



INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS

Pia Isabel Basaure García

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

Pia Isabel Basaure García

**INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS
NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN
POSTNATAL A CLORPIRIFÓS**

Tesis Doctoral

Dirigida por

Dra. Maria Teresa Colomina Fosch

Dra. Maria Cabré Bargalló

Departamento de Psicología



Universitat Rovira i Virgili

Tarragona

2017

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García



FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat *“Influència del genotip apoE en l’expressió d’efectes neuroconductuals derivats de l’exposició postnatal a clorpirifós”*, que presenta Pia Isabel Basaure García per a l’obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meua direcció al Departament de Psicologia/Departament de Bioquímica i Biotecnologia d’aquesta universitat.

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado *“Influencia del genotipo apoE en la expresión de efectos neuroconductuales derivados de la exposición postnatal a clorpirifós”*, que presenta Pia Isabel Basaure García para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Psicología/Departamento de Bioquímica y Biotecnología de esta universidad.

I STATE that the present study, entitled *“Influence of apoE genotype on the expression of neurobehavioral effects triggered by postnatal exposure to chlorpyrifos”*, presented by Pia Isabel Basaure García for the award of the degree of Doctor, has been carried out under my supervision at the Department of Psychology/Department of Biochemistry and Biotechnology of this university.

Reus, 25 d’abril de 2017

El/s director/s de la tesi doctoral

El/los director/es de la tesis doctoral

Doctoral Thesis Supervisor/s

Maria Teresa Colomina Fosch

Maria Cabré Bargalló

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

Todas las fases experimentales incluidas en esta tesis doctoral se realizaron dentro del grupo de investigación Neurocompartamiento y Salud (NEUROLAB) y el Centro de Investigación en Evaluación y Medida de la Conducta (CRAMC) del Departamento de Psicología, y del Centro de Tecnología Ambiental Alimentaria y Toxicológica (TecnATox) de la Universitat Rovira i Virgili, y fueron financiadas por:

- **Programa FI de la Agencia de Administración de Becas Universitarias y de Investigación (AGAUR).** Comisión de Universidades e Investigación del Departamento de Innovación, Universidades y Empresa del Gobierno de Cataluña; Número de subvención **2014FI_B 00075**.
- **Programa Estatal de I+D e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016.** Cambios neuroconductuales y metabólicos en ratones transgénicos para la APOE expuestos durante el periodo postnatal a clorpirifos. Posible implicación de la microbiota y la neuroinflamación. Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno español. **Referencia: PSI2014-55785-C2-2-R.**

También, agradecemos a Helena Torrell Galceran y Lorena García Alcalde de las instalaciones del Centre for Omic Sciences (COS) de la Universitat Rovira i Virgili, reconocida como Infraestructura Singular de Investigación y Tecnología (ICTS) por el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno español, por sus contribuciones en el análisis de la expresión génica realizada en esta tesis doctoral.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

*“I am among those who think that science has great beauty
...A scientist in his laboratory is not a mere technician:
he is also a child placed before natural phenomena
which impress him like a fairy tale.”*

Marie Curie

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

Agradecimientos

Es de noche y yo estoy acabando un escrito, el que nunca pensé hacer. ¿Cansancio? ¡Mucho! Pero es ese agotamiento que viene después de una gran experiencia, un inmenso viaje. He llegado al final de un camino en compañía de muchos y la bondad de tantos. Y sí, es enorme el sentimiento que me cobija en este momento. Es calor. Es pura gratitud hacia todos.

En primer lugar, quiero agradecer profundamente a mis dos directoras de tesis. Tuve la gran suerte de hacerla con dos mujeres que poseen una inmensa calidad científica, académica y personal. A la Dra. Maria Teresa Colomina por aceptarme en su laboratorio y enseñarme lo bello que es vivir de la ciencia, mostrarme lo que significa ser un buen jefe, animarme cada día a ser mejor, indicarme mis errores de la manera más dulce y honesta y conseguir que me enamore constantemente de la psicobiología. A la Dra. Maria Cabré por ayudarme siempre cuando lo necesité, calmarme y alentarme en todo momento, entregarme su objetividad infinita y explicarme cada detalle con paciencia y cariño. A ambas, gracias por vuestra disposición ilimitada para conmigo, por cobijarme en los instantes duros y darme todo vuestro apoyo minuto a minuto. Nunca me sentí sola en esta aventura y eso es debido a ustedes. Les estaré eternamente agradecida por esta oportunidad que me dieron.

A mis chicas del laboratorio, las toxiconenas-psicobiólicas Ingrid, Fiona y Laia. Mis compañeras de mesa, pipetas, ratones, vinos, llantos y risas. Mujeres talentosas, sumamente capaces e inteligentes que me enseñaron, cada una en su momento, lo que era trabajar por un bien común y divertirse en el proceso. Ingrid, muchas gracias por ser la primera que estuvo conmigo, ayudando a abrirme camino en este mundo, compartiéndome tus conocimientos y dedicándome tu tiempo en los inicios. No sabes lo importante que fue tu mano en ese instante, muchas gracias por dar conmigo esos primeros pasos y los siguientes. Fiona, ¡hay tanto que podría decirte! Quiero agradecerte por tus innumerables ayudas académicas y laborales, pero por sobre todo, por ser ese apoyo interminable en instantes que sólo había oscuridad. Muchas gracias por haber hecho de tu hombro, corazón y razón un hogar para mí, cuando yo no conocía ese concepto. Fue todo un honor poder conocerte en plenitud y completa sinceridad. Laia, no creí que existieran personas tan buenas como tú; de hecho, soy yo la honrada por tenerte como compañera de trabajo. Sin ti, estos últimos 2 años de mi vida en la URV no habrían sido lo mismo. Tú significas apoyo extremo y empuje... todo eso y más. Nunca dejo de aprender de ti y siempre admiro cada paso que das. Por cada minuto de estos años ¡muchas gracias!

A cada una de las personas que han pasado por el laboratorio y que han aportado con sus ganas y vida. Jordi, nos has entregado energía, sonrisas y conocimientos. Muchas gracias por haberte integrado a este grupo de mujeres. Gracias a Jenny, Phoebe, Josep Albert e Ylenia por su paso reconfortante por este laboratorio y ayudar siempre cuando fue necesario. También a ti Cristian, por ayudarme con el Ethovision y salvarme la tesis doctoral... nunca te dejaré de agradecer ese minuto de tu vida que para mí fue casi la mitad de este escrito.

Gracias también al personal del estabulario, Juan y Esperanza por cuidar de nuestros animalitos con tanta dedicación. Especiales agradecimientos a Amparo por darme una mano en uno de los momentos críticos de mi vida Reusense. Y como no, al personal del departamento de Psicología, Joan, Esther y Toni que siempre están cuando se les necesita con tremenda disposición.

Sin lugar a dudas que vivir en tierras catalanas me ha entregado experiencias que quizá nunca podría haber contado, si el destino hubiera sido otro. Cada una de las personitas con las que he compartido estos últimos años ha sido pieza fundamental en este capítulo. Especialmente aquellos que pertenecen a la URV y que día a día me abrazaron con su inmenso cariño.

Cintia, Nohora, Laia, Simona y Lucia. Agradezco cada día por haberlas encontrado. Mujeres increíbles, enteras, fuertes y dulces a la vez. Existe un mundo de diferencia desde la aparición de ustedes en mi vida. Cintia, eres mi ángel y el corazón más bondadoso que jamás había conocido. Gracias por darme tu vida y seguir entregándome tu apoyo infinito. Nohorita ¡qué amor eres! ¿Qué haría yo sin ti? ¿Sin tu enorme alma y fortaleza eterna? Eres de esas mujeres que admiro y el honor siempre será mío por compartir cada día cerquita tuyo. A ambas, muchas gracias por creer en mí cuando nadie lo hizo, levantarme y enseñarme que el mundo es más bello de lo que yo pensaba. Laia, te quiero muchísimo, y demás está decirte que aparte de ser mi compañera y mi equipo, eres mi amiga y una de las mejores que se puede tener. Simona y Lucia, gracias por darme un espacio en sus vidas. Me siento tan en casa a su lado que me llenan con su sola presencia. Para mí ustedes son pura vida y libertad. Agradecida estoy por cada minuto que vivimos juntas. Las quiero millones y más.

Pablo, tú eres mi especial. Sin ti no habría sobrevivido a muchos momentos. Te quiero muchísimo. De hecho, no existe día en que no vibre estando a tu lado ¡gracias por todo!

Nuria, gracias por todos los momentos compartidos y esos abrazos que construyen. Y a ti Aida, mi negra bella, gracias por aparecer en mi vida.

Muchas gracias también al resto del grupo random, por cada birra, alegría celebrada y apoyo entregado, Tere, Iván, Pol, José, Gemma, Laura, Erica, Anna, Victor, Jesús y en especial a Fadua, por haber sido una excelente compañera de casa, apoyarme cuando más lo necesité y abrazarme como sólo una hermana podría hacerlo.

Cómo no mencionar también a Claudia, Javo y María. Muchas gracias a cada uno por acompañarme en los primeros días de mi vida Reusense. Siempre están presentes en los buenos recuerdos de esos días. Al grupo de Barcelona, Ricardo, Roland, Luis, Maybell y Patri, por esas noches, esas risas, esas músicas, esas conversaciones y ese cariño que siempre me han entregado. Y a ti Roberto, muchísimas gracias por haber aparecido en Barcelona, trayendo sabor de hogar y nuevos aires a mi vida ¡no sabes cuánto te quiero!

Pero sin duda, a la persona que le debo seguir estando entera, después de todo esto, es a ti. Juan, muchas gracias por aparecer en mi vida y confiar en que lo mejor para ambos era caminar juntos construyendo un presente. No sabes todo lo que ha significado el que tú hayas estado a mi lado todo este tiempo, compartiendo lo duro de este último tramo. Gracias por sostenerme, darme abrigo, creer en mí, hacerme sonreír y dejarte abrazar todas las noches. Para mí es un honor poder vivir tu empuje, grandeza, bondad, fortaleza y humildad diariamente. De hecho, cada uno de esos atributos ha contribuido para que este trabajo salga a flote. Te amo muchísimo.

Hace casi 5 años lo dejé todo en Chile, viniéndome con una maleta llena de expectativas y ansiedades a España. Después de todo, la gente que está detrás de mí es ésa, la chilena, la que nunca ha dejado de confiar en mí y creer que esta locura era necesaria.

En primer lugar, darles las gracias a mis hermanas Paula, Paulina, Joceline y Camila. Podría estar eternamente diciéndoles lo importantes que son para mí. Ustedes son el soporte, el hogar, el amor y la familia. Esa mano pese a las distancias y a las horas de diferencia. Gran parte de

este camino fue gracias a la fraternidad eterna que ustedes cuatro me brindan. Gracias por todo. Los amo muchísimo.

Sandra ¡ay amor! ¡Cuánto extraño cada uno de tus abrazos y tus palabras! Sin embargo, he podido sentir tu apoyo incondicional, diariamente. Tú fuiste una de esas personas que me empujó a decidir y no sabes lo agradecida que estoy por eso. Te adoro.

Especiales agradecimientos a Miguel, Gonzalo, Pame, Diego, Paula, Vivian y Marcela. Muchas gracias por darme su amistad a la distancia y haber estado en momentos claves de estos últimos años ¡los quiero mucho!

Naza, prima. Gracias por valorarme a pesar de todo y por tus ánimos infinitos. Y tío José, he estado siempre agradecida por su eterna preocupación para conmigo.

Finalmente, y no menos importantes, no puedo dejar de lado a esas dos personitas que fueron las últimas que se despidieron de mí, después de una locura de cambios de casa, visados, billetes de avión y contratiempos. Papá, sin tus sabios consejos no hubiera podido llegar a cumplir ninguna de mis metas. Tus retos personales, tu responsabilidad, practicidad, calma, empuje y fortaleza son para mí una base para construir mi futuro. Muchas gracias por haberte querido dar conmigo una segunda oportunidad. Mamá, me dejaste volar y aquí me encuentro, a más de 11000 km de ti, escribiéndote. Eso te lo agradeceré toda mi vida. Eres el motor de mis decisiones y el apoyo constante aunque las circunstancias fuesen adversas. Muchas gracias por dármelo todo, tus alegrías, tiempos, errores y bellezas. A ambos, millones de gracias. Nunca han dejado de estar presentes. Los amo y amaré eternamente.

*...Y en un pequeño instante, dejó de ser de noche.
¡Gracias a todos!*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

Resumen

Uno de los insecticidas más utilizados en el mundo es el organofosforado clorpirifós (CPF). Su uso masivo provoca que una gran parte de la población esté en constante exposición. De hecho, diversas investigaciones han evidenciado los efectos perjudiciales derivados de exposiciones a bajas dosis de CPF en edades tempranas y adultas. Sin embargo, las variaciones genéticas dentro de una población pueden alterar en gran medida los efectos de algunos agentes químicos, contribuyendo al desarrollo de diferentes niveles de susceptibilidad entre individuos. Las dos isoformas más frecuentes de la apolipoproteína E (apoE) humana han demostrado afectar diferencialmente procesos neurobiológicos y metabólicos. En este sentido, es sabido que el genotipo apoE presenta interacciones específicas con factores medioambientales. El objetivo principal de esta tesis doctoral fue estudiar la influencia del genotipo apoE sobre los cambios físicos, conductuales y bioquímicos provocados por una exposición postnatal a CPF a corto, medio y largo plazo, valorando además la respuesta a una re-exposición posterior en sujetos adultos. Se utilizaron ratones transgénicos homocigotos para los alelos $\epsilon 3$ o $\epsilon 4$ del gen APOE humano de ambos sexos, exponiéndolos a 0 ó 1 mg/kg/día de CPF desde el día 10 a 15 postnatal, y a una re-exposición de 0 ó 2 mg/kg/día desde el quinto a séptimo mes, valorándose en el periodo de lactancia: el desarrollo postnatal y la expresión génica de enzimas de detoxificación de CPF en hígado y componentes del sistema colinérgico en cerebro; y evaluándose en edad adulta: la socialización y preferencia por la novedad social, el aprendizaje y memoria espacial, la glicemia y la ingesta de comida. Además, se evaluó el peso corporal a lo largo de los 7 meses, y la actividad colinesterasa plasmática y cerebral después de cada exposición. En general, los sujetos apoE3 y apoE4 presentaron diferencias a todos los niveles estudiados desde el nacimiento. La exposición postnatal a CPF provocó un retraso en la apertura de ojos y un deterioro en el desarrollo neuromotor. En tanto, la exposición en edad adulta causó un aumento en la ingesta de comida, en todos los individuos. No obstante, la mayoría de efectos causados por ambas exposiciones a CPF variaron según el genotipo apoE y el sexo. Así, CPF en edad temprana modificó la expresión génica de determinados marcadores hepáticos y del sistema colinérgico en los sujetos apoE3 a corto plazo. A largo plazo, esta exposición causó alteraciones sobre los comportamientos sociales en

los machos apoE3 y el aprendizaje en las hembras apoE4; asimismo, desencadenó distintos cambios sobre el peso corporal en los machos de ambos genotipos, desde el tercer mes de vida. CPF en edad adulta afectó la glicemia, el aprendizaje, la memoria y la actividad colinesterasa cerebral en sujetos apoE4, en función del sexo. En determinados casos, en machos apoE3 se observó que la re-exposición a CPF en edad adulta revierte los efectos provocados por la exposición postnatal. En conjunto, estos resultados demuestran que el genotipo apoE contribuye en la manifestación de diversos efectos derivados de la exposición a CPF, existiendo una diferencia significativa entre las consecuencias de una exposición en periodo postnatal y en edad adulta. En este sentido, la exposición en edad temprana repercutió en mayor medida a los sujetos apoE3, mientras que las consecuencias inmediatas de la exposición en edad adulta fueron más evidente en los apoE4. De este modo, esta tesis doctoral pone en evidencia nuevos datos acerca de la vulnerabilidad presente en cada subpoblación hacia este insecticida.

Palabras clave: clorpirifós, apolipoproteína E, desarrollo, paraoxonasas, colinesterasa, sistema colinérgico, peso corporal, comportamiento, conductas sociales, aprendizaje y memoria.

Abreviaturas

5-HT: Serotonina

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

AChE-R: Isoforma R de la acetilcolinesterasa

AChE-S: Isoforma S de la acetilcolinesterasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ApoE: Apolipoproteína E

ANOVA: Análisis de la varianza

ARN: Ácido ribonucleico

BChE: Butirilcolinesterasa

BDE-209: Decabromodifenil éter

ChAT: Colinacetiltransferasa

ChE: Colinesterasa

CPF: Clorpirifós

CPO: Clorpirifós-oxón

CYP450: Citocromo P450

Ct: Ciclo umbral

DEP: Dietilfosfato

DEPC: Dietil pirocarbonato

Dietiltiofosfato: DETP

DL₅₀: Dosis letal 50

DPN: Día postnatal

DTNB: Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)

EA: Enfermedad de Alzheimer

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EE.UU.: Estados Unidos de América

EPA: Agencia de Protección Ambiental de EE.UU.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HC-3: *Hemicholinium-3*

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

LDLR: Receptores de lipoproteínas de baja densidad

mAChRs: Receptores muscarínicos

MANOVA: Análisis multivariado de la varianza

MWM: Laberinto acuático de Morris

nAChRs: Receptores nicotínicos

OP: Organofosforado

PCR: *Polymerase chain reaction*

PON1: Paraoxonasa-1

PON2: Paraoxonasa-2

PON3: Paraoxonasa-3

qPCR: PCR en tiempo real (*quantitative polymerase chain reaction*)

RIN: Número de Integridad de ARN

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple

TCPy: 3,5,6-tricloro-2-piridinol

TDAH: Trastorno por déficit de atención e hiperactividad

TEA: Trastorno espectro autista

TG: Triglicéridos

UE: Unión Europea

VACHT: Transportador vesicular de acetilcolina

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

Contenidos

Capítulo I. Introducción	27
1. Clorpirifós	29
1.1. Contexto general	29
1.2. Estructura y propiedades fisicoquímicas	31
1.3. Vías de exposición	33
1.4. Absorción, distribución, metabolismo y excreción	34
1.4.1. Enzimas de detoxificación	36
1.5. Principales dianas y mecanismos de acción	38
1.5.1. Sistema colinérgico	39
1.5.2. Otras dianas para clorpirifós	40
2. Clorpirifós y desarrollo	42
2.1. Vulnerabilidad durante el desarrollo en los sistemas de detoxificación	42
2.2. La importancia del sistema colinérgico en el desarrollo	43
2.2.1. Efectos de las exposiciones tempranas a clorpirifós sobre el sistema colinérgico	45
2.3. Evidencia de los efectos a largo plazo de las exposiciones tempranas	46
3. Clorpirifós y vida adulta	49
3.1. Evidencia de exposiciones en adultos	49
3.2. Exposiciones tempranas y re-exposiciones	51
4. La conducta como diana	53
4.1. Aprendizaje y memoria espacial	54
4.2. Emoción y conductas sociales	55
5. Modelos animales de vulnerabilidad: isoformas humanas de apoE en los déficits cognitivos y metabólicos	57
5.1. Apolipoproteína apoE	57
5.1.1. Estructura, polimorfismos y funciones	57
5.1.2. Funcionamiento cognitivo y conducta asociada	60
5.2 Modelos animales transgénicos	63
5.2.1. Influencia de apoE en el desarrollo	63
5.2.2. Interacciones genotipo apoE – factores medioambientales	65
Capítulo II. Planteamiento y Objetivos	67
1. Planteamiento	69
2. Objetivos	69
2.1. Objetivo general	69
2.2. Objetivos específicos	69

Capítulo III. Metodología General	71
1. Animales	73
2. Compuesto químico	73
3. Tratamientos	74
4. Grupos de experimentación	74
5. Planificación experimental	76
5.1. Fase experimental I: efectos en el desarrollo	76
5.2. Fase experimental II: efectos en la edad adulta	76
6. Evaluación física a corto y a largo plazo	77
6.1. Peso corporal	77
6.2. Apertura de ojos	77
6.3. Desarrollo sexual	78
6.4. Evaluación neuromotora	78
7. Valoración conductual	78
7.1. Tres compartimentos de Crawley	79
7.1.1. Aparato y materiales	79
7.1.2. Procedimiento	80
7.1.3. Parámetros analizados	81
7.2. Laberinto de Barnes	81
7.2.1. Aparato y materiales	82
7.2.2. Procedimiento	82
7.2.3. Parámetros analizados	83
8. Sacrificio de los animales y preparación de muestras	85
8.1. Procedimiento en crías	85
8.2. Procedimiento en adultos	86
9. Determinaciones bioquímicas	86
9.1. Determinación de la actividad ChE	86
9.1.1. ChE cerebral	86
9.1.2. Cuantificación de proteínas	88
9.1.3. ChE plasmática	88
9.2. Análisis de expresión génica	88
9.2.1. Extracción del ARN	89
9.2.2. Evaluación de la cantidad y calidad del ARN	90
9.2.3. Retrotranscripción de ARN a ADNc	91
9.2.4. Secuencia y concentración de <i>primers</i>	92
9.2.5. qPCR	92
10. Análisis estadístico	93

Capítulo IV. Fase Experimental I: Efectos en el periodo postnatal	95
1. Resultados	97
2. Discusión	118
Capítulo V. Fase Experimental II: Efectos en la edad adulta	131
1. Resultados	133
2. Discusión	162
Capítulo VI. Discusión General	181
1. Discusión general	183
2. Limitaciones y futuras direcciones	189
Capítulo VII. Conclusiones	193
Bibliografía	197

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

Figuras

Figura 1: Estructura química general de los plaguicidas OPs	30
Figura 2: Metabolismo de CPF y CPO	36
Figura 3: Representación esquemática de la sinapsis colinérgica	41
Figura 4: Modelo estructural de la apoE humana	58
Figura 5: Grupos de tratamiento para cada genotipo	75
Figura 6: Diagrama de materiales y sujetos empleados en la prueba tres compartimentos de Crawley	79
Figura 7: Fotografías representativas de las 3 fases experimentales de la prueba tres compartimentos de Crawley	80
Figura 8: Diagrama de materiales empleados en el laberinto de Barnes	82
Figura 9: Diagrama de procedimiento del laberinto de Barnes	84
Figura 10: Esquema de la fase experimental I dentro de la línea de tiempo de la investigación	97
Figura 11: Peso corporal de las camadas	99
Figura 12: Incremento de peso corporal	99
Figura 13: Apertura de ojos	100
Figura 14: Desarrollo sexual	101
Figura 15: Evaluación neuromotora	102
Figura 16: Expresión relativa de la apoE humana (apoE-H) en hígado	104
Figura 17: Expresión relativa de la butirilcolinesterasa (BChE) en hígado	105
Figura 18: Expresión relativa de la paraoxonasa-1 -2 -3 (PON1, PON2, PON3) en hígado	106
Figura 19: Expresión relativa de la colinacetyltransferasa (ChAT) y del transportador vesicular de acetilcolina (VChT) en cerebro	109
Figura 20: Expresión relativa de los receptores muscarínicos M2, M3 y M5 en cerebro	111
Figura 21: Expresión relativa del receptor muscarínico M1, M4 y la isoforma S de la acetilcolinesterasa (AChE-S) en cerebro	112
Figura 22: Expresión relativa de la isoforma R de la acetilcolinesterasa (AChE-R) en cerebro	113
Figura 23: Actividad de la enzima colinesterasa (ChE) plasmática	114
Figura 24: Actividad de la enzima colinesterasa (ChE) cerebral	115
Figura 25: Peso corporal de las camadas desde el primer a quinto mes de vida	116
Figura 26: Peso corporal de las camadas desde el primer a quinto mes de vida, en función de la edad, el sexo y el genotipo	117
Figura 27: Esquema de la fase experimental II dentro de la línea de tiempo de la investigación	133
Figura 28: Peso corporal de las camadas desde el quinto a séptimo mes de vida	135
Figura 29: Efectos generales del sexo y genotipo sobre el incremento de peso corporal de 8 semanas, desde el quinto a séptimo mes de vida	136
Figura 30: Incremento de peso corporal de 8 semanas, desde el quinto a séptimo mes de vida	137

Figura 31: Ingesta de comida de 8 semanas, desde el quinto a séptimo mes de vida	138
Figura 32: Número de entradas a los compartimentos laterales en la habituación de la prueba de tres compartimentos de Crawley	141
Figura 33: Actividad en la fase de socialización de la prueba de tres compartimentos de Crawley	142
Figura 34: Tiempo en el compartimento social y no social en la fase de socialización de la prueba de tres compartimentos de Crawley	143
Figura 35: Exploración social en la prueba de tres compartimentos de Crawley	144
Figura 36: Actividad en la fase de preferencia por la novedad de la prueba de tres compartimentos de Crawley	145
Figura 37: Tiempo en el compartimento de la novedad y de lo conocido en la fase de preferencia por la novedad, de la prueba de tres compartimentos de Crawley	147
Figura 38: Exploración de la novedad en la prueba de tres compartimentos de Crawley	147
Figura 39: Efecto general del genotipo y de los tratamientos sobre la distancia total recorrida en la fase de habituación del laberinto de Barnes	149
Figura 40: Distancia total recorrida en fracciones de tiempo en la fase de habituación del laberinto de Barnes en machos y hembras	149
Figura 41: Distancia recorrida en el centro la fase de habituación del laberinto de Barnes	151
Figura 42: Tiempo de permanencia en el centro en la fase de habituación del laberinto de Barnes	151
Figura 43: Velocidad en el centro, en la fase de habituación del laberinto de Barnes	152
Figura 44: Distancia total recorrida en las 9 sesiones de adquisición de la prueba del laberinto de Barnes	153
Figura 45: Tiempo total en las 9 sesiones de adquisición de la prueba del laberinto de Barnes	155
Figura 46: Uso de la estrategia de búsqueda aleatoria, serial y espacial, en la primera y novena sesión de adquisición de la prueba del laberinto de Barnes, en función del genotipo y el sexo	156
Figura 47: Uso de la estrategia de búsqueda aleatoria y serial, en la primera y novena sesión de adquisición de la prueba del laberinto de Barnes, en función del tratamiento	157
Figura 48: Uso de la estrategia de búsqueda espacial, en la primera y novena sesión de adquisición de la prueba del laberinto de Barnes, en función del tratamiento	158
Figura 49: Esquema del cuadrante objetivo y el agujero objetivo y tiempo en el cuadrante objetivo en la fase de retención de la prueba del laberinto de Barnes	159
Figura 50: Exploración del agujero objetivo de la fase de retención de la prueba del laberinto de Barnes	160
Figura 51: Actividad de la enzima colinesterasa (ChE) en plasma, corteza frontal y núcleo estriado	161

Tablas

Tabla 1: Principales propiedades fisicoquímicas de clorpirifós	32
Tabla 2: Protocolo de puntuación de los parámetros físicos evaluados en las crías	78
Tabla 3: Parámetros evaluados en la prueba tres compartimentos de Crawley	81
Tabla 4: Parámetros evaluados en el laberinto de Barnes	84
Tabla 5: Listado de genes evaluados en hígado con secuencia de <i>primer</i> utilizado	89
Tabla 6: Listado de genes evaluados en cerebro con secuencia de <i>primer</i> utilizado	91
Tabla 7: Características post-parto de las camadas monitorizadas	98
Tabla 8: Valores de expresión relativa de diferentes genes en hígado, presentados por edad, sexo, genotipo y tratamiento postnatal	105
Tabla 9: Valores de expresión relativa de diferentes genes en cerebro, presentados por edad, sexo, genotipo y tratamiento	110
Tabla 10: Glicemias de ambos sexos y genotipos	139
Tabla 11: Glicemias de cada grupo de tratamiento	139

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García



Introducción

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

I. Clorpirifós

Las consecuencias de la interacción entre los plaguicidas y los seres vivos se han estudiado en profundidad desde hace más de 20 años, sin embargo la primera voz de alerta fue Rachel Carson en su libro “La Primavera Silenciosa” del año 1962, donde expone una poderosa pregunta *¿quién puede creer que se pueda verter sobre la superficie de la tierra semejante diluvio de venenos sin hacer que enferme toda forma de vida?* (Casida and Quistad, 1998). Por consecuencia de diferentes movimientos y bajo la necesidad de verificar el nexo entre los beneficios aportados y los perjuicios adquiridos, tanto para el ecosistema y la biodiversidad, como para las posibles consecuencias en la salud humana, se crearon agencias reguladoras a mediados de los años 70. Asimismo, han habido muchos esfuerzos desde entonces para acotar los usos de los plaguicidas y poder minimizar los riesgos asociados (Eaton et al., 2008). Sin embargo, la evidencia sugiere que flora y fauna siguen estando amenazadas por una gran cantidad de ellos (Saunders et al., 2012). Hasta la fecha, se ha establecido que la población de mayor vulnerabilidad para los efectos neurotóxicos, provocados por estos agentes, son los niños; sin embargo, los trabajadores que los manejan diariamente, son el grupo que se enfrenta a una mayor posibilidad de sufrir re-exposiciones continuas (Guardino et al., 1998).

