

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



FACULTAD DE PSICOLOGÍA



Trabajo Fin de Grado en Psicología

Convocatoria Julio 2016

Exposición postnatal a Clorpirifos, actividad locomotora y farmacología

Postnatal exposure to Chlorpyrifos, locomotor activity and pharmacology

Autor:

José Mata Ferrón

Tutor: Luís Fernando Sánchez Santed

Agradecimientos

Antes de comenzar con mi trabajo, me gustaría dedicar una serie de palabras a aquellas personas que me han ayudado y apoyado en la consecución de esta meta y sin las cuales no hubiese sido posible para mí llegar hasta donde me encuentro hoy en día.

En primer lugar, me gustaría agradecer a Luís Fernando Sánchez Santed su labor como tutor de este trabajo a lo largo de estos últimos meses, pues no han sido pocas las oportunidades de aprender que me ha ofrecido y de las cuales estoy orgulloso de haber sido receptor. Muchas gracias Fernando y espero que este sea el principio de un camino que culmine con mi doctorado.

En segundo lugar, me gustaría dar las gracias a mis padres y a hermano, no ya por estos últimos meses, ni estos años de carrera, sino por todo lo que han invertido en mí a lo largo de los años. Desde que yo era tan solo una idea en vuestras cabezas, hasta que por fin vine al mundo y durante estos 23 años que llevo con vosotros, solo puedo estar eternamente agradecido por todo. Os agradezco el techo en el que vivo, la ropa con la que me vestíais, la comida que me poníais en mi mesa, agradezco vuestro hombro para llorar y vuestros ojos para verme reír, os agradezco las palabras de apoyo y las correcciones necesarias para encauzar este maravilloso proyecto mío que es mi vida. Por mucho que escriba, por mucho que os diga, no habrá letras ni palabras para describir el amor que os tengo y el amor que he recibido de vosotros. Papa, mama, Rafa, mi pequeño y maravilloso Loki... gracias por ser y estar en mi vida.

En tercer lugar, quisiera agradecer a mis amigos, a todos vosotros y a vuestra estancia a mi lado. Sois risas, sois amor hecho personas, todos y cada uno de vosotros sois las losas y las barandillas del camino que ando y del apoyo que necesito. Tanto a los presentes a lo largo de la carrera, como a aquellos que me acompañan desde mi infancia. Mención especial merecen, por su peso y mi convivencia en el laboratorio con ellos estos últimos meses, Jesús Padilla Mohamed y Elena Martín González, Jesús y Elena, gracias por ser una sonrisa sobre una bata blanca.

A ti Cristian Pérez Fernández... a ti te agradezco del primer día, al último día de mis prácticas y de los que están por venir el mero hecho de tu presencia. Es enorme haberte conocido y descubierto, ciertamente es sin ti sin el cual este trabajo no podría llevarse a cabo. Por la forma de enseñar, por tu humor, por estar siempre disponible, por tu comprensión y paciencia, por tu labor como persona y profesional, por todas las horas contigo y todo lo aprendido gracias a ti, por acogerme como a uno más y hacerme sentir como tal... ojalá esto no termine aquí. Gracias de corazón Cristian, estoy seguro de que llegarás hasta donde tú quieras, eres una de las personas más sabias que he conocido nunca y haces real la frase: "No es más sabio el que más sabe, sino aquel que mejor enseña" Gracias amigo mío.

Por último... Laura, estás al lado de mí ahora mismo mientras escribo y mientras derramo una lágrima de la más pura alegría. Decir que te quiero no hace realmente justicia a lo que me inspiras cada vez que pienso en ti, que estoy contigo y que soy yo a tu lado. Dos caminos diferentes dentro de la misma carrera y un amor infinito hacia la misma. Eres una fuente de alegría incesable, inagotable, eres más que apoyo y comprensión y el amor más incondicional que he recibido en este último tramo. Laura, ten mi mano y no la sueltes, ten mi amor y no dejes de sentirlo, mahalo.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	1
Introducción.....	2
Metodología.....	9
<i>Animales.....</i>	<i>9</i>
<i>Drogas.....</i>	<i>10</i>
<i>Aparato.....</i>	<i>10</i>
<i>Procedimiento.....</i>	<i>11</i>
<i>Análisis.....</i>	<i>11</i>
Resultados.....	12
<i>Anfetamina Distancia Total.....</i>	<i>12</i>
<i>Anfetamina Tiempo en el Centro.....</i>	<i>15</i>
<i>Escopolamina Distancia Total.....</i>	<i>17</i>
<i>Escopolamina Tiempo en el Centro.....</i>	<i>20</i>
<i>Dizocilpina Distancia Total.....</i>	<i>21</i>
<i>Dizocilpina Tiempo en el Centro.....</i>	<i>23</i>
Discusión.....	24
Conclusión.....	26
Referencias.....	27

Resumen

El propósito del presente trabajo es realizar un screening de los sistemas de neurotransmisión que puedan verse afectados y/o modulados por la exposición postnatal temprana al pesticida organofosforado Clorpirifos a través de un modelo experimental animal. Para ello, se ha contado con una muestra de 40 ratas Wistar albinas (20 hembras y 20 machos) de origen propio, a las cuales se les han administrado tres sustancias psicoactivas diferentes mediante un diseño en cuadrado latino, Anfetamina con dosis de 0.5 mg/Kg y 1mg/Kg, Escopolamina con dosis de 0.5 mg/Kg y 1 mg/Kg y Dizocilpina con dosis de 0.1 mg/Kg y 0.2 mg/Kg, moduladoras cada una de un sistema de neurotransmisión diferente (catecolaminérgico, colinérgico y glutamatérgico respectivamente). Para observar los efectos sobre la conducta de los animales, se ha empleado una tarea locomotora de campo abierto (OpenField) y seleccionado las variables distancia total (cm) y tiempo de permanencia en el centro de las cajas locomotoras (seg). A su vez, se intentará puntualizar la posible acción potenciadora o inhibidora del CPF sobre los sistemas evaluados y a su vez proponer mejores y nuevas líneas de investigación futuras en función de los resultados obtenidos.

Palabras clave: Wistar, screening, neurotransmisión, Clorpirifos, OpenField, Anfetamina, Escopolamina y Dizocilpina.

Abstract

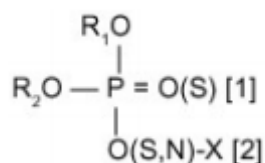
The aim of this study is to realize a screening of neurotransmitter systems that may be affected and/or modulated by early postnatal exposure to organophosphate pesticide Chlorpyrifos through an experimental animal model. To this, it has had a sample of 40 Wistar albino rats (20 females and 20 males) from own origin, which have been administered with three different psychoactive substances using a latin square design, Amphetamine with doses of 0.5 mg/Kg and 1mg /Kg, Scopolamine 0.5 mg/Kg and 1 mg/Kg and Dizocilpine dose of 0.1 mg/Kg and 0.2 mg/Kg, modulating each of a set of different neurotransmission (catecholaminergic, cholinergic and glutamatergic respectively). To observe the effects on the behavior of animals, it has been used a locomotive task outfield (OpenField) and selected variables total distance (cm) and time spent in the center of the boxes locomotives (s). In turn, we will try to point out the possible potentiating or inhibiting action of the CPF on the evaluated systems and in turn propose new and better future research based on the results obtained.

Keywords: Wistar, screening, neurotransmission, chlorpyrifos, OpenField, Amphetamine, Scopolamine and Dizocilpine.

La denominación de compuesto orgánico fosforado (COP) hace alusión al conjunto de sustancias xenobióticas y degradables que contienen enlaces fosforo-carbono, constituyendo un amplio grupo de compuestos de síntesis con una toxicidad variable, pero en su mayoría de moderada a alta.

Tomados de forma genérica, son compuestos apolares, lo que implica una escasa solubilidad al agua y una alta solubilidad en grasas, es por ello que combinado con sus acciones sobre los sistemas neuroquímicos colinérgicos hayan sido históricamente empleados como armas químicas en acciones militares formando parte de los conocidos “gases nerviosos” por su alta absorción dérmica. Pero el empleo actual más extendido y aprobado, aunque no por ello exento de una intensa supervisión sigue siendo como plaguicidas, conociéndose como insecticidas organofosforados (IOF)

Generalmente estos compuestos comparten la siguiente fórmula estructural, basada en la presencia de tres funciones de éster:



Donde R₁ y R₂ son radicales alquilo (metilo o etilo), el grupo X sería característico de cada familia química, aunque predominan los radicales arilos, contribuyendo en gran medida a las propiedades bio-físico-químicas del COP.

Dependiendo del posicionamiento de ciertos elementos dentro de la estructura previamente representada los COP pueden dividirse en 14 grupos, aunque atendiendo a la clasificación de Holmsted, cuyo criterio es el carácter del elemento en la posición X y en R₁ y R₂, destacaríamos las siguientes cuatro categorías:

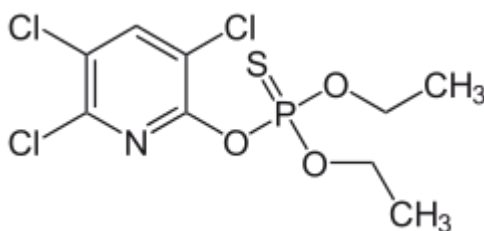
Categoría	Nombre	Elemento característico	Usos
I	Fosforicolinas	Nitrógeno cuaternario en X	Acción colinérgica directa usado en medicina.

II	Fluorofosfatos	Flúor en X	Gases nerviosos en conflictos armados aunque incluyen usos como pesticidas
III	No especificado	Grupo halogenado en X que no sea Flúor	Gases nerviosos pero no como pesticidas
IV	No especificado	IV.1- dimetoxi en R ₁ y R ₂ IV.2- dietoxi en R ₁ y R ₂ IV.3- dialkoxis en R ₁ y R ₂ IV.4- diamino en R ₁ y R ₂ IV.5- clorados y dialkoxis en R ₁ y R ₂ IV.6- tritioalquil en R ₁ y R ₂ IV.7- trifenil en R ₁ y R ₂ IV.8- sustituyentes mixtos en R ₁ y R ₂	La gran mayoría de ellos se emplean como insecticidas, plaguicidas y acaricidas. También se reportan usos como aditivos en gasolinas y lubricantes industriales.

Dentro de este último grupo se ubica el compuesto objeto de interés de este trabajo, el conocido como Clorpirifos (CPF) y comercializado bajo diversos nombres como Lorsban, Dursban, Empire, etc.

El CPF es un compuesto xenobiótico clorado organofosforado, cuyo nombre según la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) es O, O-dietil O-3,5,6-tricloro-piridil -2-il fosforotiato, y su número de registro en el Chemical Abstract

Service (CAS) es 2921-88-2. Su fórmula sería $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, con un peso molecular de 350.6 g/mol, quedando su estructura representada de la siguiente manera:



El CPF fue registrado y fabricado para su comercialización en 1965 por Dow Chemical Company en 1965. Reconocido como COP, ha sido históricamente utilizado como plaguicida en el interior de viviendas e inmuebles contra cucarachas y termitas principalmente. A su vez, ha sido empleado en los collares antiparásitos y en pipetas antiparásitas para animales domésticos, así como en el control de garrapatas y pulgas en el ganado. Pero el uso más común de esta sustancia es en la agricultura como un potente insecticida de acción colinérgica para controlar plagas, ya sea mediante rociado en las hojas de los cultivos o directamente sobre el suelo antes de proceder a la inserción de las semillas en este según la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR 1997).

Al igual que todos los COP, el mecanismo de acción del CPF es la inhibición de la acción enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE), encargada de la hidrólisis del neurotransmisor colinérgico excitatorio acetilcolina (ACh), esta se encuentra ampliamente repartida por todo el organismo, hallándose tanto en el SNC, como en el SNA y en el SNP. Una sobreestimulación colinérgica neurológica derivada de su no eliminación del espacio sináptico durante la transmisión de información neuronal, así como una sobreestimulación colinérgica en las sinapsis musculo-esqueléticas llevaría a una incesante actividad de músculos, glándulas y estructuras cerebrales, cursando en bradicardia, hipotensión, hipermotilidad intestinal y/o disminución de la presión intraóptica, con un desenlace fatal. Esta inhibición de la AChE es la más que probable causa de los tres grandes síndromes colinérgicos manifestados en humanos y asociados a la actividad de los organofosforados:

Síndrome colinérgico agudo: sudoración, broncoconstricción, incremento de secreción bronquial, diarreas, parálisis transitoria de los músculos respiratorios, temblores, miosis

y diversos síntomas centrales. Puede derivar en la muerte del organismo causada por los fallos respiratorios.

