



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
Facultad de Psicología

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



FACULTAD DE PSICOLOGÍA



Trabajo Fin de Grado en Psicología

Convocatoria Junio 2020

Autismo, conducta y medioambiente: influencias de la exposición gestacional a clorpirifos sobre la emisión de vocalizaciones ultrasónicas en ratas

Autism, behavior and environment: influences of gestational exposure to chlorpyrifos on the emission of ultrasonic vocalizations in rats

Pablo Pérez Gómez

Luis Fernando Sánchez Santed
Cristian Antonio Pérez Fernández

Resumen

El trastorno del espectro autista (TEA) se caracteriza por un déficit de interacción social, comunicación, así como comportamientos repetitivos y/o estereotipias. Aunque el origen es desconocido, existe un amplio consenso de que a su base interaccionan tanto factores de vulnerabilidad genéticos como factores ambientales, por lo que hay un amplio margen para las influencias ambientales como los plaguicidas, como es el organofosforado Clorpirifós, en la etiología del TEA. Con el fin de comprobar si la exposición a dosis bajas de Clorpirifós induce alteraciones conductuales y de comunicación en ratas, exponemos a 14 hembras a este plaguicida durante el GD12.5, y sus crías fueron utilizadas para una serie de experimentos. En los resultados se observó un efecto del tratamiento en la frecuencia de las vocalizaciones de las ratas en la prueba de USV y una reducción de la movilidad en el Plus-Maze, lo que apoya datos aportados por estudios similares. Los datos recogidos en esta investigación permiten comprobar los efectos del CPF en ratas en su desarrollo, haciendo posible relacionarlo con las diversas patologías asociadas al TEA.

Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) is characterized by a deficit of social interaction, communication, as well as repetitive and/or stereotypical behaviors. Although the origin is unknown, there is a wide consensus that both genetic and environmental vulnerability factors interact at its base, so there is a wide margin for environmental influences as the pesticides, such as the organophosphate Chlorpyrifos, in the etiology of ASD. In order to test whether exposure to low doses of Chlorpyrifos induces behavioral and communication alterations in rats, we exposed 14 females to this pesticide during GD12.5, and their offspring were used for a series of experiments. The results showed an effect of the treatment on the frequency of rat vocalizations in the USV test and a reduction in mobility in the Plus-Maze, which supports data from similar studies. The data collected from this research allow us to verify the effects of CPF in rats on their development, making it possible to relate it to the various pathologies associated with ASD.

ÍNDICE

.....	0
Introducción	1
Metodología	5
<i>Animales de experimentación</i>	5
<i>Agente utilizado</i>	5
<i>Conducta maternal</i>	6
<i>Batería funcional: análisis del desarrollo</i>	6
<i>Evolución del peso</i>	6
<i>Evolución de la apertura ocular</i>	6
<i>Desarrollo neuromotor</i>	7
<i>Descenso testicular</i>	7
<i>Vocalizaciones ultrasónicas (USV)</i>	8
<i>Plus maze (PM)</i>	9
<i>Tube test</i>	10
<i>Análisis estadístico</i>	11
Resultados	12
<i>Conducta maternal</i>	12
<i>Batería funcional: crías</i>	13
<i>Pesaje</i>	13
<i>Apertura Ocular</i>	13
<i>Neuromotricidad</i>	14
<i>Vocalizaciones de ultrasonidos (USVs)</i>	14
<i>Plus Maze (PM)</i>	16
<i>Tube Test</i>	17
Discusión	18
Conclusiones	19
Referencias bibliográficas	20

Introducción

El trastorno del espectro autista (TEA) es un conjunto heterogéneo de patologías que causa serias dificultades en la interacción social y en la comunicación cuya definición ha variado mucho en las últimas décadas. El primero en indagar sus características fue Leo Kanner en 1943, quien describió el cuadro clínico del trastorno denominándolo “autismo infantil precoz”. En 1944, Hans Asperger publicó una serie de casos de pacientes con una leve afectación de lenguaje, así como un coeficiente intelectual menos deficiente, lo que denominó “psicopatía autista”. No fue hasta 1966 cuando Wing propuso el término “trastorno del espectro autista” (Varela-González, Ruiz-García, Vela-Amieva, Munive-Baez y Hernández-Antúnez, 2011). Por su parte, la Asociación Americana de Psiquiatría describió el autismo, en principio, como trastornos profundos del desarrollo en 1987 y, más tarde, trastornos generalizados del desarrollo en 1994 (Rodríguez-Barrionuevo y Rodríguez-Vives, 2002). Hoy en día, el autismo se refiere a un trastorno caracterizado por conductas estereotípicas y un déficit notable en el lenguaje, la comunicación y la conducta social (Díaz-Anzaldúa y Díaz-Martínez, 2013), así como puede presentar alteraciones en atención, memoria, control inhibitorio y, comúnmente, a nivel motor (Keehn et al., 2017; Whyatt y Craig, 2013; Christ et al., 2006; Habib et al., 2019).

Actualmente, la APA (American Psychiatric Association, 2013) por medio del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales en su quinta edición (DSM-V) describe los criterios diagnósticos del TEA dentro de los trastornos del neurodesarrollo, cuyas características generales son deficiencias persistentes en la comunicación social e interacción social en diversos contextos, patrones de conducta restrictivos y repetitivos, además de presentarse los síntomas en las primeras fases del período de desarrollo.

Según Rodríguez-Barrionuevo y Rodríguez-Vives (2002) la etiopatología de los TEA no es conocida aún, considerándose como un síndrome que desemboca en una disfunción neurológica manifestada por un trastorno de la conducta. Pese a su etiología multifactorial, destaca la importancia de su base genética (Sandin et al., 2017; Grove et al., 2019), cuya interacción con los factores ambientales producen diversos fenotipos específicos para cada trastorno del espectro autista (Chaste et al., 2012).

En las últimas décadas ha aumentado considerablemente la prevalencia del diagnóstico TEA en todo el mundo (Abrahams & Geschwind, 2008; Sevilla, Bermúdez & Sánchez, 2013; Organización Mundial de la Salud, 2019), hecho que no puede ser explicado desde la perspectiva de la base genética de este complejo grupo de patologías. A pesar de que la evolución del diagnóstico puede ser un factor importante en esta variación (Hertz-Picciotto y Delwiche, 2009; Zúñiga, Balmaña & Salgado, 2017;

Hansen et al., 2015), tampoco explica completamente este abrupto incremento en el diagnóstico. Diversos estudios han destacado que existe una relación entre variables genéticas y ambientales que puede ayudar a explicar este incremento, como es el caso de los estudios con gemelos monocigóticos y dicigóticos, los cuales sugieren un componente genético moderado y unos factores ambientales cada vez más importantes, como la exposición a contaminantes ambientales (Folstein & Rosen-Sheidley, 2001; De Felice, Scattoni, Ricceri, & Calamandrei, 2015). Dentro del resto de factores ambientales que podrían estar facilitando el aumento del número de niños/as con TEA, ciertos compuestos, así como la exposición a plaguicida, parecen haber ganado un interés especial en los últimos años años (Pelch et al., 2019; Roberts et al., 2019; Modabbernia et al., 2017), documentándose la exposición gestacional a diversos tóxicos se ha asociado con una mayor prevalencia/sintomatología TEA en modelos humanos (Folstein & Rosen-Sheidley, 2001; Rauh et al., 2011-2012; Shelton, Hertz-Picciotto & Delwiche, 2012) así como alteraciones en sociabilidad y/o comunicación en roedores (De Felice et al., 2014-2015).