1.1. Contexto general

En el año 1942, la incorporación del insecticida organoclorado llamado dicloro-difenil-tricloroetano o DDT a los campos agrícolas, daría paso a la llamada “era dorada de los plaguicidas” (Casida and Quistad, 1998). En este periodo, se crearon diversas sustancias utilizadas como herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas, rodenticidas y fumigantes, siendo todas estas una herramienta fundamental para la actividad agraria.

Particularmente, una gran familia de plaguicidas la componen los compuestos orgánicos organofosforados (OPs), siendo más de 200 derivados ésteres, amidas o tioles obtenidos del ácido fosfónico y ácido fosfórico (Figura 1) (Jett and Richardson, 2009). A mitades del 1800 se sintetizó el primer OP, el tetraetil pirofosfato (TEPP), pero no fue hasta el 1937 cuando el químico alemán Gerhard Schrader descubrió la propiedad insecticida de estos compuestos (Soltaninejad and Shadnia, 2014). Más adelante, los agentes OPs

demonstraron ser menos persistentes en el ambiente que los organoclorados y también, altamente eficaces. Estas características junto a las restricciones sobre el uso de la mayoría de los insecticidas organoclorados persistentes, impuestas en la década del 70', contribuyeron a que los OPs fuesen los plaguicidas de elección, provocando su uso masivo (Pope, 1999). Importante mencionar que, además de este fin, los OPs han sido utilizados como agentes terapéuticos, plastificantes, lubricantes, retardantes de llama, aditivos para combustibles y armas de guerra (ver revisión de Ehrich, 1998).

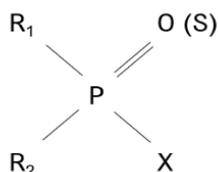


Figura 1. Estructura química general de los plaguicidas OPs. X es el residuo acilo, pudiendo ser un haluro, cianuro, tiocianato, fenoxi u otra estructura aromática. R₁ y R₂ son radicales orgánicos como alquilo, alcoxi, alquiltio o grupo amida. Un oxígeno o un átomo de azufre pueden unirse con un enlace doble al fósforo. Adaptado de Costa, 2006.

Los OPs tienen un mecanismo de toxicidad en común, la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en el sistema nervioso central (SNC) y periférico. No obstante, se han descrito numerosas dianas adicionales para los OPs como otras enzimas, sistemas de neurotransmisión, factores neurotróficos y moléculas específicas de algunas vías de señalización celular (ver revisiones de Casida and Quistad, 2004; Pope, 1999; Terry, 2012). A su vez, estos insecticidas presentan una selectividad relativamente baja, llegando a ser tóxico para otras especies, incluida la humana (Costa, 2006). En efecto, este grupo de sustancias es responsable de diversos casos de intoxicación en el mundo, siendo parte de accidentes tanto intencionales como no intencionales, especialmente en ambientes laborales (Suratman et al., 2015). Además de las consecuencias por intoxicaciones agudas, se han descrito múltiples trastornos asociados a la exposición crónica de los OPs como déficits cognitivos, fallas motoras y sensoriales, enfermedades neurológicas (ver revisiones de Alavanja et al., 2004; Sánchez-Santed et al., 2016); dificultades respiratorias, alergias, efectos endocrinos y en el sistema inmune (ver revisión de Costa, 2006); trastornos emocionales, depresión y ansiedad (Bayrami et al., 2012; Malekirad et al., 2013; Muñoz-Quezada et al., 2017; Wesseling et al., 2010); y efectos sobre el metabolismo, incidencia de diabetes y aumento de peso (Lee et al.,

2014; Malekirad et al., 2013; Montgomery et al., 2008). También, cabe señalar que un gran número de autores han asociado estos insecticidas a problemas sobre el neurodesarrollo en los niños (ver revisiones de Jurewicz et al. 2013; Muñoz-Quezada et al. 2013; Aguilar-Garduña et al. 2014), evidenciando que estos compuestos efectivamente son neurotóxicos para la población en general.

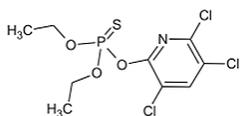
Uno de los OPs más utilizados en el mundo es el clorpirifós (CPF) (Saunders et al., 2012). Este compuesto está registrado como insecticida y acaricida para ser utilizado sobre una gran diversidad de suelos y follajes, incluyendo cultivos de uso alimentario (frutas, cereales, hortalizas, etc.), actividades industriales no alimentarias (césped de campos de golf, césped cultivado en granjas, zonas industriales, invernaderos, viveros y productos de madera), productos para fines residenciales (cebo para cucarachas y tratamientos para hormigueros), y prácticas de salud pública (control aéreo y terrestre de mosquitos) (United States Environmental Protection Agency - EPA, 2014). Su introducción en el mercado fue en el año 1965, pero no fue hasta el 2001 cuando la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA) comenzó a restringir algunos usos, específicamente los de índole doméstica por su gran potencial neurotóxico. Sin embargo, en la UE hasta hace algunos años continuaban las discusiones entre organizaciones y estamentos gubernamentales sobre la prohibición para ciertos fines, al basarse en que faltaban pruebas concluyentes sobre la aparente toxicidad de CPF (Saunders et al., 2012). Igualmente, dentro de estos últimos años la EPA ha contabilizado cerca de 800 formulaciones que contenían CPF como principio activo, siendo las marcas más conocidas Dursban y Lorsban, disponible en preparaciones fluidas y granulares comercializadas por Dow AgroSciences (United States Environmental Protection Agency - EPA, 2014). Esta empresa, la mayor fabricante de CPF en los EE.UU. y la UE, comenzó en el año 2006 a retirar progresivamente las recomendaciones de uso fuera de la industria agrícola, pero otros productores de CPF han podido mantener su utilización doméstica en otros países (European Food Safety Authority - EFSA, 2015).

1.2. Estructura y propiedades fisicoquímicas

CPF (O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotionato) es un sólido blanco, cristalino, con un ligero olor mercaptánico, soluble en un gran número de solventes

orgánicos (acetona, xileno y cloruro de metileno, entre otros) y prácticamente insoluble en agua (Tabla 1). Es estable en soluciones acuosas ácidas y neutras, sin embargo es inestable a medida que aumenta el pH del medio. Posee un átomo central de fósforo pentavalente y tetracoordinado, con un enlace covalente unido a un átomo de azufre. Este fósforo presenta unión con dos grupos etilos más estables. Un átomo de oxígeno une a la molécula con una compleja estructura aromática inestable, la que se libera fácilmente durante el proceso de biotransformación (United States Environmental Protection Agency - EPA, 2014).

Tabla 1. Principales propiedades fisicoquímicas de clorpirifós

Estructura molecular	
	
Estructura empírica	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Nombre IUPAC	O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotionato
Número CAS	2921-88-2
Peso molecular	350,57 g/mol
Densidad (a 43,5°C)	1,398 g/cm ³
Presión de vapor (a 20-25°C)	1,87x10 ⁻⁵ mmHg
Punto de fusión	41,5 - 43,0 °C
Punto de ebullición	Descomposición a 160°C
Coefficiente de reparto octanol:agua	4,82
Solubilidad en agua (a 20 °C)	0,7 mg/L
Solubilidad en agua (a 25 °C)	2,0 mg/L
Solubilidad en isooctano	79% p/p
Solubilidad en metanol	43% p/p

Adaptado de National Center for Biotechnology Information, 2017.

Por otra parte, CPF tiene una persistencia corta a moderada en el medio ambiente como resultado de variados mecanismos de degradación, incluyendo la volatilización, fotólisis, hidrólisis abiótica y biodegradación mediada por algunas bacterias (Solomon et al., 2014). No obstante, estudios recientes revelan que residuos de CPF se pueden encontrar tanto en áreas rurales como urbanas (Ccanccapa et al., 2016; Page et al., 2014), detectándose también en aire, lluvia y nieve, lo que indicaría su potencial para ser transportado a grandes distancias (Mackay et al., 2014). Además, CPF se une rápidamente a plantas y suelos, con una vida media que varía de 6 h a 3 días. Por este motivo, se recomienda

que se evite su liberación masiva al medioambiente (Eaton et al., 2008; United States Environmental Protection Agency - EPA, 2014). Este insecticida se considera tóxico por ingestión, sin embargo puede ingresar al organismo por otras vías, como la inhalatoria o la dérmica (European Chemicals Agency - ECHA 2008). La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a CPF dentro de los compuestos moderadamente peligrosos, clase II, con una DL₅₀ en ratas de 135 mg/kg (World Health Organization - WHO, 2009).

1.3. Vías de exposición

A lo largo de los últimos 50 años, numerosos estudios han evaluado las potenciales vías de exposición a CPF (Eaton et al., 2008). Si bien, no cabe duda que los trabajadores agrícolas y sus familias son la población de mayor riesgo a la exposición de este insecticida y otros OPs (Suratman et al., 2015), no deja de ser preocupante que fuera de zonas principalmente agrícolas, también se presenten efectos de exposición (Muñoz-Quezada et al., 2017).

Durante muchos años, la absorción por vía inhalatoria se consideró una importante ruta de exposición para la población general, ya que CPF se encontraba disponible para el control de insectos a nivel residencial (Eaton et al., 2008). Aunque ya no es un problema relevante en países desarrollados como EE.UU. y algunos de la UE, todavía en España, algunas de las 40 marcas comerciales de este insecticida poseen la autorización para ser utilizadas en jardinería exterior doméstica hasta el año 2018 (Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, 2017).

Por otro lado, las características de CPF y su uso conducen a su dispersión atmosférica y acumulación en el suelo, el agua y en los alimentos, provocando que fuera de los ámbitos laborales la población también se vea expuesta (Saunders et al., 2012). Asimismo, la exposición alimenticia está siendo considerada la principal fuente de exposición no ocupacional (de Gavelle et al., 2016; Fang et al., 2015). En los años 90, el Consejo Nacional de Investigación de EE.UU. (NRC) declaró que *"la ingesta por vía alimenticia representa la principal fuente de exposición a plaguicidas para lactantes y niños"* (National Research Council - NCR, 1993). Asimismo, se considera que la dieta es la fuente más importante de exposición a CPF para este grupo, estimándose una dosis

consumida de 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ en niños (Eaton et al., 2008). Esta exposición puede surgir de los residuos de CPF en las frutas y vegetales que se consumen en una ingesta normal de comida, pero igualmente del agua, de la leche y sus productos derivados (Saunders et al., 2012). También se debe tener presente que, en el periodo pre y postnatal, la madre vehiculiza en parte la exposición a este insecticida, mediante la vía placentaria y su propia leche (Li et al., 2012). En este sentido, estudios con animales han concluido que el estrés oxidativo y las alteraciones bioquímicas e histopatológicas en lactantes, pueden deberse a la transferencia de CPF desde la leche materna (Mansour and Mossa, 2010).

1.4. Absorción, distribución, metabolismo y excreción

El perfil farmacocinético de CPF ha sido extensamente analizado en sistemas *in vitro*, modelos animales *in vivo* y seres humanos (Nolan et al., 1984; Smith et al., 2014; Timchalk et al., 2002).

Por vía oral, CPF se absorbe bien en el intestino, con una biodisponibilidad de un 70% en humanos, aunque las propiedades fisicoquímicas de la formulación mediarían el grado de absorción del compuesto (Nolan et al., 1984). Por vía inhalatoria, CPF es bien absorbido (Geer et al., 2004), sin embargo no existen mediciones directas de biodisponibilidad por esta vía (Eaton et al., 2008). No obstante, en accidentes, donde la exposición por esta ruta ha sido alta, los síntomas de intoxicación (confusión, dolor de cabeza, náuseas, vómitos y mareos), han ocurrido en un tiempo inferior a 1 hora, lo que indica la rápida absorción del insecticida (Cochran, 2002). En humanos se sabe que la absorción dérmica no es más de un 5% (Griffin et al., 1999; Meuling et al., 2005; Nolan et al., 1984) y depende de la formulación comercial. En ratas, esta vía ha demostrado producir inhibición de la actividad colinesterasa (ChE) (Latuszyńska et al., 2001).

Por otra parte, la elevada lipofilidad de CPF permite que su distribución y acumulación sea principalmente en tejidos con alto contenido en grasa. Así, el coeficiente de partición grasa/sangre es de 435:1 y el de cerebro/sangre es de 33:1, superando a las presentadas por el hígado y riñón (Eaton et al., 2008). CPF también se une un 99-98% a diversas

proteínas, como por ejemplo la albúmina plasmática (Tarhoni et al., 2008). Estudios epidemiológicos han encontrado una alta correlación entre CPF en sangre materna y CPF en cordón umbilical, lo cual indica que este insecticida es capaz de atravesar fácilmente la barrera placentaria (Whyatt et al., 2005).

Cabe señalar que para entender los efectos neurotóxicos de CPF es necesario detenerse en sus vías de biotransformación (Figura 2). Como otros fosforotioatos, CPF se metaboliza por el citocromo P450 (CYP450) y el paso de CPF a CPF-oxón (CPO) se produce por la reacción de desulfuración oxidativa, originando un enlace P-O, que lo convierte en un potente inhibidor de la ChE (Sultatos et al., 1982). La detoxificación del oxón la realizan otra serie de enzimas, como la enzima paraoxonasa-I (PON1), que cataliza su hidrólisis (Costa et al., 1990; Sultatos and Murphy, 1983) y las carboxilesterasas y la butirilcolinesterasa (BChE), que previenen la entrada de CPO al cerebro u otros órganos (Chanda et al., 1997) (ver en detalle en sección 1.4.1.). A su vez, diversas isoformas de la CYP450 catalizan la dearilación de CPF transformándolo a dietilfosfato (DEP), dietiltiofosfato (DETP) y 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCPy). Otros productos de la metabolización de CPF son los productos glutatión conjugados y glucurónidos conjugados (Eaton et al., 2008).

CPF no puede ser detectada en orina, por ser un compuesto rápidamente metabolizado y extremadamente lipofílico (Nolan et al., 1984). Así, gran parte de los metabolitos procedentes de su biotransformación son eliminados por excreción urinaria, siguiendo esta concentración: TCPy > DETP > DEP > glucurónidos conjugados (Eaton et al., 2008). Estudios en exposición por vía oral han demostrado que se pueden encontrar metabolitos en orina 24 h después de dicha exposición, y que DEP y TCPy siguen siendo detectable a las 48 h, teniendo el pico máximo de excreción a las 12 h (Timchalk et al., 2007). En relación a la excreción por vía biliar, se han encontrado tanto los productos glutatión conjugados como glucurónidos conjugados (Eaton et al., 2008). Por otro lado, estudios con humanos han encontrado CPF en muestras de leche en mujeres de la India (Sanghi et al., 2003) y en madres de poblaciones urbanas en California (Weldon et al., 2011). Estudios empíricos también han detectado altos niveles de CPF en leche materna (Mattsson, 2000).

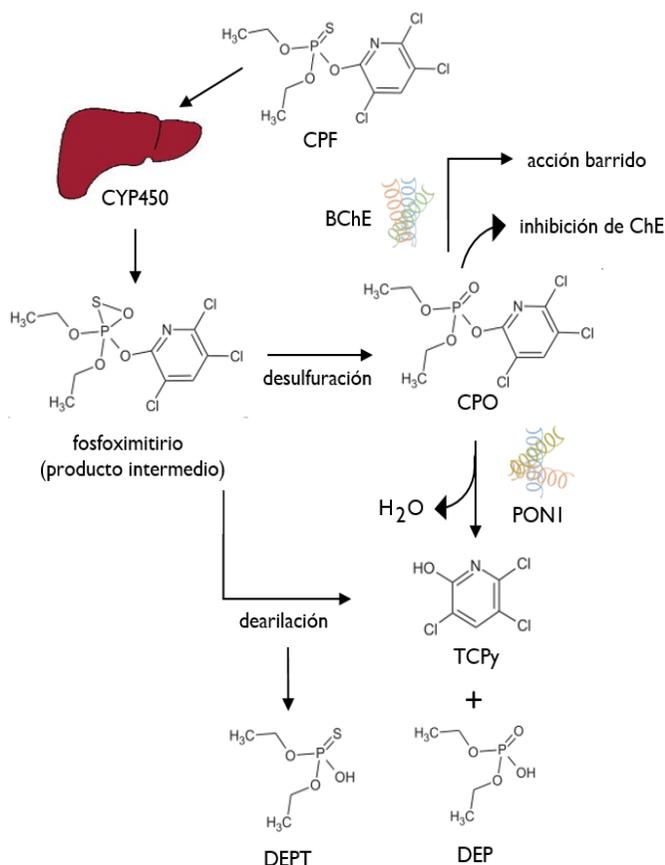


Figura 2. Metabolismo de CPF y CPO. Dentro de la vía de transformación de CPF participa el citocromo P450 (CYP450), el producto intermedio fosfoximitirio, las enzimas butirilcolinesterasa (BChE) y paraoxonasa-1 (PONI) y sus productos finales 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCPy), dietiltiofosfato (DEPT) y dietilfosfato (DEP). Adaptado de Smith et al., 2014.

1.4.1. Enzimas de detoxificación

La BChE pertenece a la familia de las serinas hidrolasas, enzimas que poseen como característica la presencia de una serina en su sitio activo (Lockridge, 2015). El gen *BCHE* se localiza en el brazo largo del cromosoma 3 (3q26.1-26.2). El gen en humanos es polimórfico, con más de 75 variantes genéticas en la población (Lockridge, 2015), sin embargo, no se produce un *splicing* alternativo de la BChE. Así, la BChE tetramérica globular soluble en plasma y las formas ligadas a la membranas de las células musculares y neurales, están codificadas por el mismo gen (Massoulié, 2002). El cuerpo humano posee BChE en la mayoría de los tejidos, no obstante se encuentra en mayor proporción

en plasma e hígado. Igualmente, altos niveles de expresión de BChE están presentes en el hígado, el cual es la principal fuente de la BChE plasmática (Johnson and Moore, 2012). Por otra parte, se ha observado que la actividad BChE es mayor en hombres que en mujeres (Brock and Brock, 1993; Zimmer et al., 2012).

Aunque no se sabe con exactitud el rol principal de BChE en el organismo (Lockridge, 2015), se han descrito diversas funciones en la mayoría de los tejidos. BChE está asociada a la biotransformación de distintas sustancias como la fisostigmina, cocaína, heroína, terbutalina, ácido acetilsalicílico, 2-araquidonoilglicerol y OPs, entre ellos CPF. Para estos últimos, la BChE reacciona rápidamente hasta con dosis sub-tóxicas, siendo un excelente biomarcador de exposición (Lockridge, 2015). También, actúa respaldando la función fisiológica de AChE en la hidrólisis de ACh en situaciones donde ésta se encuentra disminuida (Manoharan et al., 2007). Además, BChE desacila el péptido grelina (De Vriese et al., 2004), el cual es uno de los orexígenos y agentes adipogénicos más potentes conocidos en la fisiopatología mamífera (ver revisión de Giménez and Caixàs, 2004). Altos niveles de grelina acilada en plasma, con una elevada inhibición de la ChE plasmática, se han observado tras un significativo aumento de peso en ratones expuestos a CPF (Peris-Sampedro et al., 2015b). A la vez, se ha demostrado que la sobreexpresión de BChE provoca una disminución de la agresión y el estrés social en ratones, mediante la reducción de los niveles de grelina en el torrente sanguíneo (Brimijoin et al., 2016).

Por otro lado, se han descrito tres enzimas paraoxonasa, la PON1, paraoxonasa-2 (PON2) y paraoxonasa-3 (PON3). Los genes de cada una están agrupados conjuntamente en el brazo largo del cromosoma humano 7 (7q21-22) (Furlong et al., 2016). PON1 se sintetiza principalmente en el hígado y una fracción va hacia el plasma, donde se asocia con lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Costa et al., 2005). Además, está presente en primates y otros mamíferos, pero sólo se han descrito polimorfismos en humanos y conejos (Watson et al., 2001). PON2 se ha detectado en diversos tejidos incluyendo hígado, pulmón, riñón, corazón, páncreas, intestino delgado, músculo, testículos, células endoteliales, células epiteliales traqueales, macrófagos y cerebro, tanto de humano como de ratón (Marsillach et al., 2008). Se sabe que los niveles de PON2 son mayores en hembras que en machos, estas diferencias entre sexos se han

encontrado en ratones, ratas, humanos y primates no humanos (Garrick et al., 2016; Giordano et al., 2013). En tanto, PON3 es sintetizada principalmente por el hígado y, en niveles más bajos, por el riñón. Al igual que PON1, PON3 se encuentra en plasma estrechamente ligado a HDL (Furlong et al., 2016). También se ha identificado en múltiples tejidos de ratón (Marsillach et al., 2008).

Las tres formas modulan la inflamación y el estrés oxidativo en diferente grado. Sin embargo, sólo PON1 hidroliza metabolitos activos de varios OPs, como el paraoxón, diazoxón y CPO (Furlong et al., 2016) con diferente eficiencia catalítica, siendo para CPO 10 veces mayor que para paraoxón (Li et al., 2000). Las variantes alélicas atribuidas a su gen afectan de manera diferente la eficiencia catalítica de la enzima y su nivel de expresión. Así, en base al polimorfismo presentado por la propia PON1, cada individuo tendrá una capacidad distinta de detoxificar CPO (Furlong et al., 2005). Por otra parte, se ha observado, bajo estrés oxidativo, un incremento de la expresión de PON2, como también una disminución de la actividad de PON3 (Rosenblat et al., 2003). Asimismo, un único estudio ha estudiado el efecto de CPF sobre los niveles de PON2, demostrando que aumenta su expresión en el epitelio pigmentario de la retina tras su exposición (Jasna et al., 2014).

1.5. Principales dianas y mecanismos de acción

El mecanismo de acción principal de CPF es inhibir la acción de AChE, mediante la fosforilación del residuo serina localizado en su sitio catalítico. La inhibición es de carácter irreversible, debido a que esta enzima se “envejece”, es decir, pierde uno de los grupos alquilo y la actividad AChE sólo se reestablece por la nueva síntesis de la enzima. Esto trae como consecuencia la acumulación de la acetilcolina (ACh) en los terminales nerviosos, obteniéndose una sobreestimulación en los receptores colinérgicos del sistema nervioso periférico y SNC (Chambers, 1992), dando paso a una regulación decreciente de los receptores, como por ejemplo los receptores muscarínicos (mAChRs) (Li et al., 2012).

Adicionalmente a la inhibición producida en cerebro, espina dorsal y sistema nervioso periférico, CPO se une e inhibe la AChE de los glóbulos rojos y la BChE plasmática (Li

et al., 2012). BChE fue la segunda molécula en identificarse como diana de acción para la familia de los OPs, aunque su sensibilidad varía entre un compuesto y otro (Casida and Quistad, 2004).

1.5.1. Sistema colinérgico

El sistema colinérgico es un conjunto de diversos elementos que modulan la sinapsis colinérgica (Figura 3). En la neurona presináptica, la enzima colinacetyltransferasa (ChAT) es la responsable de catalizar la biosíntesis de la acetilcolina (ACh) a partir de dos precursores: la acetil-coenzima A (acetil-coA) y la colina. Tras su síntesis, ACh es transportada, desde el citoplasma hacia el interior de las vesículas sinápticas, mediante el transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT) (Kandel et al., 2013). Así, pequeños cambios en la expresión de VAcHT pueden generar alteraciones en el almacenaje de ACh en las vesículas y, posteriormente, en la transmisión sináptica (Prado et al., 2013). Por otro lado, cabe mencionar que la ChAT está presente en numerosas células y participa en funciones no-colinérgicas diversas como la homeostasis celular, mitosis, diferenciación celular, organización del citoesqueleto y regulación del sistema inmune (Abreu-Villaça et al., 2011).

Después de la liberación de ACh al espacio sináptico, puede unirse a dos tipos de receptores: los mAChRs y los nicotínicos (nAChRs). Se han descrito cinco mAChRs (M1, M2, M3, M4 y M5), los cuales activan distintas vías de señalización: M2 y M4 reduce los niveles de AMP cíclico, inhibiendo la adenilato ciclasa, a través de la activación de una proteína G inhibidora (Gi); M1, M3 y M5 están involucrados en la formación de 1,4-trisfosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG), activando la fosfolipasa C acoplada a proteína Gq (Kandel et al., 2013). En tanto, nAChRs son canales iónicos activados por ligando, compuestos por combinaciones de subunidades y se pueden clasificar en dos principales: los homoméricos y los heteroméricos, siendo estos últimos los más preponderantes en el cerebro de mamífero (Zoli et al., 1998). Los receptores mAChRs y nAChRs desempeñan un papel en la modulación de la proliferación y supervivencia celular, diferenciación neuronal, formación y maduración de sinapsis, desplazamiento axonal y liberación de neurotransmisores (Abreu-Villaça et al., 2011).

La AChE es una esterasa que hidroliza a la ACh en acetato y colina, regulando la concentración de este neurotransmisor en la sinapsis (Massoulié et al., 1993). Esta enzima se encuentra, en mayor medida, en músculo esquelético y cerebro (Lockridge, 2015). Está codificada por un único gen, localizado en el cromosoma 7 en humanos y 5 en ratones. Por medio de *splicing* alternativo puede generar diferentes isoformas: dimérica (AChE-E), monomérica (AChE-R) y tetramérica (AChE-S), siendo estas dos últimas importantes para el sistema nervioso (Meshorer et al., 2002; Meshorer and Soreq, 2006). AChE-S se asocia con moléculas de anclaje de membrana, que determinan parcialmente la localización sináptica de la proteína (Massoulié et al., 1999). En tanto, la AChE-R es soluble (Soreq and Seidman, 2001). Las formas ancladas representan el 70-90% de la actividad AChE total en el sistema nervioso (Grassi et al., 1982) y el otro 10-30% involucran las formas desancladas (Perrier et al., 2005). Tradicionalmente, las formas ancladas de AChE-S se les ha designado como G4, mientras que AChE-R y AChE-S solubles o desancladas se les conoce como G1 y G2, respectivamente (Zimmerman and Soreq, 2006). Por otra parte, AChE-S es la isoforma más abundante en sujetos sanos (Weinstock and Groner, 2008) y se ha vinculado al rendimiento cognitivo (Das et al., 2005; García-Ayllón et al., 2003). Además, se ha encontrado que, bajo condiciones de estrés, existe una sustitución a largo plazo de la isoforma S a R (Meshorer et al., 2002). A su vez, la expresión de la AChE-R se ha visto incrementada en exposiciones a somán (Perrier et al., 2005), paratión (López-Granero et al., 2014) y CPF (López-Granero et al., 2014, 2013b). Algunos autores han asociado esos incrementos de AChE-R con un posible rol neuroprotector (Meshorer et al., 2002; Schliebs and Arendt, 2011).

1.5.2. Otras dianas para clorpirifós

Se han observado otras dianas y mecanismos asociados a CPF y su forma oxón, como la inhibición de las enzimas encargadas del metabolismo de endocannabinoides, la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Carr et al., 2013; Casida et al., 2008; Liu et al., 2015; Nomura et al., 2008; Noro et al., 2013; Quistad et al., 2001); la inhibición *in vitro* e *in vivo*, por CPF y otros OPs, del receptor CB1 del sistema cannabinoide (Quistad et al., 2002; Ross et al., 1998; Segall et al., 2003); la inhibición a las ATPasas por niveles de micro a milimolar de CPO (Schuh et al., 2002);

la inhibición de la acilpeptido hidrolasa (APH), enzima involucrada en el metabolismo de péptidos (Cardona et al., 2013; Fu et al., 2016; Quistad et al., 2005).

Además, se ha relacionado CPF a la inhibición de la síntesis de ADN en cultivos celulares (Qiao et al., 2001); al incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células PC12 (Barber et al., 2001); a la regulación de la gluconeogénesis hepática, mediada por receptores pre y postsinápticos β -adrenérgicos (Meyer et al., 2005; Seidler and Slotkin, 2011); al incremento de los niveles de ERK1/2, mediado por estrés oxidativo en células de cáncer de mamá (Ventura et al., 2015); y la activación de la CREB (Crumpton et al., 2000).