Síndrome intermedio: desarrollado escasos días después de la exposición del organismo al CPF, cuyas principales manifestaciones serían debilidad de la musculatura proximal, de los músculos involucrados en el control del cuello y debilidad respiratoria.

Neuropatía periférica: generalmente se desarrolla tras episodios de los dos síndromes anteriormente descritos, que causa una degeneración de las fibras de las vías nerviosas espinales así como de los músculos y miembros que estas inervan.

A modo de resumen de las principales propiedades físico-químicas he elaborado la siguiente tabla, recogiendo cuales son, sus principales unidades de medida y la fuente de la cual las extraje, así como la interpretación derivada de dichos valores:

Propiedades	Valores	Interpretaciones	Referencias
Constante de Henry (solubilidad de gas en liquido)	2.8×10^{-04} a 20^0C	Volátil	Pesticides Properties Data Base (2012)
Solubilidad al agua	0.39mg/L a 20^0C	Baja solubilidad en agua	OMS (2009)
Coefficiente de división octanol/agua	Log K_{ow} = 4.7mg/L a 20^0C	Afinidad muy alta para tejidos grasos animales	OMS (2009)
Coefficiente de absorción del suelo	652-30.381 L/Kg	Absorción alta más aún en suelos orgánicos	Gabremariam et al (2012)
Absorción en sedimento acuático	3.000-25.565 L/Kg	Afinad superior que para suelo	Gabremariam et al (2012)

Otro aspecto de interés a la hora de abordar la naturaleza y la acción del CPF es el estudio y determinación de sus metabolitos toxicológicamente relevantes ya que por un

lado suelen presentar mayores índices tóxicos que el mismo CPF y a su vez es la forma de poder abordar el fenómeno de la intoxicación en animales y en humanos debido a su recogida en los productos de excreción. Atendiendo a la European Food Safety Authority, los principales metabolitos del CPF serían el TCP, el TMP, el Fosforotioato y el Clorpirifos-oxon, siendo el primero y el último de ellos los de mayor interés, presentando ambos mayor toxicidad que CPF y por tanto una fuente muy importante para estudios superiores sobre toxicidad y ecotoxicidad de los COP y del CPF en particular (US EPA 2009).

A su vez, hay ciertos aspectos en los cuales estaría bien incidir para obtener una visión un poco más amplia y a su vez más profunda sobre las características de este compuesto, basándome en los criterios recogidos en el Anexo D del Convenio de Estocolmo sobre la inclusión de sustancias xenobióticas como contaminantes orgánicos persistentes y el compromiso para la eliminación de su uso como punto de referencia a la hora de realizar este inciso, y aprovechando la ratificación de este Convenio por parte de 172 países miembros y no miembros del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, resumiré brevemente tres indicadores de especial relevancia atendiendo a los criterios antes mencionados:

Persistencia: Racke et al (1994) miembros de la fábrica de CPF Dow Chemical reportan vidas medias que van de los 180 días hasta los 1576 en cinco suelos de diferentes zonas de EE UU y bajo condiciones de laboratorio. Zohng et al (2012) alertan sobre persistencias en suelo de más de siete años tras su aplicación inicial. Estos y otros estudios como los llevados a cabo considerando la fotodegradación lenta (Chai et al 2008), como los llevados a cabo en condiciones antárticas por Hermanson et al (2005) muestran que CPF excede los criterios de inclusión del Convenio de Estocolmo en términos de persistencia.

Bioacumulación: El Instituto Nacional de Salud Pública holandés elaboró una herramienta guía basada en las propiedades que se desprenden de la estructura química de diversos compuestos para incluirlos como persistentes, bioacumulativos y tóxicos. Con la aplicación de dicha herramienta por parte de Rorije et al (2011), se obtuvo el puntaje PB del CPF siendo igual a 1.428, cumpliendo el criterio de incluirse entre valores de 1 a 1.5 para considerarse una sustancia bioacumulable, persistente y tóxica.

Son muy diversos los estudios centrados en la toxicidad del CPF, para su abordaje, procederé a realizar un compendio de diferentes estudios en base a un área toxicológica concreta:

Toxicidad genética: Estudios como Ojiha et al 2011 y Cui et al 2011 muestran que la exposición aguda y crónica a CPF cursan en daños en el ADN en el tejido hepático, cerebral y renal en ratas, así como rupturas de las cadenas del mismo en ratones.

Mutaciones genéticas: Se han reportado aberraciones cromosómicas en tejidos de cultivo del bazo de ratas directamente relacionadas a la cantidad de insecticida empleado (Amer y Aly 1992). También en 2008, Ali et al demostraron inducción del micrnúcleo y daño del ADN en peces como el *Channa punctatus*.

Toxicidad inmunológica: Navarro et al (2011) encontraron que las exposiciones a CPF cursan en fallos mitogénicos de las células T en ratas adultas tratadas en los días post natales primero y cuarto con 1mg/Kg.

Toxicidad asociada a la reproducción: Se ha reportado datos de toxicidad de CPF con efectos teratogénicos en ratas con dosis maternas de 25mg/Kg administradas de forma diaria, produciendo desde descenso de peso hasta cambios e vísceras, columna y músculos externos (Farga et al 2003); Sherman (1996) reportó casos de malformaciones en ventrículos, cuerpo calloso, pies, dientes, corazón, cuerpo calloso en niños expuestos *in útero*.

Un aspecto a considerar por separado son los efectos neurotóxicos del CPF en el desarrollo, que no pueden asociarse directamente a los efectos asociados a la acción de este organofosforado sobre las colinesterasas antes nombradas. Un ejemplo de ello podemos verlo en diversos estudios cuyas conclusiones establecen que niveles de exposición fetal de 1mg/KG interfieren en el desarrollo cerebral y del SN en mamíferos, con fallos en la multiplicación, diferenciación y maduración tanto de las neuronas, como de las células gliales y en la formación y función sináptica (Whitney et al 1995; Slotkin et al 2006).

Lo relevante de este estudio, amén de los datos obtenidos, es por un lado que la concentración utilizada de CPF es menor que el umbral necesario para afectar a los mecanismos colinérgicos (Quiao et al 2002); y por otro lado que el daño en las regiones

cerebrales es más palpable conforme aumenta el periodo madurativo de los organismos. Slotkin volvió a utilizar concentraciones de 1mg/Kg en animales de laboratorio neonatos y descubrió cambios en factores de crecimiento asociados a la diferenciación de las células neuronales, a la función neurítica y a la recuperación del daño cerebral (Slotkin et al 2007).

Compendio de todo lo anterior es que CPF es un compuesto que afecta potencialmente al desarrollo neurológico a concentraciones más bajas de las necesarias para ver las colinesterasas, principales dianas de acción del pesticida, afectadas en su función. Por todo lo anterior descrito, no se puede afirmar que la acción colinérgica sea la causante de las diversas manifestaciones aberrantes resultantes de la exposición a CPF, menos aún de su exposición pre o perinatal.

Teniendo en cuenta que los diversos sistemas neuroquímicos son el sustrato neurobiológico mediante el cual el cerebro puede realizar su actividad correctamente y por tanto permitir el correcto funcionamiento psicobiológico de un organismo, el interés por descubrir la forma en la cual CPF puede afectar al desarrollo de estos sistemas queda justificado, ya que podría ser causante o coadyuvante en la manifestación de diversos problemas en procesos superiores tales como disminución en la memoria de trabajo (Horton et al 2012); funcionamiento deficitario de los sistemas de recompensa, atención, control e inhibición emocional (Rough et al 2012) e incluso parecen modular la manifestación de hiperactividad y déficits de atención (Rough et al 2006)

Los efectos en el neurodesarrollo derivados de la exposición a CPF son el objeto de interés del equipo de investigación cts-280 de la Universidad de Almería, cuyo investigador responsable es a su vez director del Prácticum *Neurodesarrollo y Psicopatología 2015-2016* y tutor del presente trabajo.

Mediante la consecución de los siguientes objetivos: (a) realizar un screening de los diferentes sistemas neuroquímicos que pueden verse modulados por la exposición temprana a CPF; (b) averiguar la acción activadora o inhibidora de CPF sobre los sistemas neuroquímicos con los que interaccione; (c) aportar más información sobre el impacto de los COP en el desarrollo del SNC y (d) formular nuevas áreas de interés y posibles nuevas líneas de investigación sobre esta temática; que llevaremos a cabo a través de un diseño experimental con animales en el laboratorio de psicología,

utilizando el paradigma locomotor de openfield combinado con administraciones de diversas sustancias psicoactivas y con diferentes dosis, someteremos a contraste la hipótesis principal planteada para este trabajo:

Ho: La exposición postnatal temprana a dosis bajas de CPF modifica el desarrollo y funcionamiento de varios sistemas neurobiológicos aparte del ya conocido sistema colinérgico.

Metodología

Animales

Se recibieron 20 ratas Wistar en estado de gestación procedentes de la empresa Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia), estabulándose individualmente en los animalarios del laboratorio de Psicobiología de la UAL en cajas de plexiglás de 50x15x25cm, bajo condiciones de laboratorio estándar (temperatura $21\pm 2C^0$; humedad $50\pm 10\%$) y ciclo de luz invertida de 12 horas (08:00-20:00, light-off 08:00) y régimen de comida y agua *ad libitum*.

Tras el parto, en el día post natal 1 (PND1, siendo el día del parto el PND0), se contaron a las crías y se distribuyeron aleatoriamente entre las madres a razón de cinco machos y cinco hembras por cada madre. Del PND10 al 15 se les administró diariamente y en su animalario una solución de CPF hecha de 1mg/Kg del pesticida con una concentración del 99%, cuyo vehículo fue aceite de maíz, a razón de 1ml/Kg o su vehículo con el método de alimentación forzada (gavage), usando una micropipeta tipo PASTEUR con punta de plástico marca DASLAB®. Finalmente, en su PND21, día del destete, fueron separadas y repartidas aleatoriamente, pero por género a razón de cuatro animales por caja.

Para el presente experimento se utilizaron 40 animales mitad machos mitad hembras, repartidos en cuatro grupos (10 hembras CPF, 10 hembras con vehículo y la misma proporción en los 20 machos). Todos los animales fueron tratados respetando la declaración de Principios Éticos de Investigación Médica en Animales de la World Medical Assembly (Helsinki, 1994).

Drogas

Todas las sustancias psicoactivas utilizadas proceden de la corporación Sigma Aldrich S.A. (Tres Cantos, Madrid), elaboradas con un periodo de antelación de 12 a 24 horas respecto a cada semana de administración.

Como solvente para la preparación de todas se utilizó suero fisiológico con concentración 0.9% (NaCL), misma solución que la usada para las administraciones de salino. Las administraciones se llevarán a cabo intraperitonealmente (ip.) a razón de 1ml/Kg mediante jeringas de 1ml y agujas de 0.6x25mm marca Termuro.

-Anfetamina, (DL Amphetamine hydrochloride (\pm)-1-fenilpropan-2-amina). Se eligió esta sustancia por su acción agonista indirecta del sistema catecolaminérgico. Tras una revisión bibliográfica se seleccionaron dos dosis estándar, una dosis alta (B) de 1mg/Kg y una dosis baja (A) 0.5mg/Kg y se empleó suero fisiológico como vehículo y como sustancia control para las administraciones.

-Escopolamina, (Scopolamine hydrobromide, (S)-3Hidroxi-2-fenilpropanoato de (1R,2R4S7S,9S)-9-metil-3-oxa-9-azatriciclo[3.3.1.0^{2,4}]non-7-ilo). Se eligió esta sustancia por su acción antagonista competitiva del sistema acetilcolinérgico. Tras una revisión bibliográfica se seleccionaron como dosis B 1mg/Kg y como dosis A 0.5mg/Kg, utilizando el mismo vehículo y sustancia control que la anterior droga.

-Dizocilpina, (MK-801-Hydrogene maleate, [5R,10S]-[+]-5-methyl-10,11- dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine. Se eligió esta sustancia por su acción antagonista no competitiva de los receptores glutamatérgicos NMDA. Tras una revisión bibliográfica se seleccionaron como dosis B 0.2mg/Kg y como dosis A 0.1mg/Kg, utilizando el mismo vehículo y sustancia control que las anteriores drogas.

Aparato

Para obtener las medidas de la actividad locomotora de los animales se empleó un OpenField (campo abierto) consistente en ocho cajas de plexiglás de 42x42x30cm separadas entre sí por un espacio de 2.5cm. En cada caja hay emplazado un dispositivo de receptor de rayos laser de 16x16x16 cuya función es detectar la actividad locomotora de los animales y transformarla en datos cuantificables. Las ocho cajas están conectadas a un ordenador ASUS VivoPC M32CD-TI014T habilitado con el programa VERSAMAX 42 software 127E que registra los datos procedentes de las cajas.

