumentos en el contenido total de una proteína pueden traducirse en disminuciones de su contenido en la membrana, ya que esto reduce su función y las células pueden responder aumentando su expresión, aunque la proteína no llega a la membrana donde ejerce su función.

El CYP deteriora el aprendizaje espacial en el laberinto radial (empeora la memoria de referencia) en machos pero lo mejora en el MWM tanto en machos como en hembras. Otros autores también encontraron diferencias entre las tareas en ambos laberintos. Spritzer et al, (2008) observaron que ratas macho adultas castradas tienen deteriorada la memoria de referencia en el laberinto radial pero no el MWM. Gaytan-Tocavén y

Olvera-Cortés, (2004) mostraron que lesiones en el cerebelo empeoran el aprendizaje en el laberinto radial pero no en el MWM, sugiriendo que el cerebelo está implicado en el aprendizaje secuencial del radial pero no en la navegación espacial en el MWM, en el cual no se requiere un aprendizaje secuencial. Estos datos apoyan que los mecanismos implicados en el aprendizaje en estos dos tests son, al menos en parte, diferentes. Una posible explicación de porqué el CYP en machos empeora la memoria de referencia en el laberinto radial pero no el aprendizaje espacial en el MWM es que podría afectar a las funciones del cerebelo y esto afectaría el aprendizaje en el laberinto radial pero no en el MWM. Otra diferencia entre ambas tareas de aprendizaje espacial es que en el caso del laberinto radial la motivación es apetitiva (comida para saciar el hambre) mientras que en el MWM es aversiva (escapar del agua). Ratonos que carecen de la subunidad GluR1 del receptor AMPA tienen deteriorada la memoria espacial a corto plazo pero la memoria a largo plazo mejorada (Sanderson et al, 2009).

6. Interacción entre los pesticidas CYP+END en una mezcla.

Nuestros resultados muestran que según el parámetro analizado se produce interacción o no y el tipo de interacción es diferente entre el CYP y el END cuando se exponen las ratas a la mezcla de estos pesticidas.

La exposición a CYP o END por separado no afecta a la memoria de trabajo en el laberinto radial en ratas macho, sin embargo la mezcla de ambos deteriora la memoria de trabajo, indicando que se produce una interacción sinérgica entre estos dos compuestos. Efectos sinérgicos se han observado también en las hembras expuestas a la mezcla, tienen deteriorado el aprendizaje asociativo, mientras que la exposición a los pesticidas individuales no tiene ningún efecto. La actividad motora en general, los movimientos verticales y estereotípicos está aumentada en las ratas expuestas a la mezcla pero no en ratas expuestas a cada pesticida individual. Además, este efecto es más evidente en machos que en hembras. Lo mismo ocurre con la exposición a CPF en machos. Como se ha discutido en la pág.93, el aumento de actividad motora y movimientos ambulatorios está relacionado con alteración del sistema dopaminérgico y está presente en individuos con trastornos como esquizofrenia, adicción, TDAH o autismo. Por tanto, la exposición a la mezcla de CYP y END pero no a cada uno individualmente puede aumentar el riesgo de sufrir estos trastornos.

En otros parámetros analizados se ha observado una interacción por la cual la co-exposición previene el efecto de uno o los dos pesticidas de la mezcla. Por ejemplo, el

CYP mejora la memoria de trabajo en ratas hembra, pero la co-exposición con END previene este efecto. La exposición a CYP o END induce incoordinación motora en ratas hembra en el rotarod, mientras que en la mezcla se previene este efecto y las ratas expuestas a la mezcla no muestran incoordinación motora. En este caso, el antagonismo se produce también a nivel neuroquímico, ya que ambos pesticidas por separado aumentan el GABA extracelular en cerebelo, produciendo incoordinación motora, mientras que la exposición a la mezcla no aumenta el GABA en cerebelo y tampoco induce incoordinación motora en estas ratas. La ansiedad inducida por exposición a END en los machos también se previene por co-exposición con el CYP.

Este efecto se ha observado en otros casos de exposición a mezclas. La exposición a PCB 126 o PCB 153 deteriora la capacidad de aprendizaje y la coordinación motora, mientras que la mezcla de cualquiera de estos PCBs con MeHg no produce efecto sobre ninguna de estas funciones (Piedrafita et al, 2008; Cauli et al, 2013).

En otras funciones, como la actividad motora, hemos observado incluso un efecto opuesto del pesticida individual comparado con la mezcla, ya que las ratas macho expuestas únicamente a CYP tienen menor actividad ambulatoria, sin embargo la mezcla aumenta esta actividad, hasta valores mayores incluso que en los controles.

En otros casos no hemos encontrado interacción entre estos dos pesticidas en la mezcla, es decir, la exposición a la mezcla produce el mismo efecto que la exposición a uno o los dos pesticidas individualmente, o simplemente ni los pesticidas solos ni su mezcla producen alteraciones. Por ejemplo, no hay interacción en el aprendizaje espacial en el laberinto radial ni en machos ni hembras y tampoco en la coordinación motora en el *beam walking*, en hembras. Este caso se encontró también para una mezcla de disruptores endocrinos, ya que encontraron los mismos efectos para la exposición a PCBs, que en la exposición a una mezcla de PCBs, MeHg y pesticidas organoclorados, sobre el metabolismo del estradiol (Desaulniers et al, 2012).

Efectos diferentes de la aditividad para una mezcla de END+CYP también se han descrito en otros trabajos. Un estudio mostró que la combinación de CYP y END produce toxicidad aguda en el SNC de la larva de una especie de sapo argentino en desarrollo, observando diferente interacción entre ambos pesticidas según el estadio del desarrollo: un efecto sinérgico durante el desarrollo del embrión, pero un efecto aditivo en el estadio de larva. Cuando la exposición era crónica, sin embargo, se producía sinergismo en ambos estadios. Los autores concluían que la mezcla de END+CYP da

lugar a diferentes tipos de interacciones en función de la duración de la exposición y del grado de desarrollo en el momento de la exposición (Svartz et al. 2016).

La desviación de la aditividad también se ha observado en mezclas de otros pesticidas. Las mezclas más estudiadas son de carbamatos y organofosforados, ya que ambos actúan inhibiendo la AChE. Gordon et al (2006) describieron desviaciones de la aditividad en el efecto de una mezcla de CARB y CPF sobre la temperatura y la inhibición de la AChE.

Por otro lado, puesto que la neuroinflamación en hipocampo contribuye al deterioro del aprendizaje espacial, hemos analizado si la interacción de los pesticidas en la mezcla se produce en paralelo en los efectos sobre el aprendizaje y memoria espaciales y en los efectos sobre la neuroinflamación. Sin embargo, nuestros resultados no muestran un paralelismo, ya que aunque la mezcla altera el aprendizaje espacial en los machos como los pesticidas individuales, el contenido de IL-1 β está aumentado por exposición a END o CYP solos, pero este aumento no se produce por exposición a la mezcla de ambos. Esto mismo ocurre con el contenido de IL-10 en machos, el cual está disminuido por exposición a END pero no por exposición a la mezcla. La mezcla no altera ninguna de las citocinas analizadas en hipocampo de machos. Por tanto, otros factores deben contribuir al deterioro del aprendizaje espacial por exposición a la mezcla en los machos. La disminución del contenido de la subunidad NR2B en el hipocampo se produce por exposición a CYP o END solos y por exposición a la mezcla de ambos, este efecto podría explicar el deterioro del aprendizaje espacial. La disminución de NR2B se ha asociado con alteraciones del aprendizaje espacial en diferentes situaciones, como por ejemplo, la exposición postnatal a MeHg (Liu et al, 2009), una anestesia durante largo tiempo con alta concentración de isofluorano (Liu et al, 2014), la exposición perinatal a di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), un disruptor endocrino contaminante ambiental (Dai et al, 2015), la exposición a arsénico (Ramos Chávez et al, 2015), la inhalación de dióxido de sulfuro (Yao et al, 2015), diabetes (Li et al, 2015), todos ellos deterioran el aprendizaje espacial en machos, asociado con una disminución de la subunidad NR2B del receptor NMDA en el hipocampo. La deficiencia del receptor D5 de DA reduce la subunidad NR2B en hipocampo, lo cual se asocia con deterioro del aprendizaje espacial en el MWM, mientras que no se afecta la memoria de trabajo (Moraga-Amaro et al, 2016). Cambios en la proporción NR2A/NR2B en el hipocampo se asocian con alteración de la LTP (Wang et al, 2016). La alteración de la LTP debe estar implicada en el deterioro del aprendizaje espacial por reducción del contenido de

NR2B inducido por exposición a CYP, END y la mezcla. Solamente la exposición a la mezcla disminuye el contenido de la subunidad NR1 del receptor NMDA en el hipocampo de los machos, pero no en aquellas ratas expuestas a CYP o END solos. Esto sugiere que la disminución de NR1 podría contribuir al deterioro de la memoria de trabajo espacial en el laberinto radial y la memoria espacial en el MWM en machos. La falta de NR1 en una subregión del hipocampo se asoció con alteración de la memoria de trabajo, sin afectarse la memoria de referencia (Niewoehner et al, 2007). La separación de un complejo entre NR1 y el receptor de DA, D1 en el hipocampo también deteriora la memoria de trabajo, corroborando el importante papel de NR1 en el hipocampo en la memoria de trabajo (Nai et al, 2010).