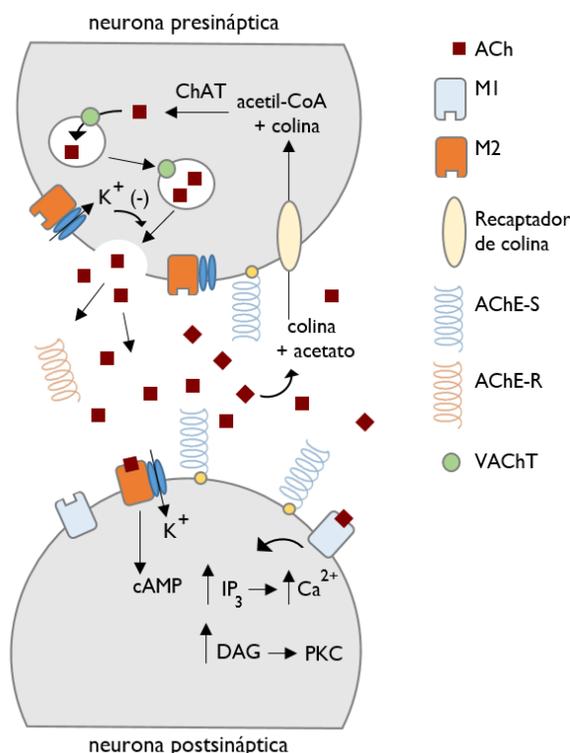


Figura 3. Representación esquemática de la sinapsis colinérgica. En la neurona presináptica, la colinacetiltransferasa (ChAT) cataliza la síntesis de acetilcolina (ACh) a partir de colina y acetil-coenzima A (acetil-CoA). La ACh se empaqueta en las vesículas sinápticas a través de un transportador vesicular de ACh (VChT). ACh se libera al espacio sináptico donde puede unirse a receptores muscarínicos localizados en la membrana presináptica y en la postsináptica. En la neurona postsináptica, los receptores M1 transducen señales a través de la vía del 1,4-trisfosfato de inositol (IP₃), el diacilglicerol (DAG) y una proteína quinasa dependiente de Ca²⁺ (PKC). En el hipocampo, la mayoría de receptores postsinápticos son M1, en la corteza los receptores M2 también se encuentran localizados en la membrana postsináptica. ACh se hidroliza por los tetrámeros AChE-S que están unidos al anclaje de membrana rico en prolina (PRiMA). Los monómeros AChE-R están solubles en el espacio sináptico. *Adaptado de Soreq and Seidman, 2001.*

2. Clorpirifós y desarrollo

La respuesta a una sustancia química dependerá del tamaño corporal, flujo sanguíneo, funciones de órganos y sistema de detoxificación del sujeto expuesto (Timchalk et al., 2007). Además de estas diferencias individuales, un mismo individuo presenta distintas vulnerabilidades a lo largo de su vida. En este sentido, los niños son un grupo especialmente susceptible a los tóxicos medioambientales, debido al alto grado de inmadurez de sus diversos mecanismos de barrera y detoxificación. Cualquier cambio, en el curso normal del desarrollo, podría conllevar efectos adversos sobre su salud (Au, 2002; Grandjean and Landrigan, 2014; Neal-Kluever et al., 2014).

2.1. Vulnerabilidad durante el desarrollo en los sistemas de detoxificación

El inicio, duración y término de las distintas fases del desarrollo son específicos para cada especie. En humanos, la diferenciación celular y organogénesis se produce desde el día 56 de gestación hasta el parto (día 267 aproximadamente). Entre los días 60 y 195 del periodo prenatal, el hígado es el sitio hematopoyético predominante en el cuerpo (Moscovitz and Aleksunes, 2013). El proceso de maduración de este órgano dura hasta los 5 años de edad (Walthall et al., 2005). También, es bien sabido que determinadas enzimas en el periodo perinatal siguen patrones de desarrollo específicos, variando en cada subfamilia e isoforma. Así, estos sistemas de detoxificación no se desarrollan completamente hasta varios años después del nacimiento (Moscovitz and Aleksunes, 2013).

En el año 1975, Benke y Murphy observaron que los neonatos presentaban una marcada sensibilidad al methyl-paratión y paratión, debido a la falta de un sistema metabólico maduro (Benke and Murphy, 1975). Moser et al. (1998) revelaron que el comportamiento de las esterasas hepáticas de ratas lactantes es distinto al de ratas adultas de 70 días de vida, después de una exposición a CPF. A partir de entonces, diversos estudios han demostrado que los animales jóvenes son más susceptibles a los efectos agudos de CPF (Eaton et al., 2008). La DL_{50} de CPF en ratas al día postnatal (DPN) 7 es 10 veces inferior a la de los animales adultos, y la dosis máxima tolerada en

ratas al DPN 10 ha sido estimada en 15 mg/kg, 7 veces por debajo de la estipulada para ratas adultas (Moser and Padilla, 1998).

Por otra parte, estudios epidemiológicos señalan que la actividad de BChE aumenta significativamente desde la semana 28 de gestación, estabilizándose en el primer año de vida, donde alcanza los niveles de un adulto (Ecobichon and Stephens, 1973; Lund Karlsen, 1981). Del mismo modo, en humanos se han detectado niveles bajos de PON1 al nacer, alcanzando una meseta entre los 6 y 15 meses de edad (Cole et al., 2003), presentando los niveles de los adultos a los 9 años (Gonzalez et al., 2012). Dicha meseta, en ratones y ratas, se alcanza entre la segunda y tercera semana de vida, paralelamente con el aumento de su expresión en hígado (Li et al., 1997). En ratones C57BL/6J, se ha observado que la expresión de PON2 y PON3 es mayor a las 3 semanas de edad (Garrick et al., 2016). Asimismo, el nivel de expresión de PON3 es mayor en ratones recién nacidos que en adultos (Shih et al., 2010). En el periodo de desarrollo, una baja actividad de PON1 representa un factor de riesgo relevante para la toxicidad de ciertos insecticidas OPs (Costa et al., 2005; Furlong et al., 2005). Igualmente, cada polimorfismo de PON1 modula, de forma específica, los efectos de CPO sobre el cerebro, después de una exposición postnatal (Marsillach et al., 2016).

2.2. La importancia del sistema colinérgico en el desarrollo

El cerebro presenta diversos cambios a nivel de expresión génica, neurogénesis, formación y maduración de circuitos neuronales, a lo largo de la vida. Durante el desarrollo existen “periodos sensibles”, que se manifiestan por una mayor plasticidad, en los cuales diferentes sistemas neurales son particularmente receptivos a cualquier tipo de evento (Casey et al., 2015). Por ejemplo, durante los 6 primeros meses de vida se concretan cambios importantes como la mejora de la memoria y la desaparición de los reflejos neonatales (Grandjean and Landrigan, 2014).

La actividad colinérgica es una señal importante para el desarrollo cerebral de diversos mamíferos. El momento en el cual ocurre esta activación, en la corteza, es crítico para el desarrollo normal de la estructura cortical y las funciones cognitivas (Berger-Sweeney, 2003).

En el desarrollo, ChAT y VAcHt son reguladas por factores extracelulares como el factor de crecimiento nervioso (Madziar et al., 2008). Los genes de ambas se encuentran organizados en el mismo locus, esto es conocido como el “locus colinérgico” (Holler et al., 1996). En ratones, durante este periodo, se ha observado expresión de la ChAT en el prosencéfalo (Lauder and Schambra, 1999), presentando niveles menores que en edad adulta (Gould et al., 1991) y alcanzando la meseta entre la tercera y cuarta semana de vida (Descarries et al., 2005; Ninomiya et al., 2001).

En tanto, la expresión de los mAChRs M1, M2 y M4, en rata, es predominante en el cerebro adulto. Sin embargo los mAChRs están presentes tanto en el prosencéfalo como en el romboencéfalo, durante los primeros estadios de desarrollo (Levey et al., 1991). Igualmente, existen cambios en la expresión de los receptores durante el periodo postnatal, con un aumento de la expresión en esta etapa, alcanzando la meseta y distribución final en la adolescencia (Rossner et al., 1994, 1993).

Los nAChRs son una de las primeras proteínas que aparecen durante el desarrollo del sistema nervioso. No obstante, sufren variaciones hasta llegar a niveles estables a lo largo del periodo de gestación en humanos y en el primer mes de vida en roedores (Doura et al., 2008; Hellström-Lindahl et al., 1998).

Por otra parte, en el periodo de desarrollo la proporción en el cerebro AChE:BChE es de 9:1 y la actividad de AChE cerebral llega a su meseta en el DPN 27 en ratas (Mortensen et al., 1998). Aparte de su rol catalítico como esterasa, diversos estudios sugieren que AChE también puede ejercer un papel morfógeno, influenciando el crecimiento de células durante el neurodesarrollo, independientemente de su actividad enzimática (United States Environmental Protection Agency - EPA, 2014). Esto va asociado, principalmente, a las características de su distribución y patrón de maduración en el desarrollo, puesto que AChE se expresa en todo el cerebro durante los periodos de crecimiento axonal, en ausencia de otros marcadores colinérgicos, como la ChAT y la propia ACh, y antes de que se formen conexiones sinápticas (Brimijoin and Koenigsberger, 1999; Grisaru et al., 1999).

El patrón de maduración de este sistema varía en función del sexo. Por ejemplo, la actividad AChE y ChAT en el periodo postnatal es superior en hembras que en machos, alcanzando antes la actividad normal de ratas adultas (Loy and Sheldon, 1987). De hecho, las aferencias al prosencéfalo se producen en periodos diferentes entre ambos sexos en ratones, por lo que se ha sugerido que la manipulación del sistema colinérgico puede resultar en cambios de comportamiento diferente en machos y hembras, a largo plazo (Berger-Sweeney, 2003).

2.2.1. Efectos de las exposiciones tempranas a clorpirifós sobre el sistema colinérgico

Una gran cantidad de estudios avalan que la señalización colinérgica es fundamental para la morfogénesis del cerebro. Sobre esto se ha sugerido que su modificación, en la etapa del desarrollo, sería la causa de los efectos neurotóxicos relativos a exposiciones a CPF en edades tempranas (United States Environmental Protection Agency - EPA, 2014).

Los efectos inmediatos de CPF se han estudiado extensamente en base a los grados de inhibición de la AChE cerebral y las posibles consecuencias sobre el sistema colinérgico, a diferentes dosis y edades del periodo postnatal. En ratas y ratones, dosis repetidas de 1-6 mg/kg han provocado un 15-60% de inhibición AChE cerebral y, por consiguiente, una disminución de los niveles de los mAChRs, la ChAT y el VAcHT (Carr et al., 2001; Guo-Ross et al., 2007; Richardson and Chambers, 2005; Tang et al., 1999). Tratamientos de 4,5-7,5 mg/kg han mostrado una disminución de un 40-90% de la actividad AChE y cambios en la liberación de ACh (Chakraborti et al., 1993; Liu et al., 1999; Won et al., 2001; Zhang et al., 2002; Zheng et al., 2000). Contrario a estos resultados, diversos estudios han observado una nula variación de la actividad AChE cerebral, con dosis de 0,3 mg/kg (Jett et al., 2001) y 1 – 3 mg/kg (Ricceri et al., 2003, 2006) en la ventana postnatal tardía (DPN 11-14); en un tratamiento de 1 mg/kg desde el DPN 4-10 (Oriel and Kofman, 2015); y con una dosis única de 5 mg/kg en el DPN 10 (Lee et al., 2015). También se ha establecido que el NOEL (Nivel de Efecto No Observado) de este insecticida en ratas del DPN 7 y adultas se produce por dosis sub-letales y repetidas similares (1,2-2,2 mg/kg/día en crías; 0,5-3,3 mg/kg/día en adultos) (Zheng et al., 2000). Este efecto se debe a que la actividad AChE se reestablece rápidamente en los recién nacidos, después de una exposición (Ashry et al., 2002; Liu et al., 1999; Moser and Padilla,

1998; Pope et al., 1991). Los autores sugieren que este fenómeno se debe a que un animal en desarrollo presenta una mayor síntesis proteica que un adulto (Brimijoin and Koenigsberger, 1999).

Estudios *in vivo* en el pez cebra indicaron que CPF o CPO pueden interrumpir el crecimiento axonal (Yang et al., 2011). Al mismo modo, se ha observado una significativa disminución de la corteza parietal, después de una exposición perinatal de 1-5 mg/kg/día en ratas hembras (Maurissen et al., 2000). Además, en diversos estudios, se ha descrito la disminución de la unión con *hemicholinium-3* (HC-3) sobre los receptores mAChRs por exposiciones a CPF en todo el periodo perinatal: en periodo prenatal (Qiao et al., 2004, 2003); en la ventana postnatal temprana (DPN 1-4) por dosis de 1 y 1,5 mg/kg (Dam et al., 1999; Richardson and Chambers, 2005; Slotkin et al., 2001); y en la ventana postnatal tardía por dosis de 5 mg/kg (Rhodes et al., 2004; Slotkin et al., 2001).

2.3. Evidencia de los efectos a largo plazo de las exposiciones tempranas

Un gran número de estudios han vinculado la exposición perinatal a OPs con efectos neurotóxicos sobre el desarrollo, y las consecuencias a largo plazo sobre la conducta en los niños (Aguilar-Garduña et al., 2014; Jurewicz et al., 2013; Muñoz-Quezada et al., 2013). Para este tipo de investigaciones se tiene en consideración la búsqueda en la orina de metabolitos no-específicos como los diaquilfosfato (DAP), otros específicos de cada OP y niveles del insecticida en el cordón umbilical (Li et al., 2012).

Concretamente, sobre exposiciones a CPF durante la etapa del desarrollo, diversas investigaciones de los últimos 10-15 años han encontrado una gran correlación entre éstas y variadas patologías neuroconductuales en neonatos o niños pequeños (United States Environmental Protection Agency - EPA, 2014). Así, se han observado en niños de 3 años alteraciones en habilidades motoras, desarrollo mental, problemas de atención, trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), trastorno generalizado del desarrollo (Rauh et al., 2006); en niños de 7 años déficits en la memoria de trabajo (Horton et al., 2012; Rauh et al., 2011); en niños de 6-11 años anomalías cerebrales (Rauh et al., 2012); en niños de 11 años alteraciones motoras (Rauh et al., 2015); en niños de 6-9 años una menor coordinación motora visual, alteraciones

cognitivas, trastorno de oposición desafiante, problemas atencionales y dificultad para discriminar colores (van Wendel de Joode et al., 2016); en niñas y niños de 6-11 años un aumento del índice de TDAH (Fortenberry et al., 2014). Las alteraciones en la memoria, observadas en estos estudios, fueron principalmente manifestadas por el sexo masculino (Horton et al., 2012; van Wendel de Joode et al., 2016).

A su vez, un considerable número de estudios han revelado efectos a largo plazo sobre la conducta por exposiciones a bajas dosis de CPF en animales de laboratorio, en periodos donde el cerebro está en desarrollo. Así, se han observado cambios conductuales después de exposiciones prenatales a CPF y también en la ventana postnatal temprana, en los comportamientos sociales y en la ansiedad por exposiciones en el periodo prenatal y en la ventana postnatal tardía (Eaton et al., 2008; Li et al., 2012; United States Environmental Protection Agency - EPA, 2014). Sobre este punto, la EPA ha concluido que dosis de 1 mg/kg/día a superiores, durante el periodo de desarrollo producen efectos significativos y a largo plazo, sobre la conducta (United States Environmental Protection Agency - EPA, 2014).

Varias investigaciones han sugerido que CPF modifica las funciones cognitivas como la memoria de trabajo a largo plazo, dependiendo del periodo de exposición y la dosis administrada. Este efecto se ha observado por exposiciones en el periodo prenatal temprano a dosis de 5 mg/kg/día (Icenogle et al., 2004); en el periodo prenatal tardío por dosis de 1 mg/kg/día, sólo en hembras (Levin et al., 2002); en la ventana postnatal temprana por dosis de 1 mg/kg/día, sólo en machos (Aldridge et al., 2005a; Levin et al., 2001); y por un tratamiento prolongado del DPN 1-21, a una dosis de 1 mg/kg/día, sólo en machos (Johnson et al., 2009). Por otra parte, investigaciones que evaluaron memoria y aprendizaje espacial, a través del laberinto acuático de Morris (conocido por sus siglas en inglés MWM), observaron que una exposición a 3 mg/kg/día, en periodo prenatal temprano, provoca un enlentecimiento del proceso de aprendizaje (Turgeman et al., 2011). Asimismo, otro estudio reveló que sólo en los machos se manifestaba una alteración del aprendizaje, después de una exposición perinatal a 1 mg/kg/día (Gómez-Giménez et al., 2017). Estos autores observaron también un empeoramiento del

rendimiento en el laberinto radial de 8 brazos en machos y una mejora en las hembras (Gómez-Giménez et al., 2017).

Otros efectos conductuales relacionados con el estado de ánimo también dependen de la dosis y el periodo de exposición. Con respecto a la ansiedad, algunos estudios obtuvieron resultados contradictorios, mientras el trabajo de Icenogle et al. (2004) no reveló efectos, Venerosi et al. (2010) encontraron diferencias entre tratados y controles, aunque sólo en hembras. Como consecuencia de exposiciones postnatales, se ha observado una disminución de la ansiedad, sólo en hembras (Ricceri et al., 2006; Venerosi et al., 2008). Por otra parte, no se han observado efectos relativos a depresión por una exposición prenatal (Venerosi et al., 2010). Sin embargo, exposiciones en la ventana postnatal temprana y tardía han inducido alteraciones a este nivel en ratas y ratones (Aldridge et al., 2005a; Oriol and Kofman, 2015; Ricceri et al., 2003).

Existen pocos trabajos que estudien los efectos de CPF sobre los comportamientos sociales. A nivel de interacción social, ratones hembras han manifestado cambios significativos por exposiciones en periodo prenatal (De Felice et al., 2014; Venerosi et al., 2015, 2006) y en la ventana postnatal tardía (Ricceri et al., 2003). Con respecto a las conductas maternas, se ha observado un deterioro de la capacidad de cuidar a la cría, tanto por exposiciones prenatales (Venerosi et al., 2010), como por postnatales (Venerosi et al., 2008). Asimismo, las conductas agresivas en los machos disminuyen después de exposiciones, en ambos periodos, a dosis de 1 mg/kg/día (Ricceri et al., 2006, 2003).

En cuanto a la actividad motora, los resultados difieren entre sí y dependen del procedimiento, las dosis y el periodo de tiempo transcurrido entre la exposición y la evaluación (Lee et al., 2015; Levin et al., 2002, 2001; Ricceri et al., 2003; Venerosi et al., 2008).

A nivel metabólico, los estudios también son escasos. Se han observado niveles alterados de colesterol y triglicéridos e hiperinsulinemia en ratas en edad adulta, tras recibir un tratamiento en la ventana postnatal temprana de 1 mg/kg/día (Slotkin et al., 2005).

Lassiter and Brimijoin (2008) revelaron un aumento de peso en ratas adultas después de una exposición perinatal. A su vez, una reciente investigación mostró que ratas expuestas en periodo perinatal presentaban un peso mayor al nacer, una disminución de receptores de insulina β en el hígado e hiperglicemia (Reygner et al., 2016).

3. Clorpirifós y vida adulta

Hoy en día, la mayor parte de la población está periódicamente expuesta a dosis bajas de CPF, por lo que las exposiciones repetidas, acumulativas y a dosis sub-tóxicas deben ser cuidadosamente estudiadas, por ser potencialmente perjudiciales para la salud humana (Ross et al., 2013). Si bien, las exposiciones en periodo prenatal y/o postnatal se han estudiado con mayor profundidad, y los efectos agudos a corto plazo están ampliamente definidos (Costa, 2006), el impacto que a largo plazo puedan provocar las exposiciones por bajas dosis de OPs, sigue siendo un tema debatido y de gran incertidumbre (Rohlman et al., 2011). De hecho, estas exposiciones se han asociado a enfermedades crónicas neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica en poblaciones envejecidas (Sánchez-Santed et al., 2016); defectos congénitos, trastorno de espectro autista (TEA) o TDAH en niños; y enfermedades como asma, bronquitis, problemas de infertilidad, diabetes y obesidad en la población en general (Mostafalou and Abdollahi, 2016, 2013).

3.1. Evidencia de exposiciones en adultos

El impacto de la exposición en adultos humanos, a bajas concentraciones de OPs, se ha estudiado principalmente en poblaciones agrícolas (Suratman et al., 2015). Concretamente sobre CPF, se han revelado efectos sobre la memoria verbal como visual, y alteraciones en la habilidad visoespacial (Roldán-Tapia et al., 2005); una respuesta más lenta en pruebas neuropsicológicas (Stephens and Sreenivasan, 2004); y un bajo rendimiento en habilidades motoras, problemas en la memoria, fatiga y pérdida de la fuerza muscular (Steenland et al., 2000). Por otra parte, se han reportado casos de intoxicaciones por altas dosis de CPF que han provocado hiperglicemia grave, hipokalemia, glucosuria, cetonuria y bajas concentraciones de bicarbonato (Badrane et al., 2014).

Los estudios empíricos han confirmado que CPF altera el aprendizaje espacial y los procesos de memoria cuando se administra de forma crónica y sub-tóxica. El estudio de Yan et al. (2012) reveló que una exposición de 4 semanas a dosis bajas de CPF provocaba un deterioro en la memoria espacial, sin signos evidentes de toxicidad colinérgica. Asimismo, otra investigación analizó la memoria espacial durante 5 semanas, encontrando alteraciones a este nivel, después de 21 semanas de una exposición crónica a dosis de 5 mg/kg/día (López-Granero et al., 2013b). A su vez, trabajos de nuestro equipo han mostrado que la exposición a CPF, en ratones *wild type* C57BL/6, interfiere en la elección de una estrategia de búsqueda óptima, en el laberinto de Barnes (Basaure et al., 2017) y que produce un deterioro en la memoria espacial, en animales transgénicos portadores del genotipo apoE3 (Peris-Sampedro et al., 2015a). López-Granero et al. (2016) han observado, en ratas, que una exposición de 6 meses a 5 mg/kg/día de CPF afectaba la memoria espacial a largo plazo, 7 meses después de la exposición crónica.

Por otra parte, otros procesos se han relacionado a la exposición a CPF en animales adultos, como por ejemplo el deterioro en la atención sostenida (Middlemore-Risher et al., 2010; Peris-Sampedro et al., 2016), pero además con manifestaciones de reducción en la motivación y en la respuesta anticipatoria (Peris-Sampedro et al., 2016). Estos dos autores también observaron los efectos 4 semanas después del tratamiento. Alteraciones en el control inhibitorio, también se han observado por exposiciones crónicas (López-Granero et al., 2013a; Middlemore-Risher et al., 2010).

Importante destacar que hasta ahora se ha prestado muy poca atención a la exploración de los trastornos sobre el estado de ánimo en exposiciones crónicas a bajas dosis de CPF, en adultos. Existen dos estudios en ratas que han revelado una disminución de la ansiedad (Savy et al., 2015; Yan et al., 2012), mientras que otro estudio encontró conductas relativas a tigmotaxis después de una exposición de 6 meses (López-Granero et al., 2016). Por otro lado, no existen estudios en adultos que asocien exposiciones a CPF con algún síntoma de depresión, como tampoco con cambios sobre algún comportamiento social, en particular.

Por otra parte, en lo que respecta a la actividad motora y exposiciones sub-tóxicas de CPF existen resultados dispares entre estudios. En algunos se ha observado un aumento de la actividad (Peris-Sampedro et al., 2015a), sin embargo un número considerable de investigaciones no han llegado a observar diferencias a este nivel (Basaure et al., 2017; Savy et al., 2015; Yan et al., 2012).

A nivel metabólico, tres estudios han demostrado un aumento de peso tras una exposición sub-crónica a CPF, en ratas machos (Meggs and Brewer, 2007) y en ratones (Peris-Sampedro et al., 2015a, 2015b). Otro estudio observó un aumento de la glicemia en ratas con dosis de 5 mg/kg/día durante una exposición de 2 semanas y con dosis de 0,2-2 mg/kg/día cuando la exposición se alargó 2 semanas más (Lukaszewicz-Hussain, 2013). Un estudio de nuestro laboratorio reveló que 8 semanas de una dieta suplementada con 2 mg/kg de CPF provocaba un aumento de la glicemia y la concentración del colesterol total, como también un incremento del consumo de comida (Peris-Sampedro et al., 2015b).

3.2. Exposiciones tempranas y re-exposiciones

La toxicidad de una sustancia puede verse incrementada o disminuida por la exposición simultánea o consecutiva con otra sustancia. De este modo, los efectos combinados pueden ser aditivos (la suma de dos respuestas individuales), sinérgicos (superior a la suma de las dos respuestas individuales), potenciadores (un compuesto no tóxico adquiere esta característica en presencia de otro) o antagonísticos (un agente que interfiere o anula la propia acción de otro) (Peña et al., 2001). Las interacciones que alteran la toxicidad se pueden deber a la inducción de la biotransformación del compuesto, alterando su excreción modificando el pH en la orina o compitiendo por su transporte renal y/o desplazándola del sitio de unión de la proteína plasmática. Igualmente, una exposición previa a un agente puede modificar la respuesta propia del organismo hacia otros compuestos o al mismo (Peña et al., 2001). Un ejemplo de ello son las exposiciones repetidas y en dosis bajas de cadmio, que pueden llegar a proteger a la persona de los efectos de dosis letales (Kelley, 1999).

De este modo, existen diversos estudios empíricos que han revelado que CPF presenta efectos antagónicos o sinérgicos frente a otras sustancias. Un estudio ha evidenciado que un tratamiento de terbutalina y a continuación, una exposición a CPF en la ventana postnatal tardía, provocaba un efecto sinérgico sobre la transmisión serotoninérgica (Slotkin and Seidler, 2008). También, se ha observado alteraciones de los efectos provocados por CPF en el sistema serotoninérgico, por un tratamiento previo con nicotina (Slotkin et al., 2015). A nivel de sistema colinérgico, la administración prenatal de nicotina modifica la respuesta específica, que presenta una exposición a CPF en la ventana postnatal temprana, sobre la liberación de ACh, en la unión del HC-3 y en la actividad de ChAT, (Slotkin and Seidler, 2015). Estos autores llegaron a designar este evento como “*el fenotipo ACh*” que no se da bajo exposiciones de los dos tóxicos, individualmente. Por otra parte, estudios con ratas adultas evidenciaron que la nicotina produce un aumento del metabolismo de CPF y una reducción a la inhibición de AChE cerebral, después de un tratamiento en conjunto de 7 días (Lee et al., 2010) y que en concomitancia con etanol, dichos efectos parecen no sufrir cambios (Lee et al., 2011).

Estudios de dobles exposiciones a CPF existen muy pocas, en humanos existe un estudio que evidenció una importante pérdida de la memoria y disminución cognitiva en hombres que ingirieron altas concentraciones del insecticida, y que, a causa de re-exposiciones en bajas dosis, se volvieron a presentar tales alteraciones (Kaplan et al., 1994). Asimismo, si bien otro estudio confirmó la presencia de TCPy en las orinas de adolescentes re-expuestos de forma continua a variados insecticidas, no encontraron efectos neuroconductuales asociados (Fiedler et al., 2015).

Hasta la fecha, tres estudios empíricos se han enfocado en los efectos de CPF bajo un esquema de exposición prenatal y, posteriormente, una re-exposición en la ventana tardía postnatal en ratones (Venerosi et al., 2012). Uno de ellos reveló una disminución de la ansiedad en las hembras por una exposición postnatal de 1 mg/kg/día y prenatal de 6 mg/kg/día en el DPN 70; y también un incremento de las conductas agresivas en machos (Ricceri et al., 2006). El otro estudio mostró que CPF postnatal, a dosis de 1 y 3 mg/kg/día, producen una reversión del incremento de las vocalizaciones ultrasónicas presentadas por individuos expuestos en la etapa prenatal (Venerosi et al., 2006). En el

último trabajo se observó que la exposición prenatal altera el patrón propio de las enzimas hepáticas y el metabolismo de CPF, y que la re-exposición postnatal no potencia esos efectos (Buratti et al., 2011).

Otros tres estudios, basados en un protocolo de exposición aguda cada 2 meses en concomitancia a 1 año de exposición a bajas dosis han presentado diversos resultados. Uno de ellos no encontró interacciones entre ambas exposiciones sobre el sistema colinérgico y serotoninérgico (Padilla et al., 2005). El siguiente reveló que, si bien el tratamiento crónico no alteraba la atención sostenida, esta función variaba sólo en respuesta a la interacción con las dosis agudas (Samsam et al., 2005). Por último, mediante un MWM observaron que las ratas presentaban alteraciones en los patrones de búsqueda, por exposición a las dosis agudas en conjunto con el tratamiento crónico (Moser et al., 2005).