Procedimiento

Desde el comienzo del experimento hasta la última semana de administración se llevaron a los animales a sala de experimentación en condiciones de luz tenue y con una temperatura de $21 \pm 2C^0$ para asegurar su aclimatación al menos una hora antes del inicio. Antes de comenzar y entre cada tanda de animales se limpiarán las cajas del aparato con una solución propia de etanol al 70%.

El experimento comenzó en el PND39 de los animales con pesos medios de 147 ± 2.96 gr en el grupo CPF y de 147 ± 2.47 gr en el grupo control, y de 132 ± 1.74 gr y 161 ± 2.17 gr en hembras y pachos respectivamente. Durante cinco días (lunes-viernes) cada animal pasará por una hora de actividad locomotora libre para procurar la habituación al aparato. En su PND46, pesos CPF-control (228 ± 6.19 gr- 226 ± 5.33 gr) y hembras-machos (187 ± 2.63 gr- 264 ± 3.53 gr) pasarán por el mismo protocolo de habituación, pero esta vez se les pinchará ip. con suero fisiológico al 0.9% razón de 1ml/Kg para habituarse al estrés del pinchazo.

Las semanas de administración seguirán un diseño en cuadrado latino diferente para cada droga, asegurando que todos los animales pasen por las tres condiciones (salino, dosis A y dosis B), entre cada droga se dejará una semana sin administración para asegurar el lavado y el esquema de administración será lunes-jueves-lunes para el lavado entre dosis. En la primera semana de administración, PND53 de los animales y pesos CPF-control (275 ± 8.86 gr- $226-5.33$ gr) y hembras-machos (214 ± 2.98 gr- 331 ± 4.31 gr) con la droga Anfetamina (dosis A 0.5 mg/Kg-dosis B 1 mg/Kg.) La segunda droga administrada fue Escopolamina (dosis A 0.5 mg/Kg-dosis B 1 mg/Kg.) en el PND67 y con pesos CPF-control (311 ± 9.8 gr- $309-9.35$ gr) y hembras-machos (255 ± 3.24 gr- 388 ± 5.82 gr). La tercera administración correspondió a Dizocilpina (dosis A 0.1 mg/Kg-dosis B 0.2 mg/Kg.) comenzando el PND86 con pesos CPF-control (347 ± 12.63 gr- 344 ± 11.6 gr) y hembras-machos (258 ± 3.7 gr- 427 ± 7 gr). El experimento finalizó en el PND91 de los animales sin ningún tipo de contratiempo.

Análisis

Las variables elegidas fueron la distancia total (cm) recorrida por los animales en el aparato como índice de actividad locomotora y el tiempo total de permanencia en el centro (seg) como índice de ansiedad de los animales, a mayor tiempo en el centro del aparato y menor en las zonas marginales menor índice de ansiedad del animal (Walsh y

Cummis, 1976). Antes de proceder se eliminaron los datos outliers de las variables mediante el test de Grubbs empleando el software GraphPadQuickcalcs.

Seguidamente se procedió a un ANOVA de medidas repetidas con dos factores inter-sujeto con dos niveles cada uno: género (hembra-macho), tratamiento (CPF-vehículo) y dos factores intra-sujeto, uno con seis niveles y otro con tres niveles: bloques (1 a 6) y dosis (salino-A-B). El análisis *post hoc* de los datos significativos ($p < 0.005$) se realizó acorde al procedimiento de Bonferroni. El software utilizado fue IBM SPSS Statistics v22.

Finalmente se utilizó el programa GraphPad Prism v6 para la representación gráfica de los datos empleando las medias y el error típico de los mismos para ello.

Resultados

Antes de comenzar con este apartado, las gráficas que se encuentran en el cuerpo de este trabajo han sido seleccionadas a criterio del autor y debido a la imposibilidad de representar todas las obtenidas por el límite máximo de hojas (30) impuesto para este trabajo, el resto de ellas se encuentran brevemente explicadas en los anexos.

Anfetamina Distancia Total

El análisis ANOVA de medidas repetidas arroja significaciones estadísticas en el factor dosis [$F(2, 70) = 51.439, p < 0.001$], en el factor bloques [$F(2.960, 103.592) = 1.073, p < 0.001$] y en el género [$F(1, 35) = 36.208, p < 0.001$]. Así como podemos observar interacción dosis x género [$F(2, 70) = 15.760, p < 0.001$], dosis x bloques [$F(6.734, 235.675) = 12.315, p < 0.001$] y bloques x género [$F(3.540, 123.910) = 2.594, p < 0.046$]. Por último, observamos interacción entre dosis x bloques x género [$F(6.734, 235.675) = 3.567, p < 0.001$].

Dosis. (Figura 1)

En la siguiente gráfica podemos observar diferencias significativas en la distancia total recorrida por los animales en función de la dosis, [$F(2, 70) = 51.439, p < 0.001$]. En los análisis *post hoc* posteriores observamos que hay diferencias significativas entre el salino y las dosis A y B ($p < 0.001$) y entre la dosis A y la dosis B ($p < 0.023$).

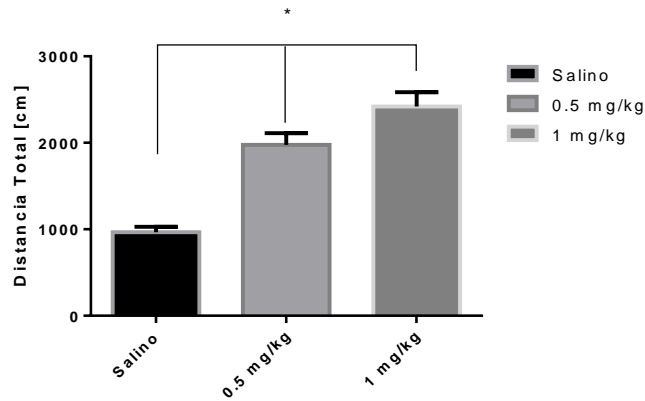


Figura1. Comparación entre las diferentes dosis en función de la distancia recorrida por los animales.* = (p<0.050)

Dosis x género. (Figura 2)

En la siguiente gráfica observamos la comparativa en función de la interacción del género y la dosis en la distancia total recorrida por los animales, observando claras diferencias en ella [$F(2, 70) = 15.760, p < 0.001$]. En los *post hoc* las diferencias estadísticamente significativas las observamos en las hembras para todas las dosis con una significación de ($p < 0.001$), hecho que se cumple en los machos con una significación de ($p < 0.010$). Entre machos y hembras vemos diferencias en las dosis A y B a favor de las hembras con una significación de ($p < 0.001$).

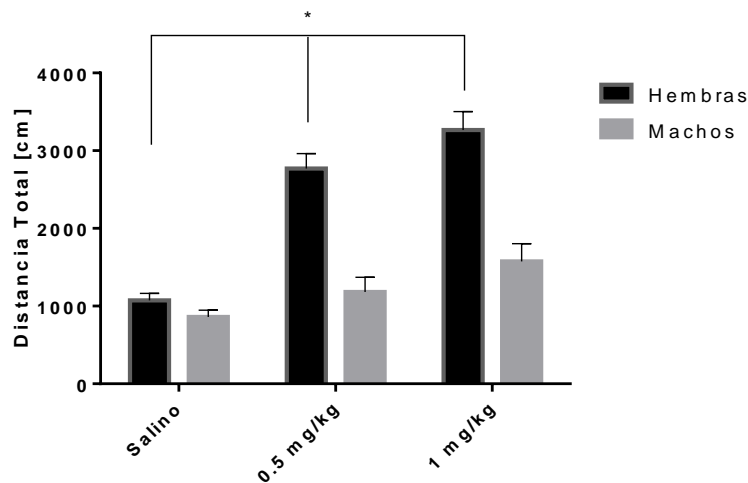


Figura2. Interacción entre el género y la dosis en distancia total recorrida por los animales, con diferencias significativas entre salino y las dosis y entre machos y hembras con diferentes dosis. * = (p<0.050)

Dosis x bloques x género. (Figura 3)

En esta gráfica vemos multitud de diferencias significativas entre todas las condiciones, lo más resaltable es la diferencia en distancia recorrida de las hembras respecto de los machos y a su vez, un descenso general de la actividad de los animales conforme avanzan de bloque, siendo este descenso más acusado en los machos que en las hembras y en la administración del salino en comparación con las dosis A y B, [F (6.734, 235.675) = 3.567, $p < 0.001$]. En los análisis *post hoc* posteriores para la condición salino encontramos diferencias significativas en el primer y segundo bloque entre hembras y machos a favor de las primeras con ($p < 0.014$) y ($p < 0.010$) respectivamente. En las dosis A y B vemos diferencias del primer bloque respecto al resto a favor de las hembras y en todo momento con significación de ($p < 0.001$). Por otro lado, si comparamos la actuación por género en función de la dosis en los diferentes bloques, las hembras en la condición salino muestran diferencias significativas del primer bloque respecto de los otros con significación de ($p < 0.001$) en todas las comparaciones, y del bloque 2 respecto del 5 y del 6 con ($p < 0.047$) y ($p < 0.002$). En la dosis A, volvemos a observar las mismas diferencias significativas en el primer bloque en comparación con el resto con el mismo índice de significación en todos los casos ($p < 0.001$), vemos diferencias significativas del bloque 2 respecto al cuarto, quinto y sexto con índices de ($p < 0.001$), ($p < 0.003$) y ($p < 0.001$) respectivamente y vemos también diferencias significativas del bloque 3 respecto al 4, 5 y 6 con ($p < 0.001$) en todos los casos. En la dosis B, solo observamos diferencias significativas en el bloque 1 en comparación con el resto de ellos menos en el bloque 4, en este caso los índices de significación serían ($p < 0.001$) y ($p < 0.019$) comparando el primero con el segundo y tercer bloque, y de ($p < 0.001$) comparando el primer bloque con el quinto y el sexto. Por último, en el grupo de los machos solo existirían diferencias significativas entre el primer bloque comparado con el resto de ellos en las tres condiciones de administración y en todo momento con índices de significación de ($p < 0.001$).

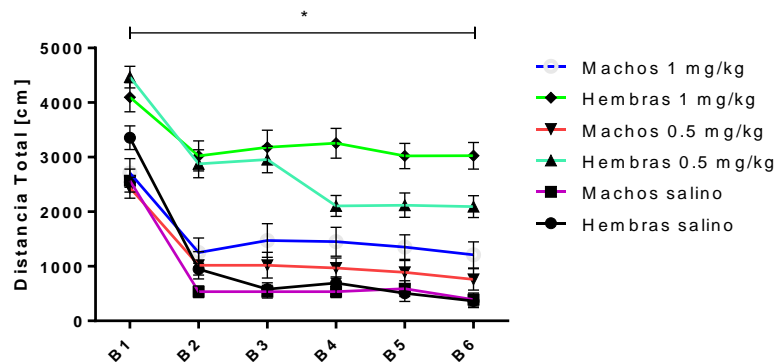


Figura3. Interacción entre hembras y machos con salino y las dosis A y B en función de la distancia recorrida a lo largo de los diferentes bloques temporales. * = (p<0.050)

Anfetamina Tiempo en el Centro

El análisis ANOVA de medidas repetidas arroja significaciones estadísticas en función de la dosis [$F(2, 58) = 35.265, p < 0.001$], en el factor bloques [$F(3.417, 99.102) = 9.959, p < 0.001$] y en las interacciones dosis x bloques [$F(6.098, 176.834) = 3.815, p < 0.001$], género x bloques x tratamiento [$F(14.330, 125.568) = 2.432, p < 0.046$] y finalmente en género x dosis x bloques [$F(8.699, 252.269) = 2.114, p < 0.031$].

Dosis. (Figura 4)

En esta gráfica podemos observar claramente diferencias significativas entre la condición salino y las dosis A y B, con estancias en el centro del OpenField mayores en estas dos últimas, [$F(2, 58) = 35.265, p < 0.001$]. El análisis *post hoc* para el factor dosis nos deja con diferencias significativas entre el salino y las dosis A y B de ($p < 0.001$) en ambos casos.