En cuanto al contenido de proteínas en el hipocampo, nuestros resultados muestran que los efectos del CYP o END, (aumento de IL-1 β por CYP o END y disminución de IL-10 por END) no se observan por exposición a la mezcla, por tanto se previenen estos efectos, en los machos. La disminución de Iba1 por CYP también se previene por co-exposición con END. Sin embargo en las hembras la exposición a la mezcla produce los mismos efectos que la exposición a END solo, por ejemplo en el aumento de IL-1 β y de IL-4 y un aumento de IL-10 al igual que en aquellas ratas expuestas a CYP o END solos, indicando que no hay interacción. Por tanto, estos resultados sugieren que la interacción entre CYP y END en una mezcla, respecto a su efecto sobre los factores inflamatorios, depende del género, siendo diferente en machos que en hembras.

Los antagonistas del receptor NMDA tienen efectos ansiolíticos y se ha descrito un papel del receptor NMDA en el hipocampo en la modulación de las emociones (Barkus et al, 2010). El aumento de NR1 en machos expuestos a END puede contribuir a la inducción de ansiedad por END, mientras que en las ratas expuestas a la mezcla de END y CYP no aumenta NR1 en el hipocampo y no aumenta la ansiedad.

Estos resultados muestran que la aditividad, es decir la suma de los efectos de los pesticidas individuales, no puede ser asumida, no es lo habitual. Esto es importante a la hora de prever los efectos de exposición a pesticidas en humanos.

CONCLUSIONES

1. La exposición a pesticidas durante el desarrollo afecta de forma diferente a hembras y machos.
2. Las hembras control realizan peor que los machos las tareas de aprendizaje espacial, mejor las de aprendizaje asociativo (evitación activa) y tienen mayor actividad motora.
3. El endosulfán deteriora el aprendizaje asociativo (evitación activa) en machos, pero no en hembras. También está deteriorado en las hembras expuestas perinatalmente a clorpirifos o carbaril, mientras que el clorpirifos lo mejora en los machos.
4. La exposición a cipermetrín, endosulfán o clorpirifos aumenta la actividad motora diurna, en la fase de sueño, solamente en los machos, sugiriendo que deben tener alterado el sueño.
5. El aumento del contenido de subunidades del receptor NMDA en hipocampo por exposición a clorpirifos o cipermetrín durante el desarrollo parece contribuir a las alteraciones en la actividad motora en machos adultos, pero no en hembras.
6. El aumento de los niveles de GABA extracelular en cerebelo contribuye a la incoordinación motora inducida en hembras por la exposición durante el desarrollo a cipermetrín o endosulfán.
7. La exposición a pesticidas durante el desarrollo aumenta la expresión de citocinas pro-inflamatorias en hipocampo. El aumento de IL-1 β en hipocampo contribuiría al deterioro del aprendizaje espacial y la memoria de trabajo en ratas macho expuestas a clorpirifos, endosulfán o cipermetrín.
8. Todos los pesticidas producen alteraciones neuroquímicas y neurológicas en ratas que se mantienen 2-3 meses después de la finalización de la exposición a los pesticidas durante el periodo perinatal:
 - La exposición a endosulfán altera todas las funciones neurológicas analizadas en machos o en hembras.
 - El cipermetrín afecta el aprendizaje y memoria espacial y las funciones motoras, pero no el aprendizaje asociativo y la ansiedad.
 - La exposición a clorpirifos causa alteraciones diferentes dependiendo de la dosis: Solo la dosis más baja aumenta la actividad motora, tanto en machos como en hembras. La dosis intermedia deteriora el aprendizaje espacial en machos y el asociativo en hembras y solo la dosis más alta deteriora la memoria espacial en machos.
 - La exposición a carbaril produce menos alteraciones que los demás pesticidas analizados, a pesar de utilizarse una dosis mayor.
9. Los efectos de la exposición a una mezcla de cipermetrín y endosulfán son diferentes de los que produce cada pesticida individualmente. Para algunos parámetros se producen efectos sinérgicos (v.g. errores de trabajo en el radial maze en machos). En otros parámetros la co-exposición previene el efecto de los pesticidas individuales (v.g. tiempo de latencia en el Morris Water Maze en hembras). En otros parámetros no se produce interacción (v.g. tiempo de latencia en el Morris Water Maze en machos).

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar MA, Miñarro J, Felipo V. 2000. Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Exp Neurol* 161(2):704-13.
- Al-Hachim GM, Al-Baker A. 1973. Effects of chlordane on conditioned avoidance response, brain seizure threshold and open-field performance of prenatally-treated mice. *Br J Pharmacol* 49(2):311-5.
- Aleksandrowicz DR. 1979. Endosulfan poisoning and chronic brain syndrome. *Arch Toxicol* 43(1):65-8.
- Anand M, Mehrotra S, Gopal K, Sur RN, Chandra SV. 1985. Role of neurotransmitters in endosulfan-induced aggressive behaviour in normal and lesioned rats. *Toxicol Lett* 24(1):79-84.
- Andersen NE, Dahmani L, Konishi K, Bohbot VD. 2012. Eye tracking, strategies, and sex differences in virtual navigation. *Neurobiol Learn Mem* 97(1):81-9.
- Arnaiz, A; Rigueiro, J; López, C.1995. *Inmunología* .Editorial Complutense. España. p311
- Astur RS, Taylor LB, Mamelak AN, Philpott L, Sutherland RJ. 2002. Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behav Brain Res* 132(1):77-84.
- Babot Z, Vilaró MT, Suñol C. 2007. Long-term exposure to dieldrin reduces gamma-aminobutyric acid type A and N-methyl-D-aspartate receptor function in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 85(16):3687-95.
- Balasubramaniam El, Paul V, Kazi M. 1995. Cyclodiene insecticides-induced changes in the central depressive effect of chlorpromazine in rats. *Indian J Physiol Pharmacol*. 39(3):231-6.
- Baldan Ramsey LC, Pittenger C. 2010. Cued and spatial learning in the water maze: equivalent learning in male and female mice. *Neurosci Lett* 483(2):148-51.
- Barkus C, McHugh SB....., and Bannerman DM. (2010) Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion *Eur J Pharmacol*. 626(1): 49–56.
- Barr JL, Forster GL, Unterwald EM. 2014. Repeated cocaine enhances ventral hippocampal-stimulated dopamine efflux in the nucleus accumbens and alters ventral hippocampal NMDA receptor subunit expression. *J Neurochem* 130(4):583-90.
- Beatty WW, Beatty PA. 1970. Hormonal determinants of sex differences in avoidance behavior and reactivity to electric shock in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 73(3):446-55.
- Bentivoglio M, Mariotti R, Bertini G. 2011. Neuroinflammation and brain infections: historical context and current perspectives. *Brain Res Rev* 66(1-2):152-73.

- Berkowitz GS, Obel J, Deych E, Lapinski R, Godbold J, Liu Z, Landrigan PJ, Wolff MS. 2003. Exposure to indoor pesticides during pregnancy in a multiethnic, urban cohort. *Environ Health Perspect* 111(1):79-84.
- Betancourt AM, Carr RL. 2004. The effect of chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon on brain cholinesterase, muscarinic receptor binding, and neurotrophin levels in rats following early postnatal exposure. *Toxicol Sci* 77(1):63-71.
- Binukumar BK, Bal A, Gill KD. 2011. Chronic dichlorvos exposure: microglial activation, proinflammatory cytokines and damage to nigrostriatal dopaminergic system. *Neuromolecular Med* 13(4):251-65.
- Bjørning-Poulsen M, Andersen HR, Grandjean P. 2008. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ Health* 7:50.
- Blanchard RJ, Blanchard DC. 1989. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol* 103(1):70-82
- Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407):31-9.
- Boix J, Cauli O, Felipe V. 2010. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. Mechanisms involved. *Neuroscience* 167(4):994-1003.
- Boix J, Cauli O, Leslie H, Felipe V. 2011. Differential long-term effects of developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 on motor activity and neurotransmission. Gender dependence and mechanisms involved. *Neurochem Int* 58(1):69-77.
- Bolton JL, Smith SH, Huff NC, Gilmour MI, Foster WM, Auten RL, Bilbo SD. 2012. Prenatal air pollution exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-specific manner. *FASEB J*. 26(11), 4743-4754.
- Bossi R, Vinggaard AM, Taxvig C, Boberg J, Bonefeld-Jørgensen EC. 2013. Levels of pesticides and their metabolites in Wistar rat amniotic fluids and maternal urine upon gestational exposure. *Int J Environ Res Public Health* 10(6):2271-81.
- Bouchard MF, Bellinger DC, Wright RO, Weisskopf MG. 2010. Attention-deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides. *Pediatrics* 125(6):e1270-7.
- Bouchard MF, Chevrier J, Harley KG, Kogut K, Vedar M, Calderon N, Trujillo C, Johnson C, Bradman A, Barr DB et al. . 2011. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. *Environ Health Perspect* 119(8):1189-95.
- Bourne JA. 2003. Intracerebral microdialysis: 30 years as a tool for the neuroscientist. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(1-2):16-24.
- Branch RA, Jacqz E. 1986. Subacute neurotoxicity following long-term exposure to carbaryl.