En relación con el último punto, Díaz-Anzaldúa y Díaz-Martínez (2013) han descrito como la exposición a ciertos factores ambientales puede incrementar la susceptibilidad a los TEA, como es el uso del ácido valproico, etanol, talidomida y misoprostol durante el embarazo. De Felice et al. (2015) destaca como factor ambiental la exposición prenatal temprana a los contaminantes del ambiente, como pueden ser los plaguicidas organofosforados (OP). Dentro de los plaguicidas OP sobresale el Clorpirifos (CPF), el cual es ampliamente utilizado en agricultura para el control de plagas de insectos tanto en Estados Unidos como en Europa en la actualidad (Eaton et al., 2008), aunque la exposición de mujeres embarazadas y niños al CPF, en general muy predominante, se produce principalmente a través de la dieta (Venerosi et al., 2015).

El CPF actúa sobre el sistema nervioso central y periférico, principalmente inhibiendo la acción de la acetilcolinesterasa (AChE), dando lugar a una hiperestimulación de los receptores colinérgicos (muscarínicos y nicotínicos) a través de la acetilcolina (Eaton et al., 2008). Esto puede producir un “síndrome colinérgico”, caracterizado por un aumento de la sudoración y salivación, secreción bronquial profunda, miosis, diarrea, temblores, así como diversos efectos en el sistema nervioso central (SNC), además de participar en el crecimiento atrofiado de axones (Holmstedt, 1959; Lotti, 2010; Costa, 2018). Sin embargo, decenas de estudios desarrollados en las últimas dos décadas han mostrado que la exposición a dosis bajas de CPF durante el desarrollo que no tienen la capacidad de inhibir significativamente la actividad de la AChE también se han relacionado con multitud de alteraciones conductuales y fisiológicas (Ricceri et al., 2006; Venerosi et al., 2008), por lo que parecen existir mecanismos moleculares toxicológicos alternativos (Burke et al., 2017). De esta forma, la exposición

a dosis bajas de CPF durante el desarrollo se han asociado con alteraciones en una amplia variedad de conductas como es la memoria, atención, aprendizaje, control inhibitorio, entre otros (Levin et al., 2002; Aldridge et al., 2005; Rauh et al., 2011, -2012).

Junto a este abanico de conductas susceptibles a ser alteradas por la exposición a CPF, diferentes estudios también han relacionado la exposición a CPF durante distintos periodos de desarrollo y las consecuencias que tiene en la sociabilidad y/o comunicación (Basaure et al., 2019; Carr et al., 2020; De Felice et al., 2014, 2015; Lan et al., 2017, 2019; Mullen et al., 2013; Ricceri et al., 2003, 2006; Venerosi et al., 2006, 2008, 2009, 2010, 2015). Partiendo de este último punto, uno de los métodos utilizados para evaluar la comunicación en roedores es por medio de las vocalizaciones ultrasónicas (USV) que éstos utilizan para comunicarse entre sí, las cuales se caracterizan por frecuencias que varían en torno a 30 y 90 kHz. Los USV demuestran que son un marcador sensible para detectar efectos neurotóxicos a corto plazo en el desarrollo debido a la exposición a contaminantes ambientales (Venerosi et al., 2009; Morales-Navas et al., en revisión).

Venerosi et al. (2009) muestra en su estudio que una exposición prenatal a CPF (6 mg / kg), concretamente en los días de gestación (GD) 14-17, 4 días antes de la última etapa de gestación es suficiente para determinar una conducta deficiente caracterizado por la disminución de la respuesta en una condición de angustia, como es separarse de la madre, además de una reducción de la actividad motora. Venerosi et al. (2010) señala, además, que la exposición al CPF en el desarrollo desempeña un papel fundamental a la hora de modular los estados afectivos/emocionales, los cuales implican una alteración del funcionamiento neuronal más allá del colinérgico, como es la transmisión serotoninérgica y dopaminérgica. De Felice et al. (2015) concluye que la exposición prenatal a CPF en el GD14-17 afecta de manera significativa en la maduración neuroconductual, como un menor aumento de peso, así como una maduración motora retrasada. Según Lan et al. (2017) la exposición de ratones a CPF durante los días de gestación 12-15, periodo que en humanos sería el segundo trimestre del embarazo, interfiere con el desarrollo neuromotor temprano, causando déficits en las conductas sociales condicionadas e innatas, así como en limitar el interés, en la edad adulta, de exploración de objetos novedosos. Sin embargo, no hay hasta la fecha ningún estudio que analice los efectos de CPF durante este periodo (GD12) en ratas, siendo todos en ratones. Esto es relevante ya que las ratas son un modelo preclínico más parecido a los humanos, y un modelo más fiable en relación con el estudio de las conductas sociales (Ellenbroek and YOUN, 2016).

Partiendo de lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo es analizar los efectos de la exposición gestacional (GD 12.5-15.5) a CPF en ratas macho sobre conductas específicas relacionadas

con el comportamiento autista como es el caso de los USV, y usando una dosis mucho más baja que anteriores trabajos (1 mg / kg de CPF). Nuestra hipótesis es que la exposición a CPF inducirá diferencias conductuales tal y como se ha comprobado en modelos de CPF en ratones.

Metodología

Animales de experimentación

Después de un tiempo apropiado de aclimatación a este nuevo contexto, durante 24h se emparejaron 14 ratas hembra y 14 machos procedentes de diferentes generaciones filiales y desconocidos entre sí. A las 24h, los machos fueron reintroducidos en sus respectivas cajas y las hembras se sometieron a la evaluación de presencia/ausencia de tapón seminal, así como de espermatozoides en las paredes vaginales a través de microscopio. Una vez confirmada dicha inseminación, las hembras permanecieron aisladas en solitario en sus respectivas cajas durante toda la gestación. Durante el proceso de gestación, fueron expuestas a CPF o a un vehículo y su peso fue controlado diariamente. Todas las crías nacieron en el día gestacional (GD) 21, el cual se estableció como el día postnatal 1 (PND1). De las crías resultantes, sólo se utilizaron machos en la presente serie de experimentos (un total de 98 ratas macho). Las crías hembras se mantuvieron hasta el PND21, día del destete, para asegurar un contexto normalizado. Los machos fueron estabulados de cuatro en cuatro en diferentes jaulas. Todas las generaciones tuvieron un acceso libre (ad libitum) a la comida (alimento estándar A04, Panlab) y al agua. Todas las generaciones vivieron bajo un ciclo de 12 horas de luz (luces encendidas a las 7 p.m.). Todas las pruebas conductuales se realizaron en su ciclo de noche, donde la actividad es mayor en los roedores. Las condiciones de temperatura y humedad del hogar se mantuvieron a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $50\pm 10\%$, respectivamente. El presente estudio forma parte del proyecto ES040130002260 y se ha realizado de acuerdo con el Real Decreto 53/ 2013 y la Directiva de la Comunidad Europea (2010/63/UE) para la investigación con animales, y ha sido aprobado por el Comité de Investigación Animal de la Universidad de Almería.