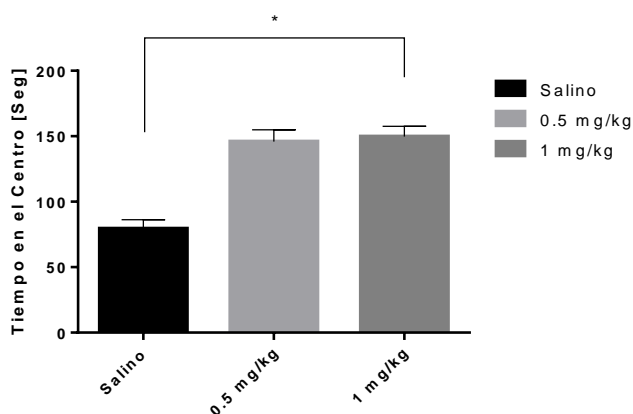


Figura4. Comparación del tiempo de permanencia en el centro de la caja en función de la dosis recibida por los animales. * = (p<0.050)

Género x tratamiento x bloques. (Figura 5)

En líneas generales podemos observar unos mayores índices de permanencia en el centro de las cajas en las hembras en comparación con los machos y respecto al tratamiento, las hembras tratadas con CPF respecto a los machos de la misma condición permanecen más en el centro, sucediendo lo mismo en el grupo tratado con vehículo, [F (14.330, 125.568) = 2.432, $p < 0.046$]. En el análisis *post hoc* vemos diferencias significativas en las hembras con vehículo entre el bloque 2 y 5 ($p < 0.049$); y en los machos CPF entre el bloque 1 y 2 ($p < 0.030$), entre el bloque 1 y 3 de ($p < 0.008$), entre el 1 y el 4 de ($p < 0.007$) y entre el 1 y el 5 de ($p < 0.016$). Finalmente, si tenemos en cuenta el género y el tratamiento, solo los machos tratados con vehículo muestran diferencias significativas entre los bloques 1 y 2 ($p < 0.014$) y entre el bloque 1 y 6 ($p < 0.026$).

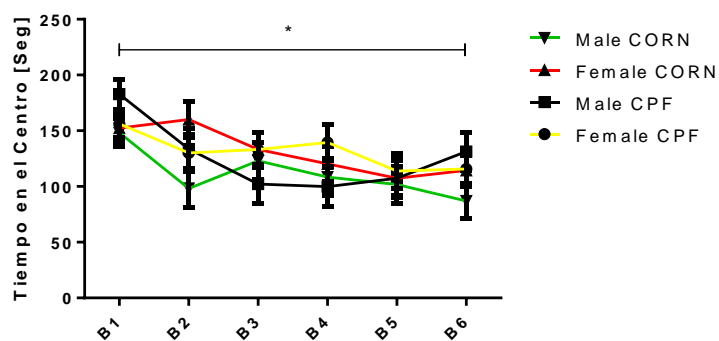


Figura 5. Interacciones entre el género y el tratamiento recibido en función de la permanencia en el centro de la caja a lo largo de los diferentes bloques temporales. * = ($p < 0.05$)

Género x dosis x bloques

En esta gráfica vemos claramente mayores índices de permanencia en el centro del OpenField para los animales administrados con las dosis A y B en comparación con el salino y curiosamente vemos que las hembras administradas con la dosis baja (A) permanecen en mayor medida en el centro que los machos con dosis altas (B), [F (8.699, 252.269) = 2.114, $p < 0.031$]. El análisis *post hoc* para las hembras nos muestra significaciones estadísticas en según el bloque al comparar las diferentes dosis, encontrando en el bloque 1 diferencias entre salino y dosis A y B de ($p < 0.0017$) y ($p < 0.015$); en el bloque 3 de ($p < 0.008$) y ($p < 0.040$) al comparar salino con A y con B; en el bloque 5 siguiendo el mismo patrón las significaciones serían ($p < 0.003$) y ($p < 0.001$) respectivamente y en el bloque 6 las diferencias significativas entre salino y ambas dosis serían de ($p < 0.001$). Dentro de los machos en el segundo bloque entre salino y dosis A y B hay diferencias significativas de ($p < 0.022$) y ($p < 0.001$); en el

bloque 3 entre salino y dosis B ($p < 0.001$); en el quinto entre salino y dosis A ($p < 0.037$) y salino y dosis B (0.001) y finalmente en el bloque 6 las diferencias significativas se dan entre salino y dosis A ($p < 0.001$) y entre dosis A y B ($p < 0.048$). Comparando machos y hembras en función de la dosis y del bloque hay diferencias significativas entre ellos de ($p < 0.037$) con el salino en el bloque 2; en la dosis A en el bloque 2 de ($p < 0.044$) y en la dosis B en el sexto bloque de ($p < 0.001$).

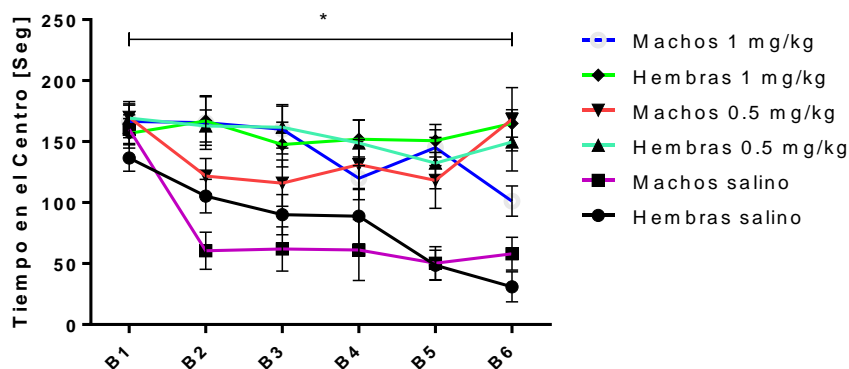


Figura 6. Interacción entre hembras y machos con salino y las dosis A y B en función de la distancia recorrida a lo largo de los diferentes bloques temporales. * = ($p < 0.050$)

Escopolamina Distancia Total

El análisis ANOVA de medidas repetidas arroja significaciones en el factor dosis [$F(1.563, 50.013) = 4.907, p < 0.017$], en el factor bloques [$F(1.781, 56.977) = 21.351, p < 0.001$] y en el factor género [$F(1, 32) = 7611., p < 0.010$]. A su vez vemos interacciones significativas en género x dosis [$F(1.563, 50.013) = 4.058, p < 0.032$], en género x bloques [$F(4.945, 164.184) = 3.258, p < 0.008$], en dosis x tratamiento [$F(1.664, 54.896) = 4.139, p < 0.027$] y dosis x bloques [$F(23.149, 100.766) = 6.039, p < 0.001$]. Finalmente, observamos significaciones también en las interacciones dosis x género x bloques [$F(4.945, 164.184) = 6.893, p < 0.001$].

Dosis. (Figura 7)

En la siguiente gráfica podemos observar diferencias significativas en la distancia total recorrida por los animales en función de la dosis, [$F(1.664, 54.896) = 27.919, p < 0.001$]. En los análisis *post hoc* observamos diferencias significativas entre el salino y las dosis A y B ($p < 0.001$), a favor de estas últimas.

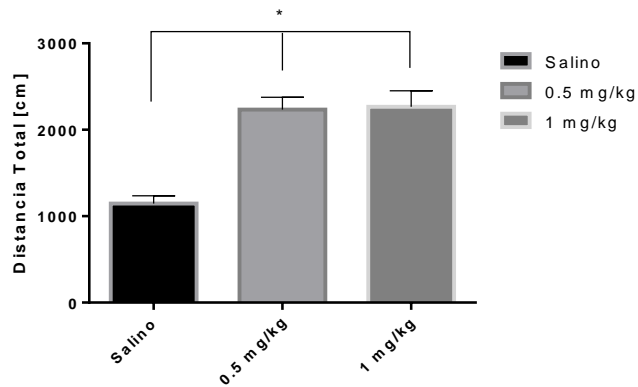


Figura7. Comparación del tiempo de permanencia en el centro de la caja en función de la dosis recibida por los animales. * = (p<0.050)

Dosis x género. (Figura 8)

En la siguiente gráfica observamos la comparativa en función de la interacción del género y la dosis en la distancia total recorrida por los animales, observando claras diferencias a favor de las hembras y de las dosis A y B, [F (1.664, 54.896) = 17.504, p<0.001]. Análisis *post hoc* posteriores arrojan diferencias significativas entre las hembras y los machos a favor de las primeras en las dosis A y B con una significación estadística de (p<0.001) en ambas. Además, en las hembras vemos diferencias significativas claras entre el salino y las otras dos dosis, en ambos casos con un índice de (p<0.001).

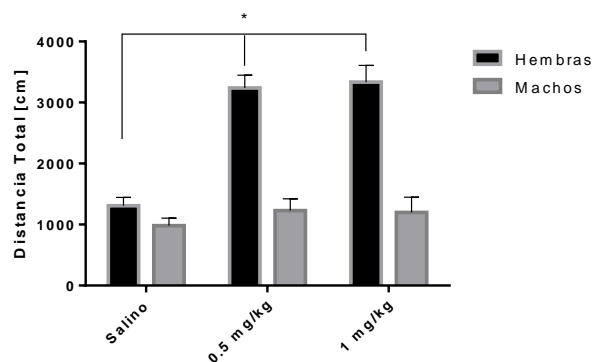


Figura8. Interacción entre el género y la dosis en distancia total recorrida por los animales, con diferencias significativas entre salino y las dosis y entre machos y hembras con diferentes dosis. * = (p<0.050)

Dosis x tratamiento. (Figura 9)

En esta gráfica se compara la distancia recorrida por los animales en función de su género y del tratamiento recibido con CPF o con aceite de maíz, observando una superioridad en la distancia para los animales tratados con vehículo en las dosis A y B, [F (1.664, 54.896) = 4.139, p<0.027]. En análisis *post hoc* posteriores vemos que en la

dosis A hay una diferencia significativa a favor del grupo con el vehículo con índice de ($p < 0.014$). Y tomando por separado al grupo de CPF vemos que entre la administración de salino y de dosis A y B existen diferencias significativas de ($p < 0.005$) y de ($p < 0.009$) respectivamente. En el grupo con vehículo, vemos que hay diferencias significativas de la condición salino respecto de las otras dos con ($p < 0.001$) para ambas.

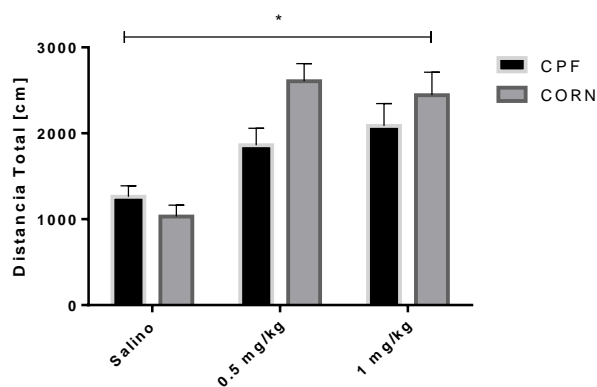


Figura 9. Interacción entre el tratamiento recibido y la dosis administrada en función de la distancia recorrida por los animales. * = ($p < 0.50$)

Género x dosis x bloques. (Figura 10)

Observando esta gráfica volvemos a hallar una superioridad de las hembras respecto de los machos bastante acusado a lo largo de todos los bloques, además es reseñable el hecho de que, pese a la diferente dosificación no salino, no se aprecia a simple vista diferencias entre la dosis A y la dosis B, [$F(4.945, 164.184) = 6.893, p < 0.001$]. En los *post hoc* observamos diferencias significativas a favor de las hembras en los bloques primero, cuarto, quinto y sexto, con significaciones de ($p < 0.044$), ($p < 0.030$), ($p < 0.002$) y ($p < 0.001$) respectivamente en la condición salino. Para la dosis A y con el mismo criterio anterior, del primer al cuarto bloque incluido, las diferencias significativas hembra-macho son de ($p < 0.001$) y en el quinto y sexto bloque de ($p < 0.004$) y ($p < 0.001$) respectivamente. Tomando por separado a las hembras de los machos y comparando su actuación a lo largo del tiempo en función de la dosis recibida, observamos en las primeras diferencias significativas del tercer al quinto y sexto bloque de ($p < 0.002$) y ($p < 0.006$) respectivamente para la dosis A; y en la dosis B observamos del primer al sexto bloque una significación de ($p < 0.001$), del segundo al tercer bloque de ($p < 0.036$) y del segundo al resto de ($p < 0.001$), del tercer al quinto bloque de ($p < 0.001$) y al sexto bloque de ($p < 0.008$). Y en los machos observamos diferencias significativas con ($p < 0.001$) en la condición salino al comparar el bloque 1 con el resto; en la dosis A observamos diferencias significativas del primer bloque al tercero y cuarto de ($p < 0.015$)

y ($p < 0.042$) y con los bloques 5 y 6 de ($p < 0.001$). Por último, para la dosis B hay diferencias significativas entre el primer bloque y el tercero, cuarto, quinto y sexto son de ($p < 0.008$), ($p < 0.016$), ($p < 0.001$) y ($p < 0.003$) respectivamente.