- Am J Med 80(4):741-5.
- Braquenier JB, Quertemont E, Tirelli E, Plumier JC. 2010. Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. *Neurotoxicol Teratol* 32(2):234-9.
- Briz V, Galofré M, Suñol C. 2010. Reduction of glutamatergic neurotransmission by prolonged exposure to dieldrin involves NMDA receptor internalization and metabotropic glutamate receptor 5 downregulation. *Toxicol Sci* 113(1):138-49.
- Brudzynski SM, Gibson CJ. 1997. Release of dopamine in the nucleus accumbens caused by stimulation of the subiculum in freely moving rats. *Brain Res Bull* 42(4):303-8.
- Buijs RM, van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A. 2003. The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol* 177(1):17-26.
- Cabaleiro T, Caride A, Romero A, Lafuente A. 2008. Effects of in utero and lactational exposure to endosulfan in prefrontal cortex of male rats. *Toxicol Lett* 176(1):58-67.
- Calderón-Garcidueñas L, Solt AC, Henríquez-Roldán C, Torres-Jardón R, Nuse B, Herritt L, Villarreal-Calderón R, Osnaya N, Stone I, García R et al. . 2008. Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. *Toxicol Pathol* 36(2):289-310.
- Canales JJ, Elayadi A, Errami M, Llansola M, Cauli O, Felipe V. 2003. Chronic hyperammonemia alters motor and neurochemical responses to activation of group I metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens in rats in vivo. *Neurobiol Dis* 14(3):380-90.
- Cañadas F, Cardona D, Dávila E, Sánchez-Santed F. 2005. Long-term neurotoxicity of chlorpyrifos: spatial learning impairment on repeated acquisition in a water maze. *Toxicol Sci* 85(2):944-51.
- Cao D, Chen N, Zhu C, Zhao Y, Liu L, Yang J, An L. 2015. β -cypermethrin-induced acute neurotoxicity in the cerebral cortex of mice. *Drug Chem Toxicol* 38(1):44-9.
- Cardona D, López-Grancha M, López-Crespo G, Nieto-Escamez F, Sánchez-Santed F, Flores P. 2006. Vulnerability of long-term neurotoxicity of chlorpyrifos: effect on schedule-induced polydipsia and a delay discounting task. *Psychopharmacology (Berl)*. 189(1):47-57.
- Caride A, Lafuente A, Cabaleiro T. 2010. Endosulfan effects on pituitary hormone and both nitrosative and oxidative stress in pubertal male rats. *Toxicol Lett* 197(2):106-12.
- Carr RL, Chambers HW, Guarisco JA, Richardson JR, Tang J, Chambers JE. 2001. Effects of repeated oral postnatal exposure to chlorpyrifos on open-field behavior in juvenile rats. *Toxicol Sci* 59(2):260-7.

- Casida JE, Quistad GB. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu Rev Entomol* 43:1-16.
- Castillo CG, Montante M, Dufour L, Martínez ML, Jiménez-Capdeville ME. 2002. Behavioral effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats. *Neurotoxicol Teratol* 24(6):797-804.
- Castro VL, Palermo-Neto J. 1988. Alterations in the behavior of Young and adult rats exposed to aldrin during lactation. *Braz J Med Biol Res* 21(5):987-90.
- Catuzzi JE, Beck KD. 2014. Anxiety vulnerability in women: a two-hit hypothesis. *Exp Neurol* 259:75-80
- Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, Llansola M, Mansouri MT, Felipo V. 2009. Neuroinflammation contributes to hypokinesia in rats with hepatic encephalopathy: ibuprofen restores its motor activity. *J Neurosci Res.* 87(6):1369-74.
- Cauli O, Piedrafita B, Llansola M and Felipo V. 2013. Gender differential effects of developmental exposure to methyl-mercury, polychlorinated biphenyls 126 or 153, or its combinations on motor activity and coordination *Toxicology* 311 61– 68
- Cellot G, Cherubini E. 2014. GABAergic signaling as therapeutic target for autism spectrum disorders. *Front Pediatr* 2:70.
- Cerrillo I, Olea-Serrano MF, Ibarluzea J, Exposito J, Torne P, Laguna J, Pedraza V, Olea N. 2006. Environmental and lifestyle factors for organochlorine exposure among women living in Southern Spain. *Chemosphere* 62(11):1917-24.
- Chen GH, Wang C, Yangcheng HY, Liu RY, Zhou JN. 2007. Age-related changes in anxiety are task-specific in the senescence-accelerated prone mouse 8. *Physiol Behav* 91(5):644-51.
- Chen XP, Chen WF, Wang DW. 2014. Prenatal organophosphates exposure alternates the cleavage plane orientation of apical neural progenitor in developing neocortex. *PLoS One* 9(4):e95343.
- Chiapella G, Flores-Martín J, Ridano ME, Reyna L, Magnarelli de Potas G, Panzetta-Dutari GM, Genti-Raimondi S. 2013. The organophosphate chlorpyrifos disturbs redox balance and triggers antioxidant defense mechanisms in JEG-3 cells. *Placenta* 34(9):792-8.
- Chiappa S, Padilla S, Koenigsberger C, Moser V, Brimijoin S. 1995. Slow accumulation of acetylcholinesterase in rat brain during enzyme inhibition by repeated dosing with chlorpyrifos. *Biochem Pharmacol* 49(7):955-63.
- Chiu CS, Brickley S, Jensen K, Southwell A, McKinney S, Cull-Candy S, Mody I, Lester HA.

2005. GABA transporter deficiency causes tremor, ataxia, nervousness, and increased GABA-induced tonic conductance in cerebellum. *J Neurosci* 25(12):3234-45.
- Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol* 11(3):315-35.
- Cooke SF, Bliss TV. 2006. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129(Pt 7):1659-73.
- Costa LG, Aschner M, Vitalone A, Syversen T, Soldin OP. 2004. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:87-110.
- Costa LG. 2015. The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides. *Handb Clin Neurol* 131:135-48.
- Cuenca-López MD, Brea D, Galindo MF, Antón-Martínez D, Sanz MJ, Agulla J, Castillo J, Jordán J. 2010. [Inflammatory response during ischaemic processes: adhesion molecules and immunomodulation]. *Rev Neurol* 51(1):30-40.
- Dai Y, Yang Y, Xu X, Hu Y. Effects of uterine and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate on spatial memory and NMDA receptor of hippocampus in mice. *Horm Behav*. 2015 71:41-8
- Dalla C, Shors TJ. 2009. Sex differences in learning processes of classical and operant conditioning. *Physiol Behav* 97(2): 229-238.
- Dalui S, Bhattacharyya A. 2014. Herbicide paraquat induces sex-specific variation of neuroinflammation and neurodegeneration in *Drosophila melanogaster*. *Indian J Biochem Biophys* 51(6):567-73.
- Dam K, Seidler FJ, Slotkin TA. 2000. Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Brain Res Dev Brain Res* 121(2):179-87.
- Damborsky JC, Winzer-Serhan UH. 2012. Effects of sex and chronic neonatal nicotine treatment on Na²⁺/K⁺/Cl⁻ co-transporter 1, K⁺/Cl⁻ co-transporter 2, brain-derived neurotrophic factor, NMDA receptor subunit 2A and NMDA receptor subunit 2B mRNA expression in the postnatal rat hippocampus. *Neuroscience* 225:105-17.
- David HN, Ansseau M, Abiraini JH. 2005. Dopamine-glutamate reciprocal modulation of release and motor responses in the rat caudate-putamen and nucleus accumbens of "intact" animals. *Brain Res Brain Res Rev* 50(2):336-60.
- Deidda G, Bozarth IF, Cancedda L. 2014. Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopmental disorders: investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives. *Front Cell Neurosci* 8:119.
- Delpuech JM, Bussod S, Amar A. 2015. The sublethal effects of endosulfan on the circadian rhythms and locomotor activity of two sympatric parasitoid species. *Chemosphere*

132:200-5.