Agente utilizado

El CPF [O, O-dietil O-3,5,6-tricloropiridina-2-il fosforotioato (Pestanal, Sigma Aldrich)] se diluyó en aceite de maíz y fue administrado por vía subcutánea en la espalda de las ratas hembra embarazada a dosis de 1mg/kg/mL/día de GD12.5 a GD15.5. La mitad de las hembras fueron aleatoriamente asignadas a CPF y la otra mitad a vehículo (aceite de maíz). Estos días fueron elegidos en base a otros químicos conocidos por inducir comportamientos similares a los del TEA en roedores (ácido valproico) así como estudios previos que involucraban CPF en ratones y en datos previos de nuestro laboratorio (Lan et al., 2017, 2019; Morales-Navas et al., en revisión). Se eligió esta dosis de CPF porque se sabe que induce alteraciones conductuales y moleculares sin inducir una inhibición significativa de las colinesterasas durante el desarrollo, tanto en el período postnatal (Pérez-Fernández

y otros, 2019, 2020a, 2020b) como en el período gestacional (Venerosi et al., 2009; De Felice et al.; 2015).

Conducta maternal

A la hora de conocer la conducta maternal de las madres (n= 14; CNT= 7; CPF= 7), se transportaba la jaula de la madre con sus crías a una sala aislada para que se habituasen durante unos 10 minutos. Después sacábamos la madre a una jaula vacía mientras repartíamos las crías por la propia jaula aproximadamente la misma distancia unas de otras, para después introducir de nuevo a la madre. Una vez la madre está dentro de la jaula, mediante un cronómetro, contabilizamos el tiempo que tardaba en recoger una a una a sus crías, apuntando el tiempo que marcaba el cronómetro al recoger cada una de ellas en segundos y llevarla al nido, siendo ésta nuestra variable dependiente (VD) principal. Una segunda VD fue utilizada con el objetivo de normalizar la VD principal, es decir, normalizar los tiempos de recogida de las crías al tiempo de la primera recogida. Esto se realizó estableciendo el tiempo de la primera cría a 0 y restando el tiempo de recogida del resto de crías al tiempo de la primera. Esta variable es de interés dado que puede que un animal tarde más en general en coger a los animales porque tarda más en ir a por el primero, afectando a su latencia a la primera recogida, pero que puede luego ser eficiente una vez empieza. De manera excepcional, si se requería al preparar la jaula, se rehacía el nido para que la madre tuviese un sitio fácilmente reconocible cuando recogiese a sus crías.

Batería funcional: análisis del desarrollo

Evolución del peso

El peso de las ratas macho (n= 98; 48 CNT; 50 CPF) fue monitoreado en dos momentos diferentes desde el nacimiento (PND1 y PND5). Los animales se pesaron en la misma habitación a una hora similar (entre las 9 y las 12 de la mañana) en una báscula, cuyos pesos se expresan en gramos (g).

Evolución de la apertura ocular

La apertura ocular de las ratas macho (n= 53; 25 CNT; 28 CPF) fue monitoreada desde el PND12 al PND16, ambos incluidos. Las puntuaciones fueron definidas por 0 puntos (ningún ojo abierto), 1 punto (un ojo abierto), y 2 puntos (ambos ojos abiertos). Todas las ratas tuvieron los dos ojos abiertos en el PND16. Este procedimiento se realizó siempre en el mismo rango de horas (entre las 10 y las 12 de la mañana), dejando alrededor de 24h entre cada medida. La apertura ocular se

monitorizó con la puntuación media de crías de cada grupo que tenían los dos ojos abiertos en los diferentes postnatales.

Desarrollo neuromotor

El desarrollo neuromotor de las ratas macho (n= 53; 25 CNT; 28 CPF) fue evaluado en PND16. Esta evaluación se dividió en tres resultados diferentes: 1) fuerza de agarre, 2) adherencia en plano inclinado y 3) capacidad de ascenso. Todos estos comportamientos se hicieron en una rejilla invertida. Con respecto al primer punto, las crías tenían que agarrar la rejilla una vez que se colocaban sobre ella y ofrecer cierta resistencia a nuestros intentos de sacarlos de la rejilla. Puntuamos a las ratas con 0 puntos cuando no mostraban resistencia, 1 cuando ofrecían algún grado de resistencia y 2 cuando la cría se agarraba fuertemente a la rejilla mostrando alta resistencia a nuestros intentos de quitarla. En cuanto al segundo punto, colocamos la rejilla con una inclinación de 60° y colocamos las crías en la sección media de la rejilla (la rejilla estaba dividida en 3 niveles diferentes por una barra paralela colocada en la parte posterior). Puntuamos a la cría con 0 puntos cuando cayó inmediatamente de la rejilla inclinada, con 1 punto cuando aguantó menos de 15 segundos, y 2 puntos cuando la cría duró 15 segundos o más en el plano inclinado. Finalmente, el tercer punto definió la habilidad de la cría para subir de la sección inferior a la superior de la rejilla inclinada. Puntuamos el rendimiento de las crías con 0 puntos cuando el animal no podía avanzar o simplemente cayó desde la rejilla en la sección inferior, con 1 punto cuando la cría era capaz de alcanzar la segunda sección (media) de la rejilla, y con 2 puntos cuando la cría era capaz de alcanzar la parte superior (tercera sección) de la rejilla. El desarrollo neuromotor se llevó a cabo en su habitación entre las 9 y las 12 de la mañana.

Descenso testicular

Todas las crías machos (n= 53; 25 CNT; 28 CPF) fueron sometidos a una prueba testicular tanto en el PND21 como en el PND30. Brevemente, la cría fue cogida a mano y su abdomen fue suavemente estirado. La caída de los testículos fue anotada como sin gota (0) y como gota visible (1). Debido a que todos los animales no mostraban descenso testicular en la primera medición, pero sí en la segunda, los datos no se analizaron y no se muestran en el presente trabajo.

Vocalizaciones ultrasónicas (USV)

Descripción

Las vocalizaciones ultrasónicas se grabaron utilizando un micrófono ultrasónico (Dodotronic ultramic 250K) dentro de una caja de atenuación de sonido (80x60x70 cm) y se colocaron a 10 cm aproximadamente por encima del animal. El programa informático utilizado para realizar y analizar las grabaciones fue el programa informático SeaWave versión 2.0 (CIBRA), con una frecuencia de muestreo de 250 kHz, en un formato de 16 bits. Se controlaron las temperaturas de la sala adyacente, de la sala experimental y de la caja interior ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). En total, se analizaron 94 grabaciones (49 CNT; 45 CPF). Todas las grabaciones fueron seleccionadas al azar hasta que cada grupo experimental fue completado. Los parámetros analizados fueron los siguientes: número total de llamadas, latencia de la primera llamada, pico de frecuencia máxima y pico de frecuencia media principal.

Procedimiento experimental

Las USV de todas las crías machos fueron evaluadas en el PND7 durante 5 minutos. Brevemente, la jaula de las madres y sus crías se colocaron en una habitación separada de la sala de pruebas 1 hora antes de comenzar el procedimiento. 15 minutos antes de la evaluación, cada cría fue conducida a otra habitación separada (de la sala de la madre y de la sala de pruebas) y fue colocada en una pequeña jaula de plástico cubierta de algodón. Las crías aisladas siempre estaban acompañadas por otros dos hermanos en la jaula de aislamiento. Después de este período de 15 minutos, la cría fue colocada en otra jaula de plástico en una caja aislada e insonorizada, y los USV fueron grabados. La temperatura de las crías se midió en tres momentos diferentes: 1) cuando se separaron de la madre, 2) antes de la prueba y 3) después de la prueba para controlar el sesgo de la temperatura. Las crías fueron colocadas de nuevo de sus madres justo después de terminar el procedimiento. La condición del tratamiento se equilibró durante el día de la prueba para evitar el sesgo de la hora del día. Los experimentadores estaban ciegos para la condición de cada grupo. La temperatura y la humedad de cada habitación (madre, aislamiento y salas de pruebas) siempre se mantuvieron como las condiciones de vida estándar descritas anteriormente. El procedimiento siempre se llevó a cabo entre las 9 y las 12 de la mañana, bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad que se definieron previamente para la habitación de la casa. La luz de la sala de pruebas era tenue. No había ninguna fuente de luz en la caja de pruebas.