Importante destacar que hasta hoy no existen estudios donde se evalúen los efectos de una exposición a CPF en edades tempranas y la respuesta que genera el organismo cuando se ve expuesto nuevamente al insecticida, en edades adultas.

4. La conducta como diana

Los diferentes estudios realizados para evaluar los efectos de CPF sobre el desarrollo neurológico se han remitido a los siguientes dominios neuroconductuales: función cognitiva (aprendizaje espacial, memoria a largo plazo y de trabajo), ansiedad y emoción (trastornos del ánimo), comportamiento social (interacción social y conductas agresivas) e interacciones maternas y actividad motora en animales de laboratorio (United States Environmental Protection Agency - EPA, 2014) y en humanos (Muñoz-Quezada et al., 2016). Importante destacar que existe una fuerte evidencia de que los estudios conductuales en rata y ratón tienen un gran valor traslacional para los humanos (Wallace et al., 2015)

4.1. Aprendizaje y memoria espacial

Los circuitos neurales relacionados con el aprendizaje y la memoria están modulados por diversos sistemas endógenos y son cruciales para asegurar la adaptación del individuo al medio. Aprendizaje es la adquisición inicial de la información, que conduce a modificaciones de la conducta, y la memoria es el proceso en el cual ese conocimiento almacenado, es recuperado (Kandel et al., 2013).

La memoria espacial es probablemente la forma de cognición más estudiada en roedores y se define como la función cerebral responsable de reconocer, codificar, almacenar y recuperar información sobre la disposición de objetos o rutas específicas (Bird and Burgess, 2008). Diversos estudios han documentado que lesiones, tratamientos farmacológicos inhibitorios y algunas mutaciones genéticas que afectan la señalización, a nivel de hipocampo, provocan alteraciones del aprendizaje y la memoria espacial (ver revisión de Vorhees and Williams, 2014).

El sistema colinérgico es clave para el aprendizaje y la memoria espacial. Durante la adquisición se libera en la sinapsis ACh, tanto en el hipocampo como en la corteza, sin embargo en el momento de la consolidación de la memoria, disminuyen los niveles de ACh (Deiana et al., 2011). Además, otros sistemas de neurotransmisores como el glutamatérgico (Tsien et al., 1996), noradrenérgico, dopaminérgico o serotoninérgico, pueden modular el desempeño de los animales en pruebas como el MWM y el laberinto de Barnes (Braun et al., 2015; Moriguchi et al., 2014; Warner and Drugan, 2012). Cabría esperar que múltiples tóxicos afecten sobre estas dianas.

Para estudiar el aprendizaje y la memoria espacial en ratas y ratones, existen diversas pruebas, entre ellas el laberinto de Barnes (Ménard et al., 2015). Si bien es menos utilizado, tiene un perfil menos estresante que el MWM al ser un laberinto seco y además, requerir un menor esfuerzo físico (Harrison et al., 2009; Holmes et al., 2002). Esta prueba ha sido utilizada para comparar diferentes cepas de ratones (Holmes et al., 2002), modelos de ratones transgénicos para la EA (Prut et al., 2007) o animales con déficits en memoria y aprendizaje (Moriguchi et al., 2014; Peris-Sampedro et al., 2015a; Seeger et al., 2004).

4.2. Emoción y conductas sociales

Las interacciones sociales, como el comportamiento sexual, la afiliación social y la agresión, son cruciales para la adaptabilidad de los mamíferos al medio. Un individuo que decide adecuadamente con quién pelear, a quién acudir, abordar y evitar, aumenta sus posibilidades de sobrevivir y reproducirse. Al contrario, las decisiones equivocadas pueden llevar a un estrés considerable, aislamiento social e incluso la muerte (Lukas and de Jong, 2017).

Una revisión del autor Brothers (1990) planteó que existía un conjunto de áreas cerebrales que se dedicaban a la cognición social, a esto lo llamó el “cerebro social”, siendo sus principales componentes la amígdala, la corteza frontal orbital y la corteza temporal. Asimismo, se ha observado que dicha cognición social es pobre en el trastorno antisocial de la personalidad y la psicopatía, el trastorno de estrés postraumático, el trastorno límite de la personalidad, los trastornos de ansiedad social, la depresión y la esquizofrenia (Patin and Hurlemann, 2015; Tudusciuc and Adolphs, 2013). Aunque dentro de este grupo, dos trastornos neuropsiquiátricos se destacan, puesto que las anomalías en el comportamiento social son su definición principal. Estos son el TEA, que se caracteriza por presentarse una importante hiposociabilidad, y el síndrome de Williams, cuyos sujetos exhiben hipersociabilidad (Barak and Feng, 2016).

A nivel neuroquímico, la oxitocina y la vasopresina se consideran facilitadoras de la socialización y la preferencia social entre machos roedores. De hecho, se ha observado que tanto la administración de oxitocina mejora las interacciones del sexo masculino, mientras que antagonistas de este neuropéptido la inhiben (Guzmán et al., 2013; Zoicas et al., 2014). A su vez, la vasopresina promueve el olfateo masculino y el “*adjacent lying*” término que se utiliza para el contacto estrecho entre roedores (Ramos et al., 2014, 2013). En tanto, una reducción de la búsqueda de encuentros sociales sugiere una interrupción en la búsqueda de recompensas (Lukas and de Jong, 2017). La incapacidad de sentir deseo por los encuentros sociales y la poca iniciativa a generar nuevos (motivación social) es crítica en personas con TEA y es causada por una interrupción de los mecanismos centrales de recompensa en los circuitos mesolímbicos dopaminérgicos-oxitocinérgicos incluyendo el núcleo accumbens, el área tegmental ventral y, también, la

amígdala y la corteza prefrontal (ver revisión de Kohls et al., 2012). Con respecto a la ACh, se sabe que es un neurotransmisor esencial evaluando el grado de satisfacción o amenaza que le confiere un estímulo, valorando los cambios en el medio ambiente, y respondiendo frente a estos (Pepeu and Giovannini, 2004). Algunos estudios han revelado que ratones *knockout* del receptor nAChRs $\beta 2$ están un mayor tiempo en contacto social y prefieren exageradamente la novedad, en comparación al *wild type* (Avale et al., 2011), y que las lesiones en el área prelímbica provocan los mismos patrones conductuales (Granon et al., 2003). Igualmente, una investigación reciente ha observado que la nicotina a dosis de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumenta las interacciones sociales en ratones C57BL/6 y en el modelo murino de autismo BTBR, con bajos niveles de ACh (Wang et al., 2015), vinculando estos comportamientos a una modulación directa del sistema colinérgico.

Es bien sabido que los ratones son una especie altamente social y poseen un amplio repertorio de comportamientos sociales que van desde interacciones sociales (Moy et al., 2004), anidación comunitaria (Heiderstadt et al., 2014), comportamientos sexuales (Zilkha et al., 2016), cuidado parental (Neumann, 2008), marcas de olores territoriales (Arakawa et al., 2009), jerarquía social y comportamientos agresivos (Wang et al., 2014). Por este motivo, son particularmente útiles para caracterizar trastornos en los cuales los comportamientos sociales inusuales son los componentes principales. Igualmente, es preciso destacar que para los ratones el reconocimiento de los congéneres puede ser importante para mantener la jerarquía social y la elección del compañero (Berry and Bronson, 1992). Dentro de los paradigmas que evalúan las interacciones sociales entre ratones, se encuentra la prueba tres compartimentos de Crawley (Crawley, 2004). Ésta analiza la socialización y la preferencia por la novedad, y ha sido empleado para estudiar el interés social, la identificación social y la memoria social en varias líneas de investigación (Clapcote et al., 2007; Kaidanovich-Beilin et al., 2011; Moy et al., 2004), siendo un ensayo que proporciona un diseño estandarizado y sencillo, con un alto rendimiento comparando genotipos, investigando el desarrollo de déficits sociales y examinando los efectos de diversos tratamientos (Silverman et al., 2010).

5. Modelos animales de vulnerabilidad: isoformas humanas de apoE en los déficits cognitivos y metabólicos.

5.1. Apolipoproteína apoE

La apolipoproteína E (apoE) humana es una proteína perteneciente a la familia de las apoproteínas. Descubierta a principios de los años 70, es una de las varias apoproteínas asociadas a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), quilomicrones y ciertas subclases de HDL. Es sintetizada y secretada por una gran diversidad de tejidos y células, además es abundante en el líquido intersticial, linfa y plasma. En estos dos últimos y en el líquido cefalorraquídeo siempre va asociado a algún lípido (Huang and Mahley, 2014). Si bien el hígado es el mayor productor de apoE, el cerebro es el segundo, tanto en neuronas como en astrocitos (Elshourbagy et al., 1985; Huang et al., 2004).

5.1.1. Estructura, polimorfismos y funciones

El gen *APOE* se encuentra en el cromosoma 19 (19q13.32) y codifica una proteína de 299 aminoácidos (Myklebost and Rogne, 1986). Este gen se encuentra en una región genómica donde también se codifican otras apoproteínas (tales como apoC1, apoC4 y apoC2) (Forero et al., 2016). El gen *APOE* humano es polimórfico con dos polimorfismos de nucleótido simple (SNP) ubicados en el exón 4 (rs429358 y rs7412) (Seripa et al., 2007). Las combinaciones de estos dos SNPs generan los tres alelos más comunes: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, que producen tres isoformas de la proteína apoE2, apoE3 y apoE4 respectivamente. Estos tres alelos son heredados en forma codominante, dando como resultado seis genotipos: tres genotipos homocigóticos ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 3/\epsilon 3$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$) y tres heterocigotos ($\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ y $\epsilon 3/\epsilon 4$) (Zannis et al., 1982). En tanto, cada una de las isoformas lleva diferentes aminoácidos en las posiciones 112 y 158, la isoforma apoE2 contiene dos cisteínas, la apoE3 contiene una cisteína y una arginina y la apoE4 contiene dos argininas (Mahley and Rall, 2000) (Figura 4).

Al realizarse comparaciones de secuencias entre especies, se ha deducido que el alelo $\epsilon 4$ es el alelo ancestral, debido a que la apoE de primate no humano y el apoE4 humano coinciden en las posiciones 112 y 158. Después de que ambos linajes se separaran,

surgieron mutaciones sucesivas únicas, dando lugar primero al alelo $\epsilon 3$ y posteriormente, al $\epsilon 2$. En términos generales, la variante $\epsilon 3$ es la más abundante en toda la población humana, seguida por $\epsilon 4$ y $\epsilon 2$ (Eisenberg et al., 2010). Igualmente, su distribución geográfica varía en función a la región, por ejemplo, en Europa, el alelo $\epsilon 3$ es el más frecuente en poblaciones de las zonas mediterráneas (Corbo and Scacchi, 1999), mientras $\epsilon 4$ abunda en las regiones del norte (Egert et al., 2012).

La proteína apoE contiene dos dominios estructurales principales, un dominio amino-terminal (N-terminal) globular compacto y estable (residuos de aminoácidos: 1 a 167) y un dominio carboxi-terminal (C-terminal) menos estable (residuos de aminoácidos: 206 a 299) (Mahley and Rall, 2000). Estos dominios están conectados entre sí por una región bisagra (residuos de aminoácidos: 167 a 206). El sitio de unión al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) está entre los residuos 136 a 150 de la proteína (Giau et al., 2015). En los residuos de aminoácidos 244 a 272 del dominio C-terminal es donde se encuentra el sitio principal de unión lipídica (Huang and Mahley, 2014) (Figura 4). Además, particularmente en la isoforma apoE4 se produce lo que se denomina interacción de dominio. Debido a que esta isoforma posee una arginina en la posición 112 (Arg-112), y ésta causa que la cadena lateral de Arg-61 se extienda lejos del dominio N-terminal, permitiéndole interactuar iónicamente con el ácido glutámico 255 (Glu-255) de la C-terminal (Dong et al., 1994; Dong and Weisgraber, 1996).

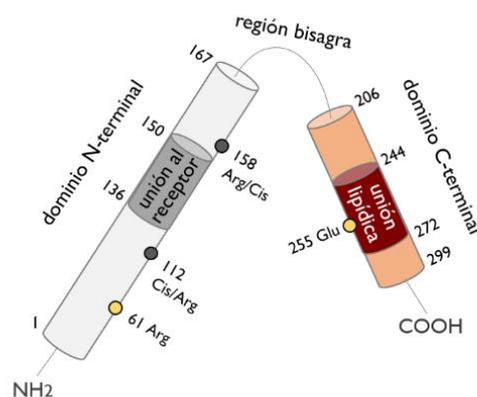


Figura 4. Modelo estructural de la apoE humana. El dominio N-terminal (residuos de aminoácidos: 1 a 167), unión al receptor de lipoproteínas de baja densidad (residuos de aminoácidos: 136 a 150), dominio C-terminal (residuos de aminoácidos: 206 a 299) y sitio de unión lipídica (residuos de aminoácidos: 244 a 272). Además, las tres isoformas difieren de los aminoácidos de las posiciones 112 y 158 por una arginina o cisteína, de este modo presentan apoE2: Cis-112 y Cis-158; apoE3: Cis-112 y Arg-158; y apoE4: Arg-112 y Arg-158. La posición Arg-61 y Glu-255 interactúan sólo en la isoforma apoE4. *Adaptado de Giau et al., 2015.*

La función general de la apoE es la de transportar y distribuir triglicéridos (TG), fosfolípidos, ésteres de colesterol, colesterol en células y tejidos (Mahley and Rall, 2000). La interacción entre los LDLR y apoE induce la eliminación de lipoproteínas que contienen apoE en la circulación, manteniéndose de esta manera la homeostasis lipídica (Hatters et al., 2006). ApoE3 y apoE4 tienen una afinidad similar a los LDLR, sin embargo la conformación estructural de apoE2 da como resultado una afinidad débil a estos. Esta diferencia condiciona una eliminación pobre de las lipoproteínas ricas en TG provocando un trastorno lipídico llamado hiperlipoproteinemia tipo III, caracterizado por altos niveles plasmáticos de colesterol y TG, y favoreciendo la aparición de enfermedades cardiovasculares prematuras (Mahley and Rall, 2000). Por el contrario, apoE3 promueve de manera óptima la eliminación de las lipoproteínas ricas en TG y se asocia con niveles normales de lípidos plasmáticos. De hecho, apoE3 se le relacionado tradicionalmente con el fenotipo saludable. A su vez, aunque la isoforma apoE4 muestra una alta afinidad por los LDLR, esta isoforma también se le asocia con alteraciones del metabolismo de los lípidos, lo que comúnmente se le llaman dislipidemias (Salameh et al., 2016). La Arg-112 provoca que apoE4 se una preferentemente a VLDL, mientras que apoE2 y apoE3 se unen en mayor medida a HDL (Dong et al., 1994). Además, posee una menor estabilidad conformacional que apoE2 y apoE3. Estas dos propiedades estructurales se consideran fundamentales dentro de la diferencias entre genotipos, puesto que se le ha conferido al genotipo apoE4 una mayor susceptibilidad para padecer la EA, otras alteraciones neurológicas y enfermedades cardiovasculares (Hatters et al., 2006).

ApoE realiza diversas funciones en el SNC: previene de la excitotoxicidad, protege a las neuronas del estrés oxidativo, fomenta la supervivencia de las neuronas y participa en la modulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas (Shen et al., 2008). ApoE se expresa en SNC en áreas como el hipotálamo y el bulbo olfatorio, indicando su posible participación en la regulación de la ingesta de alimentos (Nathan et al., 2007; Shen et al., 2011, 2008). Además, los adipocitos también expresan apoE en abundancia (Zechner et al., 1991), y participa en el almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo y en la diferenciación de adipocitos (Huebbe et al., 2015; Lasrich et al., 2015). Todos estos datos sugieren que apoE tiene un papel en el desarrollo de la obesidad (Alharbi et al., 2017; Kypreos et al., 2009).

5.1.2. Funcionamiento cognitivo y conducta asociada

ApoE ha sido vinculada a la neurobiología desde hace años y desempeña un rol importante en varias enfermedades neurológicas. En términos generales, es bien sabido que la apoE se sintetiza abundantemente en cerebro, modulando el transporte de lípidos en el líquido cefalorraquídeo. Interviene en la redistribución de los lípidos en todos los procesos de reparación neural como crecimiento de axones y remielinización. Además, modifica el crecimiento de las neuritas en cultivos de células del ganglio de raíz dorsal y en células de neuroblastoma (ver revisión de Huang and Mahley, 2014). En la década de los 90s se comenzó a asociar el genotipo apoE4 con el aumento de la frecuencia y disminución de la edad de inicio de la EA (Roses, 1996). La EA es una patología neurodegenerativa caracterizada por un deterioro progresivo de la capacidad cognitiva, y a nivel fisiopatológico, por la presencia de placas β -amiloides (A β) extracelulares y la formación intracelular de ovillos neurofibrilares (Tayeb et al., 2012). La forma familiar de la enfermedad se caracteriza por un inicio temprano y es debida a mutaciones en los genes de la proteína precursora amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2) (Pastorino and Lu, 2006). La forma tardía es la más común entre los ancianos, y se considera que múltiples factores genéticos y ambientales estarían implicados en su etiología. Uno de los factores genéticos aceptado como factor de riesgo para la EA es ser portador del alelo ϵ 4, representando más de un 50% del riesgo de padecer la enfermedad en la edad adulta (Roses, 1996). Existen variadas propuestas para explicar la relación entre el genotipo apoE4 y la EA, como por ejemplo favorecer la formación de placas amiloides y contribuir al desarrollo de los ovillos neurofibrilares (ver revisión de Huang and Mahley, 2014). Además, las mujeres que portan alelos ϵ 4 parecen estar en mayor riesgo de desarrollar EA que los hombres (Corder et al., 2004), aunque en los hombres portadores se desarrolle antes la enfermedad (Riedel et al., 2016). De hecho, la concentración de apoE a lo largo de la vida es diferente entre ambos sexos; las mujeres presentan concentraciones superiores a los hombres hasta los 17 años (Lee et al., 2001; Vincent-Viry et al., 1998), invirtiéndose a esa edad hasta la menopausia, donde vuelven a ser las mujeres las que muestran valores elevados (Burger et al., 2002; Schiele et al., 2000). Los autores Riedel et al. (2016) sugieren que estas diferencias entre sexos confieren, a las mujeres apoE4, un mayor riesgo de padecer EA.

A nivel cognitivo, se ha observado que personas con EA, con al menos un alelo $\epsilon 4$ presentan un deterioro más rápido de sus funciones, y que el genotipo apoE4 afecta negativamente la cognición en las etapas preclínicas de la enfermedad (Reitz and Mayeux, 2009). De igual manera, se ha correlacionado un incremento de las conductas agresivas en personas con EA y al menos un alelo $\epsilon 4$ (Craig et al., 2004; van der Flier et al., 2006). Además, los ancianos, del genotipo apoE4 sin EA presentan un deterioro mayor en la atención y la memoria de trabajo, en comparación a individuos de los otros genotipos apoE (Greenwood et al., 2005). Igualmente, se ha observado que las personas con este genotipo presentan un peor rendimiento en tareas de memoria episódica, navegación espacial y reconocimiento de objetos (De Blasi et al., 2009; Kukulja et al., 2010). Además, a medida que la población aumenta de edad, las diferencias entre personas portadoras del gen apoE4 y las que no, son aún mayores (Wisdom et al., 2011). A su vez, algunos desórdenes neuropsiquiátricos se han vinculado con apoE en humanos, como por ejemplo la depresión mayor en sujetos portadores de apoE2 (López-León et al., 2008); la depresión tardía en personas mayores portadoras de apoE4 (Feng et al., 2015); y un mayor riesgo de sufrir estrés post-traumático en soldados retirados con genotipo apoE4 (Kimbrel et al., 2015). Por otro lado algunas isoformas se comportan como protectoras, como es el caso de apoE3 que representa una protección frente a la esquizofrenia en la población asiática (González-Castro et al., 2015) y el rol neuroprotector y modulador de la longevidad en los sujetos del genotipo apoE2 (Reinvang et al., 2013).

Estudios en humanos también han evidenciado disfunciones del sistema colinérgico en sujetos del genotipo apoE4, como la reducción de la actividad de las neuronas colinérgicas (Salehi et al., 1998), un mayor número de mAChRs (Cohen et al., 2003) y niveles más altos de AChE (Eggers et al., 2006). Otra revisión más reciente relacionó el genotipo apoE4 con la disminución del volumen del hipocampo e hipometabolismo cerebral (Liu et al., 2015). Pese a estos antecedentes, la relación entre apoE4 y un sistema colinérgico disfuncional sigue siendo un tema controvertido, dado que existen estudios que no han observado diferencias a este nivel (Bott et al., 2013; Bronfman et al., 2000). Además, todavía no se ha podido confirmar que los portadores del alelo $\epsilon 4$ respondan mejor a los inhibidores de la ChE, que los portadores de los otros dos alelos (ver revisión de Haywood and Mukaetova-Ladinska, 2006).

Los estudios neuroconductuales en animales se han centrado en evaluar diferentes tipos de memoria y aprendizaje. Hace más de 20 años Gordon et al. (1995) observaron un déficit en la memoria de trabajo, y una disminución en la actividad de ChAT en la corteza frontal y el hipocampo en ratones *knockout* apoE, revelando una posible interacción entre el sistema colinérgico y esta proteína. En animales transgénicos apoE4 de edades avanzadas se ha observado un bajo rendimiento en la tarea de laberinto radial de 8 brazos (Hartman et al., 2001) y en hembras apoE4 también se ha encontrado un mayor deterioro en pruebas de memoria espacial (Grootendorst et al., 2005; Reverte et al., 2012). Por otra parte, los ratones transgénicos apoE3 sometidos a estimulación ambiental (etapas de estimulación a base de juguetes, túneles y ruedas de ejercicio con sus congéneres) presentaron un mejor rendimiento en pruebas de memoria y aprendizaje, comparados con animales del genotipo apoE4 bajo las mismas condiciones de estimulación (Levi et al., 2003). Sin embargo, otro estudio mostró que el ejercicio físico durante 6 semanas en un ratón apoE4 mejoraba sus funciones cognitivas (Nichol et al., 2009).

En nuestro grupo de trabajo, varios estudios han revelado la influencia del genotipo apoE sobre el aprendizaje y la memoria espacial. En un MWM, a los 4 y 12 meses de vida, los ratones apoE4 mostraron el peor rendimiento, mientras que los apoE3 el mejor y los apoE2 un aprendizaje intermedio, además de observarse un efecto del sexo (Reverte et al., 2013, 2012). En el trabajo de Peris-Sampedro et al. (2015a) se obtuvieron resultados similares, se observó que los animales apoE4 presentaron un peor rendimiento en la adquisición del laberinto de Barnes. En otras conductas, también se reveló que los ratones transgénicos apoE4 muestran una menor actividad y mayor ansiedad a los 4 y 12 meses de vida (Reverte et al., 2014b). También se ha sugerido que el genotipo apoE modula la atención y el control inhibitorio (Peris-Sampedro et al., 2016; Reverte et al., 2016).

Por todos estos hallazgos, se han sugeridos posibles explicaciones para el deterioro neuroconductual de apoE4, una de ellas es que los individuos con esta variante podrían tener niveles insuficientes de apoE funcional necesarios para mantener el buen estado neuronal, ya que se han detectado niveles más bajos de apoE en plasma, cerebro y líquido

cefalorraquídeo en ratones transgénicos apoE4 (Sullivan et al., 2011). A su vez, se ha relacionado al genotipo apoE4 con disfunciones mitocondriales, alteraciones en la mielinización y aumento del estrés oxidativo (Huang, 2006) También se ha asociado con un fenotipo proinflamatorio en la microglía, durante el periodo neonatal (Colton et al., 2005). Así, las deficiencias de apoE4 en función sináptica, metabolismo energético, reparación neural y protección contra ROS podrían explicar su asociación con procesos neurodegenerativos. Algunos datos indican que el funcionamiento alterado podría estar relacionado con la menor capacidad de los andrógenos para unirse a sus propios receptores, en los portadores del genotipo apoE4, sugiriéndose que este genotipo puede ser especialmente relevante cuando se está expuesto a disruptores endocrinos (Raber, 2008).

5.2 Modelos animales transgénicos

Bajo el marco teórico expuesto sobre apoE, múltiples autores han manifestado lo útil que son los modelos animales modificados genéticamente, para una mejor comprensión del papel del gen APOE y sus principales isoformas, sobre algunas enfermedades, funciones cognitivas, conducta y mecanismos de plasticidad neural (Forero et al., 2016). En un principio se trabajó con ratones *knockout* apoE que evidenciaron la importancia de la apoE a nivel cognitivo (Gordon et al., 1995). Después, se diseñaron ratones transgénicos que expresaban variantes de la apoE humana, mostrando en ocasiones variabilidad en la distribución de la isoforma humana en el organismo (Grootendorst et al., 2005). A partir de esto se creó un modelo de ratón transgénico que reemplazaba el gen *ApoE* murino por una de las tres variantes de la apoE humana, manteniendo intactas las secuencias reguladoras propiamente murinas (Sullivan et al., 2004, 1997). Así, se ha logrado que estos ratones expresen las isoformas apoE humana de manera funcional y a nivel fisiológico, siendo su fenotipo similar al encontrado en humanos, y convirtiéndose en un modelo adecuado para las investigaciones (Hauser et al., 2011).

5.2.1. Influencia de apoE en el desarrollo

Desde hace algún tiempo, y en vista de que algunos estudios indican la existencia de diferencias entre genotipos apoE a nivel conductual y neuroanatómico, a partir de edades

muy tempranas, ha crecido el interés por caracterizar en humanos la influencia de apoE sobre la conducta, en sujetos jóvenes. Algunos estudios asocian el genotipo apoE4 con un mejor desempeño en memoria episódica y de trabajo, función ejecutiva y fluidez verbal en adultos jóvenes (Bunce et al., 2011; Rusted et al., 2013). Otras investigaciones han reportado en jóvenes sanos portadores del genotipo apoE4 cambios en la actividad de las áreas prefrontal y media-temporal, y en el hipocampo, mientras se realizan tareas de memoria, teniendo resultados iguales o incluso mejores en tareas cognitivas y de memoria que los no portadores (Dennis et al., 2010; Mondadori et al., 2007). También se ha sugerido, que la educación en adultos jóvenes reduce los efectos de apoE4 sobre el metabolismo cerebral, y mejora el rendimiento en pruebas de memoria episódica (Arenaza-Urquijo et al., 2015). Otro estudio reveló la variación entre las estructuras cerebrales y el genotipo, sin embargo estos autores sí observaron que los niños homocigotos apoE4 obtuvieron las puntuaciones más bajas en función ejecutiva y memoria de trabajo Chang et al. (2016). Como también los hallazgos de Acevedo et al. (2010) y Alexander et al. (2007) que confirmaban una mala retención de una prueba espacial, en un grupo de niños de 7 a 10 años y peor rendimiento en navegación espacial en otro grupo de personas de 16 a 30 años, portadores del genotipo apoE4. Ninguno de estos estudios valoró las posibles diferencias entre sexos.

Los estudios realizados en ratones transgénicos portadores de apoE4 muestran que la memoria y el aprendizaje espacial se deteriora progresivamente con la edad (Pfankuch et al., 2005). Igualmente, existen datos que muestran diferencias en los patrones de maduración y desarrollo dendrítico en ratones apoE4 recién nacidos (Li et al., 2009). Este patrón también se ha observado en ratones de 3 meses de edad portadores de apoE4, estos ratones presentaban una densidad dendrítica inferior en comparación con ratones apoE3; estas diferencias a nivel dendrítico se relacionaban con un peor rendimiento en un laberinto de Barnes (Rodríguez et al., 2013).

Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha evidenciado que los ratones portadores de la apoE2, en la etapa de desarrollo, abrían antes sus ojos que apoE3 y apoE4 (Reverte et al., 2014a); asimismo, apoE4 presentaba un peso corporal inferior desde el destete y que esta diferencia se mantenía durante la vida adulta (Reverte et al., 2013).

5.2.2. Interacciones genotipo apoE – factores medioambientales

Algunos estudios también han sugerido que el genotipo apoE puede alterar la vulnerabilidad de un sujeto, a los efectos de determinados factores medioambientales. Así, por ejemplo, algunos estudios epidemiológicos han mostrado que los sujetos portadores de apoE4 están menos protegidos frente a exposiciones a plomo o mercurio (Godfrey et al., 2003; Stewart et al., 2002). En este sentido, otro estudio evidenció que después de 3 meses de una irradiación con ^{56}Fe , la protección frente a ROS en el hipocampo de ratones apoE4 era menor (Villasana et al., 2016). Por otro lado, los ratones transgénicos apoE4 expuestos a una dieta alta en grasas presentaban mayor ansiedad y efectos compatibles con una diabetes tipo II (Segev et al., 2016).