- Derecki NC, Cardani AN, Yang CH, Quinnies KM, Crihfield A, Lynch KR, Kipnis J. 2010. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J Exp Med* 207(5):1067-80.
- Desaulniers D, Leingartner K, Pelletier G, Xiao GH, Bowers WJ. 2012. Effects of developmental exposure to mixtures of environmental contaminants on the hepatic metabolism of estradiol-17 β in immature female Sprague Dawley rats. *Int J Toxicol* 31(5): 454-66.
- Dési I, Gönczi L, Simon G, Farkas I, Kneffel Z. 1974. Neurotoxicologic studies of two carbamate pesticides in subacute animal experiments. *Toxicol Appl Pharmacol* 27(3):465-76.
- Devan BD, Goad EH, Petri HL. 1996. Dissociation of hippocampal and striatal contributions to spatial navigation in the water maze. *Neurobiol Learn Mem* 66(3):305-23.
- Dheen ST, Kaur C, Ling EA. 2007. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem* 14(11):1189-97.
- Dwyer JB, Leslie FM. 2016. Adolescent Maturation of Dopamine D1 and D2 Receptor Function and Interactions in Rodents. *PLoS One*. 19;11(1):e0146966.
- Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, Coyle J, McKhann G, Mobley WC, Nadel L et al. . 2008. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Crit Rev Toxicol* 38 Suppl 2:1-125.
- Ecobichon DJ. (2001). Carbamate insecticides. En: Krieger R (Ed) *Handbook of Pesticide Toxicology (Second Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 1087-1106
- Engin E, Liu J, Rudolph U. 2012. α 2-containing GABA(A) receptors: a target for the development of novel treatment strategies for CNS disorders. *Pharmacol Ther* 136(2):142-52.
- Erbas O, Akseki HS, Aktug H, Taskiran D. 2015. Low-grade chronic inflammation induces behavioral stereotypy in rats. *Metab Brain Dis* 30(3): 739-46.
- Farina C, Aloisi F, Meinel E. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28(3):138-45.
- Faro LR, Alfonso M, Cervantes R, Durán R. 2009. Comparative effects of pesticides on in vivo dopamine release in freely moving rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 105(6):395-400.
- Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Rooney RJ, Patel DH, Thuras PD. 2010. mRNA and protein levels for GABAA α 4, α 5, β 1 and GABABR1 receptors are altered in brains from subjects with autism. *J Autism Dev Disord* 40(6):743-50
- Feinstein I, Kritzer MF. 2013. Acute N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction induced by MK801 evokes sex-specific changes in behaviors observed in open-field testing in adult male and proestrus female rats. *Neuroscience* 228: 200-14.

- Felipo V, Miñana MD, Azorín I, Grisóla S. 1988. Induction of rat brain tubulin following ammonium ingestion. *J Neurochem* 51(4):1041-5.
- Felipo V, Piedrafita B, Barrios JA, Agustí A, Ahabrach H, Romero-Vives M, Barrio LC, Rey B, Gaztelu JM, Llansola M. 2015. Rats with minimal hepatic encephalopathy show reduced cGMP-dependent protein kinase activity in hypothalamus correlating with circadian rhythms alterations. *Chronobiol Int* 32(7):966-79.
- Furlan R, Bergami A, Lang R, Brambilla E, Franciotta D, Martinelli V, Comi G, Panina P, Martino G. 2000. Interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing interferon-gamma and interleukin-4. *J Neuroimmunol* 111(1-2):86-92.
- Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J. 2012. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J Immunol* 189(9):4213-9.
- García-Ayllón MS, Silveyra MX, Sáez-Valero J. 2008. Association between acetylcholinesterase and beta-amyloid peptide in Alzheimer's cerebrospinal fluid. *Chem Biol Interact* 175(1-3):209-15.
- Gaspar PA, Bustamante ML, Silva H, Aboitiz F. 2009. Molecular mechanisms underlying glutamatergic dysfunction in schizophrenia: therapeutic implications. *J Neurochem* 111(4):891-900.
- Gaytan-Tocavén L, Olvera-Cortés ME. 2004. Bilateral lesion of the cerebellar-dentate nucleus impairs egocentric sequential learning but not egocentric navigation in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 82(2): 120-127.
- Godinho AF, Stanzani SL, Ferreira FC, Braga TC, Silva MC, Chaguri JL, Dias-Júnior CA. 2014. "Permethrin chronic exposure alters motor coordination in rats: effect of calcium supplementation and amlodipine". *Environ Toxicol Pharmacol* 37(2):878-84.
- Goshen, I., Yirmiya, R. 2007. The role of pro-inflammatory cytokines in memory processes and neural plasticity. En: Ader, R. (Ed.), *Psychoneuroimmunology*, fourth ed. Academic Press, San Diego, pp. 337-377.
- Gómez RA. 2005. Elementos para una Psicobiología. 2ed, Editorial Brujas. pag 223.
- Gordon CJ, Padnos BK. 2002. Dietary exposure to chlorpyrifos alters core temperature in the rat. *Toxicology* 177(2-3):215-26.
- Gordon CJ, Padnos BK. 2002. Dietary exposure to chlorpyrifos alters core temperature in the rat. *Toxicology* 177(2-3):215-26.
- Gordon CJ, Herr DW, Gennings C, Graff JE, McMurray M, Stork L, Coffey T, Hamm A, Mack CM. 2006. Thermoregulatory response to an organophosphate and carbamate insecticide mixture: testing the assumption of dose-additivity. *Toxicology* 217(1):1-13.
- Grabovska S, Salyha Y. 2015. ADHD-like behavior in the offspring of female rats exposed to low chlorpyrifos doses before pregnancy. *Arh Hig Rada Toksikol* 66(2): 121-7.

- Grandjean P, Landrigan PJ. 2014. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol* 13(3):330-8.
- Gregory AM, Agnew-Blais JC, Matthews T, Moffitt TE, Arseneault L. 2016. ADHD and Sleep Quality: Longitudinal Analyses From Childhood to Early Adulthood in a Twin Cohort. *J Clin Child Adolesc Psychol*:1-11.
- Gribkoff VK, Pieschl RL, Dudek FE. 2003. GABA receptor-mediated inhibition of neuronal activity in rat SCN in vitro: pharmacology and influence of circadian phase. *J Neurophysiol* 90(3): 1438-48.
- Grigoryan H, Schopfer LM, Thompson CM, Terry AV, Masson P, Lockridge O. 2008. Mass spectrometry identifies covalent binding of soman, sarin, chlorpyrifos oxon, diisopropyl fluorophosphate, and FP-biotin to tyrosines on tubulin: a potential mechanism of long term toxicity by organophosphorus agents. *Chem Biol Interact* 175(1-3):180-6.
- Gultekin F, Karakoyun I, Sutcu R, Savik E, Cesur G, Orhan H, Delibas N. 2007. Chlorpyrifos increases the levels of hippocampal NMDA receptor subunits NR2A and NR2B in juvenile and adult rats. *Int J Neurosci* 117(1):47-62.
- Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. 1994. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 11(2):187-96.
- Hanchar HJ, Dodson PD, Olsen RW, Otis TS, Wallner M. 2005. Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity. *Nat Neurosci* 8(3):339-45.
- Harari R, Julvez J, Murata K, Barr D, Bellinger DC, Debes F, Grandjean P. 2010. Neurobehavioral deficits and increased blood pressure in school-age children prenatally exposed to pesticides. *Environ Health Perspect* 118(6):890-6.
- Hawley WR, Grissom EM, Barratt HE, Conrad TS, Dohanich GP. 2012. The effects of biological sex and gonadal hormones on learning strategy in adult rats. *Physiol Behav* 105(4):1014-20.
- Hayley S, Mangano E, Crowe G, Li N, Bowers WJ. 2011. An in vivo animal study assessing long-term changes in hypothalamic cytokines following perinatal exposure to a chemical mixture based on Arctic maternal body burden. *Environ Health* 10:65.
- Heise GA, Hudson JD. 1985a. Effects of pesticides and drugs on working memory in rats: continuous delayed response. *Pharmacol Biochem Behav* 23(4):591-8.
- Heise GA, Hudson JD. 1985b. Effects of pesticides and drugs on working memory in rats: continuous non-match. *Pharmacol Biochem Behav* 23(4):599-605.
- Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Muñoz MD, Gaztelu JM, Miñana MD, Felipo V. 1998. Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat in vivo. *Eur J Neurosci*