Plus Maze (PM)

Descripción

Para el presente experimento, se utilizó el aparato estándar más utilizado. Brevemente, el aparato consistía en una estructura de 4 brazos con un cuadrado central. 2 de estos brazos tenían paredes a su alrededor (brazos cerrados), mientras que los 2 restantes sólo estaban compuestos por el suelo (brazos abiertos). Dentro de esta prueba, la situación de estrés está definida por el conflicto desencadenado por el instinto pro-exploratorio de la rata y la situación aversiva generada por la falta de protección física en los brazos abiertos vs. los brazos cerrados. Es decir, el estado de ansiedad de la rata está ligado al tiempo que está en un espacio menos protegido, abierto (brazos abiertos) vs. el tiempo en el espacio protegido (brazos cerrados). Cuanto más tiempo pase el animal en los brazos abiertos, menor será su ansiedad. Las variables dependientes relacionadas con la ansiedad fueron el tiempo total en los brazos abiertos y el número de entradas en los brazos abiertos. Todas las variables de control motor fueron el número de entradas en los brazos cerrados (frecuencias), distancia total recorrida (cm), inmovilidad (frecuencia), velocidad (cm/s) y, eminentemente y como factor motor general, la tasa de movilidad general (frecuencia). Todas estas variables se registraron y analizaron automáticamente con el Ethovision® versión 3.1. (Noldus).

Procedimiento experimental

Los animales (n= 53; 25 CNT; 28 CPF) fueron llevados a la sala de pruebas y habituados a ella durante 1 hora. Después de esto, se les introdujo en el centro del paradigma y su comportamiento fue registrado sólo una vez durante 5 minutos. El orden de los animales fue contrarrestado por la condición de exposición para evitar el sesgo de la hora del día. Todos los animales fueron llevados a la sala de experimentación 1 hora antes del comienzo de la prueba. Las pruebas siempre se realizaron entre las 9am y las 2pm. La temperatura y la humedad se establecieron de acuerdo con las condiciones de la habitación. La iluminación se fijó como luz tenue.

Tube test

Descripción

Se realizaron dos pruebas clásicas con tubos de PVC opacos. En el caso de los machos, el tubo tenía 100 cm de longitud y 7 cm de diámetro. Estas medidas fueron elegidas por dos razones: 1) El tubo debe tener la longitud suficiente para obligar a la rata "dominante" a empujar por un criterio de tiempo/distancia aceptable, mientras que el animal "sumiso" debe tener tiempo para reaccionar, y 2) El diámetro debe ser lo suficientemente ancho para permitir a los animales moverse hacia adelante y hacia atrás, pero lo suficientemente estrecho para evitar que giren sobre su propio eje. Se hizo una pequeña abertura longitudinal en la parte superior de los tubos para controlar la localización de los animales. Tres puertas (2 en los segmentos externos del tubo y otra en el centro) fueron diseñadas para limitar el libre movimiento y la disposición adecuada antes de las "peleas". El criterio para ganar un combate se definió como que el oponente colocara 4 patas fuera del tubo en su caja externa inicial. La variable dependiente analizada fue el porcentaje de victorias de cada animal. La prueba del tubo se utilizó para estudiar tanto la dominación directa (animales desconocidos) como las jerarquías bien establecidas (animales de la misma jaula).

Procedimiento experimental

Los animales (n= 49; 25 CNT; 24 CPF) fueron trasladados a la sala de experimentación 6 días antes del comienzo para la habituación y el entrenamiento del paradigma. Al principio, algunas ratas comenzaron a entrar en el tubo y a moverse hacia atrás y adelante siguiendo una suave presión del experimentador. A esto le siguieron 5 días consecutivos de comportamiento de carrera recta reforzada. Brevemente, unos pocos pellets fueron colocados en el segmento final del tubo y en la caja externa opuesta. La mayoría de los animales aprendieron rápidamente a ir directamente a la dirección opuesta ya que este programa de refuerzo fue contrarrestado (todos los animales fueron reforzados para moverse en ambas direcciones). En los días de experimentación, los animales fueron conducidos a la sala de experimentación 1 h antes del comienzo. Con objetivo de lograr información acerca de las jerarquías bien establecidas, transitividad y validación de paradigmas, dado que esta información es fundamental para estudiar la validación del paradigma a lo largo de la transitividad (cuando el animal A vence a B, y B vence a C, A debe vencer a C), procedimos a analizar las jerarquías preestablecidas (dominancia y situación en la jerarquía de las ratas de la misma jaula) (experimento de jerarquías bien establecidas). Cada animal "luchó" contra los otros tres cohabitantes 3 veces cada uno, creando así un número final de 9 combates para cada animal. El paradigma se limpió con un 70% de etanol cada vez

que se introducía una nueva rata experimental en el tubo. La temperatura ambiente, la humedad, las condiciones de luz y las horas de experimentación fueron las descritas anteriormente.

Análisis estadístico

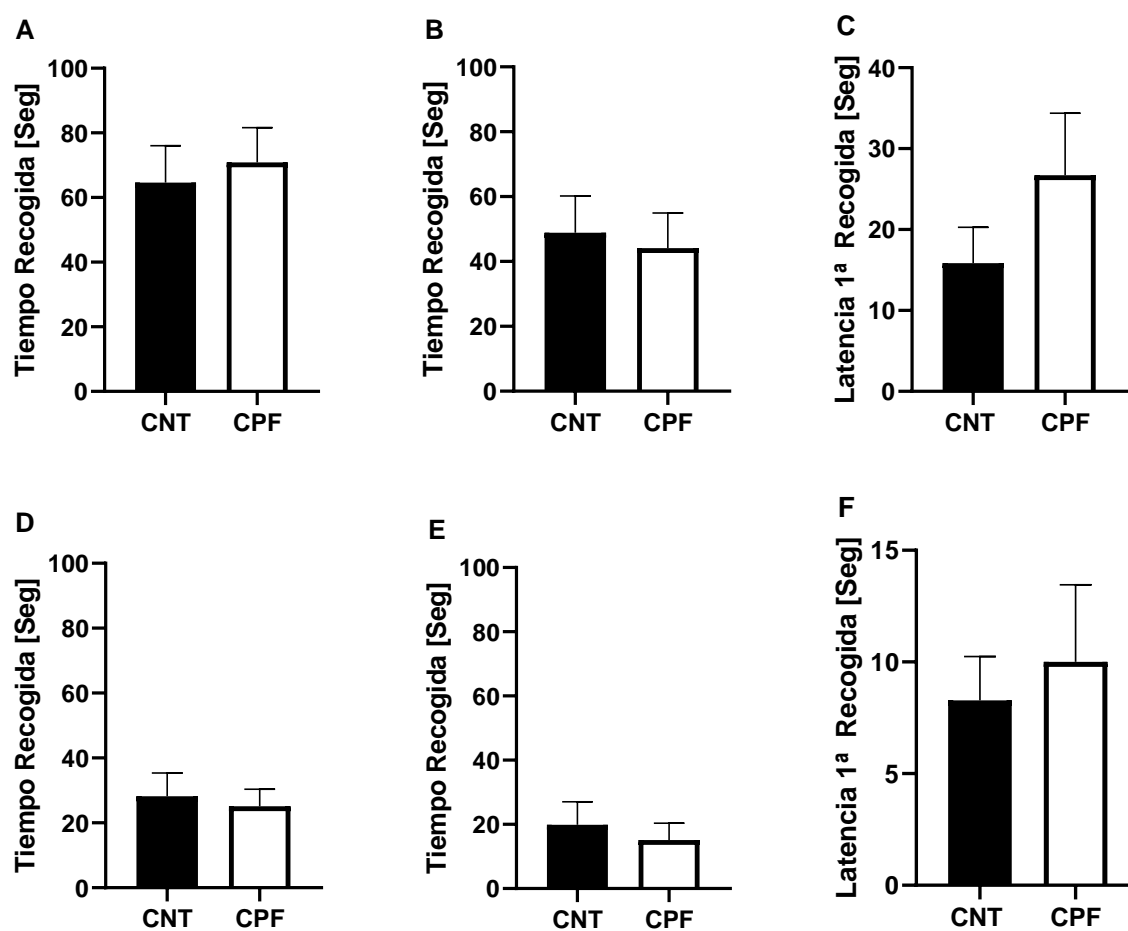
La mayoría de los datos no superó las pruebas de normalidad según la prueba de W de Shapiro-Wilk, por tanto, se utilizaron pruebas no paramétricas, cuyas diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. Además, se utilizó un modelo ANOVA para medidas repetidas para aquellas pruebas que sí pasaron las pruebas de normalidad, como fue el caso de la conducta maternal, el pesaje y la apertura ocular, cuyo factor fue el tratamiento (CNT y CPF). Mientras que para aquellas pruebas donde se compararon los grupos según una única variable dependiente y se cumplía la normalidad y homocedasticidad, fue una prueba t de student, como fue el caso de las pruebas de USVs, así como en Plus-Maze.