Además, nuestro grupo de investigación ha encontrado una interacción significativa entre el genotipo apoE3 y el compuesto lipofílico decabromodifenil éter (BDE-209) administrado durante el periodo postnatal, y también con CPF administrado durante la edad adulta, considerándose que este genotipo específico podría ser más vulnerable a estos dos tóxicos (Peris-Sampedro et al., 2015a, 2015b, Reverte et al., 2014b, 2013). Concretamente, para el compuesto BDE-209, después de una exposición postnatal, se observó un incremento de la ansiedad a los 12 meses de vida en hembras apoE3 y un aumento de las hormonas tiroideas (Reverte et al., 2014b); así como un leve deterioro en el aprendizaje espacial en machos a los 4 meses y en la retención en hembras a los 12 meses (Reverte et al., 2013). Para CPF, se ha observado que sólo los ratones del genotipo apoE3, expuestos en la edad adulta, retienen peor en el laberinto de Barnes. Además, dentro del mismo estudio, este genotipo en particular, presentó un aumento significativo de peso con una exposición mantenida durante 13 semanas a una dosis de 2 mg/kg/día administrada en la dieta (Peris-Sampedro et al., 2015a). También se pudo observar, en el genotipo apoE3, que la exposición a CPF provocaba un aumento de la glicemia, del colesterol total y el consumo de comida, así como un incremento de los niveles de leptina, posiblemente relacionados con el aumento de peso (Peris-Sampedro et al., 2015b). Otras observaciones importantes fueron sobre el control inhibitorio en este genotipo, donde CPF revirtió esta conducta característica de las hembras apoE4 (Peris-Sampedro et al., 2016).

En conjunto estos datos muestran la necesidad de estudiar la influencia del genotipo apoE sobre los efectos de tóxicos medioambientales, ya que puede constituir un sesgo importante en estudios epidemiológicos, donde no se controlen de forma adecuada variables genéticas y de sexo.



Planteamiento y Objetivos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

I. Planteamiento

Los efectos neuroconductuales y metabólicos derivados de la exposición a clorpirifós han sido los temas centrales de trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio. Desde un principio, se ha observado la influencia de los principales polimorfismos humanos del gen apoE en la expresión de tales efectos. Sin embargo, todos nuestros estudios sobre clorpirifós han sido realizados en ratones adultos. Hasta la fecha no existe información acerca de la contribución del genotipo apoE sobre los efectos que pueda causar una exposición perinatal a clorpirifós y sus posibles repercusiones a largo plazo. Dada la importante repercusión para la salud durante toda la vida de las exposiciones en edad infantil, a tóxicos en general y a plaguicidas OPs en particular, esta tesis doctoral continúa la línea de investigación de nuestro equipo, centrando su objeto de estudio en los efectos de exposiciones tempranas a clorpirifós.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal estudiar la influencia del genotipo apoE sobre los cambios inducidos por la exposición postnatal a clorpirifós a nivel físico, conductual y bioquímico a corto, medio y largo plazo, en ambos sexos. También se pretende estudiar la respuesta a la re-exposición a clorpirifós en sujetos adultos.

Los experimentos se realizaron en ratones transgénicos homocigotos para los alelos $\epsilon 3$ o $\epsilon 4$ del gen *APOE* humano, llevándose a cabo en dos fases experimentales, para estudiar los efectos durante el desarrollo y en la vida adulta.

2.2. Objetivos específicos

1. Valorar los efectos del genotipo apoE sobre parámetros post-parto y de desarrollo.

2. Estudiar los cambios físicos y neuromotores producidos por una exposición temprana a clorpirifós, durante el periodo de desarrollo postnatal, en función del sexo y del genotipo apoE (apoE3 y apoE4).

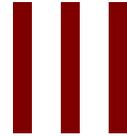
3. Valorar la actividad colinesterasa plasmática y colinesterasa cerebral tras la exposición a clorpirifós a corto, medio y largo plazo, en función del sexo y del genotipo apoE (apoE3 y apoE4).

4. Caracterizar las diferencias entre el genotipo apoE3 y apoE4 en la expresión génica de marcadores de detoxificación a nivel hepático y del sistema colinérgico a nivel cerebral, en ratones expuestos a clorpirifós durante el periodo postnatal, en función del sexo y la edad.

5. Estudiar los efectos producidos por una re-exposición a clorpirifós del quinto al séptimo mes de vida, en función del sexo y del genotipo apoE (apoE3 y apoE4), sobre el peso corporal y la ingesta de comida.

6. Caracterizar las diferencias entre el genotipo apoE3 y apoE4 sobre las conductas sociales, mediante la prueba de tres compartimentos de Crawley, tras una re-exposición a clorpirifós en machos adultos.

7. Estudiar los efectos del genotipo apoE, la exposición postnatal a clorpirifós y la re-exposición a clorpirifós en la edad adulta sobre el aprendizaje y memoria espacial en ratones de ambos sexos.



Metodología General

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

I. Animales

Para esta investigación se han utilizado ratones transgénicos portadores del gen humano *APOE*. Estos animales expresan la apoE humana en lugar de la propia, siguiendo los mismos patrones y niveles que los expresados en la población humana. Esta sustitución mantiene intacta las secuencias reguladoras requeridas para modular la apoE, permitiendo así el estudio de la neurobiología de las isoformas de la apoE humana (Sullivan et al., 2004).

Ratones machos y hembras adultos de 2 meses de edad C57BL/6NTac portadores del gen *APOE* humano, homocigotos para los dos alelos más frecuentes ($\epsilon 3$ y $\epsilon 4$), fueron suministrados por Taconic Biosciences (Germantown, EE.UU.). Los animales se mantuvieron en periodo de habituación durante 7 días. Después de esa semana se procedió al apareamiento de hembras y machos del mismo genotipo, durante una semana. El cruce se estableció entre 1 macho y 3 hembras. Después de 10 días, las hembras fueron pesadas e individualizadas ante un posible embarazo. El día del parto se denominó como DPN 0. Después de 28 días (DPN 28) se procedió al destete de las crías, alojando de 2 a 5 individuos del mismo sexo en jaulas estándar. Todos los animales se mantuvieron en una habitación del animalario con la temperatura mantenida a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, equipada con un ciclo automático día/noche (luz: 08:00-20:00 h) y una humedad relativa de $50 \pm 10\%$. A todos los animales se les suministró agua y comida estándar para ratones (Panlab, Barcelona, España) *ad libitum* en periodo de lactancia, y en la adultez en ciclos de no-tratamiento. La manipulación de los animales y los protocolos experimentales se aprobaron por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona, España) y se llevaron a cabo según el Real Decreto Español 53/2013 para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

2. Compuesto químico

El compuesto de estudio para el tratamiento de los animales fue el insecticida OP clorpirifós (CPF) (O,O-dietil-O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato al 99,9% de pureza,

suministrado por Sigma-Aldrich Química, Riedel-de Haën, Alemania). La administración de CPF se realizó de forma directa usando como vehículo de disolución aceite de girasol, o a través de la dieta utilizando dieta suplementada con este compuesto.

3. Tratamientos

La primera exposición a CPF se realizó durante la lactancia, mediante alimentación forzada a una disolución del compuesto en aceite de girasol. La dosis administrada fue de 1 mg/kg de peso corporal y ajustado para ser administrada con micro-pipeta en un volumen de 1 µl/g de peso corporal del animal. El periodo de tratamiento comenzó el DPN 10 y finalizó el DPN 15. Se eligió el DPN 10 para el comienzo del tratamiento, por ser el día de máximo crecimiento cerebral y desarrollo en los roedores (Watson et al., 2006). La dosis, para el estudio de la influencia de CPF en el desarrollo y a largo plazo, se ha escogido en base a trabajos previos (De Angelis et al., 2009; Ricceri et al., 2006; Ricceri et al., 2003; Venerosi et al., 2006). La segunda exposición al insecticida se efectuó en ratones adultos mediante una dieta estándar suplementada con CPF, procesada y suministrada por SAFE (Vannes, Francia). Este periodo de tratamiento se llevó a cabo al quinto mes de vida de los animales, durante 8 semanas consecutivas. La dieta se ajustó a 4 g/día, de manera que cada animal recibió la dosis final de 2 mg/kg/día, según estudios anteriores de nuestro laboratorio. Además, el tiempo de exposición coincide con efectos observados a nivel metabólico y neuroconductual (Peris-Sampedro et al., 2015a, 2015b). En su momento, esta dosis fue escogida por el equipo experimentador con la intención de hacer coincidir exposiciones experimentales con lo que pudiese ser una exposición diaria a CPF cercana a lo real, en humanos adultos (Peris-Sampedro et al., 2015a, 2015b). Para todos los tratamientos se administraron los vehículos para originar las poblaciones controles correspondientes a cada fase experimental.

4. Grupos de experimentación

Este estudio se realizó en dos fases de experimentación para alcanzar los objetivos propuestos. Las camadas y animales que conformaron las dos fases experimentales se resumen en el esquema de la **Figura 5**. Después del cruce (**Figura 5A**) y el parto, la pauta

de selección de las camadas que entraban en el proceso de exposición y su consiguiente monitorización, fueron aquellas que mantuvieron un número superior a 4 crías hasta el DPN 10. Asimismo, las camadas que no llegaban a cumplir este criterio se sacaron del experimento. Las camadas fueron aleatoriamente asignadas como camadas controles (camada control postnatal) o tratadas (camada tratada postnatal: CPF1) (Figura 5B) generando, de este modo, cuatro grupos diferentes (Figura 5C). Al cumplirse el quinto mes de vida, los ratones de cada una de las camadas se distribuyeron en jaulas de 2 a 5 ratones del mismo sexo, genotipo y tratamiento postnatal, conformándose finalmente 16 grupos (Figura 5D).

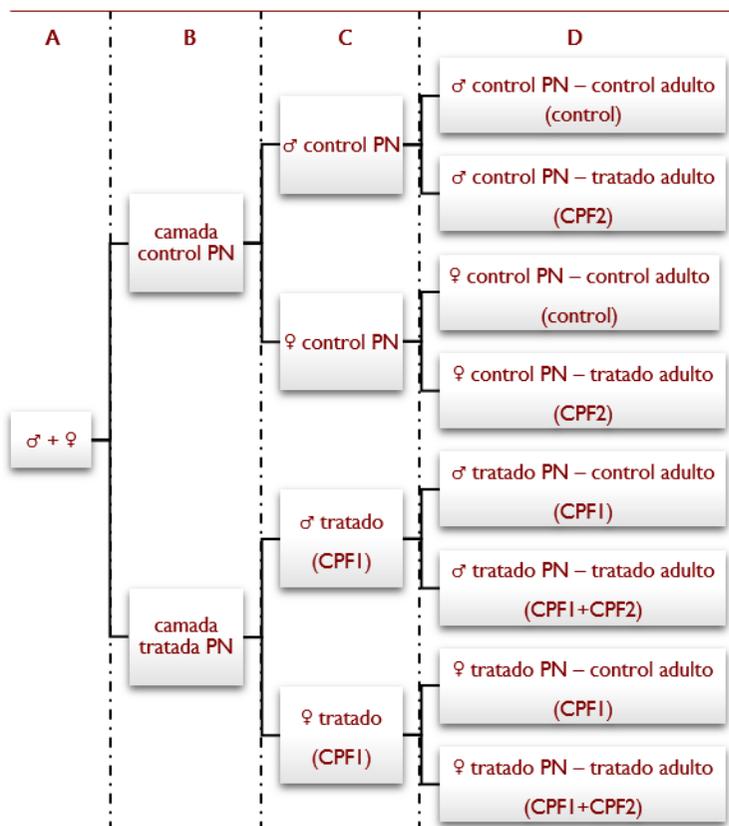


Figura 5. Grupos de tratamiento para cada genotipo. La primera pareja de cruce (A); las camadas conseguidas después del cruce, aleatorizadas para recibir el tratamiento postnatal (control PN y tratada PN), siendo vehículo y CPF, respectivamente (B); los animales después del destete, separados por sexo y tratamiento recibido (C); y los grupos de tratamiento para la re-exposición (D).

5. Planificación experimental

5.1. Fase experimental I: efectos en el desarrollo

Este estudio se realizó para valorar los efectos de la exposición a CPF en periodo de desarrollo y las posibles interacciones con el genotipo apoE y el sexo. La observación de los animales comenzó desde el DPN 0, correspondientes al día del parto, registrando el número total de crías de cada camada, tanto sujetos vivos como muertos. Esta vigilancia se llevó a cabo durante todo la lactancia, especialmente siendo cautos en los días post-tratamiento y entre el DPN 0 y DPN 4 por el gran índice de mortalidad sufrido en ese periodo y para la selección final de camadas a tratar con CPF. Durante el periodo comprendido entre el DPN 4 hasta el DPN 33 se realizaron diferentes pruebas para evaluar parámetros de desarrollo físico y neuromotor (sección 6). El protocolo de seguimiento de las crías se ejecutó en base a los resultados de un estudio realizado con ratones transgénicos apoE de nuestro laboratorio (Reverte et al., 2014a). En el DPN 15, 4 h después de la administración de la última dosis de tratamiento, y el DPN 30 se sacrificaron ratones escogidos al azar, para controlar los efectos del tratamiento mediante determinación de la actividad ChE en plasma y en cerebro, y para estudios de expresión génica en cerebro e hígado (ver en detalle en la sección 9). Finalizado el periodo de lactancia, después del destete (DPN 28), se controló la evolución del peso corporal de las crías hasta el quinto mes de vida. La evaluación física y el sacrificio de los animales se encuentran detallados en las secciones 6 y 8.1, respectivamente.

5.2. Fase experimental II: efectos en la edad adulta

Esta fase se diseñó para valorar los efectos a largo plazo de la exposición postnatal a CPF en ratones adultos apoE3 y apoE4, además de identificar la respuesta física y conductual a una re-exposición al insecticida en edad adulta durante 8 semanas desde el quinto a séptimo mes de vida. A los grupos experimentales asignados como CPF2 y CPF1+CPF2 (Figura 5D) se les administró una dieta suplementada con CPF 2 mg/kg/día y al resto de grupos una dieta estándar. Cada grupo estuvo conformado entre 8 a 10 animales. A todos los grupos de ratones machos se les evaluó en dos pruebas conductuales: tres compartimentos de Crawley y en el laberinto de Barnes. A las

hembras sólo se las evaluó en esta última prueba. Al mismo tiempo, se registró el peso de cada individuo y la ingesta de comida por jaula, semanalmente. Acabadas estas 8 semanas, se sacrificó a los animales y se recogieron muestras de cerebro, plasma e hígado para su estudio posterior. La evaluación física, la valoración conductual, el sacrificio de los animales y la preparación de las muestras, y las determinaciones bioquímicas están descritas en detalle en las secciones: **6.1, 7, 8.2 y 9.1** respectivamente.

6. Evaluación física a corto y a largo plazo

La evaluación de distintos parámetros físicos se realizó durante 7 meses, con el objetivo de registrar potenciales efectos producidos por la exposición postnatal a CPF y observar las diferencias a nivel de genotipo, sexo y las posibles interacciones de estos con el insecticida a lo largo de este periodo.

6.1. Peso corporal

El peso corporal en el periodo postnatal se registró el DPN 4, durante el periodo de tratamiento (DPN 10-15), y también el DPN 16 y el DPN 28.

Desde el DPN 28 el registro fue mensual. A partir del quinto mes, coincidiendo con el periodo de la re-exposición a CPF, el registro del peso se llevó a cabo una vez por semana, consecutivamente durante 8 semanas. Paralelamente, se estimó la comida diaria ingerida por cada animal, realizando el siguiente cálculo:

(comida suministrada semanal – comida sobrante semanal) ÷ (7 días x sujetos de la jaula)

6.2. Apertura de ojos

Se realizó un registro diario desde el DPN 12-16 puntuando el progreso de la apertura de ojo, en cada cría. El sistema de puntuación está detallado en la **Tabla 2**.

6.3. Desarrollo sexual

Desde el DPN 28-33 se valoró el desarrollo sexual en machos y hembras. En los machos se evaluó el descenso de los testículos y en las hembras la apertura vaginal. La puntuación de cada uno de los parámetros está especificado en la **Tabla 2**.

6.4. Evaluación neuromotora

La valoración sensorimotora y coordinación de los animales se realizó en el DPN 16, 24 h después de la última dosis de CPF, evaluándose: la fuerza de agarre, la capacidad de adherencia sobre un plano inclinado y la habilidad de trepar. Las crías demostraron estas destrezas sobre una rejilla metálica, y el registro de la ejecución se cumplió en base al protocolo de puntuación descrito en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Protocolo de puntuación de los parámetros físicos evaluados en las crías

Parámetro evaluado	Puntuación otorgada
Apertura de ojos	0 = ambos ojos cerrados 1 = primer ojo abierto
Fuerza de agarre	0 = la cría no ofrece resistencia 1 = la cría ofrece cierta resistencia agarrándose en la rejilla 2 = la cría ofrece buena resistencia agarrándose en la rejilla
Adherencia sobre un plano inclinado	0 = la cría cae de inmediato 1 = la cría cae antes de 15s 2 = la cría se mantiene agarrada durante 15s
Habilidad de trepar	0 = la cría cae de inmediato 1 = la cría sube hasta la mitad de la rejilla 2 = la cría sube hasta la parte superior de la parrilla
Descenso de los testículos	0 = sin presencia de los testículos cuando se presiona el abdomen 1 = testículos detectados a simple vista o presionando el abdomen
Apertura de la vagina	0 = sin orificio vaginal 1 = abertura vaginal

7. Valoración conductual

Los efectos a largo plazo de la exposición a CPF en la etapa postnatal sobre la conducta se valoraron a los 5 meses de vida en dos pruebas conductuales, evaluándose conductas sociales, aprendizaje y memoria espacial mediante dos paradigmas diferentes. En estas

dos pruebas se utilizó una video cámara (Sony CCD-IRIS) para grabar los movimientos y recorridos de los animales y un programa de detección (Etho-Vision® XT 11.5, Noldus Information Technologies; Wageningen, Holanda) para procesarlos y analizarlos posteriormente.

7.1. Tres compartimentos de Crawley

Tres compartimentos de Crawley es la prueba conductual que se realizó para estudiar la sociabilidad y la preferencia por la novedad, en ratones machos apoE3 y apoE4 sometidos a la exposición postnatal y a 15 días de re-exposición a CPF en adultos. Esta prueba se ejecutó en una cámara con tres compartimentos, adaptación del aparato desarrollado por Moy et al. (2004) para estandarizar déficits sociales en modelos animales de autismo y otros desordenes del neurodesarrollo.

7.1.1. Aparato y materiales

La cámara consiste en una caja rectangular de 45 x 15 x 30 cm de plástico grueso dividida en tres compartimentos, cada uno de ellos mide 15 x 15 x 30 cm (Figura 6A). El piso y las paredes externas están construidas con polimetilmetacrilato transparente liso (PL10011, Polimark; Monza, Italia). Cada pared interna tiene 1 puerta que mide 4,5 x 4,5 cm. Adicionalmente, hay 2 paredes removibles para colocarlas en las mismas puertas. Además, dos cubiletes cuadrados de rejilla metálicos e idénticos (7 x 7 cm) (Figura 6B) se usaron para que cada uno estuviera en cada compartimento lateral, y de manera invertida contener a los ratones desconocidos (Figura 6C) o a un objeto inanimado (rana roja mate de plástico), cuando fuera requerido (Figura 6D).

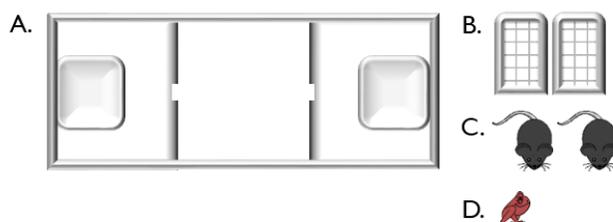


Figura 6. Diagrama de materiales y sujetos empleados en la prueba tres compartimentos de Crawley. La cámara de los tres compartimentos con los cubiletes metálicos vista de planta (A); los cubiletes de rejilla metálicos (B); dos ratones desconocidos del mismo sexo y tamaño que el sujeto evaluado para eliminar estímulos distractores de dominancia y/o sexuales, se utilizaron como estímulo social y de novedad, respectivamente (C); y una rana de plástico color rojo mate como el objeto inanimado elegido para observar los comportamientos no-sociales de los individuos valorados (D)

7.1.2. Procedimiento

La prueba se realiza en 3 fases (Figura 7). La primera es la habituación al nuevo espacio, donde se permite al animal la exploración libre de la cámara durante un periodo de 10 min (Figura 7A). Asimismo, para que se familiarice completamente, los cubiletes vacíos se dejan en cada uno de los compartimentos (derecho e izquierdo). Al finalizar la fase de habituación, el animal se traslada sutilmente al compartimento central, cerrando las puertas de éste. La segunda fase consiste en observar las conductas de socialización (Figura 7B). En un compartimento, elegido aleatoriamente, se coloca un ratón desconocido para el individuo (compartimento social) y en el otro compartimento el objeto inanimado (compartimento no social). Se comienza abriendo las puertas del compartimento central, de manera que se deja al ratón libre de movimiento dentro de la cámara durante 6 min. La tercera y última fase sirve para valorar preferencias por la novedad (Figura 7C). El ratón desconocido de la fase de la socialización, en el mismo cubilete, se mantuvo en su compartimento (compartimento conocido), mientras que el objeto inanimado se sustituyó por un nuevo animal (compartimento novedad). Se posicionó al individuo en el compartimento central con las puertas abiertas, quedando el animal libre de movimiento dentro de la cámara durante 6 min. Al finalizar la prueba, la caja se limpiaba cuidadosamente con etanol 70%, tanto los compartimentos como los cubiletes, para poder comenzar una nueva prueba.

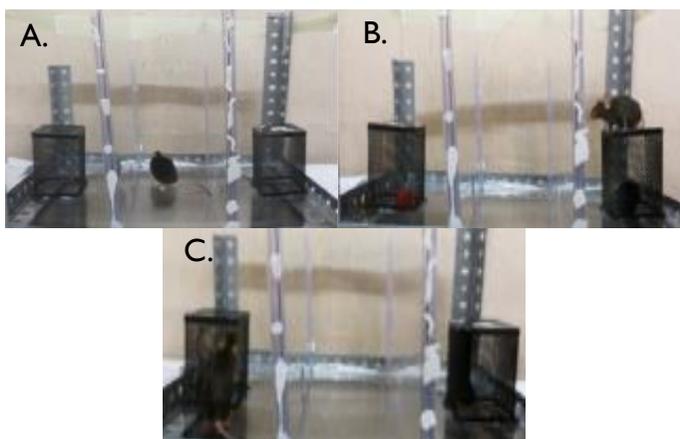


Figura 7. Fotografías representativas de las 3 fases experimentales de la prueba tres compartimentos de Crawley. La habituación al nuevo espacio que otorga al animal libre movimiento para que explore los tres compartimentos durante 10 min (A); en la socialización se observó la conducta del sujeto analizado frente a un ratón desconocido y un objeto inanimado (B); y en la preferencia por la novedad, se evaluó la predilección por el ratón conocido en la etapa anterior u otro totalmente desconocido (C).

7.1.3. Parámetros analizados

Los parámetros escogidos para valorar las diferentes conductas están descritos en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Parámetros evaluados en la prueba tres compartimentos de Crawley

Fase	Parámetro evaluado	Descripción
Habitación	Tiempo en compartimentos (s)	Todos los compartimentos
	Entradas a compartimentos laterales	Media de los 2 compartimentos laterales
Socialización	Entradas a compartimentos laterales	Media de los 2 compartimentos laterales
	Latencia mínima (s)	Tiempo mínimo de salida del compartimento central
	Tiempo en compartimentos (s)	Social No social
	Exploración social	$(\text{Tiempo social} - \text{tiempo no social}) \div (\text{Tiempo social} + \text{tiempo no social})$
Preferencia por la novedad	Entradas a compartimentos laterales	Media de los 2 compartimentos laterales
	Latencia mínima (s)	Tiempo mínimo de salida del compartimento central
	Tiempo en compartimentos (s)	Novedad Conocido
	Exploración de la novedad	$(\text{Tiempo novedad} - \text{tiempo conocido}) \div (\text{Tiempo novedad} + \text{tiempo conocido})$

7.2. Laberinto de Barnes

La segunda prueba conductual se llevó a cabo para evaluar memoria y aprendizaje espacial en ratones machos y hembras apoE3 y apoE4 sometidos a la exposición postnatal y a 30 días de re-exposición a CPF mediante el laberinto de Barnes (Barnes, 1979). Esta tarea se elaboró en base a la tendencia intrínseca de los individuos por escapar de entornos aversivos y en la memoria de referencia espacial dependiente de hipocampo (Harrison et al., 2009)

7.2.1. Aparato y materiales

La prueba se ejecuta en un tablero circular de 92 cm de diámetro, de metacrilato color blanco, elevado a 1 m del suelo. El tablero posee 20 agujeros circulares, cada uno de 4,5 cm de diámetro, situados uniformemente a 2,5 cm del borde del tablero (Figura 8A). Virtualmente, un número del 1 al 20 se asigna, por orden, a cada agujero. El primero es el agujero objetivo y con los dos agujeros contiguos, es decir 2 y 20, conforman la zona objetivo (ver en detalle en sección 7.2.2). El sistema también dispone de una caja negra desmontable de 16 x 8 x 8 cm con dos peldaños pequeños para el acceso fácil del animal (Figura 8B), localizada bajo el agujero objetivo. Una luz brillante e intensa se utiliza para alentar a los ratones a escapar hacia dentro de la caja oscura. Un cilindro hermético de color gris se usa para posicionar a los sujetos en el centro del tablero antes de comenzar los ensayos (Figura 8C). Asimismo, para acostumar a los animales al agujero objetivo se emplea un cubilete rectangular de 10 x 10 x 10 cm (Figura 8D).

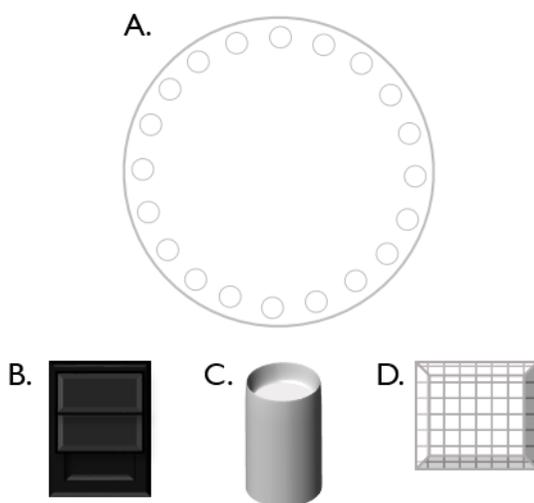


Figura 8. Diagrama de materiales empleados en el laberinto de Barnes. El tablero circular con los 20 agujeros alrededor del perímetro visto de planta (A); la caja oscura utilizada para el escape de los animales (B); el cilindro usado para contener al ratón antes de que comience cada ensayo (C); y el cubilete transparente donde se introduce al ratón para habituarlo a entrar a la caja de escape (D).

7.2.2. Procedimiento

La prueba se realiza en 3 fases y se desarrolla en 12 días. El primer día se efectúa la habituación al tablero, donde el sujeto tiene 15 min para familiarizarse con el nuevo ambiente, moviéndose libremente por él, sin caja de escape adosada al tablero.

Virtualmente se asigna una zona central de 72 cm de diámetro y una zona periferia (10 cm de diámetro). El segundo día se realiza la habituación a introducirse a la caja de escape. El ratón se coloca sobre el agujero objetivo y, encima de él, se le pone el cubilete rectangular (Figura 8D), reduciendo la movilidad del animal, con el objetivo que recorra sólo la zona mencionada y entre a la caja. Esta etapa dura un total de 5 min. Al terminar el tiempo, si el animal no consigue entrar a la caja de escape, se le sitúa sutilmente dentro durante 60 s; si dentro de este periodo el animal entraba a la caja de escape, igualmente se le dejaba allí por 60 s. La adquisición de la prueba se realiza en los siguientes nueve días. Durante este periodo, los animales se someten a una sesión diaria de dos ensayos de 120 s cada uno, con un intervalo entre estos de 2 h. Se inicia siempre después de que el animal se ubica en el centro del laberinto. Desde esa posición, al ratón se le permite mover libremente por el tablero. El ensayo termina cuando entra en la caja de escape o cumplidos los 120 s cuando sutilmente se traslada a la caja de escape. En ambos casos, al ratón se mantiene allí durante 30 s después del final de cada ensayo, antes de ser devuelto a su jaula. El tablero se gira entre cada ensayo 45° y en sentido de giro de las agujas del reloj, para evitar señales y pistas proximales presentes en el propio tablero, asegurando así un aprendizaje dependiente de hipocampo y por consiguiente, la correcta adquisición de la tarea. Además, el agujero objetivo y la caja de escape siempre se mantienen en una posición fija, con respecto a las señales externas del tablero (Figura 9). Para eliminar cualquier rastro de olor, el tablero y la caja de escape se limpian con etanol 70% después de cada ensayo. La fase de retención de la prueba se realiza 24 h después del último ensayo de adquisición. Consiste en una sesión de 90 s de exploración libre sin la caja de escape.