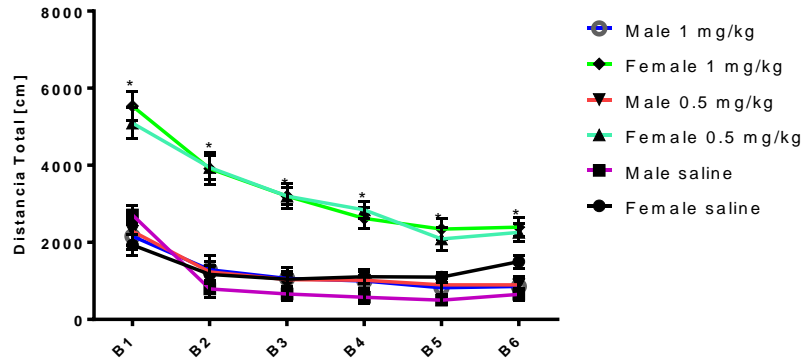


Figura 10. Interacción entre hembras y machos con salino y las dosis A y B en función de la distancia recorrida a lo largo de los diferentes bloques temporales. * = ($p < 0.050$)

Escopolamina Tiempo en el Centro

El análisis principal ANOVA de medidas repetidas arroja significaciones en el factor dosis [$F(2, 50.717) = 4.015, p < 0.022$]; en el factor bloques [$F(5, 135) = 5.196, p < 0.001$] y en el factor tratamiento [$F(1, 27) = 7.340, p < 0.011$]. Así como nos permite observar interacción entre los factores género x bloques [$F(5, 135) = 5.196, p < 0.001$].

Tratamiento. (Figura 11)

De forma gráfica podemos ver como el grupo tratada con el vehículo permanece mayor tiempo en el centro que el grupo tratado con CPF, [$F(1, 27) = 7.340, p < 0.011$]. El *post hoc* del factor tratamiento arroja diferencias significativas entre las dos condiciones a favor del grupo tratado con aceite de maíz, con una significación de ($p < 0.011$).

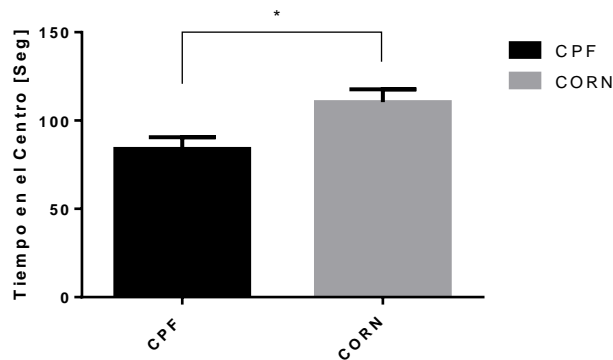


Figura 11. Comparación de los tiempos de permanencia en el centro de la caja en función del tratamiento recibido. * = ($p < 0.050$)

Dosis. (Figura 12)

Pese a que encontramos significación de $[F(2, 50.717) = 4.015, p < 0.022]$ en el factor dosis, los análisis *post hoc* no arrojan diferencias significativas entre las tres condiciones.

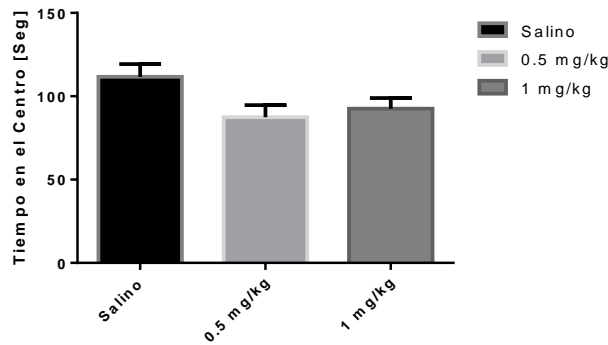


Figura 12. Comparación de los diferentes tiempos de permanencia en el centro de la caja en función de la dosis recibida.

Dizocilpina Distancia Total

El análisis ANOVA de medidas repetidas arroja significaciones en el factor dosis $[F(1.563, 50.013) = 4.907, p < 0.017]$, en el factor bloques $[F(1.781, 56.977) = 21.351, p < 0.001]$ y en el factor género $[F(1, 32) = 7611., p < 0.010]$. A su vez vemos interacciones significativas en género x dosis $[F(1.563, 50.013) = 4.058, p < 0.032]$ y dosis x bloques $[F(23.149, 100.766) = 6.039, p < 0.001]$. Finalmente, observamos significaciones también en las interacciones dosis x género x bloques $[F(3.149, 100.766) = 7.950, p < 0.001]$.

Dosis. (Figura 13)

En esta gráfica observamos el desempeño locomotor de los animales en función de la dosis administrada a los mismos, viendo superioridad entre las dosis A y B en comparación con el salino, $[F(1.563, 50.013) = 4.907, p < 0.017]$. En el tratamiento *post hoc* de los datos para el factor dosis vemos diferencias significativas entre el salino y las dosis A y B de $(p < 0.026)$ y de $(p < 0.032)$ respectivamente.

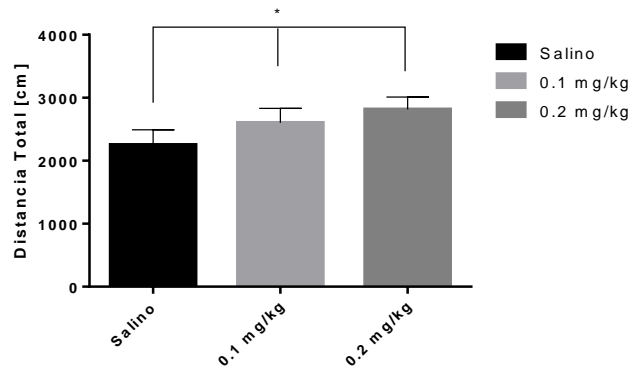


Figura 13. Diferencias en la distancia recorrida por los animales en función de la dosis recibida. * = ($p < 0.005$)

Dosis x género x bloques. (Figura 14)

En esta gráfica podemos observar la distancia total recorrida de los animales en función del género y de la dosis administrada a lo largo de los diferentes bloques temporales, encontrando que las hembras independientemente de la administración recibida tienen mayor índice de actividad que los machos, [$F(3.149, 100.766) = 7.950, p < 0.001$]. El análisis *post hoc* nos deja diferencias significativas según la dosis entre hembras y machos en los bloques 1, 5 y 6 de ($p < 0.006$), ($p < 0.048$) y ($p < 0.031$) respectivamente en la condición salino, en el bloque 1 de la dosis A con índice de ($p < 0.004$) y en la dosis B de ($p < 0.007$) en el bloque 3 y de ($p < 0.001$) en los bloques 4, 5 y 6. Por último, en el grupo de las hembras tratadas con salino vemos diferencias significativas entre bloques, del 1 al 2 y al 3 de ($p < 0.001$), del 2 al 4, 5 y 6 de ($p < 0.040$), ($p < 0.020$) y ($p < 0.004$), del bloque 3 al 4, 5 y 6 de ($p < 0.004$), ($p < 0.003$) y ($p < 0.001$) y del 4 al 6 con índice de ($p < 0.016$); para la dosis A hay diferencias entre el primer y el segundo bloque ($p < 0.001$) y en la dosis B del primer al segundo bloque ($p < 0.001$), del segundo al resto de bloques de ($p < 0.001$), las mismas diferencias significativas que del bloque 3 al 4, 5 y 6. Y en el grupo de los machos teneos que para la condición salino, las diferencias significativas se dan del entre el bloque 1 y el 2 y 3 ($p < 0.001$), en la dosis A entre el bloque 1 y 2 ($p < 0.001$) y entre el 2 y el 6 ($p < 0.043$) y finalmente, para la dosis B tenemos diferencias significativas en las comparaciones entre el bloque 1 y el 2, 3 y 4 con índices de significación ($p < 0.001$), ($p < 0.002$) y ($p < 0.014$) respectivamente.

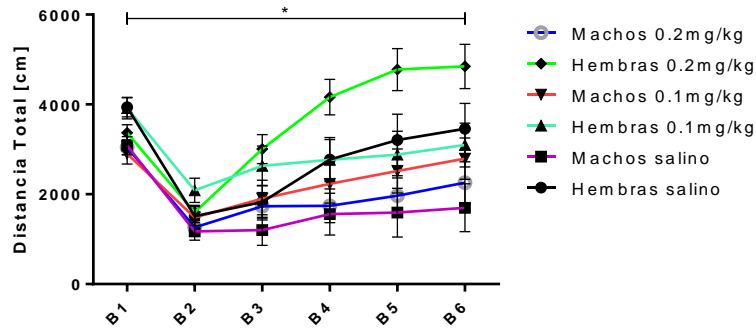


Figura14. Interacción entre hembras y machos con salino y las dosis A y B en función de la distancia recorrida a lo largo de los diferentes bloques temporales. * = (p<0.050)

Dizocilpina Tiempo en el Centro

El análisis general ANOVA de medidas repetidas muestra diferencias significativas en el factor género [F (1, 32) = 8.198, p<0.007], así como en el factor bloques [F (2.929, 93.715) = 13.954, p<0.001].

Bloques. (Figura 15)

Gráficamente podemos ver un descenso de la permanencia en el centro de los animales conforme avanza el curso temporal, [F (2.929, 93.715) = 13.954, p<0.001]. Análisis *post hoc* del factor bloques nos deja diferencias estadísticamente significativas en el primer bloque en comparación con los bloques 2, 3, 4 y 5 de (p<0.001) para todos los casos; en el bloque 4 en comparación con el sexto (p<0.041) y en el bloque 5 respecto del bloque 6 (p<0.046).

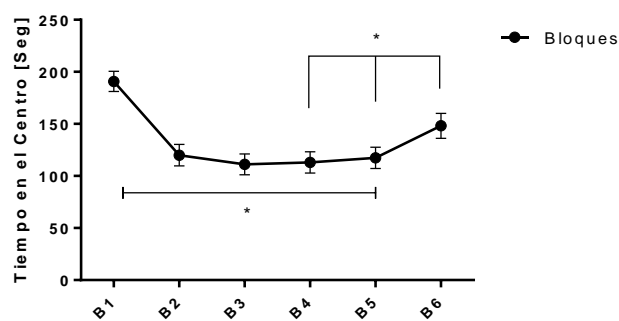


Figura15. Comparación de los diferentes tiempos de permanencia en el centro de la caja a lo largo de los diferentes bloques temporales. * = (p<0.050)

Género. (Figura 16)

A nivel visual podemos observar mayores permanencias temporales en los machos en comparación con las hembras, [F (2.929, 93.715) = 13.954, p<0.001]. Finalmente, el

post hoc del factor género nos deja con diferencias estadísticamente significativas entre las hembras y los machos a favor de estos últimos con una significación de ($p < 0.007$).

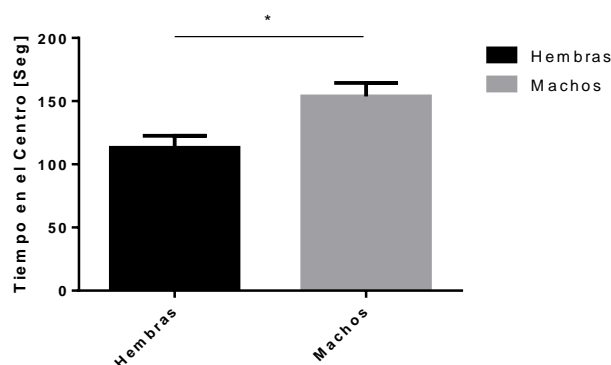


Figura 16. Comparación de los diferentes tiempos de permanencia en el centro de la caja en función del género de los animales. * = ($p < 0.050$)

Discusión

Poniendo en relación la hipótesis de partida de este trabajo final de estudios a saber, la exposición postnatal temprana a dosis bajas de CPF modifica el desarrollo y funcionamiento de varios sistemas neurobiológicos aparte del ya conocido sistema colinérgico con los resultados obtenidos podemos llegar a afirmar que CPF parece actuar de forma directa o indirecta con ellos.