El análisis estadístico se llevó a cabo por medio del software de IBM SPSS® Statistics versión 25 y a GraphPad Prism® versión 8.0.2., siendo este último el software utilizado además para el diseño de las gráficas utilizadas en este trabajo. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en $p < 0.05$. En el texto se muestra la descripción estadística de los datos. En las gráficas se muestra la media y el SEM.

Resultados

Conducta maternal

Comenzamos analizando, mediante el procedimiento ANOVA, la conducta maternal para averiguar si la exposición a CPF afectó al tiempo de recogida de las crías. Los resultados muestran que no hay diferencias tanto en el PND 2 sin normalizar [F(1,11)= 0.092; p= 0.767] como en el PND 2 normalizado [F(1,12)= 0.283; p= 0.605] (Gráfica 1A y 1B) así como en el PND 9 tanto no normalizado [F(1,11)= 0.075; p= 0.790] como normalizado [F(1,12)= 1.103; p= 0.314] (Gráfica 1D y 1E). Además, se analizó la latencia a la primera recogida en cada grupo en ambos postnatales, donde comprobamos que tampoco existió diferencias significativas ni en el PND 2 [U (6, 7) = 13, p= 0.2949] ni en el PND 9 [U (7, 7) = 23; p= 0.8992] (Gráfica 1C y 1F).

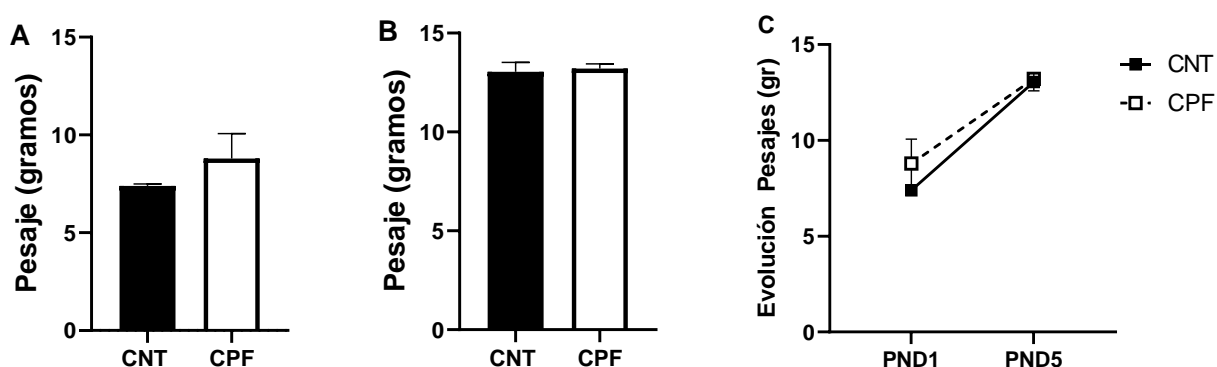


Gráfica 1. Conducta maternal. Tiempo de recogida en segundos, arriba, PND2 normalizado (A), no normalizado (B) y latencia a la primera recogida (C); abajo, PND9 normalizado (D), no normalizado (E) y latencia a la primera recogida (F).

Batería funcional: crías

Pesaje

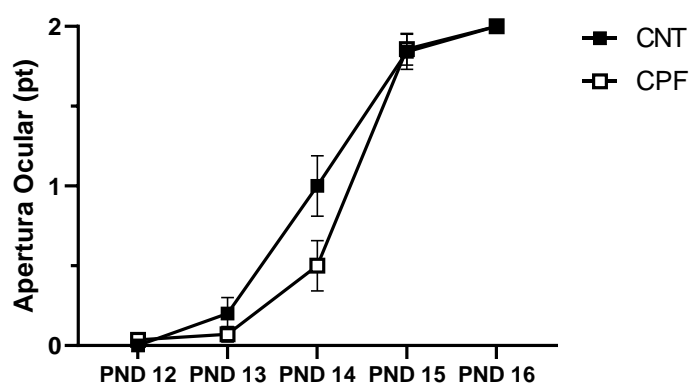
Tras analizar el peso de ambos grupos tanto en el PND 1 como en el PND 5 para comprobar si la exposición al CPF alteró el peso ganado en las crías, encontramos que no existen diferencias significativas tanto en el PND 1 [U (48, 50) = 1132; p= 0.6286] (Gráfica 2A) como en el PND 5 [t(1)= 0.3045; p= 0.7614] (Gráfica 2B). Además, se creó una gráfica dónde observar la evolución con el fin de ilustrar la diferencia de peso en estos PND entre ambos grupos (Gráfica 2C).



Gráfica 2. Pesaje de los grupos CNT y CPF en los PND1 (A) y PND9 (B), y evolución del pesaje en ambos grupos (C). Los datos se expresan en su valor medio y el error estándar de la media.