7.2.3. *Parámetros analizados*

Los parámetros escogidos para evaluar las diferentes conductas están descritos en la Tabla 4 y están basados en un estudio anterior realizado por nuestro laboratorio (Peris-Sampedro et al., 2015a).

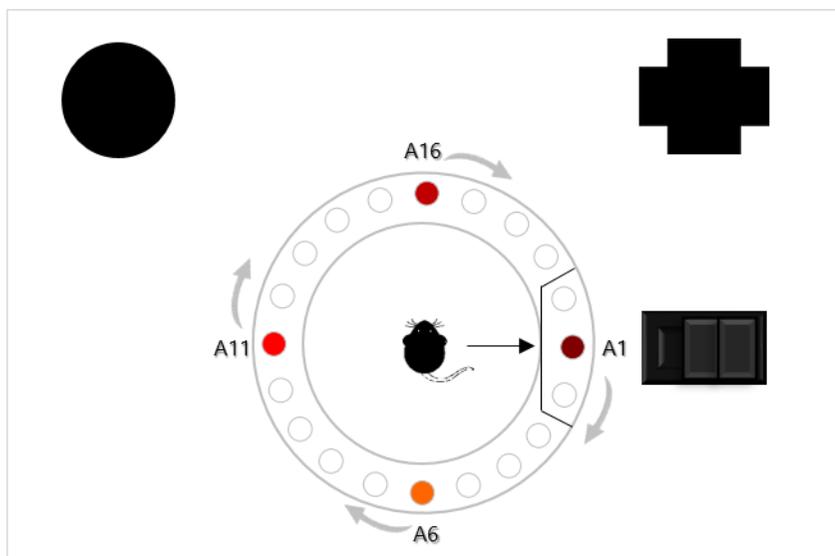


Figura 9. Diagrama de procedimiento del laberinto de Barnes. El círculo, que delimita las zonas central y periferia, y la flecha que indica la zona objetivo que comprende el agujero objetivo y sus dos agujeros adyacentes. La caja de escape se posiciona bajo A1. Al acabar cada ensayo el tablero se rota 45°, pasando a ser A16 el agujero donde se encontraba la caja de escape, y así sucesivamente (es decir, A11, A6, etc.). La posición de la zona y el agujero objetivo se mantuvo por las señales externas al tablero, que en este experimento fueron una cruz y un círculo negro, arriba de él.

Tabla 4. Parámetros evaluados en el laberinto de Barnes

Fase	Parámetro evaluado	Descripción	
Habitución	Distancia recorrida total (cm)	Fraccionada en periodos de 5 min	
	Distancia recorrida (cm)	Espacio central	
	Tiempo (s)	Espacio central	
	Velocidad (s)	Espacio central	
Adquisición	Distancia recorrida (cm)	Tablero completo	
	Tiempo (s)	Tablero completo	
	Estrategias de búsqueda		<i>Aleatoria</i> (el ratón muestra una búsqueda arbitraria con múltiples cruces a través del centro del tablero)
			<i>Serial</i> (el ratón gira alrededor del borde del tablero, cruzando al menos tres agujeros próximos antes de entrar en el agujero objetivo)
		<i>Espacial</i> (el ratón se mueve directamente hacia el agujero objetivo desde el centro del tablero)	
Retención	Tiempo (s)	Cuadrante objetivo	
	Exploración agujero objetivo	(Frecuencia de entrada a agujero objetivo) ÷ (Frecuencia de entrada a todos los agujeros)	

8. Sacrificio de los animales y preparación de muestras

8.1. Procedimiento en crías

Con el objetivo de valorar los efectos de la exposición postnatal, se sacrificaron crías a los 15 y 30 días de edad para la recolección de muestras biológicas, a las 4 h después de la última dosis de tratamiento y a los 15 días después de ésta. El sacrificio realizado 4 h después de la administración de CPF, se estableció considerando diversos estudios que indican este intervalo de tiempo el necesario para alcanzar el pico máximo de los efectos de este compuesto (Dam et al., 2000; Moser et al., 1998; Moser and Padilla, 1998; Pope et al., 1991). Los animales se sacrificaron mediante exanguinación previa anestesia inhalatoria con isoflurano (Vetflurane[®] 1000 mg/g; Virbac, Esplugues de Llobregat, España). Al ser animales de bajo peso (5 a 10 g) y pequeña estatura (5 a 7 cm) se siguió una serie de pasos para la recolección de sangre: se comprobó la correcta anestesia valorando el patrón respiratorio enlentecido y la relajación de esfínteres; se orientó el animal en decúbito supino, con la cabeza a 30° de su eje en dirección derecha; se extendió el cuello y, usando el ángulo mandibular como guía, se rasuró de la zona izquierda hasta la clavícula; se cortó hasta hacer visible la vena yugular; se realizó un pequeño corte en ésta, en la zona más próxima al cuello, donde se colocó el recolector del tubo con anticoagulante EDTA (K2E tubes, BD Microtainer; Franklin Lakes, EE.UU.) para la extracción. Para las crías de DPN 15 el volumen disponible fue de 0,1 a 0,25 mL; para los de DPN 30 se obtuvo de 0,25 a 0,5 mL. Al finalizar la extracción, se procedió a centrifugar la sangre para separar el plasma a 10000 g durante 20 min a 4°C (centrífuga Sigma 2-16 PX[®], SciQuip; Newtown, Gales). Después de la exanguinación del animal, se decapitó con una tijera mediana y se extrajo cuidadosamente el cerebro completo, recolectando el cerebro anterior. La disección de esta área se realizó en placas Petri con bisturí estéril y siempre en hielo seco. Para obtener hígado, se localizó la región abdominal y se extrajo completamente. Estos dos tejidos se guardaron en criotubos, libres de ARNasas, (Cryo.S[™], Greiner Bio-One; Monroe, EE.UU.) y se congelaron al instante en nitrógeno líquido. Posteriormente, las muestras obtenidas se guardaron a -80°C hasta su posterior análisis.

8.2. Procedimiento en adultos

Para valorar en adultos los efectos a largo plazo de la exposición postnatal y los derivados de la re-exposición a CPF, se sacrificaron los ratones a sus 7 meses de edad, después de un ayuno de 3 h, previa determinación de la glicemia en un glucómetro (Freestyle®, Abbott; Chicago, EE.UU.). Los animales se anestesiaron con isoflurano (Vetflurane® 1000 mg/g; Virbac, Esplugues de Llobregat, España) vía inhalatoria. Después de comprobar la correcta anestesia valorando el patrón respiratorio enlentecido y respiratorio enlentecido y la arreflexia tras la estimulación sensitiva, se efectuó la extracción de sangre mediante punción cardíaca. Se obtuvo un volumen de 0,9 a 1 mL de sangre completa en tubos con anticoagulante EDTA (K2E tubes, BD Microtainer; BD Medical Technology, Franklin Lakes, EE.UU.). La sangre recolectada se centrifugó para separar el plasma a 10000 g por 20 min a 4°C. A continuación, se procedió a la disección del animal, extrayendo cuidadosamente cerebro completo para separar estriado y corteza frontal. El proceso de disección se realizó sobre placas Petri rellenas de hielo. Todas las muestras extraídas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, las muestras obtenidas se guardaron a -80°C hasta su posterior análisis.

9. Determinaciones bioquímicas

9.1. Determinación de la actividad ChE

Se analizó la actividad ChE plasmática y cerebral en muestras de crías del DPN 15 y DPN 30, y adultos de 7 meses de edad.

La actividad ChE durante la etapa del desarrollo se determinó en un total de 64 muestras de cerebro y 64 muestras de plasma, disponiendo de una n=4 para cada grupo. En adultos, se determinó en un total de 89 muestras de cerebro y 89 muestras de plasma, disponiendo de una n=5-6 para cada grupo.

9.1.1. ChE cerebral

La actividad de ChE en cerebro de las crías, se realizó en el tercio medio del cerebro anterior incluido el núcleo estriado, dejando el tercio anterior para el análisis de la

expresión génica (ver en detalle en sección 9.2). En adultos, la actividad ChE se determinó en estriado y corteza frontal. El cerebelo no se consideró para las determinaciones de marcadores colinérgicos, puesto que al ser tan dispersa la innervación colinérgica en esta región proporcionaría valores muy bajos, no viéndose reflejadas las diferencias en actividad o expresión (Dam et al., 1999). A su vez, si bien CPF inhibe ambas ChEs (AChE y BChE), se decidió analizar la actividad cerebral AChE, refiriéndose en el texto como ChE cerebral, puesto que BChE representa una pequeña fracción de la actividad cerebral total de ChE (Lassiter et al., 1998; Linardaki et al., 2013) y por lo tanto su contribución a la actividad total de la enzima en el cerebro es mínima.

El tejido se homogeneizó con Tritón X-100 al 1% en PBS 0,1 M a pH 7,6 en una concentración final de homogeneizado al 10% p/v, con la ayuda de un homogeneizador de vidrio de borosilicato de 5 mL (Comercial Belles, Tarragona, España) siempre en hielo. El homogeneizado se centrifugó a 15000 g durante 10 min a 4°C y se separó el sobrenadante.

La actividad ChE se determinó mediante un ajuste del método espectrofotométrico de Ellman (Ellman et al., 1961; Peris-Sampedro et al., 2016; Salazar et al., 2011). Este método se basa en el uso de la acetilcolina (tioanálogo de la acetilcolina) como sustrato de la reacción, en la cual el ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) reacciona con la tiocolina oxidando los grupos tioles, formando el conjugado DTNB-tiocolina y al anión 5-tio-2-nitrobenzoato. Este último, es un cromóforo de color amarillo con un máximo de absorbancia de 412 nm. La relación anión, conjugado y tiocolina es 1:1:1, por lo que la concentración del anión permite conocer la concentración de tiocolina liberada por unidad de tiempo. La reacción se realizó utilizando DTNB (Sigma-Aldrich Química; Riedel-de Haën, Alemania) a una concentración final de 1,3 mM en tampón fosfato a pH 7,3 y acetilcolina iodada (Sigma-Aldrich Química, Riedel-de Haën, Alemania) a una concentración final de 6 mM en solución de tampón fosfato a pH 7,3, en condiciones termostatazadas. La lectura de absorbancia se efectuó a 405 nm, durante 1 min en el autoanalizador COBAS MIRA® (Hoffman-La Roche & Co., Basilea, Suiza). Todas las reacciones se realizaron por duplicado.

La actividad ChE se expresa en U de enzima por miligramo de proteínas (U/mg de proteínas), considerando el coeficiente de extinción molar de $1,36 \times 10^4 \text{ L/mol} \times \text{cm}^{-1}$.

9.1.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en los homogeneizados de cerebro se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). El fundamento del método consiste en la unión del colorante Comassie Blue G-250 (Serva Blue) a las proteínas, formando un complejo que presenta absorbancia máxima a 595 nm. En una placa de 96 pozos se añadieron las muestras y se elaboró una recta patrón con albúmina de 0,125, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 a 2 mg/mL, a partir de un kit comercial suministrado por BioRad (Hercules, EE.UU.). La reacción se realizó utilizando el reactivo de Bradford BioRad (Hercules, EE.UU.) y la lectura de la placa se efectuó a 595 nm en un lector de microplacas (PowerWave® X52; Biotek, Winooski, EE.UU.). Todas las reacciones se realizaron por duplicado. Mediante los datos de absorbancia de la recta patrón se extrapoló la cantidad de proteínas de cada muestra, expresándose finalmente en mg/mL.

9.1.3. ChE plasmática

La actividad ChE plasmática se determinó con el método Ellman utilizando un kit comercial provisto por QCA (Química Analítica Clínica S.A., QCA, Amposta, España). En la reacción se utilizó la butiriltiocolina en su forma de sal yodada a una concentración de 6 mM, DTNB a 0,26 mM y un tampón fosfato a 50 mM pH 7,4. La reacción se efectuó a una temperatura constante de 37°C. La lectura se realizó a 405 nm, siguiendo las indicaciones del proveedor comercial, en el autoanalizador COBAS MIRA® (Hoffman-La Roche & Co., Basilea, Suiza). Todas las reacciones se efectuaron por duplicado. La actividad enzimática se expresó en U/L.

9.2. Análisis de expresión génica

Para evaluar los efectos del genotipo apoE, el sexo y el tratamiento se analizó la expresión génica en las crías de DPN 15 y DPN 30, mediante la técnica de retrotranscripción y PCR en tiempo real (qPCR). Los genes evaluados están indicados

en la **Tabla 5 y 6**. Para efectos de este texto, se hablará de expresión utilizando la nomenclatura de la proteína correspondiente.

Todos los equipos utilizados en este análisis son del Servicio de Recursos Científicos y Técnicos (SRCiT) de la Universidad Rovira i Virgili.

Tabla 5. Listado de genes evaluados en hígado con secuencia de *primer* utilizado

Nombre del gen	Proteína (abreviatura)	Referencia	Forward Primer	Reverse Primer
<i>APOE</i>	Apolipoproteína E humana (apoE-H)	(Laffitte et al., 2001)	GTGGAGCA AGCGGTGG AGAC	GAGCTGAG CAG CTCCTCCTG
<i>Bche</i>	Butirilcolinesterasa (BChE)	(García-Gómez et al., 2015)	TAGCACAA TGTGGCCT GTCT	ATTGCTCCA GCGATGAAA TC
<i>Pon1</i>	Paraoxonasa-1 (PON1)	(Ali et al., 2003)	TTGCTGCA CTTGTCCA TCCTC	ACTGCTGGC TCCTTCTTG TTC
<i>Pon2</i>	Paraoxonasa-2 (PON2)	(Boesch-Saadatmandi et al., 2009)	ATGGTGGC TCTGAGTTT G	TCCTCAGCT CCAGTTTCG AT
<i>Pon3</i>	Paraoxonasa 3 (PON3)	(Shih et al., 2007)	GATCTGAA TGAGCAAA ACCCAGAG GC	GAGTCCATG TTGGGGTGA TTCACGAC
<i>Gapdh</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	(Yao et al., 2016)	ACAACCTTT GGCATTGT GGAA	GATGCAGG GATGATGTT CTG

9.2.1. Extracción del ARN

La extracción de ARN se realizó en 64 muestras (n=4 por grupo) del tercio anterior del cerebro anterior y en 64 muestras (n=4 por grupo) de hígado. Durante todo este procedimiento se utilizó la solución RNaseZap® (Thermo Fischer Scientific; Waltham, EE.UU) para la limpieza de las superficies e instrumentos, y se trabajó con reactivos, tubos y puntas de pipetas libres de ARNasas. El primer paso para este proceso fue la homogeneización de las muestras, las cuales se pulverizaron en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido. Obtenido el polvo, y con la precaución de que se mantuviera congelado, se trasladó a un recipiente de plástico donde se le añadió solución

desnaturalizadora al 10% p/v para su homogeneización. El lisado se centrifugó a 4500 g durante 3 min a 4°C, y se separó el sobrenadante. La segunda etapa consistió en la extracción con solventes orgánicos. Al sobrenadante se le añadió igual volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se mezcló en vórtex durante 1 min, se conservó 5 min en hielo y, después, se centrifugó durante 5 min a 12000 g y a 4°C, recuperándose la fase acuosa. Se le agregó igual volumen de partida de ácido fenólico:cloroformo, se mezcló en vórtex por 1 min y se repitió el proceso anterior de conservación y centrifugación. A este último preparado, se le añadió su mismo volumen en isopropanol, se mezcló y se conservó un mínimo de 30 min a -20°C. Finalmente, se centrifugó durante 15 min a 12000 g, se retiró el sobrenadante por decantación y, cuidadosamente, se continuó el proceso con el pellet formado. Las sales residuales del proceso de extracción se lavaron con etanol 70%. El ARN se recuperó por centrifugación a 10 min a 3000 g a 4°C y eliminando el etanol del sobrenadante. El ARN se resuspendió con 100 µL con agua DEPC y se agitó en vórtex hasta completa disolución. Las muestras obtenidas se conservaron a -80°C hasta posterior manipulación. A continuación, se procedió a eliminar el ADN residual mediante el kit DNA-free (AM 1906; Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.). Para esto se añadió enzima ADNasa y tampón presente en el kit a las muestras de ARN, mezclándolo cuidadosamente e incubando a 37°C durante 30 min. Después, se agregó el reactivo de inactivación de ADNasa, incubándose 2 min a temperatura ambiente, mezclando ocasionalmente. Finalmente, se centrifugó a 10000 g durante 1,5 min y se recogió el sobrenadante, el cual contiene el ARN.

9.2.2. Evaluación de la cantidad y calidad del ARN

La concentración de ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) y la pureza con los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230, usando el equipo NanoDrop 2000 Thermo Scientific (Thermo Fischer Scientific; Waltham, EE.UU.).

Por otra parte, también se evaluó la calidad del ARN mediante una electroforesis microfluída con el kit Agilent RNA 6000 Nano kit y el equipo Bioanalyzer Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.) según protocolo del fabricante. El Número de Integridad de ARN (RIN) se calculó en las 128 muestras, entrando todas en el rango de valor de RIN correcto a excelente (RIN>6 a RIN>8,5).

Tabla 6. Listado de genes evaluados en cerebro con secuencia de *primer* utilizado

Nombre del gen	Proteína (abreviatura)	Referencia	Forward Primer	Reverse Primer
<i>Chat</i>	Colinacetiltransferasa (ChAT)	(García-Gómez et al., 2015)	TGTCATCGT GGCCTGCT GCAA	CTCGCTCC TCCCGTCT GACGT
<i>Slc18a3</i>	Transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT)	(Yamamuro and Aizawa, 2010)	TCACTCACT TGGCTTTG AGC	GGTTCATC AAGCAGCA CATC
<i>Chrm1</i>	Receptor muscarínico m1 (M1)	(Laspas et al., 2015)	TGACAGGC AACCTGCT GGTGCT	AATCATCA GAGCTGCC CTGCGG
<i>Chrm2</i>	Receptor muscarínico m2 (M2)	(Laspas et al., 2015)	CGGACCAC AAAAATGG CAGGCAT	CCATCACC ACCAGGCA TGTTGTTGT
<i>Chrm3</i>	Receptor muscarínico m3 (M3)	(Laspas et al., 2015)	CCTCTTGA AGTGCTGC GTTCTGAC C	TGCCAGGA AGCCAGTC AAGAATGC
<i>Chrm4</i>	Receptor muscarínico m4 (M4)	(Laspas et al., 2015)	TGTGGTGA GCAATGCC TCTGTCATG	GGCTTCAT CAGAGGGC TCTTGAGG A
<i>Chrm5</i>	Receptor muscarínico m5 (M5)	(Laspas et al., 2015)	ACCACTGA CATACCGA GCCAAGCG	TTCCCGTT GTTGAGGT GCTTCTAC G
<i>Ache</i>	Acetilcolinesterasa isoforma-S (AChE-S)	(Dori et al., 2011)	CTGAACCT GAAGCCCT TAGAG	CCGCCTCG TCCAGAGT AT
<i>Ache</i>	Acetilcolinesterasa isoforma-R (AChE-R)	(Dori et al., 2011)	GAGCAGGG AATGCACA AG	GGGGAGGT GGAGAAGA GAG
<i>Gapdh</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	(Yao et al., 2016)	ACAACCTTTG GCATTGTG GAA	GATGCAGG GATGATGTT CTG

9.2.3. Retrotranscripción de ARN a ADNc

La retrotranscripción se llevó a cabo con 13 µl del producto de ARN libre de ADN y con los componentes del kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor Isolation (Thermo Fischer Scientific, Waltham, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante a un volumen final de 20 µl.

9.2.4. Secuencia y concentración de primers

La secuencia de los *primers* se revisó con las herramientas Primer3 (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser et al., 2012) y Primer-Blast (Ye et al., 2012), comprobando su especificidad, la temperatura de fusión adecuada para las condiciones de PCR, y la no formación dímeros de *primer*.

Se valoró la concentración idónea de cada pareja de *primers* para la PCR cuantitativa. En hígado: 200nM en PON1, PON2, PON3, BChE, GAPDH y 400nM en apoE-H. En cerebro: 200nM en M1, M2, M4, M5, ChAT, VACHT, AChE-S, GAPDH y 400nM M3, AChE-R.

9.2.5. qPCR

El ADNc se diluyó a un volumen final de 200 μ L con agua libre de nucleasas (Ambion; Thermo Fischer Scientific, Waltham, EE.UU.). Cada reacción de PCR cuantitativa contenía 2 μ L de este ADNc diluido, 5 μ L de Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, Waltham, EE.UU.), el volumen necesario de cada *primer* y agua hasta completar un volumen final de 10 μ L. En todas las muestras, se evaluó la expresión del gen diana y del gen de referencia (GAPDH) por triplicado. Las muestras se repartieron en placas de 384 pozos para el desarrollo de la reacción de la PCR cuantitativa en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems®; Thermo Fischer Scientific, Waltham, EE.UU.). Se repitió una misma muestra por algunos genes en cada placa para evaluar la variación entre ensayos.

Para la obtención de los valores de expresión relativa se empleó el valor de ciclo de PCR umbral (Ct) de cada pozo. Entre triplicados, se descartaron los que superaron una desviación estándar de 0,5 unidades de Ct, y con los valores restantes de Ct se calculó la media por gen y muestra. Los resultados se trataron con el programa computacional Expression Suite v1.0 de Life Technologies (Thermo Fischer Scientific, Waltham, EE.UU.). Los resultados se expresaron en delta Ct (Δ Ct), que es el resultado de restar la Ct media de un gen diana de una muestra menos la Ct media del gen de referencia de la misma muestra. Para efectos estadísticos se calculó la $2^{-\Delta$ Ct} para cada muestra.

10. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS v.22. Para el análisis del periodo postnatal se empleó como unidad de estudio la camada, y el sexo se consideró un factor intra-camada para los parámetros de monitoreo, exceptuando la maduración sexual y las determinaciones bioquímicas y moleculares, en las cuales se evaluaron los dos sexos de manera independiente. Para todos los casos, el genotipo y el tratamiento postnatal se analizaron como factores inter-sujetos. En la segunda fase experimental se consideró como unidad de estudio cada animal, evaluando el sexo, el genotipo, el tratamiento postnatal y el tratamiento adulto como factores inter-sujetos. En determinados casos, se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas, utilizando el periodo de tiempo específico de cada parámetro como factor de repetición. Los análisis de la homogeneidad de la varianza se ejecutaron mediante una prueba de Levene, en caso de varianzas no homogéneas se aplicaron pruebas no paramétricas. También, se utilizó el análisis multivariado de la varianza (MANOVA) para estudiar variables relacionadas; el ANOVA de uno o más factores inter-sujetos; el t-test para una muestra y el t-test para medidas relacionadas en casos específicos. Tras los ANOVA las diferencias entre grupos se analizaron mediante el análisis *post-hoc* Tukey para corregir las múltiples comparaciones. El cálculo de la eta al cuadrado (η^2) se realizó en base a la suma de cuadrados tipo III dividido por la suma de cuadrados tipo III del total corregido de cada factor facilitado por el ANOVA de dos o más factores. Este valor se agregó en la sintaxis de cada efecto inter-sujeto de este análisis. Además, se expresó en el texto como un porcentaje de la varianza observada. La significación estadística fue definida para un valor de $p < 0,05$ y todos los valores se expresaron como la media \pm E.E.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

IV

Fase Experimental I

Efectos en el periodo postnatal

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

I. Resultados

La primera fase experimental abarcó la valoración de los efectos de la exposición a CPF 1 mg/kg/día desde el DPN 10-15 en ratones transgénicos apoE3 y apoE4 en diferentes parámetros de desarrollo físico, neuromotor y bioquímico. La unidad de estudio fue la camada, y el sexo se consideró un factor intra-camada para los parámetros de monitoreo, exceptuando el caso de la maduración sexual. Asimismo, los parámetros bioquímicos se evaluaron de forma independiente en los 2 sexos (Figura 10). Los animales estudiados se distribuyeron en: grupo control (**control**) y grupo expuesto a 1 mg/kg/día de CPF durante el periodo postnatal (**CPF1**).

Los resultados de esta fase se presentarán en el siguiente orden:

Efectos del genotipo sobre factores post-parto: tamaño de la camada, proporción de machos, índice de viabilidad, índice de lactancia.

Evaluación de parámetros físicos: peso corporal, apertura de ojos, desarrollo sexual.

Evaluación neuromotora: fuerza de agarre, adherencia sobre un plano inclinado, habilidad de trepar.

Análisis de expresión génica: marcadores hepáticos y cerebrales.

Actividad ChE: plasmática y cerebral.

Peso corporal del primer a quinto mes: en ambos sexos.

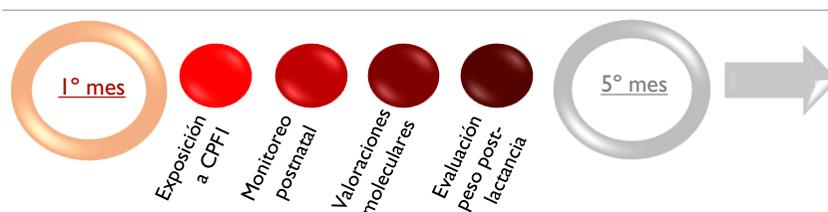


Figura 10. Esquema de la fase experimental I dentro de la línea de tiempo de la investigación.

Efectos del genotipo sobre factores post-parto

Los efectos del genotipo sobre factores post-parto se estudiaron en 36 camadas, 17 apoE3 (controles=9; tratadas=8) y 19 apoE4 (controles=10; tratadas=9). En éstas se observó el tamaño de camada, la proporción de machos, el índice de viabilidad y el índice

de lactancia (Tabla 7). Mediante un ANOVA, se observó un efecto general del genotipo sobre el tamaño de camada [$F(1,35)=5,224$ $p=0,025$], mostrando que nacieron más individuos por camada del genotipo apoE3 que del genotipo apoE4. No se observaron diferencias en los otros parámetros descritos.

Tabla 7. Características post-parto de las camadas monitorizadas

	apoE3	apoE4
Tamaño de camada	8,71 ± 0,40*	7,58 ± 0,30*
Proporción de machos	0,52 ± 0,05	0,49 ± 0,05
Índice de viabilidad	0,89 ± 0,04	0,90 ± 0,03
Índice de lactancia	0,96 ± 0,03	1,00 ± 0,00

Diferencia entre genotipos está representada con un asterisco a $p<0,05$.

Evaluación de parámetros físicos

A partir del DPN 4 hasta el DPN 33 de vida, se evaluó el peso corporal, la apertura de ojos y el desarrollo sexual de cada camada.

Peso corporal

Se observó el peso corporal de los individuos, desde el DPN 4-28 (Figura 11). A través de un ANOVA de dos factores (genotipo y tratamiento postnatal) para medidas repetidas, utilizando la edad como factor de repetición y el sexo como factor intra-camada, se observó un efecto significativo de la edad [$F(8,25)=151,565$, $p<0,008$], indicando el aumento de peso en todos los sujetos, a lo largo del tiempo. También, el análisis mostró una interacción entre el sexo y genotipo [$F(1,32)=7,508$, $p=0,008$], revelando que ambos sexos presentaron diferencias en su crecimiento en función del genotipo. Por este motivo, se estudió cada edad en función del sexo y genotipo, observándose diferencias sólo en el DPN 4 [$F(1,71)=3,302$, $p=0,025$]. El análisis *post-hoc* mostró que los machos apoE4 son más grandes que los apoE3 a esa edad. No se encontraron diferencias en las demás edades, ni entre hembras. Por otro lado, la Figura 12 muestra el incremento de peso corporal en tres periodos: DPN 4-10, DPN 10-15 y DPN 16-28, con el objetivo de detectar diferencias en el crecimiento en las etapas pre-tratamiento, tratamiento y post-tratamiento, respectivamente. Mediante un ANOVA de dos factores (genotipo y tratamiento postnatal), se observó un efecto general del

genotipo en las hembras [$F(1,35)=4,898$, $p=0,034$, $\eta^2=0,127$] (Figura 12B) durante el periodo de pre-tratamiento (DPN 4-10), señalando que las hembras apoE4 tienen un crecimiento menor que las hembras apoE3 sólo en ese periodo. No se encontraron diferencias en los machos (Figura 12A), ni tampoco efectos asociados al tratamiento.