Un apoyo a esta idea se desprende de la interacción género x dosis x tratamiento (figura 5) en la variable de tiempo en el centro para la droga Anfetamina, moduladora del sistema catecolaminérgico, con mayores permanencias en el mismo en el grupo de las hembras tratadas con el pesticida, lo que nos llevaría a postular la idea de que CPF genere menores índices de ansiedad en los animales reflejado en tiempos de permanencia mayores.

A su vez, observando la ejecución de los animales con la droga Escopolamina para la variable distancia total recorrida se han obtenido resultados de interacción dosis x tratamiento (figura 9), con diferencias significativas entre la administración del salino y las dosis A y B de la droga de ($p < 0.005$) y de ($p < 0.009$) en el grupo tratado con CPF, pero con mayores distancias recorridas en el grupo tratado con vehículo postnatalmente de forma general y de forma estadísticamente significativa con la dosis A, con diferencias de índice ($p < 0.014$). Esto parece indicar que, aunque Escopolamina potencia la actividad locomotora de los animales, al interaccionar con CPF este efecto potenciador se vería reducido al compararse con el grupo de vehículo inoculados con

dosis A y B y por tanto tenemos un posible efecto modulador colinérgico. Esto se combina en la misma droga al analizar la variable tiempo en centro, que como se ha dicho se relaciona de forma inversa con los niveles de ansiedad en los animales, encontrándonos con una diferencia significativa a favor del grupo tratado con vehículo en comparación con el grupo CPF de ($p < 0.011$).

Examinando ahora la droga Dizocilpina, no encontramos efectos de interacción directa de CPF en ninguna de las variables examinadas, pero no se puede llegar a afirmar que no exista modulación indirecta del pesticida en el sistema neuroquímico glutamatérgico.

Por otro lado, el resultado que se ha obtenido de forma sistemática en las tres drogas y en todas las variables ha sido ver que en el grupo de animales formado por las hembras los efectos de los psicoactivos han sido en todo momento mayores que en el grupo de los machos. De hecho, podemos ver interacciones dosis x género en distancia total con Escopolamina (figura 8) y en la misma variable para Anfetamina (figura 2); e interacciones dosis x género x bloques en las distancias totales de las tres drogas (figuras 3, 10 y 14) y en los tiempos de permanencia en el centro para la droga Anfetamina (figura 6). Centrándonos en las figuras 2 y 8, vemos que las hembras presentan unos picos de actividad muy superiores en las dosis A y B respecto del salino, pero vemos que los machos no presentan apenas variaciones en su actividad al comparar las dosis A y B con el salino, este hecho refleja una más que probable acción indirecta del CPF sobre los efectos neuromoduladores de los psicoactivos utilizados en una dirección facilitadora de los efectos de estas sustancias. Respecto a las figuras 3, 10, 14 y 6, lo más destacable es que este efecto de aumento de la influencia de la sustancia respecto al género se da de forma mantenida a lo largo de los bloques, lo que nos permite destacar picos de actividad aleatorios de las hembras frente a los machos a favor de una acción sistemática de CPF en los animales hembra.

De todo ello se desprende a) unos efectos mayores a favor de la actividad de las hembras en comparación con los machos en cuanto a la distancia total recorrida, b) mayores tiempos de permanencia en el centro de las cajas en el grupo de las hembras frente a los machos ligado por tanto a menores índices de ansiedad en ellas respecto a ellos y c) efectos significativos en función del tratamiento con CPF en las drogas Escopolamina y Anfetamina.

Conclusión

Para finalizar, es destacable el hecho de que en la mayoría de los casos las diferentes dosis utilizadas de las drogas no han demostrado diferencias significativas entre sí, con lo cual una posible mejora del diseño experimental hubiese sido realizar una mayor revisión bibliográfica a conciencia para poder establecer una diferenciación mayor entre las dosis alta y baja utilizadas para cada una de las drogas, debido a que podrían haberse visto efectos de interacción con el tratamiento postnatal con el CPF en los animales. También, una posible mejora sería haber empleado muestras de animales diferentes para cada droga, pues aunque con el tipo de diseño en cuadrado latino que hemos realizado, todos los animales han pasado por todas las drogas y por todas las dosis de estas y se han asegurado tiempos de lavado entre sustancias y entre dosis a nuestro juicio suficientes, no ha sido posible calcular con exactitud la influencia del reservorio psicoactivo que hayan podido manifestar los animales, dándose la posibilidad de que la permanencia a nivel sistémico de una de las drogas afectase a la actividad locomotora de los animales al inyectarle la siguiente y por tanto puede que las drogas hayan interactuado entre sí a lo largo de todo el diseño experimental, por tanto, al usar una muestra de animales equivalentes entre sí pero destinada cada una de ellas a la evaluación locomotora con la inoculación de una única sustancia podría evitarnos la influencia de esta variable extraña y obtener datos locomotores sólidos por sustancia.

Además, el hecho de no haber encontrado de forma sistemática interacciones entre las diferentes sustancias y sus dosis con el tratamiento recibido puede que no se deba a que CPF no interaccione con los sistemas neuroquímicos implicados, sino que es congruente con las investigaciones previas que establecen que la verdadera influencia de la exposición a este xenobiótico queda reflejada en la época adulta. Por tanto, sugiero una re-evaluación de los animales en su edad adulta para realizar contrastes tanto con su propia ejecución en la adolescencia y para poder observar si verdaderamente CPF afecta o no afecta a dichos sistemas neuroquímicos, ya que como se ha comentado, la acción neuromoduladora de este compuesto es más visible a edades más avanzadas de los organismos; este punto podría llevarse a cabo tanto con la misma muestra empleada siendo evaluada en un futuro, como con una muestra paralela de animales que hayan recibido el mismo tratamiento postnatal y que pasen por el mismo diseño experimental con una edad más avanzada; además, creo que si se llega a demostrar que CPF interactúa con algún sistema neuroquímico específico, sería aconsejable realizar una

revisión bibliográfica en profundidad para diseñar un nuevo experimento utilizando pruebas conductuales específicas para cada sistema neuroquímico, ejemplo de ello sería si observamos interacción en la edad adulta de CPF con Dizocilpina que actúa en el sistema glutamatérgico y concretamente en los receptores NMDA, podría emplearse un paradigma de aprendizaje para ver en la posible dirección de la interacción del CPF con este sistema que se sabe implicado en las funciones de aprendizaje. Continuando con el aspecto neuroquímico y para finalizar este apartado, sería aconsejable realizar una evaluación neuroquímica y sanguínea de los animales para poder observar de verdad las dianas del CPF en los sistemas de neurotransmisión evaluados y en las diferentes etapas de la transmisión sináptica, obteniendo por tanto una imagen más enriquecida de lo que la exposición a este pesticida puede originar en el organismo de los animales y por tanto en nuestro propio organismo.

Referencias

- Ali D, Nagpure NS, Kumar S, Kumar R, Kushwaha B. 2008. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell electrophoresis. *Chemosphere* 7:1823-31.
- Amer SM, Aly FAE. 1992. Cytogenic effects of pesticides. IV. Cytogenic effects of the insecticides Gardona and Dursban. *Mutat Res* 279:165-70.
- Chai L-K, Mohd-Tahir N, Hansen HCB. 2008. Dissipation of acephate, chlorpyrifos, cypermethrin and their metabolites in a humid-tropical vegetable production system. *Pest Manag Sci* 65:189096.
- Cui Y, Guo J, Chen Z. 2011. Genotoxicity of chlorpyrifos and cypermethrin in ICR mouse lymphocytes. *Toxicol Mech Meth* 21(1):70-4.
- Farag AT, El Okazy AM, El-Aswed AF. 2003. Developmental toxicity study of chlorpyrifos in rats. *Repro Toxicol* 17:203-8.
- Hermanson MH, Isaksson E, Teixeira C, Muir DCG, Compher KM, Li YF, Igarashi M, Kamiyama K. 2005. Current and legacy pesticide history in the Austfonna Ice Cap, Svalbard, Norway. *Environ Sci Technol* 39(21):8163-9.

- Horton MK, Kahn LG, Perera F, Barr DB, Rauh V. 2012. Does the home environment and the sex of the child modify the adverse effects of prenatal exposure to chlorpyrifos on child working memory? *Neurotoxicol Teratol* [Epub 20 Jul].
- Navarro HA, Basta PV, Seidler FJ, Slotkin TA. 2001. Neonatal chlorpyrifos administration elicits deficits in immune function in adulthood: a neural effect. *Brain Res Dev Brain Res* 130(2):249-52.
- OMS. 2009. OMS Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides. Chlorpyrifos O,O-diethyl O-3,5,6- trichloro-2-pyridyl phosphorothioate. World Health Organization, Geneva
- Ojha A, Yaduvanshi SK, Pant SC, Lomash V, Srivasta N. 2011. Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by three commonly used organophosphate pesticides individually and in mixture, in rat tissues. *Environ Toxicol* [Epub July 22].
- Qiao D, Seidler F, Padilla S, Slotkin TA. 2002. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: What is the vulnerable period? *Environ Health Perspect* 110:1097-103.
- Racke KD, Fontaine DD, Yoder RN, Miller JR. 1994. Chlorpyrifos degradation in soil at termiticidal application rates. *Pestic Sci* 42:43-51.
- 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* 118:1845-59.
- Rauh VA, Perera FP, Horton MK, Whyatt RM, Bansal R, Hao X, Liu J, Barr DB, Slotkin TA, Peterson BS. 2012. Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *PNAS* 109(20):7871-6.
- Rorjie E, Verbruggen EMJ, Holander A, Traas TP, Jansen MPM. 2011. Identifying potential POP and PBT substances. Development of a new Persistence/Bioaccumulation-score. RIVM Report 601356001/2011. National Institute for Public Health and the Environment.
- Sherman JD. 1996. Chlorpyrifos (Dursban)-associated birth defects: report of four cases. *Arch Environ Health* 51(1):5-8.

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* 115:909-16.

Walsh, R.N., and R.A. Cummins. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin* 83:482-504, 1976.

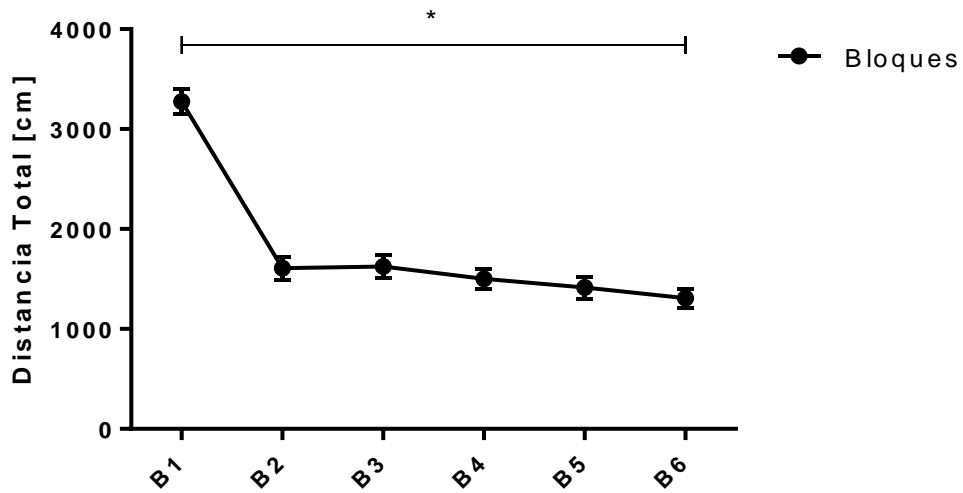
Whitney KD, Seidler FJ, Slotkin TA. 1995. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 134:53-62.

ANEXOS

Anfetamina Distancia Total

Bloques.