Apertura Ocular

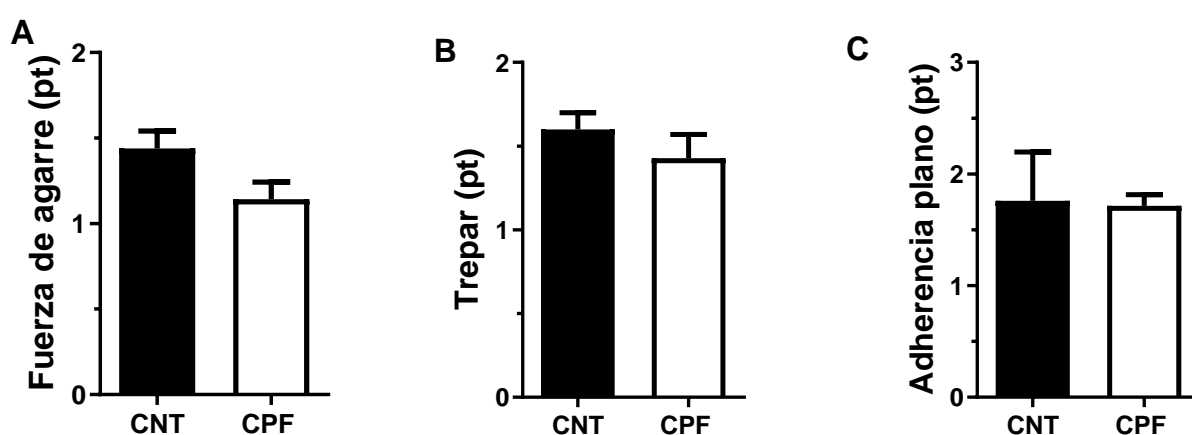
La apertura ocular refleja cómo el grupo CPF tardó más en empezar abrir algún ojo, sin embargo, ambos grupos tenían los dos ojos abiertos al llegar al PND 15, pudiendo comprobarse perfectamente en el PND 16 [t(1,4)= 1.147; p= 0.3155] (Gráfica 3).



Gráfica 3. Apertura ocular de ambos grupos. Los datos se expresan en su valor medio y error estándar de la media.

Neuromotricidad

Al analizar si la exposición a CPF influyó en la neuromotricidad de ambos grupos, comprobamos como las diferencias entre los grupos no es significativa en las pruebas que hicimos. En la “fuerza de agarre” el grupo control obtiene una puntuación un poco más alta, pero sin ser significativa [U (25, 28) = 257; p= 0.0672] (Gráfica 4A). En la habilidad de “trepar”, la puntuación entre ambos grupos se vuelve más similar, cuya poca diferencia entre ambos no es significativa [U (25, 28) = 320; p= 0.5702] (Gráfica 4B). Por último, evaluamos la “adherencia al plano” de ambos grupos, cuyos resultados muestran ser casi iguales [U (25, 28) = 343.5; p= 0.8850] (Gráfica 4C).

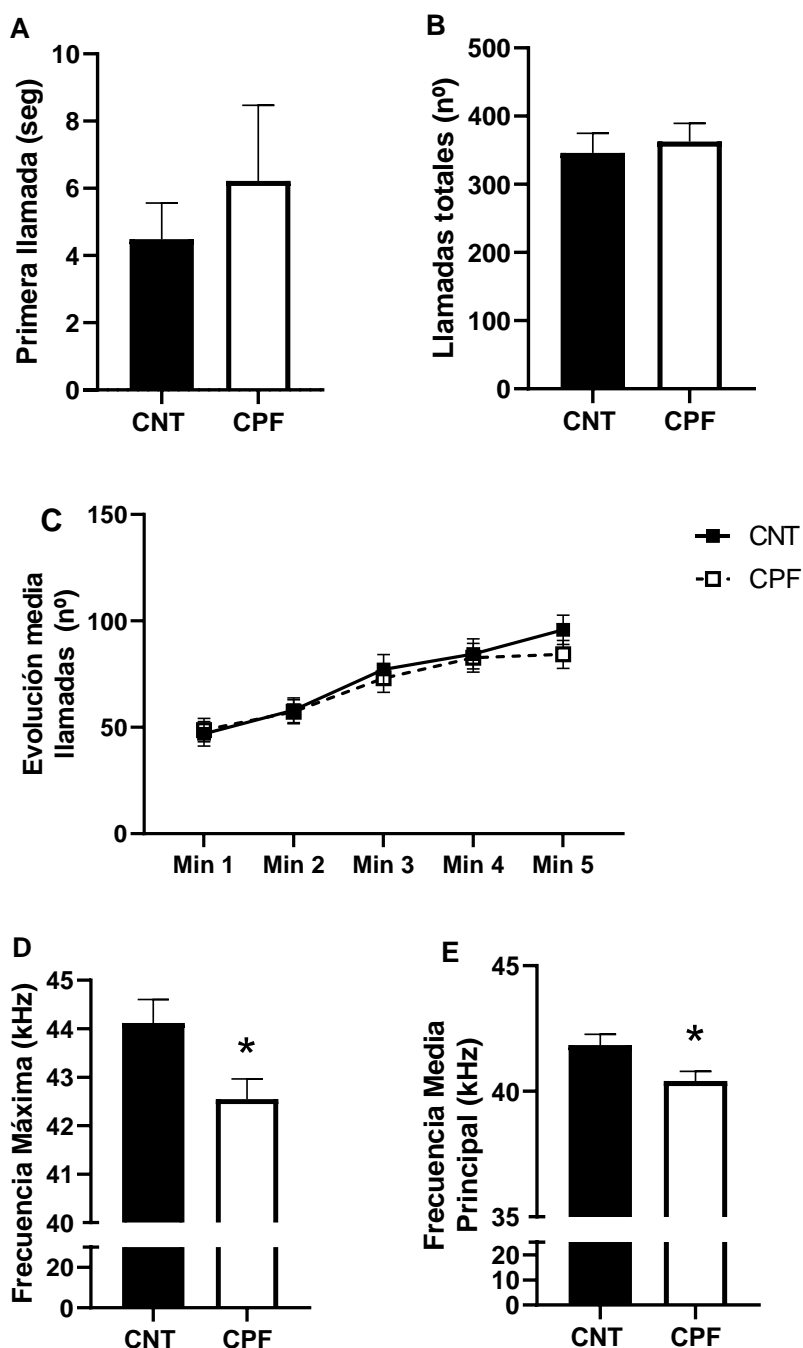


Gráfica 4. Comparación de habilidades neuromotoras. Fuerza de agarre (A), Trepar (B) y Adherencia al plano (C) de ambos grupos según su puntuación. Los datos se expresan en su valor medio y error estándar de la media.

Vocalizaciones de ultrasonidos (USVs)

Para evaluar cómo afectó la exposición a CPF a nuestras ratas, se comprobó el número total de USV emitidos por cada una de las crías durante cinco minutos, tiempo que duró el procedimiento (Gráfica 4). En la variable “Latencia a la primera llamada” de las crías, encontramos cómo los animales expuestos a CPF tardaron más tiempo en realizar la primera llamada, aunque este efecto no fue estadísticamente significativo [U (45,49) = 11.02; p= 0.99] (Gráfica 5A). También se analizó la variable “Llamadas totales”, en ella encontramos un número similar de llamadas totales en ambos grupos donde la poca diferencia no es estadísticamente significativa [t(1)= 0.4223; p= 0.6738] (Gráfica 5B). Además, se comprobó cómo fue la evolución de ambos grupos de investigación a lo largo de los cinco minutos de la prueba, subdividido en minutos (Gráfica 5C), donde vemos que apenas hay diferencia en el número de llamadas entre grupos, mientras que sí se aprecia en el minuto 5. Por último, se analizó la variable denominada “Frecuencia máxima” así como la variable “Frecuencia