- 10(10):3201-9.
- Hernández AF, Parrón T, Tsatsakis AM, Requena M, Alarcón R, López-Guarnido O. 2013. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. *Toxicology* 307:136-45.
- Hernandez-Rabaza V, Agusti A, Cabrera-Pastor A, Fustero S, Delgado O, Taoro-Gonzalez L, Montoliu C, Llansola M, Felipo V. 2015. Sildenafil reduces neuroinflammation and restores spatial learning in rats with hepatic encephalopathy: underlying mechanisms. *J Neuroinflammation* 12:195.
- Hernández-Rabaza V, Cabrera-Pastor A, Taoro-González L, Malaguarnera M, Agustí A, Llansola M, Felipo V. 2016. Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *J Neuroinflammation* 13:41.
- Heudorf U, Angerer J, Drexler H. 2004. Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: urinary levels of metabolites of pyrethroid and organophosphorus insecticides. *Int Arch Occup Environ Health* 77(1):67-72.
- Hossain MM, Suzuki T, Unno T, Komori S, Kobayashi H. 2008. Differential presynaptic actions of pyrethroid insecticides on glutamatergic and GABAergic neurons in the hippocampus. *Toxicology* 243(1-2):155-63.
- Huang Y, Hu Z, Liu G, Zhou W, Zhang Y. 2013. Cytokines induced by long-term potentiation (LTP) recording: a potential explanation for the lack of correspondence between learning/memory performance and LTP. *Neuroscience* 231:432-43.
- Hundley RJ, Shui A, Malow BA. 2016. Relationship Between Subtypes of Restricted and Repetitive Behaviors and Sleep Disturbance in Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord*.
- Hönack D, Löscher W. 1993. Sex differences in NMDA receptor mediated responses in rats. *Brain Res* 620(1):167-70.
- Icenogle LM, Christopher NC, Blackwelder WP, Caldwell DP, Qiao D, Seidler FJ, Slotkin TA, Levin ED. 2004. Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicol Teratol* 26(1):95-101.
- Ivens IA, Schmuck G, Machemer L. 1998. Learning and memory of rats after long-term administration of low doses of parathion. *Toxicol Sci* 46(1):101-11.
- Iyyadurai R, Peter JV, Immanuel S, Begum A, Zachariah A, Jasmine S, Abhilash KP. 2014. Organophosphate-pyrethroid combination pesticides may be associated with increased toxicity in human poisoning compared to either pesticide alone. *Clin Toxicol (Phila)* 52(5):538-41.
- Jensen V, Rinholm JE, Johansen TJ, Medin T, Storm-Mathisen J, Sagvolden T, Hvalby O,

- Bergersen LH. 2009. N-methyl-D-aspartate receptor subunit dysfunction at hippocampal glutamatergic synapses in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuroscience* 158(1):353-64.
- Jiménez VL, Quilodrán PJ, Miranda OJP, Rodríguez BH. 2008. Efecto de dosis única intraperitoneal de cipermetrina en la corteza cerebral somatosensorial de ratones CF-1. *Int. J. Morphol* 26(1):19-26.
- Jones DC, Miller GW. 2008. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochem Pharmacol* 76(5):569-81.
- Jorsaraei SG, Maliji G, Azadmehr A, Moghadamnia AA, Faraji AA. 2014. Immunotoxicity effects of carbaryl in vivo and in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol* 38(3):838-44.
- Joukhadar C, Müller M. 2005. Microdialysis: current applications in clinical pharmacokinetic studies and its potential role in the future. *Clin Pharmacokinet* 44(9):895-913.
- Kamboj A, Sandhir R. 2007. Perturbed synaptosomal calcium homeostasis and behavioral deficits following carbofuran exposure: neuroprotection by N-acetylcysteine. *Neurochem Res* 32(3):507-16.
- Keeley RJ, Tyndall AV, Scott GA, Saucier DM. 2013. Sex difference in cue strategy in a modified version of the Morris water task: correlations between brain and behaviour. *PLoS One* 8(7):e69727.
- Kelly A, Lynch A, Vereker E, Nolan Y, Queenan P, Whittaker E, O'Neill LA, Lynch MA. (2001). The anti-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-10, blocks the inhibitory effect of IL-1 beta on long term potentiation. A role for JNK. *J Biol Chem*. 276(49), 45564-45572.
- Ki YW, Park JH, Lee JE, Shin IC, Koh HC. 2013. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis. *Toxicol Lett* 218(3):235-45.
- Kim JH, Vezina P. 1997. Activation of metabotropic glutamate receptors in the rat nucleus accumbens increases locomotor activity in a dopamine-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther* 283(2):962-8.
- Koirala B, Alele PE, Devaud LL. 2008. Influence of hormonal status on behavioral responses to an acute ethanol challenge during ethanol withdrawal in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 90(4):691-700.
- Kong WX, Chen SW, Li YL, Zhang YJ, Wang R, Min L, Mi X. 2006. Effects of taurine on rat behaviors in three anxiety models. *Pharmacol Biochem Behav* 83(2):271-6.
- Kotagal S, Broomall E. 2012. Sleep in children with autism spectrum disorder. *Pediatr Neurol* 47(4): 242-51.
- Kovács AD and Pearce DA. 2013. Location- and sex-specific differences in weight and motor coordination in two commonly used mouse strains. *SCIENTIFIC REPORTS* 3 : 2116.

- Laetz CA, Baldwin DH, Collier TK, Hebert V, Stark JD, Scholz NL. 2009. The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon. *Environ Health Perspect* 117(3): 348-53.
- Lafuente A, Pereiro N. 2013. Neurotoxic effects induced by endosulfan exposure during pregnancy and lactation in female and male rat striatum. *Toxicology* 311(1-2):35-40.
- Lai AY, Swayze RD, El-Husseini A, Song C. 2006. Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons. *J Neuroimmunol* 175(1-2): 97-106.
- Landrigan PJ. 2001. Pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs): an analysis of the evidence that they impair children's neurobehavioral development. *Mol Genet Metab* 73(1):11-7.
- Lauder JM, Schambra UB. 1999. Morphogenetic roles of acetylcholine. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 1:65-9.
- Lee I, Eriksson P, Fredriksson A, Buratovic S, Viberg H. 2015a. Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and biomolecular studies on chlorpyrifos and carbaryl. *Toxicol Appl Pharmacol* 288(3):429-38.
- Lee I, Eriksson P, Fredriksson A, Buratovic S, Viberg H. 2015b. Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and neuroprotein studies on endosulfan and cypermethrin. *Toxicology* 335:1-10.
- Lemaire G, Mnif W, Mauvais P, Balaguer P, Rahmani R. 2006. Activation of alpha- and beta-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life Sci* 79(12):1160-9.
- Levesque S, Surace MJ, McDonald J, Block ML. 2011. Air pollution & the brain: Subchronic diesel exhaust exposure causes neuroinflammation and elevates early markers of neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 8:105.
- Levi Y, Kofman O, Schwebel M, Shaldubina A. 2008. Discrimination and avoidance learning in adult mice following developmental exposure to diisopropylfluorophosphate. *Pharmacol Biochem Behav* 88(4):438-45.
- Levin ED, Addy N, Nakajima A, Christopher NC, Seidler FJ, Slotkin TA. 2001. Persistent behavioral consequences of neonatal chlorpyrifos exposure in rats. *Brain Res Dev Brain Res* 130(1):83-9.
- Levin ED, Addy N, Baruah A, Elias A, Christopher NC, Seidler FJ, Slotkin TA. 2002. Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. *Neurotoxicol Teratol* 24(6):733-41.
- Levin ED, Chrysanthis E, Yacisin K, Linney E. 2003. Chlorpyrifos exposure of developing zebrafish: effects on survival and long-term effects on response latency and spatial discrimination. *Neurotoxicol Teratol* 25(1):51-7.
- Levita L, Hoskin R, Champi S. 2012. Avoidance of harm and anxiety: a role for the nucleus

- accumbens. *Neuroimage* 62(1):189-98.
- Li AA, Lowe KA, McIntosh LJ, Mink PJ. 2012. Evaluation of epidemiology and animal data for risk assessment: chlorpyrifos developmental neurobehavioral outcomes. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 15(2):109-84.
- Li J, Zhang S, Zhang L, Wang R, Wang M. 2015. Effects of L-3-n-butylphthalide on cognitive dysfunction and NR2B expression in hippocampus of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Cell Biochem Biophys*. 71(1):315-22.
- Liu J, Morrow AL, Devaud LL, Grayson DR, Lauder JM. 1997. Regulation of GABA(A) receptor subunit mRNA expression by the pesticide dieldrin in embryonic brainstem cultures: a quantitative, competitive reverse transcription-polymerase chain reaction study. *J Neurosci Res* 49(5):645-53.
- Liu W, Wang X, Zhang R, Zhou Y. 2009. Effects of postnatal exposure to methylmercury on spatial learning and memory and brain NMDA receptor mRNA expression in rats. *Toxicol Lett*. 10;188(3):230-5.
- London L, Beseler C, Bouchard MF, Bellinger DC, Colosio C, Grandjean P, Harari R, Kootbodien T, Kromhout H, Little F et al. . 2012. Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. *Neurotoxicology* 33(4):887-96.
- Luong TN, Carlisle HJ, Southwell A, Patterson PH. 2011. Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *J Vis Exp*(49).
- Lynch MA. 1999. What is the biological significance of an age-related increase in IL-1beta in hippocampus? *Mol Psychiatry* 4(1):15-8.
- Mactutus CF, Tilson HA. 1984. Neonatal chlordecone exposure impairs early learning and retention of active avoidance in the rat. *Neurobehav Toxicol Teratol* 6(1):75-83.
- Mansouri MT, Naghizadeh B, López-Larrubia P, Cauli O. 2013. Behavioral deficits induced by lead exposure are accompanied by serotonergic and cholinergic alterations in the prefrontal cortex. *Neurochem Int* 62(3):232-9.
- Martínez RC, Oliveira AR, Macedo CE, Molina VA, Brandão ML. 2008. Involvement of dopaminergic mechanisms in the nucleus accumbens core and shell subregions in the expression of fear conditioning. *Neurosci Lett* 446(2-3):112-6.
- Martini F, Fernández C, Segundo LS, Tarazona JV, Pablos MV. (2010). Assessment of potential immunotoxic effects caused by cypermethrin, fluoxetine, and thiabendazole using heat shock protein 70 and interleukin-1 β mRNA expression in the anuran *Xenopus laevis*. *Environ Toxicol Chem* 29(11): 2536-2543.
- Mattson JL, Maurissen JPJ, Nolan RJ and Brzak KA. 2000. Lack of Differential Sensitivity to Cholinesterase Inhibition in Fetuses and Neonates Compared to Dams Treated Perinatally with Chlorpyrifos *Toxicol. Sci.* 53, 438–446
- Maurya SK, Mishra J, Abbas S, Bandyopadhyay S. 2016. Cypermethrin Stimulates GSK3 β -