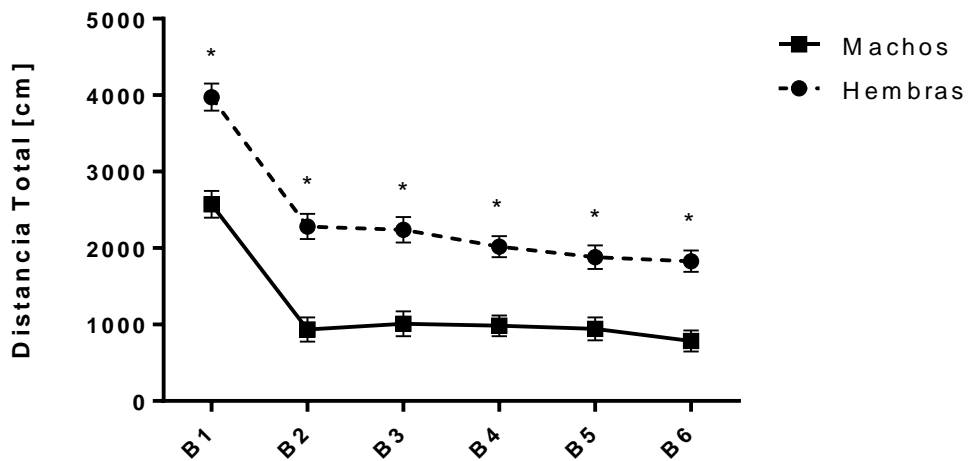
F [(2.960, 103.592) = 1.073, p<0.001]



Evolución temporal de la distancia total recorrida por los animales a lo largo de los diferentes bloques. * = (p<0.050)

Género x bloques

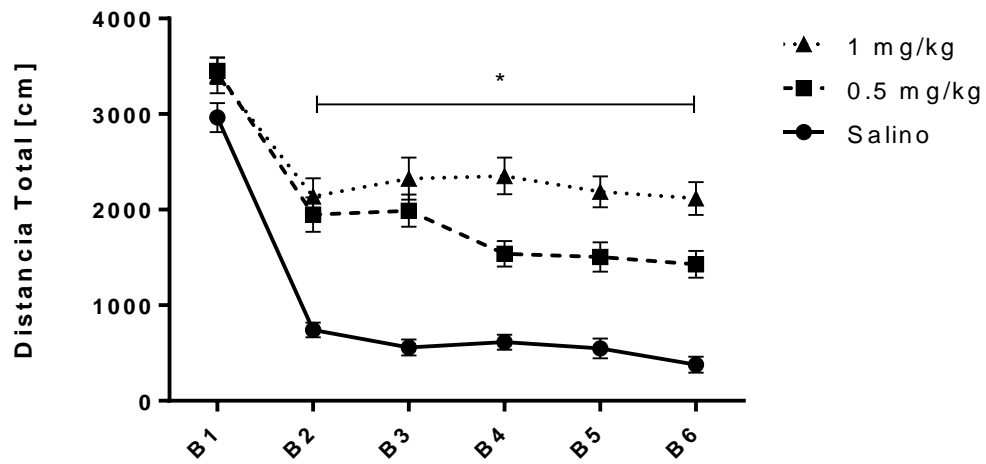
F [(3.540, 123.910) = 2.594, p<0.046]



Distancia total recorrida por los animales en función del género a lo largo de todos los bloques temporales. * = (p<0.005)

Género x dosis

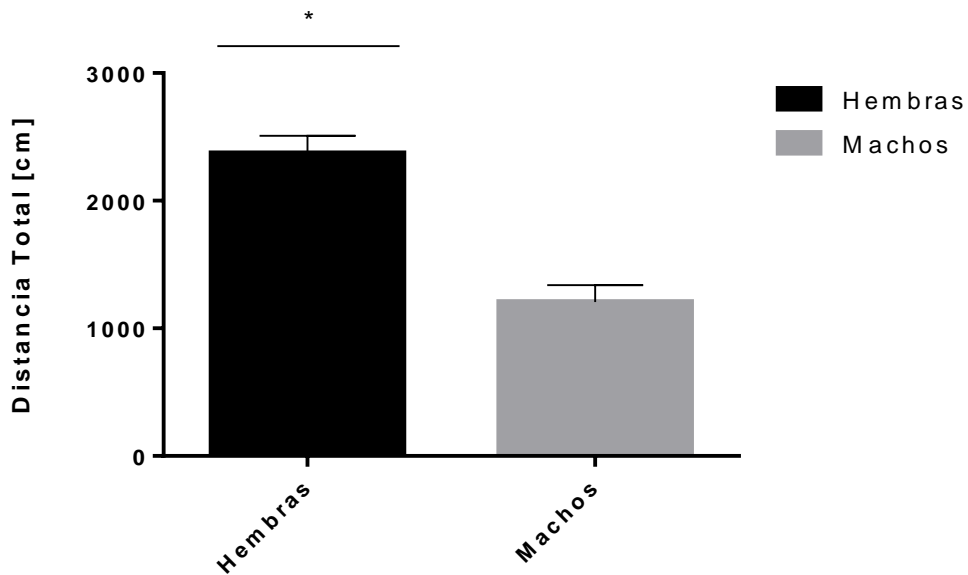
F [(6.734, 235.675) = 12.315, p<0.001]



Distancia total recorrida por los animales en función de la dosis recibida a lo largo de todos los bloques temporales. * = (p<0.050)

Género

F [(1, 35) = 36.208, p<0.001]

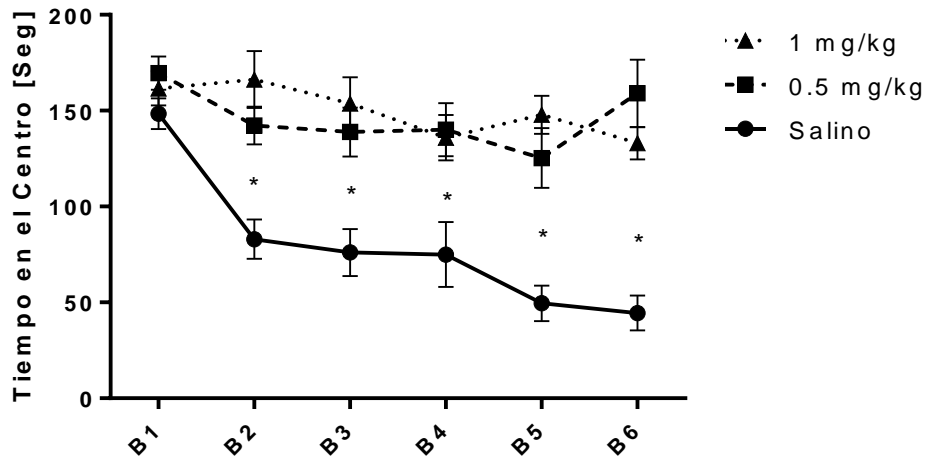


Diferencias en la distancia total recorrida por los animales en función del género. * = (p<0.050)

Anfetamina Tiempo en el Centro

Dosis x bloques

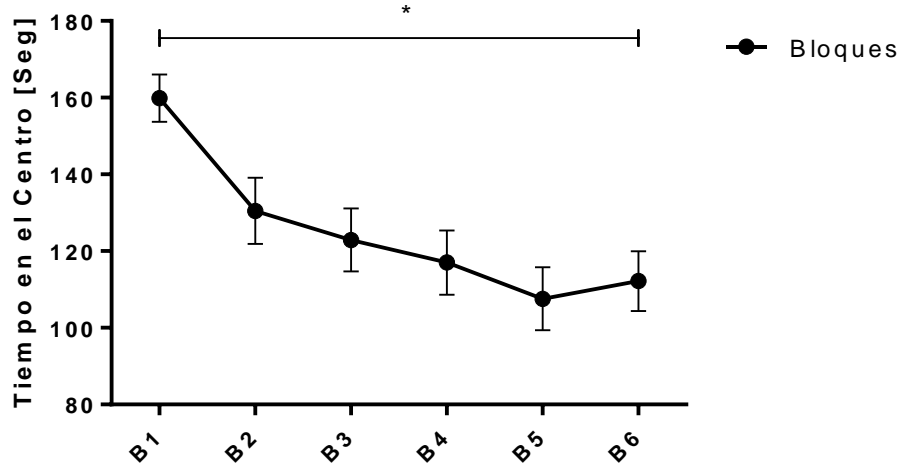
[F(6.098, 176.834)= 3.815, p<0.001]



Tiempo de permanencia en el centro de la caja en función de la dosis recibida a lo largo de los diferentes bloques temporales. * = (p<0.050)

Bloques

[F (3.417, 99.102) = 9.959, p<0.001]



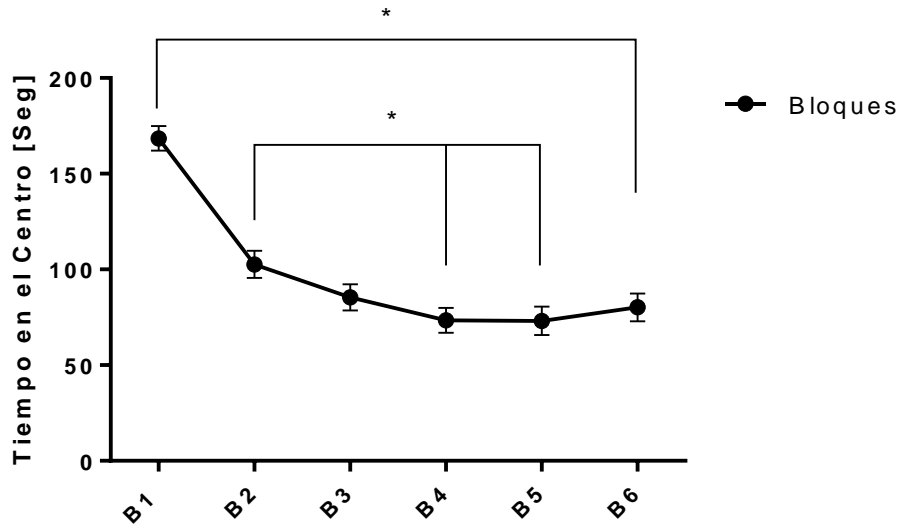
Evolución temporal de la distancia total recorrida por los animales a lo largo de los diferentes bloques. * = (p<0.050)

Escopolamina

Tiempo en el Centro

Bloques

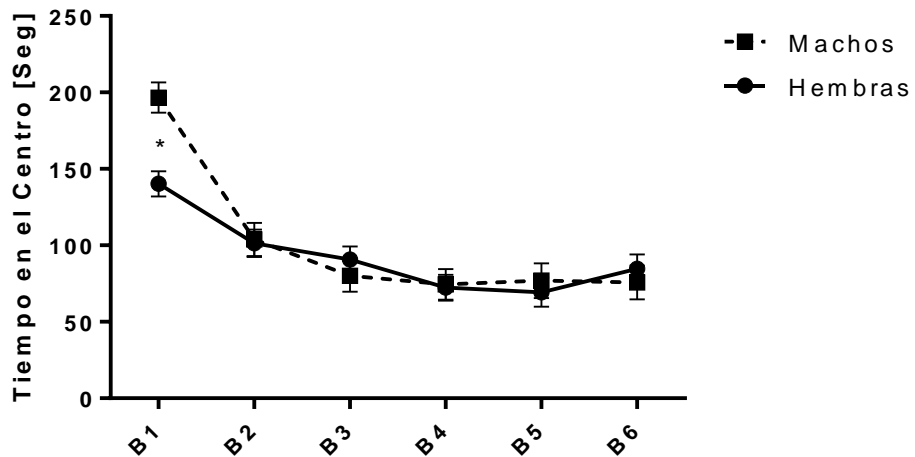
[F(5, 135)= 5.196, p<0.001]



Tiempo de permanencia en el centro de la caja a lo largo de los diferentes bloques temporales. * = (p<0.050)

Género x bloques

[F(5, 135)= 5.196, p<0.001]

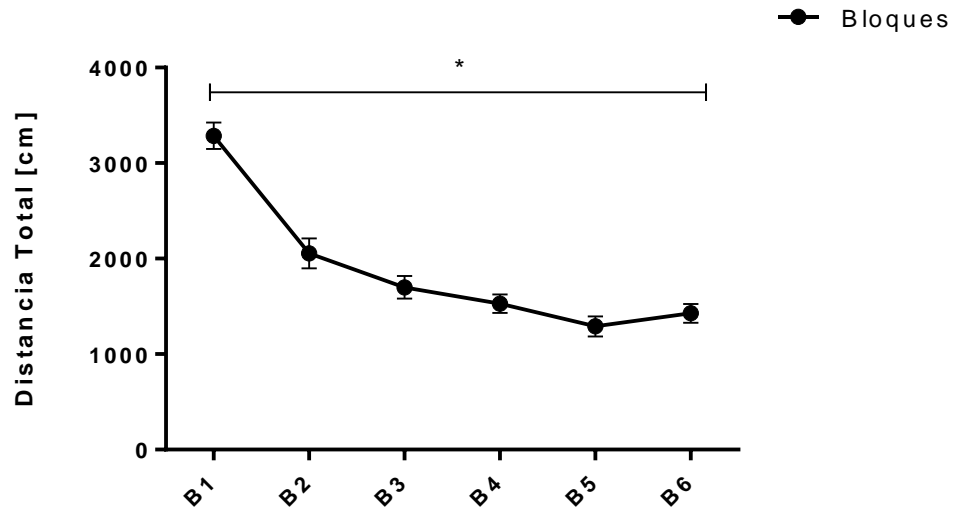


Comparación del tiempo total de permanencia en el centro de la caja en función del sexo y a lo largo de todos los bloques temporales. * = (p<0.050)