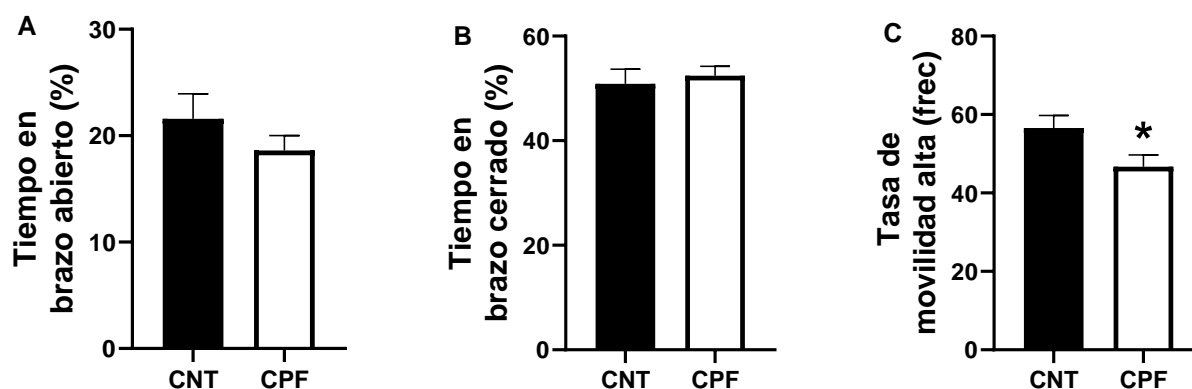
media principal”, donde encontramos que los animales expuestos a CPF mostraron una reducción estadísticamente significativa tanto en la “Frecuencia máxima” [$t(1)= 2.457$; $p= 0.0159$] (Gráfica 5D) como en la “Frecuencia media principal” [$t(1)= 2.466$; $p= 0.0155$] (Gráfica 5E) en comparación a los datos observados en los animales control.



Gráfica 4. Vocalizaciones ultrasónicas (USVs). Con * se indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos en las variables “Frecuencia máxima” (D) y “Frecuencia media principal” (E). Los datos se expresan en su valor medio y error estándar de la media.

Plus Maze (PM)

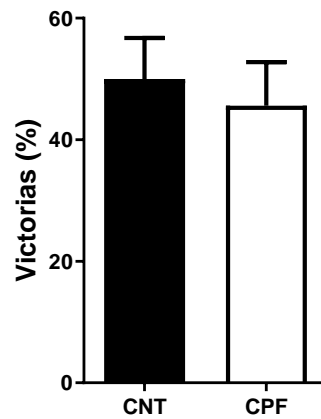
En esta prueba analizamos los niveles de ansiedad y motricidad de las ratas para comprobar si la exposición a CPF afectó a la conducta de exploración de éstas (Gráfica 6). Mediante el test de Mann-Whitney se comprobó el tiempo que pasan las ratas en el brazo abierto, mostrando que el grupo de animales expuestos a CPF pasó menos tiempo en el brazo abierto, aunque este dato no fue estadísticamente significativo [$U(25, 24) = 303$; $p = 0.4080$] (Gráfica 6A). Además, se evaluó el tiempo que pasan ambos grupos en el brazo cerrado, los resultados muestran como el grupo CPF pasó más tiempo en dicho brazo frente al grupo control, aunque los datos no indican diferencias estadísticamente significativas [$t(1) = 0.4843$; $p = 0.6303$] (Gráfica 6B). Los resultados respecto a la influencia de la exposición a CPF en la motricidad sólo muestran diferencias significativas entre los grupos en la variable “Tasa de movilidad alta” [$t(1) = 2.243$; $p = 0.0293$] donde los animales expuestos a CPF tuvieron una tasa menor que el grupo control (Gráfica 6C). Sin embargo, no muestran diferencias significativas en el resto de variables estudiadas (datos no mostrados).



Gráfica 6. Plus-Maze. Diferencias significativas en Tasa de movilidad alta. * $p < 0.05$.
Los datos se expresan en su valor medio y error estándar de la media.

Tube Test

Los resultados, tras evaluar si las jerarquías preestablecidas estaban influenciadas por la exposición a CPF, muestran cómo el grupo control tuvo un porcentaje algo mayor de victorias, sin embargo, este dato no muestra diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos [U (25, 24) = 277; p= 0.6494] (Gráfica 7).



Gráfica 7. Tube test. Comparación de jerarquía. Los datos se expresan en su valor medio y error estándar de la media.

Discusión

La presente investigación muestra cómo la exposición gestacional a CPF (1 mg / kg de CPF) entre los días 12,5 al 15,5 puede alterar el comportamiento y comunicación de las ratas. Dicha alteración se puede comprobar en los resultados obtenidos en la prueba de USV realizada, donde se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos CPF y CNT tanto en “frecuencia máxima” como en “frecuencia media principal”. Además, en la prueba Plus-Maze, se observa una alteración en el grupo expuesto a CPF en la actividad motora, como se muestra en la variable anteriormente expuesta, “tasa de movilidad alta”. Esto es, para nuestro conocimiento, la primera vez que se analizan los efectos de la exposición a dosis tan bajas de CPF en el desarrollo conductual de las ratas a estas edades.

Los resultados obtenidos en la batería funcional realizada en este trabajo muestran cómo el grupo expuesto a CPF no vio afectada su ganancia de peso, sí tardó más en abrir alguno de los ojos, además de una puntuación menor respecto al grupo control en las pruebas neuromotoras, lo que viene a demostrar una tendencia de cómo la exposición a CPF, incluso a dosis tan bajas como la utilizada en este trabajo, puede afectar al desarrollo motor temprano. Resultados que no son estadísticamente significativos, por lo que no permiten apoyar estudios anteriores, como los obtenidos por De Felice et al. (2015) en su estudio con ratones.

En relación a los USV, la exposición gestacional a CPF no afectó las variables principales de número total de llamadas, latencia a la primera llamada, o total de llamadas por minuto. Estos datos contrastan con los resultados obtenidos por Venerosi et al. (2009), quienes sí vieron una diferencia significativa entre grupos en el número y duración de las llamadas. Además, nuestros resultados muestran cómo existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos tanto en la “frecuencia máxima” como en la “frecuencia media principal”. Es probable que esta diferencia se deba a un retraso en el desarrollo de la cría, influyendo en su capacidad de emitir una llamada a la madre más alta. Además, existen una diferencia importante en la variable “latencia a la primera llamada”, que, pese a no ser estadísticamente significativa, sí que refleja una latencia importante del grupo expuesto a CPF frente al grupo CNT. Resultado similar al estudio realizado por Venerosi et al. (2009), el cual, a diferencia del aquí presentado, los animales expuestos a CPF tuvieron un número mayor de llamadas. Esto demuestra la influencia que provoca la exposición prenatal a CPF en las ratas, reduciendo la tasa de vocalizaciones ultrasónicas, así como su frecuencia máxima. Estos datos vienen a demostrar cómo los USV permiten detectar los efectos del CPF en el desarrollo neurobiológico de la rata.

Mientras, los resultados del Plus-Maze muestran una diferencia significativa en la frecuencia de movilidad alta, donde destaca una hipoactividad del grupo expuesto a CPF. Sin embargo, esta exposición gestacional a CPF no alteró el estado de ansiedad basal de los animales durante la adolescencia. Esto corrobora la información vista en varios estudios que relacionan la exposición a dosis bajas de CPF con alteraciones en el desarrollo, como es una actividad locomotora reducida (Lan et al., 2017). Sin embargo, otros estudios han visto que el CPF altera la actividad locomotora, observándose una hiperactividad de esta (Levin et al., 2002; Icenogle et al., 2004). Los datos aportados por esta investigación sugieren que la exposición a CPF, incluso a dosis tan bajas (1 mg / kg de CPF), puede provocar una alteración en la actividad motora. Por tanto, tras contrastar estos datos con otros estudios parece las alteraciones en la actividad motora está relacionada con el momento de exposición al CPF. Además, no se encontró ninguna diferencia en la dominancia en la jerarquía ya establecida, este fenómeno ya se ha observado previamente, solo un estudio ha analizado algo similar con la misma dosis, pero en el periodo predestete (Pérez-Fernández et al., 2020a).