- Dependent A β and p-tau Proteins and Cognitive Loss in Young Rats: Reduced HB-EGF Signaling and Downstream Neuroinflammation as Critical Regulators. *Mol Neurobiol* 53:968-982.
- McDaniel KL, Padilla S, Marshall RS, Phillips PM, Podhorniak L, Qian Y, Moser VC. 2007. Comparison of acute neurobehavioral and cholinesterase inhibitory effects of N-methylcarbamates in rat. *Toxicol Sci* 98(2):552-60.
- McKelvey W, Jacobson JB, Kass D, Barr DB, Davis M, Calafat AM, Aldous KM. 2013. Population-based biomonitoring of exposure to organophosphate and pyrethroid pesticides in New York City. *Environ Health Perspect* 121(11-12):1349-56.
- Méndez-López M, Méndez M, López L, Arias JL. 2009a. Spatial working memory in Wistar rats: brain sex differences in metabolic activity. *Brain Res Bull* 79(3-4):187-92.
- Méndez-López M, Méndez M, López L, Arias JL. 2009b. Sexually dimorphic c-Fos expression following spatial working memory in young and adult rats. *Physiol Behav* 98(3):307-17
- Mense SM, Sengupta A, Lan C, Zhou M, Bentsman G, Volsky DJ, Whyatt RM, Perera FP, Zhang L. 2006. The common insecticides cyfluthrin and chlorpyrifos alter the expression of a subset of genes with diverse functions in primary human astrocytes. *Toxicol Sci* 93(1):125-35.
- Miller PS, Aricescu AR. 2014. Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature* 512(7514):270-5.
- Miranda-Contreras L, Dávila-Ovalles R, Benítez-Díaz P, Peña-Contreras Z, Palacios-Prü E. 2005. Effects of prenatal paraquat and mancozeb exposure on amino acid synaptic transmission in developing mouse cerebellar cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 160(1):19-27.
- Möhler H. 2012. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 62(1):42-53
- Monfort P, Gomez-Gimenez B, Llansola M, Felipe V. 2015. Gender differences in spatial learning, synaptic activity, and long-term potentiation in the hippocampus in rats: molecular mechanisms. *ACS Chem Neurosci* 6(8):1420-7.
- Moniz AC, Bernardi MM, Spinosa HS. 1994. Effects of a pyrethroid type II pesticide on conditioned behaviors of rats. *Vet Hum Toxicol* 36(2):120-4.
- Montes de Oca L, Moreno M, Cardona D, Campa L, Suñol C, Golofré M, Flores P, Sánchez-Santed F. 2013. Long term compulsivity on the 5-choice serial reaction time task after acute Chlorpyrifos exposure. *Toxicol Lett* 216(2-3):73-85.
- Moore AH, Wu M, Shaftel SS, Graham KA, O'Banion MK. (2009). Sustained expression of interleukin-1 beta in mouse hippocampus impairs spatial memory. *Neuroscience* 164(4):1484-1495.
- Mori H, Mishina M. 1995. Structure and function of the NMDA receptor channel.

- Neuropharmacology 34(10):1219-37.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297(5868):681-3.
- Moser VC, McDaniel KL, Phillips PM, Lowit AB. 2010. Time-course, dose-response, and age comparative sensitivity of N-methyl carbamates in rats. *Toxicol Sci* 114(1):113-23.
- Muckle G, Ayotte P, Dewailly E E, Jacobson SW, Jacobson JL. 2001. Prenatal exposure of the northern Québec Inuit infants to environmental contaminants. *Environ Health Perspect* 109(12):1291-9.
- Nai Q, Li S, Wang SH, Liu J, Lee FJ, Frankland PW, Liu F. 2010. Uncoupling the D1-N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex promotes NMDA-dependent long-term potentiation and working memory. *Biol Psychiatry*. 67(3):246-54.
- Narahashi T. 1996. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol Toxicol* 79(1):1-14.
- Nasr HM, El-Demerdash FM, El-Nagar WA. 2015. Neuro and renal toxicity induced by chlorpyrifos and abamectin in rats : Toxicity of insecticide mixture. *Environ Sci Pollut Res Int*.
- Nasuti C, Gabbianelli R, Falcioni ML, Di Stefano A, Sozio P, Cantalamessa F. 2007. Dopaminergic system modulation, behavioral changes, and oxidative stress after neonatal administration of pyrethroids. *Toxicology* 229(3):194-205.
- Neta G, Goldman LR, Barr D, Apelberg BJ, Witter FR, Halden RU. 2011. Fetal exposure to chlordane and permethrin mixtures in relation to inflammatory cytokines and birth outcomes. *Environ Sci Technol* 45(4):1680-7.
- Newman HM, Yang RS, Magnusson KR. 2002. Effects of developmental exposure to lead, magnesium and zinc mixtures on spatial learning and expression of NMDA receptor subunit mRNA in Fischer 344 rats. *Toxicol Lett* 126(2):107-19.
- Nieradko-Iwanicka B, Borzecki A. 2008. Effect of cypermethrin on memory, movement activity and coordination in mice after transient incomplete cerebral ischemia. *Pharmacol Rep* 60(5):699-705.
- Niewoehner B, Single FN, Hvalby Ø, Jensen V, Meyer zum Alten Borgloh S, Seeburg PH, Rawlins JN, Sprengel R, Bannerman DM. 2007. Impaired spatial working memory but spared spatial reference memory following functional loss of NMDA receptors in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. 25(3):837-46.
- Olmos G, Lladó J. 2014. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm* 2014:861231.
- Olton DS, Feustle WA. 1981. Hippocampal function required for nonspatial working memory. *Exp Brain Res* 41(3-4):380-9.
- Olvera-Hernández S, Chavira R, Fernández-Guasti A. 2013. Sex- and endocrine-stage-

- differences in middle-aged rats in an animal model of OCD. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 44:81-7.
- Olvera-Hernández S, Fernández-Guasti A. 2011. Sex differences in the burying behavior test in middle-aged rats: effects of diazepam. *Pharmacol Biochem Behav* 99(4):532-9.
- Omurtag GZ, Tozan A, Sehirli AO, Sener G. 2008. Melatonin protects against endosulfan-induced oxidative tissue damage in rats. *J Pineal Res* 44(4):432-8.
- Oriel S, Dori A, Kofman O. 2014. Postnatal diisopropylfluorophosphate enhances conditioned vigilance in adult BALB/c and C57BL/6 mice and alters expression of acetylcholinesterase splice variants. *Behav Pharmacol*. 25(7):661-72.
- Oriel S, Kofman O. 2015. Strain dependent effects of conditioned fear in adult C57Bl/6 and Balb/C mice following postnatal exposure to chlorpyrifos: relation to expression of brain acetylcholinesterase mRNA. *Front Behav Neurosci* 9:110.
- Orzi F, Morelli M, Fieschi C, Pontieri FE. 1993. Metabolic mapping of the pharmacological and toxicological effects of dopaminergic drugs in experimental animals. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 5(2): 95-121.
- Ostrea EM, Reyes A, Villanueva-Uy E, Pacifico R, Benitez B, Ramos E, Bernardo RC, Bielawski DM, Delaney-Black V, Chiodo L et al. . 2012. Fetal exposure to propoxur and abnormal child neurodevelopment at 2 years of age. *Neurotoxicology* 33(4):669-75.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54(5):581-618.
- Padilla S, Marshall RS, Hunter DL, Lowit A. 2007. Time course of cholinesterase inhibition in adult rats treated acutely with carbaryl, carbofuran, formetanate, methomyl, methiocarb, oxamyl or propoxur. *Toxicol Appl Pharmacol* 219(2-3):202-9.
- Parsania S, Shabani M, Moazzami K, Razavinasab M, Larizadeh MH, Nazeri M, Asadi-Shekaari M, Kermani M. 2014. Gender difference in motor impairments induced by chronic administration of vinblastine. *Iran J Basic Med Sci* 17(6):433-40.
- Patel HC, Boutin H, Allan SM. 2003. Interleukin-1 in the brain: mechanisms of action in acute neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 992:39-47.
- Patro N, Shrivastava M, Tripathi S, Patro IK. 2009. S100beta upregulation: a possible mechanism of deltamethrin toxicity and motor coordination deficits. *Neurotoxicol Teratol* 31(3):169-76.
- Paul V, Balasubramaniam E, Kazi M. 1994. The neurobehavioural toxicity of endosulfan in rats: a serotonergic involvement in learning impairment. *Eur J Pharmacol* 270(1):1-7.
- Paul V, Balasubramaniam E, Jayakumar AR, Kazi M. 1995. A sex-related difference in the neurobehavioral and hepatic effects following chronic endosulfan treatment in rats. *Eur J Pharmacol* 293(4):355-60.
- Paul V, Balasubramaniam E. 1997. Effects of single and repeated administration of endosulfan