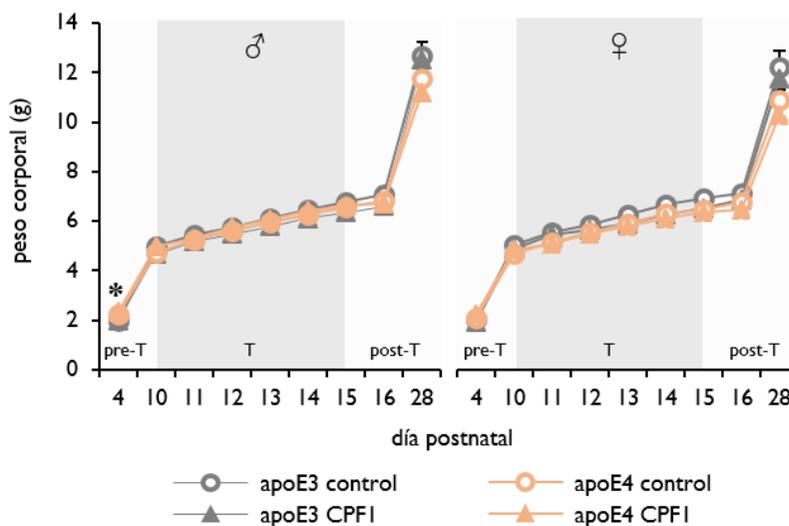


Figura 11. Peso corporal de las camadas, registrado desde el DPN 4-28, en machos y hembras. Los diferentes colores en el fondo del gráfico representan los periodos pre-tratamiento (pre-T), tratamiento (T) y post-tratamiento (post-T). Diferencia entre machos apoE4 y apoE3 está representada con un asterisco a $p<0,05$.

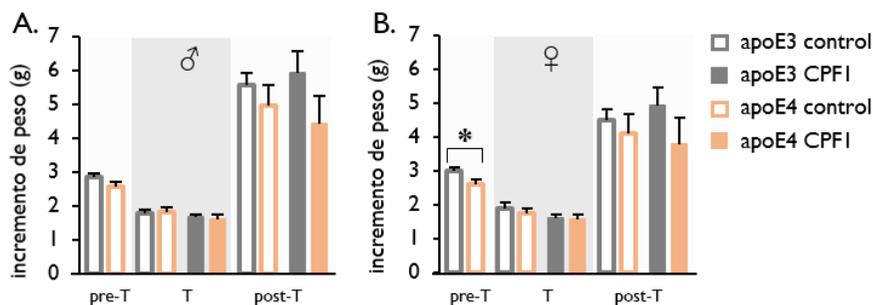


Figura 12. Incremento de peso corporal de las camadas en los periodos DPN 4-10 (pre-tratamiento: pre-T), DPN 10-15 (tratamiento: T) y DPN 16-28 (post-tratamiento: post-T), en machos (A) y en hembras (B). Diferencia en el periodo del DPN 4-10, entre las hembras apoE3 y apoE4 está representada con un asterisco a $p<0,05$.

Apertura de ojos

La apertura de ojos se evaluó entre el DPN 12-16 (Figura 13). Mediante un ANOVA de dos factores (genotipo y tratamiento postnatal) para medidas repetidas, utilizando la edad como factor de repetición y el sexo como factor intra-camada, se observó un

efecto significativo de la edad [$F(3,30)=947,685$, $p<0,001$], indicando que los individuos abren los ojos, a lo largo del periodo. Además, hubo una interacción entre la edad y genotipo [$F(5,35)= 30,331$, $p<0,001$], señalando que las crías del genotipo apoE4 abren los ojos antes que las crías apoE3, y una interacción entre la edad, genotipo y tratamiento postnatal [$F(3,30)=4,557$, $p=0,010$], indicando que CPF enlentece este proceso de forma distinta, según el genotipo (Figura 13A). Asimismo, se observó un efecto general del genotipo [$F(1,35)=77,379$, $p<0,001$, $\eta^2=0,669$] y del tratamiento postnatal [$F(1,35)=6,347$, $p=0,017$, $\eta^2=0,054$]. La Figura 13B muestra que en general los individuos del genotipo apoE3 demoraron más en abrir sus ojos. En tanto, el tratamiento en general también produce que se enlentezca este proceso (Figura 13C). Entre ambos factores, el genotipo explica el 67% del efecto observado, mientras que el tratamiento un 5,4%. No se observaron efectos asociados al factor sexo.

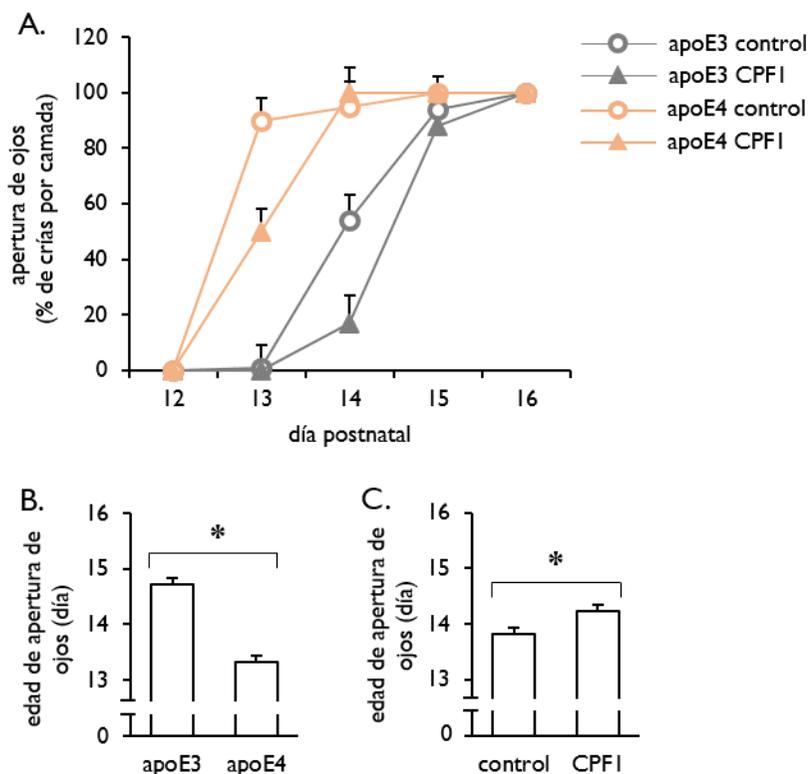


Figura 13. Apertura de ojos entre el DPN 12-16 de vida. Porcentaje de individuos por camada que abren sus ojos (A), efecto general del genotipo (B) y efecto general del tratamiento sobre el día de apertura de ojos (C). Diferencias entre genotipos y tratamientos están representadas con un asterisco a $p<0,05$.

Desarrollo sexual

El desarrollo sexual se evaluó mediante el descenso de los testículos en machos y la apertura vaginal en hembras durante el periodo DPN 28-33 (Figura 14). En los machos, un ANOVA de dos factores (genotipo y tratamiento postnatal) mostró un efecto no significativo del tratamiento postnatal [$F(1,35)=3,312$, $p=0,078$, $\eta^2=0,086$], que indica un ligero enlentecimiento en el descenso testicular provocado por CPF (Figura 14A). No se encontraron efectos asociados al genotipo. En las hembras no se observaron diferencias en apertura vaginal (Figura 14B).

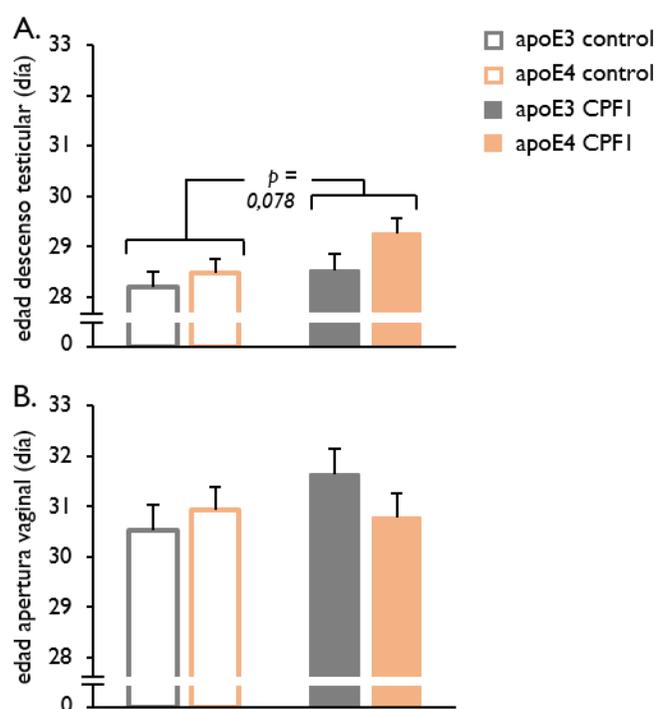


Figura 14. Desarrollo sexual entre el DPN 28-33 de vida. Edad de descenso testicular (A) y apertura vaginal (B).

Evaluación neuromotora

La fuerza de agarre, la adherencia sobre un plano inclinado y la habilidad de trepar se evaluaron el DPN 16, 24 h después de la última dosis de CPF (Figura 15). Mediante un MANOVA de estas tres habilidades, se observó un efecto del tratamiento postnatal [$F(3,62)=7,305$, $p<0,001$]. El efecto del tratamiento postnatal fue significativo en cada una de estas variables: la fuerza de agarre [$F(1,71)=19,133$, $p<0,001$, $\eta^2=0,212$] (Figura

15A); la adherencia sobre un plano inclinado [$F(1,71)=8,203$, $p=0,006$, $\eta^2=0,096$] (Figura 15B); y la habilidad de trepar [$F(1,71)=11,704$, $p=0,001$, $\eta^2=0,143$] (Figura 15C), mostrando que CPF empeoró el rendimiento de los animales en todas las pruebas, siendo responsable de entre un 10% y 21% de la varianza observada. No se observaron efectos significativos del sexo, del genotipo, ni interacciones entre factores.

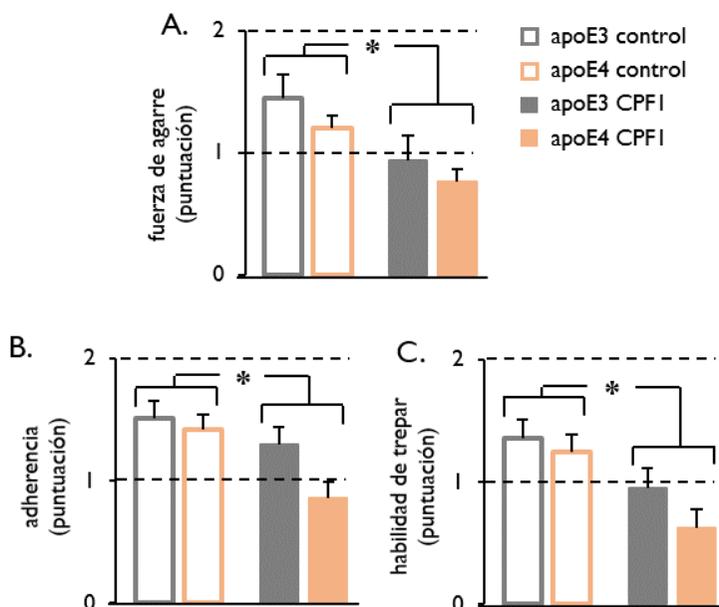


Figura 15. Evaluación neuromotora de las camadas en el DPN 16: la fuerza de agarre (A), la adherencia sobre un plano inclinado (B) y la habilidad de trepar (C). Las líneas discontinuas indican la puntuación que se le otorgó a cada prueba. Diferencias entre tratamientos están representadas con un asterisco a $p<0,05$.

Análisis de expresión génica

Se determinó la expresión de la apoE humana, BChE, PON1, PON2 y PON3, en hígado, a las 4 h de la última dosis de CPF (DPN 15) y 15 días después de ésta (DPN 30). Además, se evaluó para el mismo periodo, la expresión de ChAT, VAcHT, de 5 mAChRs (M1, M2, M3, M4 y M5) y las isoformas AChE-S y AChE-R, en cerebro.

Expresión en hígado

Mediante un MANOVA se observó que la expresión de la apoE humana, BChE, PON1, PON2 y PON3 se modificaba con la edad [$F(5,41)=65,058$, $p<0,001$] y el genotipo [$F(5,41)=5,000$, $p=0,001$].

Concretamente, la expresión de la apoE humana fue mayor el DPN 15 [$F(1,60)=263,315$, $p<0,001$, $\eta^2=0,826$] (Tabla 8). El factor edad explicaría el 83% de la varianza observada. No se observaron efectos del genotipo ni interacciones entre los otros factores analizados (Figura 16).

Por otra parte, la expresión de BChE fue distinta en función de la edad [$F(1,60)=36,263$, $p<0,001$, $\eta^2=0,334$], el sexo [$F(1,60)=9,922$, $p=0,003$, $\eta^2=0,091$] y el genotipo [$F(1,60)=10,798$, $p=0,002$, $\eta^2=0,099$], siendo expresada mayormente en el DPN 15, por las hembras y por los individuos apoE3 (Tabla 8). El factor más relevante en la expresión de BChE es la edad (33%), mientras que el sexo y el genotipo contribuyen en un 9-10% en las diferencias observadas. No se encontraron interacciones entre los factores analizados (Figura 17).

La expresión de PON1 fue distinta en función de la edad [$F(1,60)=37,772$, $p<0,001$, $\eta^2=0,338$] y el genotipo [$F(1,60)=15,588$, $p<0,001$, $\eta^2=0,139$]. La Tabla 8 muestra que la expresión fue mayor el DPN 15 para los individuos del genotipo apoE3. También se observó una interacción significativa entre la edad y el genotipo [$F(1,60)=4,683$, $p=0,036$, $\eta^2=0,104$]. La edad y el genotipo representan el 34% y 14% respectivamente del efecto observado. Asimismo, la interacción entre ambos contribuye en un 10,4% de la varianza observada. A continuación, se realizó un ANOVA en función de la edad, revelándose diferencias entre los genotipos sólo el DPN 15 [$F(1,30)=15,443$, $p<0,001$], indicando que la mayor expresión de PON1 en los sujetos apoE3 es más evidente en el DPN 15 (Figura 18A).

Por otro lado, las diferencias observadas en la expresión de PON2 se debieron a la edad [$F(1,60)=20,072$, $p<0,001$, $\eta^2=0,243$]. La Tabla 8 muestra que este gen se expresó más en el DPN 15 que el DPN 30. El análisis también mostró tendencias a la interacción entre la edad y el sexo [$F(1,61)=3,766$, $p=0,059$, $\eta^2=0,083$] y a la interacción entre la edad, el genotipo y el tratamiento postnatal no llegan a ser significativa [$F(1,61)=3,795$, $p=0,058$, $\eta^2=0,046$], la Figura 18B muestra que los machos apoE3-control expresan menos PON2 que el resto de grupos mientras que los machos apoE3-CPFI muestran mayor expresión el DPN 15, igualándose todos los grupos al DPN 30.

Por último, la expresión de PON3 varió en función de la edad [(1,60)=11,009, $p=0,002$, $\eta^2=0,160$]. Al igual que en los otros genes, PON3 se expresó más el DPN 15 (Tabla 8). También se observó una interacción de la edad, el genotipo y el tratamiento postnatal [F(1,63)=6,027, $p=0,018$, $\eta^2=0,087$] que explica el 8,7% de la varianza observada. Un análisis más detallado mediante un ANOVA para cada edad, en función del genotipo y del tratamiento, no mostró diferencias significativas entre grupos. La Figura 18C muestra que esta interacción podría ser debida a que machos y hembras apoE3-CPFI presentan una mayor expresión de PON3 que el resto de grupos el DPN 15.

En definitiva, los resultados de la expresión génica en hígado muestran que la expresión de los genes evaluados es mayor el DPN 15. Además, las hembras y el genotipo apoE3 expresan más BChE. Por otro lado PON1 responde a un patrón de maduración distinto entre genotipos, ya que sólo apoE3 presenta una mayor expresión el DPN 15. En tanto el efecto de CPF parece ser más evidente en la expresión de PON2 y PON3, pero sólo en los sujetos apoE3 el DPN 15.

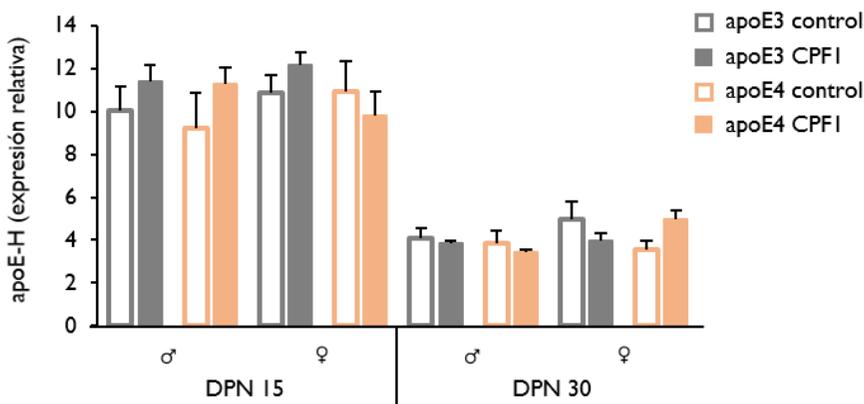


Figura 16. Expresión relativa ($2^{-\Delta Ct}$) de la apoE humana (apoE-H) en hígado, al DPN 15 y DPN 30, en machos y hembras de ambos genotipos, controles y tratados.

Tabla 8. Valores de expresión relativa ($2^{-\Delta C_t}$) de diferentes genes en hígado, presentados por edad, sexo, genotipo y tratamiento postnatal

	edad		sexo	
	15 DPN	30 DPN	♂	♀
apoE-H	10,86±0,30*	4,03±0,29*	7,20±0,29	7,68±0,30
BChE	0,36±0,01*	0,26±0,01*	0,29±0,01#	0,34±0,01#
PON1	1,32±0,06*	0,79±0,06*	1,04±0,06	1,06±0,06
PON2	0,33±0,02*	0,22±0,02*	0,27±0,02	0,29±0,02
PON3	0,19±0,01*	0,14±0,01*	0,16±0,01	0,17±0,01

	genotipo		tratamiento	
	apoE3	apoE4	control	CPF I
apoE-H	7,82±0,30	7,07±0,29	7,26±0,30	7,63±0,29
BChE	0,34±0,01&	0,28±0,01&	0,32±0,01	0,30±0,01
PON1	1,22±0,06&	0,88±0,06&	1,09±0,06	1,02±0,06
PON2	0,28±0,28	0,22±0,02	0,27±0,02	0,29±0,02
PON3	0,28±0,01	0,28±0,01	0,16±0,01	0,17±0,01

Genes evaluados: Apolipoproteína E humana (apoE-H), butirilcolinesterasa (BChE), paraoxonasa-1 (PON1), paraoxonasa-2 (PON2), paraoxonasa-3 (PON3).

La unidad utilizada es la expresión relativa de cada gen ($2^{-\Delta C_t}$).

Diferencias entre el DPN 15 y DPN 30 están representadas con un asterisco, entre ambos sexos con el símbolo # y entre genotipos con el símbolo &, a $p < 0,05$.

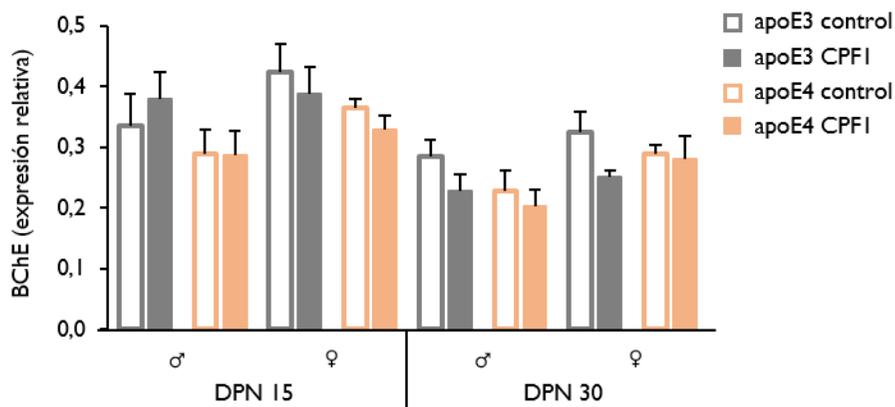


Figura 17. Expresión relativa ($2^{-\Delta C_t}$) de la butirilcolinesterasa (BChE) en hígado, al DPN 15 y DPN 30, en machos y hembras de ambos genotipos, controles y tratados.

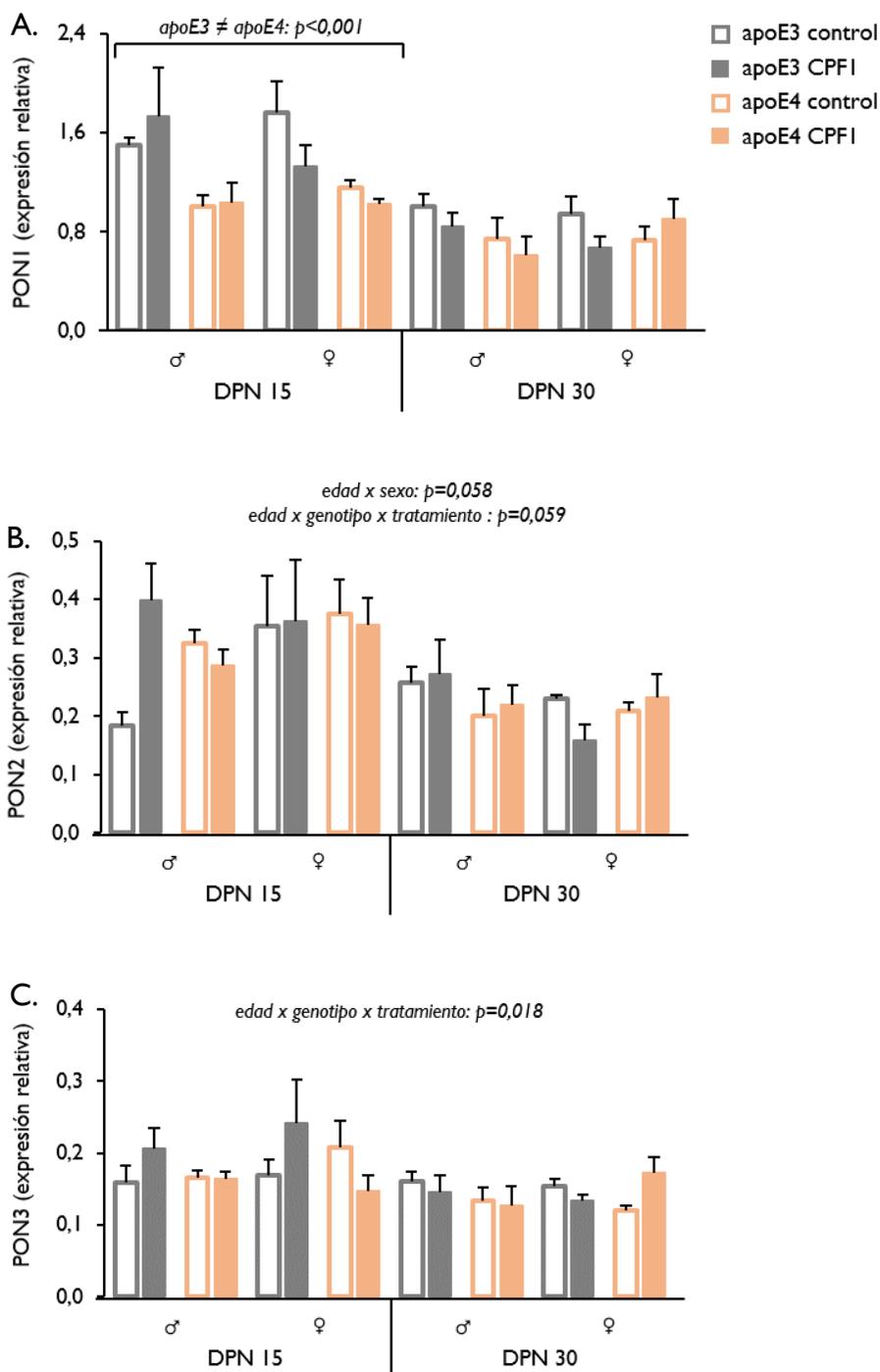


Figura 18. Expresión relativa ($2^{-\Delta Ct}$) de la paraoxonasa-1 (PON1) (A), paraoxonasa-2 (PON2) (B), paraoxonasa-3 (PON3) (C) en hígado, al DPN 15 y DPN 30, en machos y hembras de ambos genotipos, controles y tratados.

Expresión en cerebro

Un MANOVA, para valorar los efectos generales en sistema colinérgico de la expresión de ChAT, VAcHT, los receptores muscarínicos M1, M2, M3, M4 y M5 y las isoformas AChE-S y AChE-R de la AChE, reveló cambios en función de la edad [$F(9,37)=32,974$, $p<0,001$], el genotipo [$F(9,37)=2,229$, $p=0,042$] y una interacción entre el genotipo y el tratamiento postnatal [$F(9,37)=2,567$, $p=0,021$].

La expresión de ChAT sólo se modificó por la edad [$F(1,60)=80,511$, $p<0,001$, $\eta^2=0,554$]. Como se observa en **Tabla 9**, el DPN 30 fue el día de mayor expresión de este gen. El análisis también mostró una tendencia no significativa del genotipo [$F(1,60)=3,997$, $p=0,052$, $\eta^2=0,027$], los individuos apoE4 tendieron a expresar en mayor medida la ChAT comparada con la expresión presentada por apoE3 (**Figura 19A**).

Por otra parte, la expresión de VAcHT varió en función de la edad [$F(1,60)=24,476$, $p<0,001$, $\eta^2=0,233$]. También se observó una interacción entre el genotipo y el tratamiento postnatal [$F(1,60)=13,585$, $p=0,001$, $\eta^2=0,129$]. En la **Tabla 9** se puede observar que este gen se expresó en mayor medida el DPN 15. A partir de estos datos, mediante un ANOVA se analizaron las diferencias entre tratamientos en función de la edad y el genotipo. Este análisis mostró diferencia entre grupos el DPN 15 [$F(1,14)=5,396$, $p=0,037$] y el DPN 30 [$F(1,15)=7,252$, $p=0,017$]. La **Figura 19B** ilustra que en los sujetos apoE3-CPF1 disminuyó la expresión de VAcHT con respecto a apoE3-control, tanto el DPN15, 4 h después de la última dosis de CPF, como al DPN 30, 15 días después del tratamiento.

En cuanto a los receptores muscarínicos solo M2, M3 y M5 (**Figura 20**) mostraron algún cambio, mientras que la expresión de M1 y M4 no varió en función de los factores evaluados (**Figura 21A-21B**).

Particularmente, la expresión de M2 se modificó en función de la edad [$F(1,60)=11,372$, $p=0,002$, $\eta^2=0,150$]. En la **Tabla 9** se puede observar que M2 se expresó más el DPN 30. También se observó una interacción entre la edad, el sexo y el tratamiento postnatal [$F(1,60)=4,510$, $p=0,039$, $\eta^2=0,059$], explicando un 6% de la varianza observada. A partir

de estos datos, se realizó un ANOVA para cada edad en función del sexo y el tratamiento, no observándose diferencias entre grupos. La **Figura 20A** muestra que la interacción encontrada se debe a que en el DPN 15 la expresión de M2 es similar en los grupos, sin embargo en el DPN 30 los machos y hembras controles expresan de manera diferente M2, mientras que ambos sexos tratados expresan el gen a un nivel semejante.

La expresión de M3 sólo varió en función de la edad [$F(1,60)=9,710$, $p=0,003$, $\eta^2=0,145$] (**Figura 20B**). La **Tabla 9** muestra que se alcanzó una expresión más elevada el DPN 30.