El principal factor limitante de esta investigación en relación con otros estudios similares es la utilización únicamente de ratas macho, perdiendo la opción de comparar estos datos en ambos sexos. Además, la edad de evaluación es más concreta a otros estudios, que comparan los resultados en distintos periodos de desarrollo. Esto hace que no podamos comprobar si los resultados aquí mostrados perduran en la rata o son un efecto puntual.

Conclusiones

En líneas generales, estos resultados permiten comprobar los efectos de una exposición a CPF incluso a dosis tan bajas (1 mg / kg de CPF) en el desarrollo conductual y actividad motora de la rata, así como en la comunicación de esta. La exposición prenatal a CPF produjo una alteración en la conducta motora, sin aumentar la ansiedad, en nuestro modelo animal, demostrando que los efectos que produce este plaguicida varían en función de la edad. Debido a que cualquier alteración en la función motora está en la base de los trastornos neurodegenerativos actuales, la investigación aquí presentada pretende aumentar el interés acerca de los efectos de estos contaminantes en el desarrollo de estas patologías. Por tanto, para futuros estudios sería conveniente validar estos resultados con relación a ambos sexos.

Referencias bibliográficas

- Abrahams, B. S., & Geschwind, D. H. (2008). Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nature reviews genetics*, 9(5), 341-355.
- Aldridge, J. E., Meyer, A., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2005). Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure. *Environmental health perspectives*, 113(8), 1027–1031.
- American Psychiatry Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorder (5th ed.).
- Calderón, R. S. (2002). El síndrome autista: un acercamiento a sus características y generalidades. *Revista Educación*, 26(1), 47-61.
- Costa, L.G., (2018). Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues, *Toxicological Sciences*, Volume 162, Issue 1, 1 March 2018, Pages 24–35,
- De Felice, A., Venerosi, A., Ricceri, L., Sabbioni, M., Scattoni, M. L., Chiarotti, F., & Calamandrei, G. (2014). Sex-dimorphic effects of gestational exposure to the organophosphate insecticide chlorpyrifos on social investigation in mice. *Neurotoxicology and teratology*, 46, 32-39.
- Díaz-Anzaldúa, A., & Díaz-Martínez, A. (2013). Contribución genética, ambiental y epigenética en la susceptibilidad a los trastornos del espectro autista. *Rev Neurol*, 57(556), 68.
- Fernández-Mayoralas, D. M., Fernández-Perrone, A. L., & Fernández-Jaén, A. (2013). Trastornos del espectro autista. Puesta al día (I): introducción, epidemiología y etiología. *Acta Pediátrica Española*, 71(8), E217-E223.
- Folstein, S.E., Rosen-Sheidley, B., (2001). Genetics of autism: complex etiology for a heterogeneous disorder. *Nature Reviews Genetic*; 2:943–955.
- Hertz-Picciotto, I., & Delwiche, L. (2009). The rise in autism and the role of age at diagnosis. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 20(1), 84–90.
- Holmstedt, B. (1959). Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacology. Rev.* 11, 5676–5688.
- Icenogle, L. M., Christopher, N. C., Blackwelder, W. P., Caldwell, D. P., Qiao, D., Seidler, F. J., ... & Levin, E. D. (2004). Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(1), 95-101.
- Lan, A., Kalimian, M., Amram, B., & Kofman, O. (2017). Prenatal chlorpyrifos leads to autism-like deficits in C57Bl6/J mice. *Environmental Health*, 16(1), 43.
- Levin, E. D., Addy, N., Baruah, A., Elias, A., Christopher, N. C., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2002). Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. *Neurotoxicology and teratology*, 24(6), 733-741.
- Lotti, M. (2010). Clinical toxicology of anticholinesterases in humans. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (R. Krieger, Ed.), pp. 1543–1589. Academic Press, San Diego.

- Pérez-Fernández, C., Morales-Navas, M., Aguilera-Sáez, L., Abreu, A., Guardia-Escote, L., Fernández, I., ... Sánchez-Santed, F. (2020). Medium and long-term effects of low doses of Chlorpyrifos during the postnatal, preweaning developmental stage on sociability, dominance, gut microbiota and plasma metabolites. *Environmental Research*, 184, 109341.
- Rauh, V., Arunajadai, S., Horton, M., Perera, F., Hoepner, L., Barr, D. B., & Whyatt, R. (2011). Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environmental health perspectives*, 119(8), 1196–1201.
- Rauh, V. A., Perera, F. P., Horton, M. K., Whyatt, R. M., Bansal, R., Hao, X., Liu, J., Barr, D. B., Slotkin, T. A., & Peterson, B. S. (2012). Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), 7871–7876.
- Ricceri, L., Markina, N., Valanzano, A., Fortuna, S., Cometa, M. F., Meneguz, A., & Calamandrei, G. (2003). Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 191(3), 189-201.
- Rivas Torres, R. M., López Gómez, S., & Taboada Ares, E. M. (2010). Etiología del autismo: un tema a debate. *Educational Psychology*, 15(2), 107-121.
- Rodríguez-Barrionuevo, A. C., & Rodríguez-Vives, M. A. (2002). Diagnóstico clínico del autismo. *Revista de Neurología*, 34(1), 72-77.
- Sánchez Gil, A. (2018). *Ultrasonido en crías de ratas prenatalmente expuestas a ácido valproico y clorpirifós*. Universidad de Almería.
- Semple, B.D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D.M., Noble-Haeusslein, L.J., 2013. Brain development in rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog. Neurobiol.* 106–107, 1–16.
- Sevilla, M. D. S. F., Bermúdez, M. O. E., & Sánchez, J. J. C. (2013). Aumento de la prevalencia de los trastornos del espectro autista: una revisión teórica. *International Journal of Developmental and Educational Psychology*, 1(1), 747-764.
- Shelton, J. F., Hertz-Picciotto, I., & Pessah, I. N. (2012). Tipping the balance of autism risk: potential mechanisms linking pesticides and autism. *Environmental health perspectives*, 120(7), 944–951.
- Varela-González, D. M., Ruiz-García, M., Vela-Amieva, M., Munive-Baez, L., & Hernández-Antúnez, B. G. (2011). Conceptos actuales sobre la etiología del autismo. *Acta pediátrica de México*, 32(4), 213-222.
- Venerosi, A., Ricceri, L., Scattoni, M. L., & Calamandrei, G. (2009). Prenatal chlorpyrifos exposure alters motor behavior and ultrasonic vocalization in CD-1 mouse pups. *Environmental Health*, 8(1), 12.
- Venerosi, A., Ricceri, L., Rungi, A., Sanghez, V., & Calamandrei, G. (2010). Gestational exposure to the organophosphate chlorpyrifos alters social–emotional behaviour and impairs responsiveness to the serotonin transporter inhibitor fluvoxamine in mice. *Psychopharmacology*, 208(1), 99-107.

- Venerosi, A., Tait, S., Stecca, L., Chiarotti, F., De Felice, A., Cometa, M. F., ... & Ricceri, L. (2015). Effects of maternal chlorpyrifos diet on social investigation and brain neuroendocrine markers in the offspring—a mouse study. *Environmental Health*, *14*(1), 32.
- Zúñiga, A. H., Balmaña, N., & Salgado, M. (2017). Los trastornos del espectro autista (TEA). *Pediatría Integral*, 92-108.