- on behaviour and its interaction with centrally acting drugs in experimental animals: a mini review. *Environ Toxicol Pharmacol* 3(2):151-7.
- Paxinos G, Watson C. 1997. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press
- Peleg-Raibstein D, Feldon J. 2006. Effects of dorsal and ventral hippocampal NMDA stimulation on nucleus accumbens core and shell dopamine release. *Neuropharmacology* 51(5):947-57.
- Persson J, Herlitz A, Engman J, Morell A, Sjölie D, Wikström J, Söderlund H. 2013. Remembering our origin: gender differences in spatial memory are reflected in gender differences in hippocampal lateralization. *Behav Brain Res* 256:219-28.
- Philbert MA, Billingsley ML, Reuhl KR. 2000. Mechanisms of injury in the central nervous system. *Toxicol Pathol* 28(1):43-53.
- Piedrafita B, Erceg S, Cauli O, Felipe V. 2008. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls or methylmercury, but not to its combination, impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway and learning in 3-month-old rats. *Neuroscience* 154(4):1408-16.
- Pinto FT, Golomberg DA. 1999. Neuroactive steroids alter the circadian system of the Syrian hamster in a phase-dependent manner. *Life Sci* 65(23):2497-504.
- Preud'homme V, Milla S, Gillardin V, De Pauw E, Denoël M, Kestemont P. 2015. Effects of low dose endosulfan exposure on brain neurotransmitter levels in the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Chemosphere* 120:357-64.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, White LE., editors. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2012. Traducido por Klajn D. Ed Panamericana
- Quintero GC, Erzurumlu RS, Vaccarino AL. 2008. Evaluation of morphine analgesia and motor coordination in mice following cortex-specific knockout of the N-methyl-D-aspartate NR1-subunit. *Neurosci Lett* 437(1):55-8.
- Ramirez F, Moscarello JM, LeDoux JE, Sears RM. 2015. Active avoidance requires a serial basal amygdala to nucleus accumbens shell circuit. *J Neurosci* 35(8):3470-7.
- Ramos-Chávez LA, Rendón-López C, Zepeda, Silva-Adaya, Del Razo LM, Gonsbatt ME. 2015. Neurological effects of inorganic arsenic exposure: altered cysteine/glutamate transport, NMDA expression and spatial memory impairment. *Front Cell Neurosci*. 9:21.
- Rastogi D, Narayan R, Saxena DK, Chowdhuri DK. 2014. Endosulfan induced cell death in Sertoli-germ cells of male Wistar rat follows intrinsic mode of cell death. *Chemosphere* 94:104-15.
- Rauh VA, Garfinkel R, Perera FP, Andrews HF, Hoepner L, Barr DB, Whitehead R, Tang D, Whyatt RW. 2006. Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics* 118(6):e1845-59.

- Ray A, Liu J, Ayoubi P, Pope C. 2010. Dose-related gene expression changes in forebrain following acute, low-level chlorpyrifos exposure in neonatal rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 248(2):144-55.
- Richardson JR, Chambers JE. 2005. Effects of repeated oral postnatal exposure to chlorpyrifos on cholinergic neurochemistry in developing rats. *Toxicol Sci* 84(2):352-9.
- Rinkevich FD, Du Y, Dong K. 2013. Diversity and Convergence of Sodium Channel Mutations Involved in Resistance to Pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol* 106(3):93-100.
- Roberts EM, English PB, Grether JK, Windham GC, Somberg L, Wolf f C. 2007. Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the California Central Valley. *Environ Health Perspect* 115:1482-9.
- Robinson K, Broxup B. 1997. A developmental neurotoxicity study of orally administered carbaryl, technical grade in the rat. ClinTrials BioResearch Ltd. Lab project no 97391, DPR vol no 169-384, rec.no 166126.
- Rodier PM. 1995. Developing brain as a target of toxicity. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 6:73-6.
- Rohlman DS, Anger WK, Lein PJ. 2011. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology* 32(2):268-76.
- Roof RL, Zhang Q, Glasier MM, Stein DG. 1993. Gender-specific impairment on Morris water maze task after entorhinal cortex lesion. *Behav Brain Res* 57 (1): 47-51
- Roze E, Meijer L, Bakker A, Van Braeckel KN, Sauer PJ, Bos AF. 2009. Prenatal exposure to organohalogenes, including brominated flame retardants, influences motor, cognitive, and behavioral performance at school age. *Environ Health Perspect* 117(12):1953-8.
- Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. 2012. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal* 2012:756357.
- Rudolph U, Möhler H. 2014. GABAA receptor subtypes: Therapeutic potential in Down syndrome, affective disorders, schizophrenia, and autism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54:483-507.
- Rush T, Liu XQ, Hjelmhaug J, Lobner D. 2010. Mechanisms of chlorpyrifos and diazinon induced neurotoxicity in cortical culture. *Neuroscience* 166(3):899-906.
- Sachana M, Flaskos J, Alexaki E, Hargreaves AJ. 2003. Inhibition of neurite outgrowth in N2a cells by leptophos and carbaryl: effects on neurofilament heavy chain, GAP-43 and HSP-70. *Toxicol In Vitro* 17(1):115-20.
- Sachana M, Flaskos J, Nikolaidis E, Hargreaves A, Alexaki-Tzivanidou E. 2001. Inhibition of rat platelet 5-hydroxytryptamine uptake by chlorpyrifos and carbaryl. *Pharmacol Toxicol* 89(4):195-200.
- Saeedi Saravi SS, Dehpour AR. 2015. Potential role of organochlorine pesticides in the pathogenesis of neurodevelopmental, neurodegenerative, and neurobehavioral

- disorders: A review. *Life Sci*.
- Sanderson DJ, Good MA, Skelton K, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JN, Bannerman DM. 2009. Enhanced long-term and impaired short-term spatial memory in GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice: evidence for a dual-process memory model. *Learn Mem* 16(6): 379-386.
- Santoni G, Cantalamessa F, Spreghini E, Sagretti O, Staffolani M, Piccoli M. 1999. Alterations of T cell distribution and functions in prenatally cypermethrin-exposed rats: possible involvement of catecholamines. *Toxicology* 138(3):175-87.
- Schettgen T, Heudorf U, Drexler H, Angerer J. 2002. Pyrethroid exposure of the general population-is this due to diet. *Toxicol Lett* 134(1-3):141-5.
- Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM. 2005. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ Health Perspect* 113(2):123-36.
- Shelton JF, Geraghty EM, Tancredi DJ, Delwiche LD, Schmidt RJ, Ritz B, Hansen RL, Hertz-Picciotto I. 2014. Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study. *Environ Health Perspect* 122(10):1103-9.
- Shirakawa T, Honma S, Honma K. 2001. Multiple oscillators in the suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol Int* 18(3): 371-87.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher FK, Uhler MD. 1999. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. 6ed. Cap: Excessive Glutamate Receptor Activation and Neurological Disorders.
- Silambarasan S, Abraham J. 2013. Mycoremediation of endosulfan and its metabolites in aqueous medium and soil by *Botryosphaeria laricina* JAS6 and *Aspergillus tamarii* JAS9. *PLoS One* 8(10):e77170.
- Silva MH, Gammon D. 2009. An assessment of the developmental, reproductive, and neurotoxicity of endosulfan. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 86(1):1-28.
- Singh AK, Jiang Y. 2003. Lipopolysaccharide (LPS) induced activation of the immune system in control rats and rats chronically exposed to a low level of the organothiophosphate insecticide, acephate. *Toxicol Ind Health* 19(2-6):93-108.
- Singh AK, Tiwari MN, Prakash O, Singh MP. 2012. A current review of cypermethrin-induced neurotoxicity and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* 10(1):64-71.
- Singh JM. 1973. Decreased performance behavior with carbaryl--an indication of clinical toxicity. *Clin Toxicol* 6(1):97-108.
- Slotkin TA, Oliver CA, Seidler FJ. 2005. Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination. *Brain Res Dev Brain Res* 157(2):172-80.