Distancia Total

Bloques

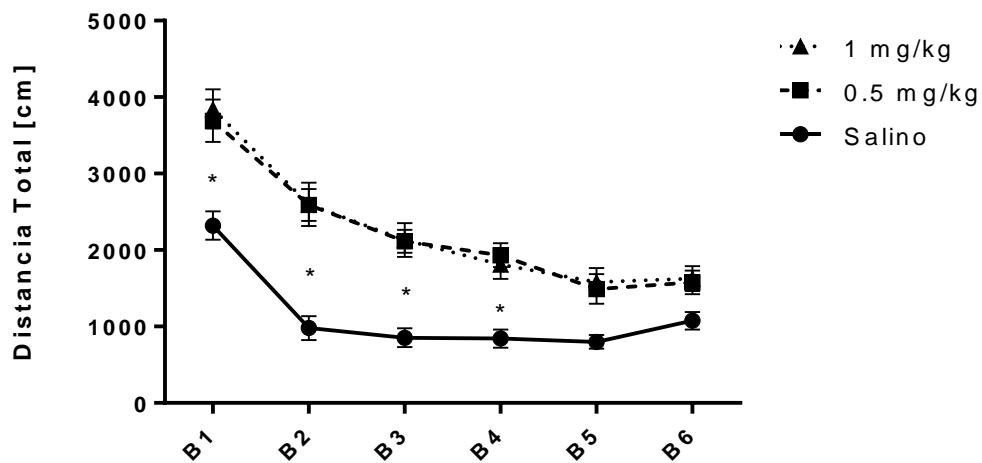
[F(3.845, 126.892)= 142.462, p<0.001]



Diferencias en la distancia total recorrida por los animales a lo largo de todos los bloques temporales. * = (p<0.050)

Dosis x bloques

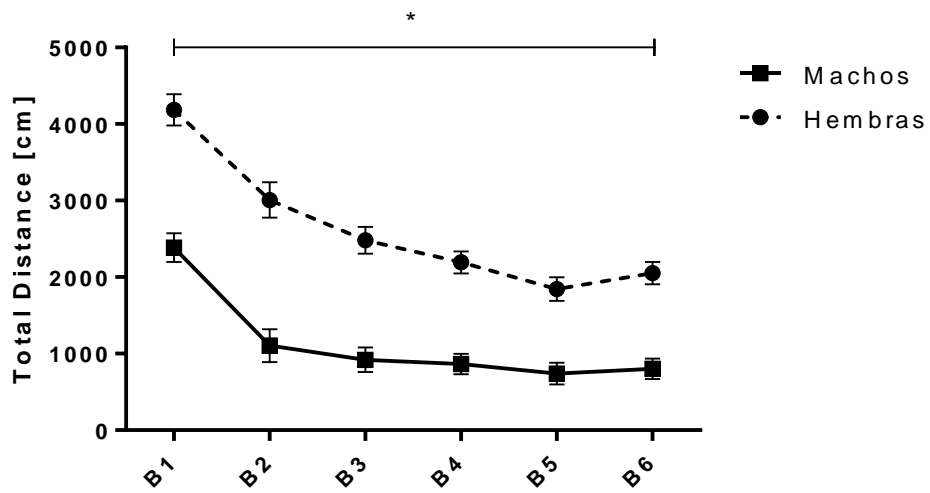
[F (4.945, 164.184)= 3.258, p<0.008]



Distancia total recorrida por los animales en función de la dosis recibida a lo largo de todos los bloques temporales. * = (p<0.050)

Género x bloques

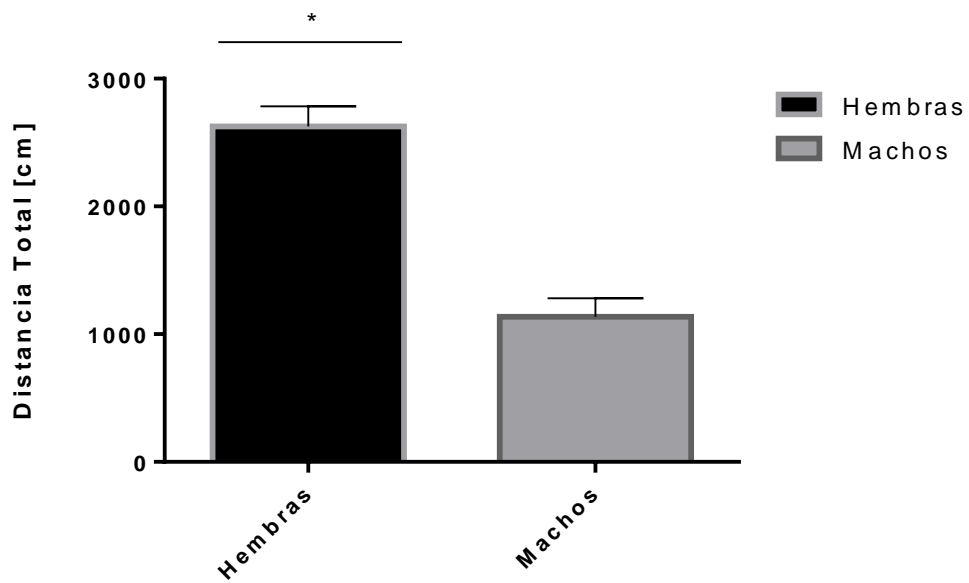
[F (3.845, 126.892) = 6.634, p<0.001]



Distancia total recorrida por los animales en función del género a lo largo de todos los bloques temporales. * = (p<0.005)

Género

[F (1, 33) = 48.107, p<0.001]



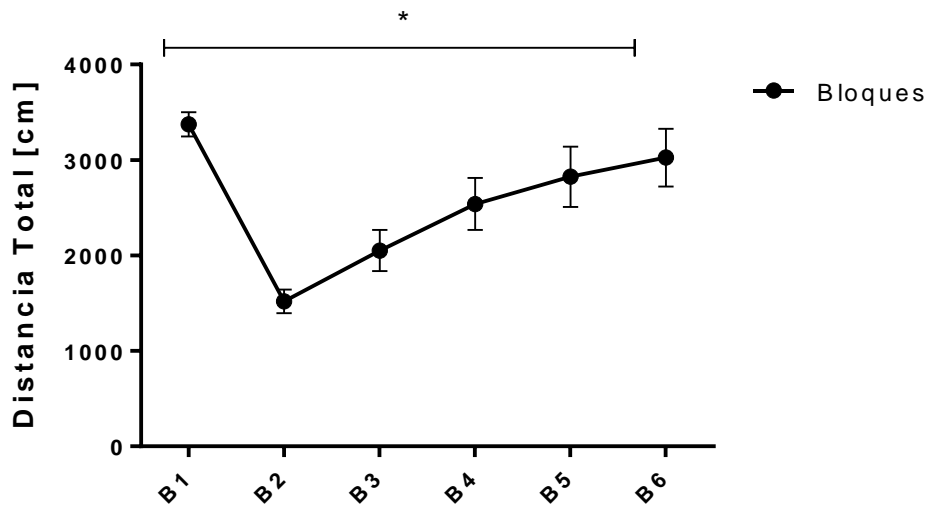
Distancia total recorrida por los animales en función del género . * = (p<0.005)

Dizocilpina

Distancia Total

Bloques

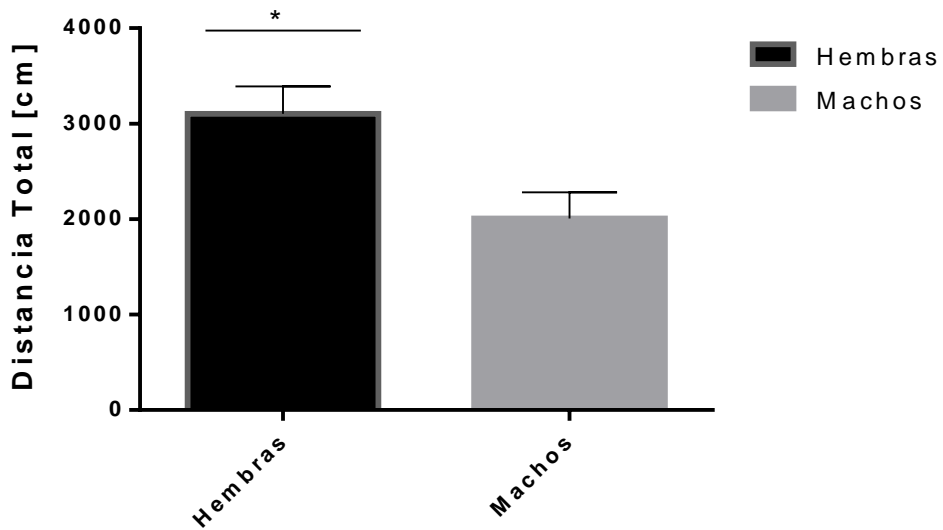
[F (1.781, 56.977) = 21.351, p<0.001]



Diferencias en la distancia total recorrida por los animales a lo largo de los diferentes bloques temporales. * = (p<0.050)

Género

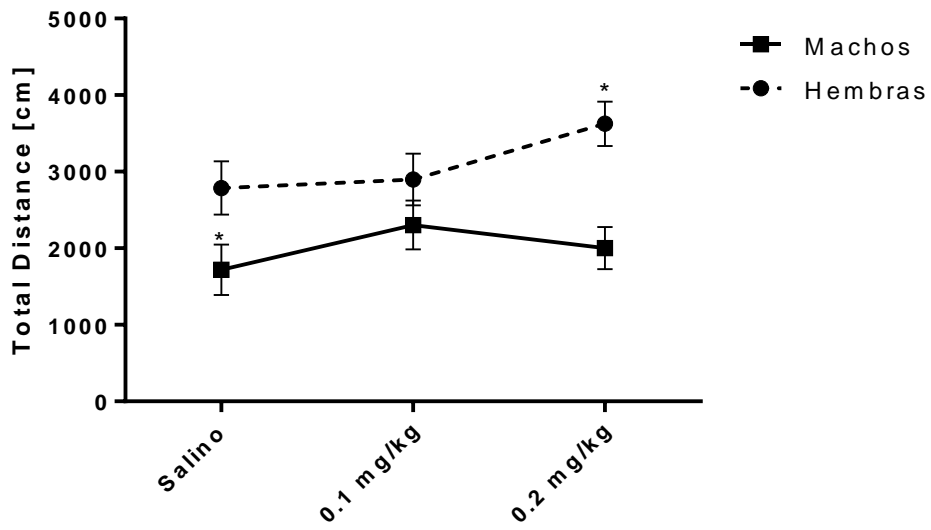
[F (1, 32) = 7611., p<0.010]



Diferencias en la distancia total recorrida por los animales en función del género. * = (p<0.050)

Dosis x género

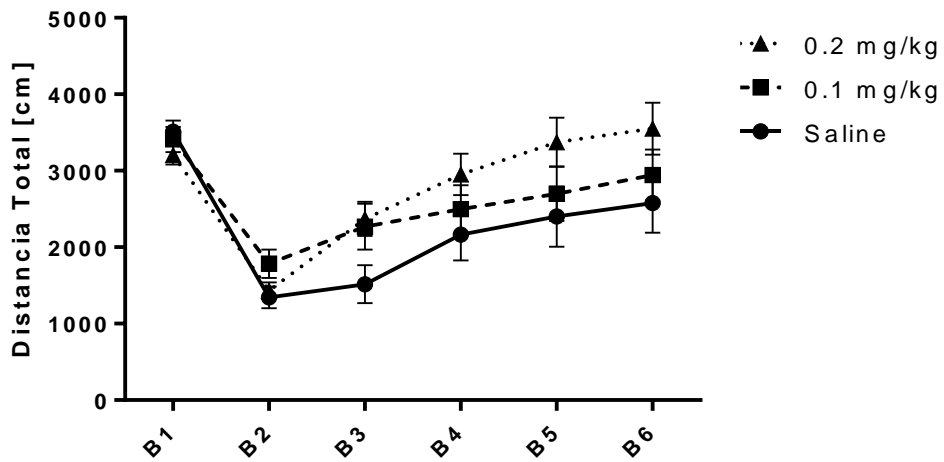
[F (1.563, 50.013) = 4.058, p<0.032]



Distancia total recorrida por los animales en función del género y de la dosis recibida . * = (p<0.005)

Dosis x bloques

[[F(23.149, 100.766)= 6.039,p<0.001]]



Distancia total recorrida por los animales en función de la dosis recibida a lo largo de todos los bloques temporales. * = (p<0.005)