- Slotkin TA, Seidler FJ, Fumagalli F. 2007. Exposure to organophosphates reduces the expression of neurotrophic factors in neonatal rat brain regions: similarities and differences in the effects of chlorpyrifos and diazinon on the fibroblast growth factor superfamily. *Environ Health Perspect* 115(6):909-16.
- Slotkin TA, Wrench N, Ryde IT, Lassiter TL, Levin ED, Seidler FJ. 2009. Neonatal parathion exposure disrupts serotonin and dopamine synaptic function in rat brain regions: modulation by a high-fat diet in adulthood. *Neurotoxicol Teratol* 31(6):390-9.
- Smalley HE, O'Hara PJ, Bridges CH, Radeleff RD. 1969. The effects of chronic carbaryl administration on the neuromuscular system of swine. *Toxicol Appl Pharmacol* 14(3):409-19.
- Soderlund DM. 2012. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Arch Toxicol* 86(2):165-81.
- Spritzer MD, Gill M, Weinberg A, Galea LA. 2008. Castration differentially affects spatial working and reference memory in male rats. *Arch Sex Behav* 37(1): 19-29.
- Spröwitz A, Bock J, Braun K. 2013. Sex-specific positive and negative consequences of avoidance training during childhood on adult active avoidance learning in mice. *Front Behav Neurosci* 7:143.
- Starr JM, Graham SE, Ross DG, Tornero-Velez R, Scollon EJ, Devito MJ, Crofton KM, Wolansky MJ, Hughes MF. 2014. Environmentally relevant mixing ratios in cumulative assessments: a study of the kinetics of pyrethroids and their ster cleavage metabolites in blood and brain; and the effect of a pyrethroid mixture on the motor activity of rats. *Toxicology* 320:15-24.
- Svartz GV, Aronzon CM, Pérez Coll CS. 2016. Combined endosulfan and cypermethrin-induced toxicity to embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *J Toxicol Environ Health A* 79(5):197-209.
- Takase K, Mitsushima D, Funabashi T, Kimura F. 2008. Postpubertal feeding experience affects sex-specific spatial ability in rats. *Physiol Behav* 93(3):553-9.
- Tayebati SK, Di Tullio MA, Ricci A, Amenta F. 2009. Influence of dermal exposure to the pyrethroid insecticide deltamethrin on rat brain microanatomy and cholinergic/dopaminergic neurochemistry. *Brain Res* 1301:180-8.
- Terry AV, Beck WD, Warner S, Vandenhuerk L, Callahan PM. 2012. Chronic impairments in spatial learning and memory in rats previously exposed to chlorpyrifos or diisopropylfluorophosphate. *Neurotoxicol Teratol* 34(1):1-8.
- Tian J, Dai H, Deng Y, Zhang J, Li Y, Zhou J, Zhao M, Zhao M, Zhang C, Zhang Y, Wang P, Bing G, Zhao L. 2015. The effect of HMGB1 on sub-toxic chlorpyrifos exposure-induced neuroinflammation in amygdala of neonatal rats. *Toxicology* 338: 95-103.
- Tonini M, Costa LG, Candura SM, Olibet G, Rizzi CA, Garlaschelli L, Manzo L. 1989.

- Interaction of the pyrethroid insecticides tetramethrin and cypermethrin with enteric cholinergic transmission in the guinea-pig. *Neurotoxicology* 10(4):707-15.
- Torres-Altora MI, Mathur BN, Drerup JM, Thomas R, Lovinger DM, O'Callaghan JP, Bibb JA. 2011. Organophosphates dysregulate dopamine signaling, glutamatergic neurotransmission, and induce neuronal injury markers in striatum. *J Neurochem* 119(2):303-13.
- Treiman DM. 2001. GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 42 Suppl 3:8-12.
- Tripathi P, Singh A, Agrawal S, Prakash O, Singh MP. 2014. Cypermethrin alters the status of oxidative stress in the peripheral blood: relevance to Parkinsonism. *J Physiol Biochem* 70(4):915-24.
- Udvardi PT, Föhr KJ, Henes C, Liebau S, Dreyhaupt J, Boeckers TM, Ludolph AG. 2013. Atomoxetine affects transcription/translation of the NMDA receptor and the norepinephrine transporter in the rat brain--an in vivo study. *Drug Des Devel Ther* 7:1433-46.
- Vieira R, Míguez JM, Aldegunde M. 2005. GABA modulates day-night variation in melatonin levels in the cerebral ganglia of the damselfly *Ischnura graellsii* and the grasshopper *Oedipoda caerulea*. *Neurosci Lett* 376(2):111-5.
- Vélez-Galarraga R, Guillén-Grima F, Crespo-Eguílaz N, Sánchez-Carpintero R. 2016. Prevalence of sleep disorders and their relationship with core symptoms of inattention and hyperactivity in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur J Paediatr Neurol*.
- Wallace KL, Lopez J, Shaffery JP, Wells A, Paul IA, Bennett WA. 2010. Interleukin-10/Ceftriaxone prevents *E. coli*-induced delays in sensorimotor task learning and spatial memory in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Brain Res Bull* 81(1):141-8.
- Walters JK, Boswell LE, Green MK, Heumann MA, Karam LE, Morrissey BF, Waltz JE. 2009. Pyrethrin and pyrethroid illnesses in the Pacific northwest: a five-year review. *Public Health Rep* 124(1):149-59.
- Wang X, Xing H, Li X, Xu S, Wang X. 2011. Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of IL-1 and IFN- γ 2b in immune organs of common carp. *Fish Shellfish Immunol* 31(1) 126-33.
- Wang DS., Zurek AA, Lecker I, Yu J, Abramian AM, Avramescu S, Davies PA, Moss SJ, Lu WY, Orser BA. 2012. Memory deficits induced by inflammation are regulated by α 5-subunit-containing GABAA receptors. *Cell Reports* 2: 488–96.
- Wang HP, Liang YJ, Sun YJ, Hou WY, Chen JX, Long DX, Xu MY, Wu YJ. 2014. Subchronic neurotoxicity of chlorpyrifos, carbaryl, and their combination in rats. *Environ Toxicol* 29(10):1193-200.
- Wang YY, Liu S, Zhang N, Yang J, Zhang Y. 2016. Impaired hippocampal synaptic plasticity

- and NR2A/2B expression ratio in remifentanyl withdrawal rats. *Neurotoxicology*. 53:115-123.
- Wendler E, Gaspar JC, Ferreira TL, Barbiero JK, Andreatini R, Vital MA, Blaha CD, Winn P, Da Cunha C. 2014. The roles of the nucleus accumbens core, dorsomedial striatum, and dorsolateral striatum in learning: performance and extinction of Pavlovian fear-conditioned responses and instrumental avoidance responses. *Neurobiol Learn Mem* 109:27-36.
- Whyatt RM, Camann DE, Kinney PL, Reyes A, Ramirez J, Dietrich J, Diaz D, Holmes D, Perera FP. 2002. Residential pesticide use during pregnancy among a cohort of urban minority women. *Environ Health Perspect* 110(5):507-14.
- Wilson WW, Onyenwe W, Bradner JM, Nennig SE, Caudle WM. 2014a. Developmental exposure to the organochlorine insecticide endosulfan alters expression of proteins associated with neurotransmission in the frontal cortex. *Synapse* 68(11):485-97.
- Wilson WW, Shapiro LP, Brdner JM, Caudle WM. 2014b. Developmental exposure to the organochlorine insecticide endosulfan damages the nigrostriatal dopamine system in male offspring. *Neurotoxicology* 44: 279-87.
- Wolansky MJ, Harrill JA. 2008. Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: a critical review. *Neurotoxicol Teratol* 30(2):55-78.
- Worthing CR and Walker SB. (1987) *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 8th ed. The British Crop Protection Council, Thornton Heath, UK.
- Wynchank DS, Bijlenga D, Lamers F, Bron TI, Winthorst WH, Vogel SW, Penninx BW, Beekman AT, Kooij JS. 2016. ADHD, circadian rhythms and seasonality. *J Psychiatr Res* 81:87-94.
- Xiao J, Kannan G, Jones-Brando L, Brannock C, Krasnova IN, Cadet JL, Pletnikov M, Yolken RH. 2012. Sex-specific changes in gene expression and behavior induced by chronic *Toxoplasma* infection in mice. *Neuroscience* 206:39-48.
- Yao G, Yue H, Yun Y, Sang N. Chronic SO₂ inhalation above environmental standard impairs neuronal behavior and represses glutamate receptor gene expression and memory-related kinase activation via neuroinflammation in rats. *Environ Res*. 2015 137:85-93.
- Zhang H, Wang H, Xu DX. 2012. [Effects of maternal cypermethrin exposure during lactation on learning and memory ability in adult female offspring]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 30(9):672-675.
- Zhang J, Dai H, Deng Y, Tian J, Zhang C, Hu Z, Bing G, Zhao L. 2015. Neonatal chlorpyrifos exposure induces loss of dopaminergic neurons in young rats. *Toxicology* 336:17-25.
- Zheng Q, Olivier K, Won YK and Pope CN (2000). Comparative Cholinergic Neurotoxicity of Oral Chlorpyrifos Exposures in Prewaning and Adult Rats. *Toxicol. Sci.* 55 (1), 124-132. doi: 10.1093/toxsci/55.1.124