En cambio, las diferencias observadas en la expresión de M5 se dieron por las interacciones entre la edad y el genotipo [$F(1,60)=6,774$, $p=0,012$, $\eta^2=0,102$], el sexo y el tratamiento postnatal [$F(1,60)=4,351$, $p=0,043$, $\eta^2=0,066$], la edad, el sexo y el genotipo [$F(1,60)=4,690$, $p=0,036$, $\eta^2=0,071$] y por la interacción de todos los factores analizados: edad, sexo, genotipo y tratamiento postnatal [$F(1,60)=4,199$, $p=0,046$, $\eta^2=0,063$]. Cada una de estas interacciones contribuyen respectivamente un 10,2%, 7%, 7,1% y un 6,3% varianza observada. Para distinguir las diferencias entre grupos se realizó un ANOVA (genotipo x tratamiento postnatal) en función del día y el sexo. Así, se observó una tendencia no significativa entre los grupos de hembras en el DPN 15 [$F(3,13)=3,341$, $p=0,064$]. Como se puede observar en la **Figura 20C**, esta tendencia puede ser debida a la mayor expresión presentada por las hembras apoE3-CPFI. Asimismo, este grupo de hembras disminuyó la expresión de M5 en el DPN 30, igualándola con el resto de grupos.

Con respecto a la expresión de las isoformas de la AChE, la AChE-S se afectó por la edad [$F(1,60)=76,775$, $p<0,001$, $\eta^2=0,525$] y el genotipo [$F(1,60)=5,135$, $p=0,028$, $\eta^2=0,035$]. La **Tabla 9** revela que la mayor expresión se presentó el DPN 15 y en los individuos apoE3. No se observaron interacciones entre los factores estudiados (**Figura 21C**). Por otro lado, la isoforma AChE-R se modificó sólo por el genotipo [$F(1,60)=6,884$, $p=0,012$, $\eta^2=0,117$], donde los individuos apoE4 presentaron una mayor expresión en comparación a los apoE3 (**Tabla 9**). No se observaron interacciones entre los factores estudiados (**Figura 22**).

En resumen, se observó que la edad es un factor importante en la expresión de los genes estudiados, indicando el proceso de maduración para cada uno: el VACHT y AChE-S presentó la mayor expresión el DPN 15, en cambio la expresión de ChAT, M2 y M3 fue mayor el DPN 30. Las isoformas de AChE, responden a una expresión diferente entre genotipos, presentando mayor expresión de AChE-S en apoE3 y AChE-R en apoE4. En tanto, CPF provocó una disminución de la expresión de VACHT en los apoE3, observándose el DPN 15 y 15 días después del tratamiento. También, se reveló que el efecto de CPF sobre M2 difiere entre machos y hembras y tiende a igualar la expresión entre ambos, provocando un incremento de la expresión en hembras y una disminución en machos el DPN 30. Además, la expresión de M5 aumenta sólo en el DPN 15, en las hembras apoE3.

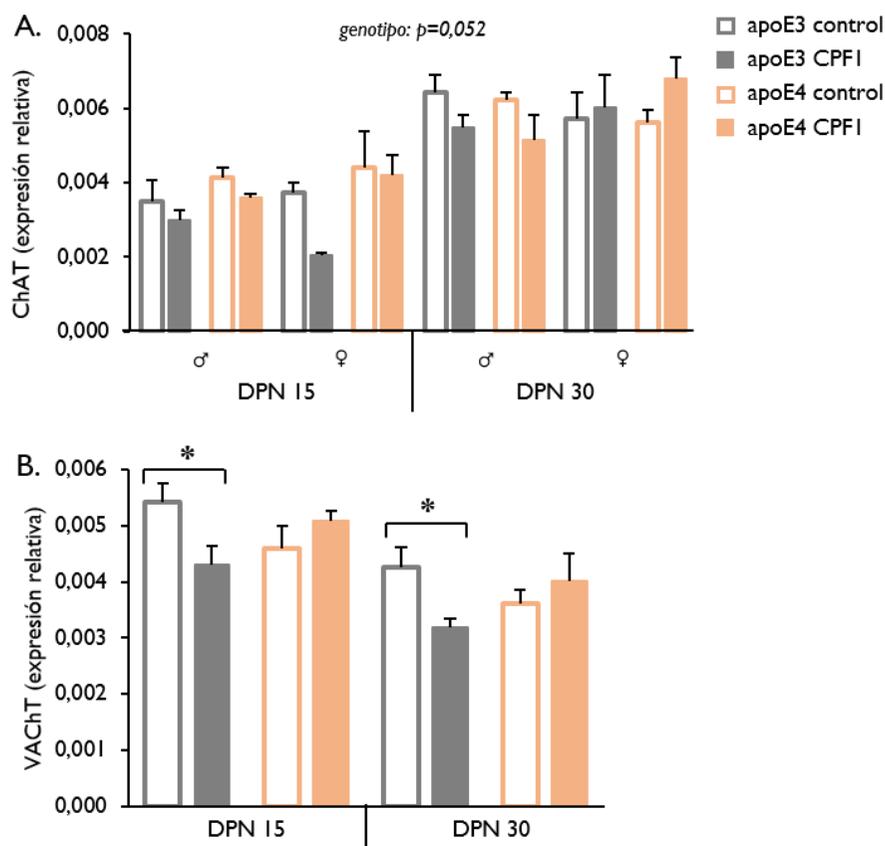


Figura 19. Expresión relativa ($2^{-\Delta Ct}$) de la colinaacetiltransferasa (ChAT), de todos los grupos y edades estudiadas, (A) y del transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) sólo entre tratamientos y genotipos el DPN 15 y DPN 30, (B), en cerebro. Diferencias en el DPN 15 y DPN 30 entre apoE3 control y tratado, están representadas con un asterisco a $p < 0,05$.

Tabla 9. Valores de expresión relativa ($2^{-\Delta C_t}$) de diferentes genes en cerebro, presentados por edad, sexo, genotipo y tratamiento

	edad		sexo	
	15 DPN	30 DPN	♂	♀
ChAT	$3,6 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4*}$	$5,9 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4*}$	$4,8 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$
VACHT	$4,8 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4*}$	$3,8 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-4*}$	$4,4 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	$4,2 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-4}$
M1	$5,2 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-3}$	$6,0 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-3}$	$5,3 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-3}$	$5,9 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-3}$
M2	$7,3 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-4*}$	$9,1 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-4*}$	$8,1 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-4}$	$8,3 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-4}$
M3	$2,7 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3*}$	$3,3 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3*}$	$3,0 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$3,1 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$
M4	$1,4 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$
M5	$1,2 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-5}$
AChE-S	$8,2 \cdot 10^{-2} \pm 3 \cdot 10^{-3*}$	$5,1 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-3*}$	$6,7 \cdot 10^{-2} \pm 3 \cdot 10^{-3}$	$6,7 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-3}$
AChE-R	$6,0 \cdot 10^{-5} \pm 8 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-6} \pm 7 \cdot 10^{-6}$	$6,0 \cdot 10^{-5} \pm 8 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-2} \pm 7 \cdot 10^{-6}$

	genotipo		tratamiento	
	apoE3	apoE4	control	CPFI
ChAT	$4,5 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}^t$	$5,0 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}^t$	$5,0 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$
VACHT	$4,3 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	$4,3 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	$4,1 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-4}$
M1	$5,2 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-3}$	$6,0 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-3}$	$5,7 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-3}$	$5,5 \cdot 10^{-2} \pm 4 \cdot 10^{-3}$
M2	$8,3 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-4}$	$8,1 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-4}$	$8,3 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-4}$	$8,1 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-4}$
M3	$2,9 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$
M4	$1,3 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$
M5	$1,2 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-3} \pm 9 \cdot 10^{-5}$
AChE-S	$7,1 \cdot 10^{-2} \pm 3 \cdot 10^{-3}^{\&}$	$6,3 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-3}^{\&}$	$6,9 \cdot 10^{-2} \pm 3 \cdot 10^{-3}$	$6,4 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-3}$
AChE-R	$4,0 \cdot 10^{-5} \pm 8 \cdot 10^{-6}^{\&}$	$7,0 \cdot 10^{-5} \pm 7 \cdot 10^{-6}^{\&}$	$5,0 \cdot 10^{-5} \pm 8,0 \cdot 10^{-6}$	$6,0 \cdot 10^{-5} \pm 7 \cdot 10^{-6}$

Genes evaluados: Colinacetiltransferasa (ChAT), transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), receptores muscarínicos (M1, M2, M3, M4 y M5) y las isoformas S y R de la acetilcolinesterasa (AChE-S) y (AChE-R).

La unidad utilizada es la expresión relativa de cada gen ($2^{-\Delta C_t}$).

Diferencias entre el DPN 15 y DPN 30 están representadas con un asterisco y entre genotipos con el símbolo &, a $p < 0,05$. La t indica ($p = 0,052$) entre ambos genotipos.

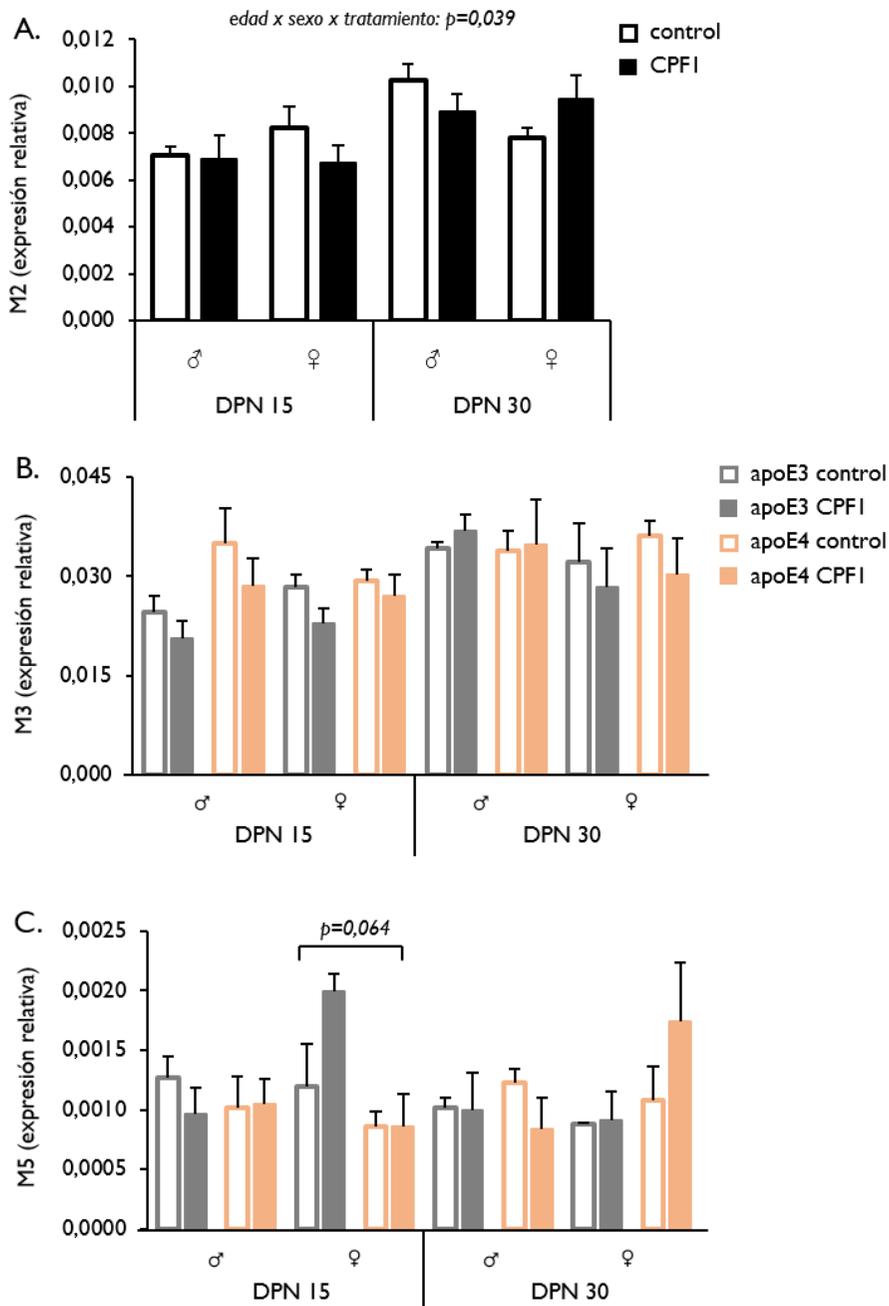


Figura 20. Expresión relativa ($2^{-\Delta Ct}$) del receptor muscarínico M2 (A), entre tratamientos y sexos el DPN 15 y DPN 30, y de M3 (B) y M5 (C) de todos los grupos y edades estudiadas, en cerebro.

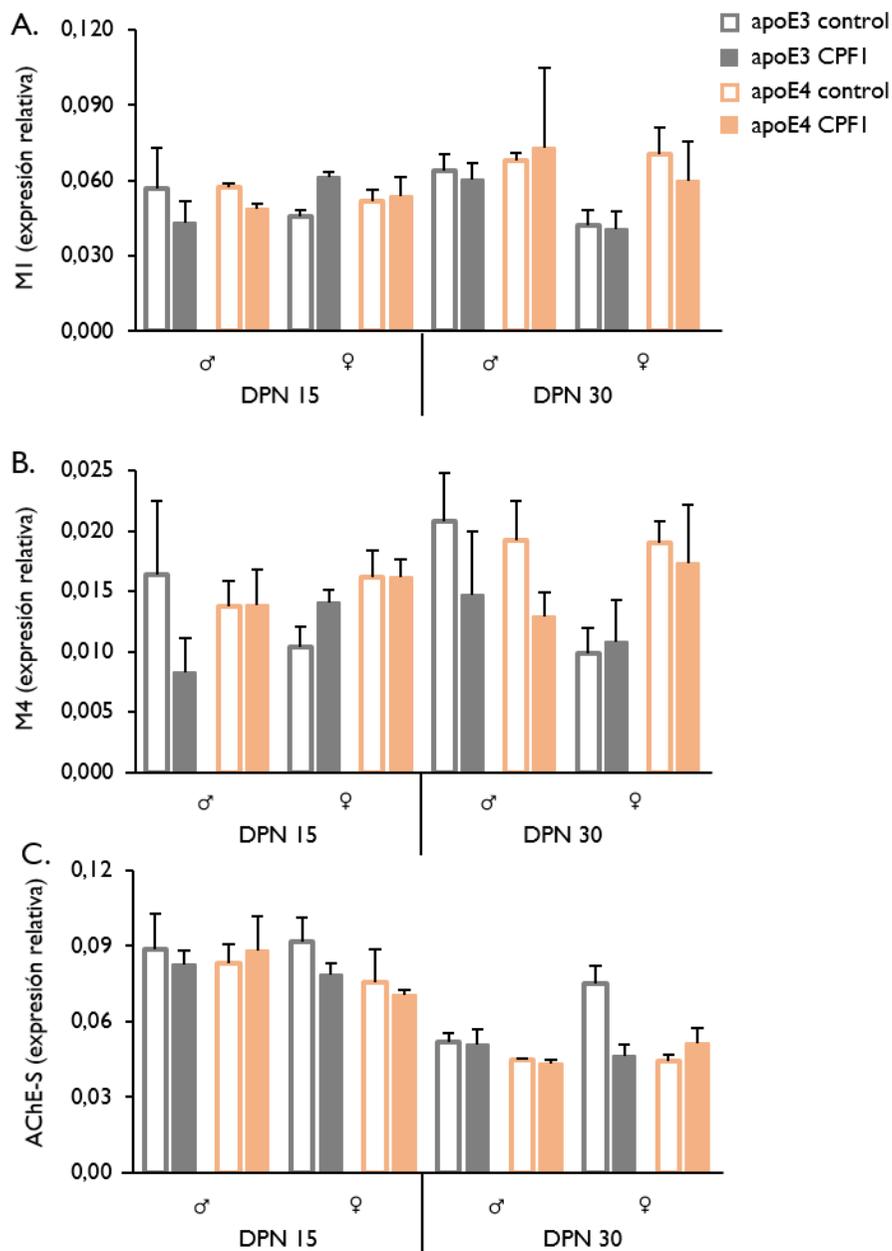


Figura 21. Expresión relativa ($2^{-\Delta C_t}$) del receptor muscarínico M1 (A), M4 (B) y la isoforma S de la acetilcolinesterasa (AChE-S) (C), en cerebro, el DPN 15 y DPN 30 en todos los sujetos.

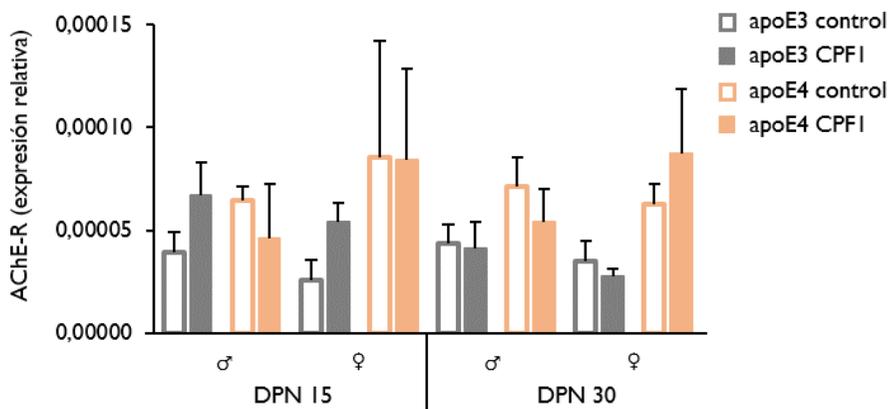


Figura 22. Expresión relativa (2^{-4Ct}) de la isoforma R de la acetilcolinesterasa (AChE-R), en cerebro el DPN 15 y DPN 30 en todos los sujetos,

Actividad ChE

La actividad ChE se determinó en plasma y en cerebro 4 h después de la última dosis de CPF (DPN 15) y 15 días después de ésta (DPN 30). Ambas variables se analizaron a través de un MANOVA, el cual mostró un efecto de la edad [$F(2,47)=269,648$, $p<0,001$], del genotipo [$F(2,47)=3,473$, $p=0,039$], del tratamiento postnatal [$F(2,47)=57,636$, $p<0,001$], una interacción entre la edad y el genotipo [$F(2,47)=5,538$, $p=0,007$], y una interacción entre la edad y el tratamiento postnatal [$F(2,47)=28,165$, $p<0,001$]. No se observaron efectos del sexo.

Concretamente, la actividad ChE en plasma se modificó por la edad [$F(1,63)=485,684$, $p<0,001$, $\eta^2=0,673$], el tratamiento postnatal [$F(1,63)=114,534$, $p<0,001$, $\eta^2=0,159$], por interacciones entre la edad y el tratamiento postnatal [$F(1,63)=57,355$, $p<0,001$, $\eta^2=0,080$], y entre la edad y el genotipo [$F(1,63)=7,418$, $p=0,009$, $\eta^2=0,010$]. Estos datos indican que los niveles de ChE aumentan a lo largo del periodo postnatal y disminuyen por el efecto inhibitor de CPF sobre la enzima. Mediante un ANOVA dentro de cada edad y genotipo, se observaron diferencias en el DPN 15 dentro del genotipo apoE3 [$F(1,15)=43,867$, $p<0,001$], y apoE4 [$F(1,15)=95,572$, $p<0,001$], y en el DPN 30 sólo en el genotipo apoE3 [$F(1,15)=7,873$, $p=0,014$], lo que revela que CPF ejerce una acción aguda sobre la enzima ChE plasmática en todos los sujetos y que, 15 días después de la última dosis, este efecto perdura sólo en los sujetos apoE3 (Figura 23).

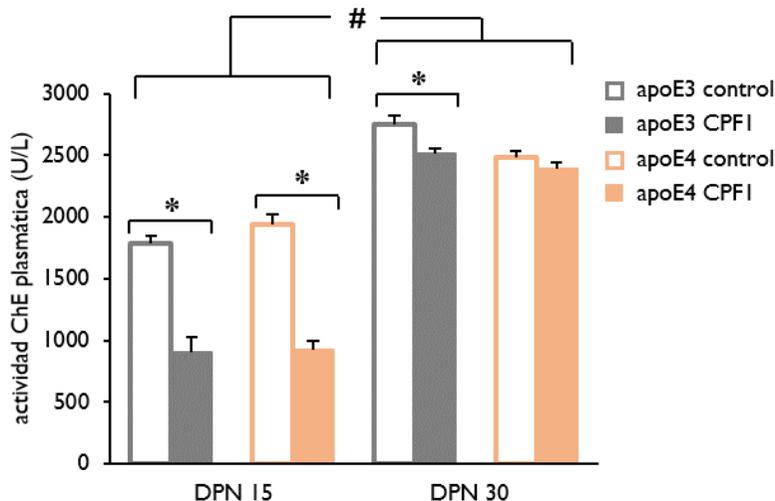


Figura 23. Actividad de la enzima colinesterasa (ChE) plasmática al DPN 15 y DPN 30, en ambos genotipos, controles y tratados. Diferencias entre el DPN 15 y DPN 30, están representados con un símbolo #, entre controles y tratados con un asterisco a $p < 0,05$.

La actividad ChE en cerebro (Figura 24) varió en función de la edad [$F(1,63)=33,567$, $p < 0,001$, $\eta^2=0,326$] (Figura 24A) y el genotipo [$F(1,63)=6,506$, $p=0,014$, $\eta^2=0,063$] (Figura 24B). Con la edad la actividad ChE cerebral aumenta. Por otro lado, el genotipo apoE4 presentó una actividad más alta que el apoE3. Asimismo, el factor edad es responsable del 33% del efecto observado y el factor genotipo de un 6%, puesto que la diferencia de genotipos es más evidente en el DPN 15. En este parámetro no se observaron efectos del tratamiento ni interacciones entre los factores estudiados.

En resumen, se observó que entre el DPN 15 y DPN 30 la actividad ChE en plasma y cerebro aumenta. Sin embargo, el efecto del tratamiento es evidente sólo a nivel sistémico. El genotipo influye en la actividad de esta enzima, apoE4 presenta una mayor actividad ChE cerebral que apoE3 principalmente al DPN 15.

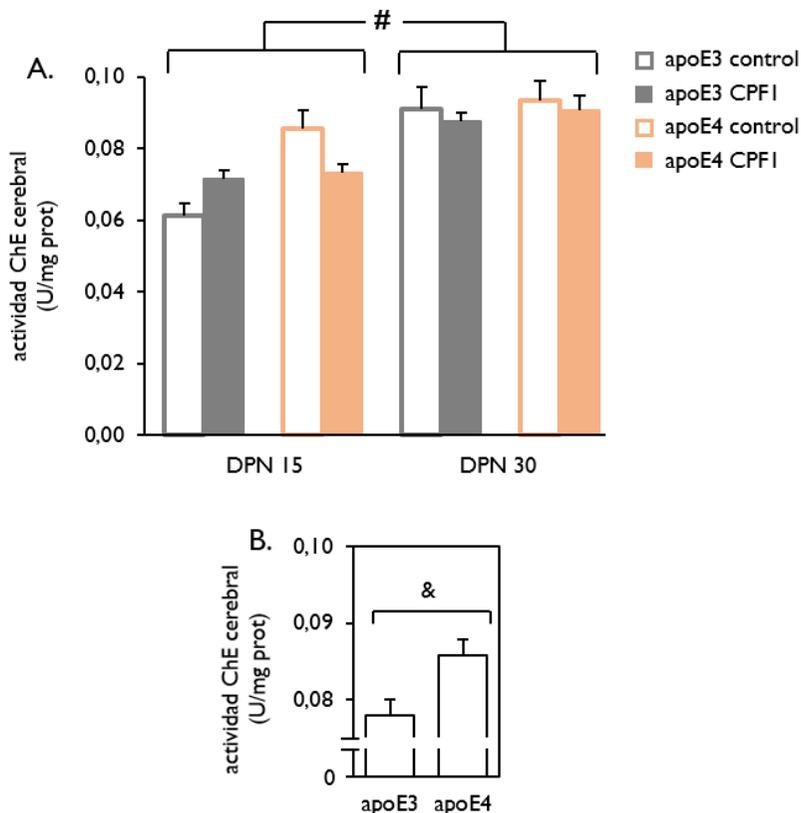


Figura 24. Actividad de la enzima colinesterasa (ChE) cerebral (A) al DPN 15 y DPN 30, en ambos genotipos, controles y tratados, y efecto general del genotipo (B). Diferencias entre el DPN 15 y DPN 30, están representados con un símbolo # y entre genotipos con un & a $p < 0,05$.

Peso corporal del primer a quinto mes

Desde el primer mes (DPN 30) hasta el quinto mes se evaluó el peso corporal medio por camada, cada 30 días (Figura 25-26). A través de un ANOVA de dos factores (genotipo y tratamiento postnatal) para medidas repetidas, utilizando la edad como factor de repetición y el sexo como factor intra-camada, permitió detectar diferencias entre grupos. En este análisis, se observó un efecto general de la edad [$F(4,21)=458,230$, $p < 0,001$], mostrando que todos los sujetos aumentaron de peso, durante estos 5 meses de vida (Figura 25A); del sexo [$(1,24)=530,318$, $p < 0,001$], mostrando que los machos pesaban más que las hembras (Figura 25A); y del tratamiento postnatal [$F(1,24)=6,813$, $p=0,015$], indicando que los individuos tratados presentaron un peso superior que los controles (Figura 25B). Además, se observaron las interacciones entre la edad y el sexo [$F(4,21)=85,168$, $p < 0,001$], la edad y el genotipo [$F(4,21)=4,865$, $p=0,006$], y una

interacción entre el sexo y el genotipo [$F(1,24)=7,824$, $p=0,010$], indicando que las hembras apoE3 son más grandes que las apoE4 (Figura 26B). También se observó una interacción entre la edad, el sexo y el genotipo [$F(4,21)=3,728$, $p=0,019$]. Con estos datos, se analizaron mediante un ANOVA las diferencias de cada edad, entre tratamientos en función del sexo y el genotipo.

En los machos se observaron diferencias sólo en el genotipo apoE4, en el tercer mes [$F(1,16)=458,230$, $p=0,007$], cuarto mes [$F(1,16)=16,013$, $p=0,001$] y quinto mes [$F(1,16)=14,100$, $p=0,002$]), revelando que en esos meses los individuos de las camadas apoE4-CPFI alcanzaron pesos superiores a las camadas apoE4-control (Figura 26A). En las hembras no se observaron diferencias entre grupos de tratamiento (Figura 26B).

En resumen, a medida que los animales crecen se hace más evidente la diferencia de peso corporal entre machos y hembras. Así, el genotipo influye en el peso de las hembras, siendo las hembras apoE3 más grandes que las apoE4. Finalmente, el efecto del tratamiento fue más evidente en los machos apoE4, produciéndose un incremento de peso significativo a partir del tercer mes.

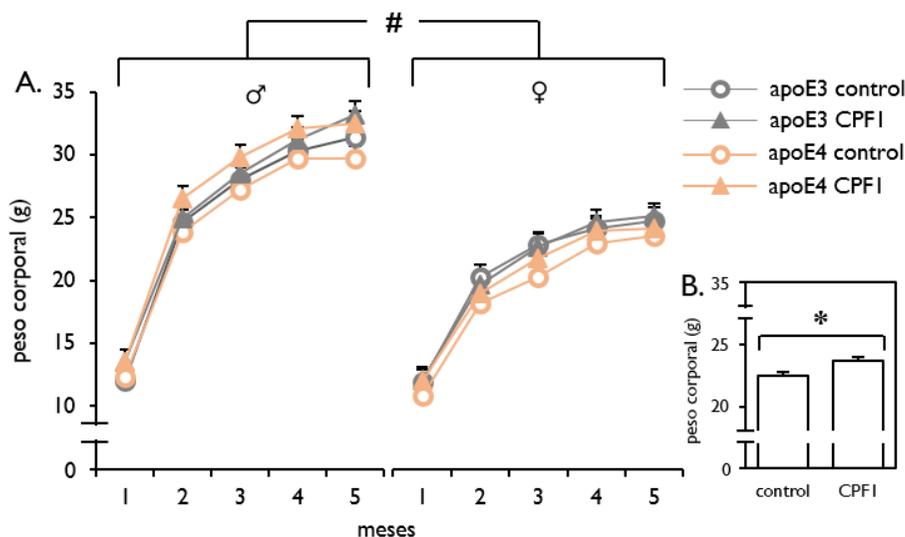


Figura 25. Peso corporal de las camadas de machos y hembras, de ambos genotipos, controles y tratados, desde el primer a quinto mes de vida (A) y el efecto general del tratamiento (B). Diferencia entre machos y hembras, están representadas con el símbolo # y entre controles y tratados con un asterisco a $p < 0,05$.

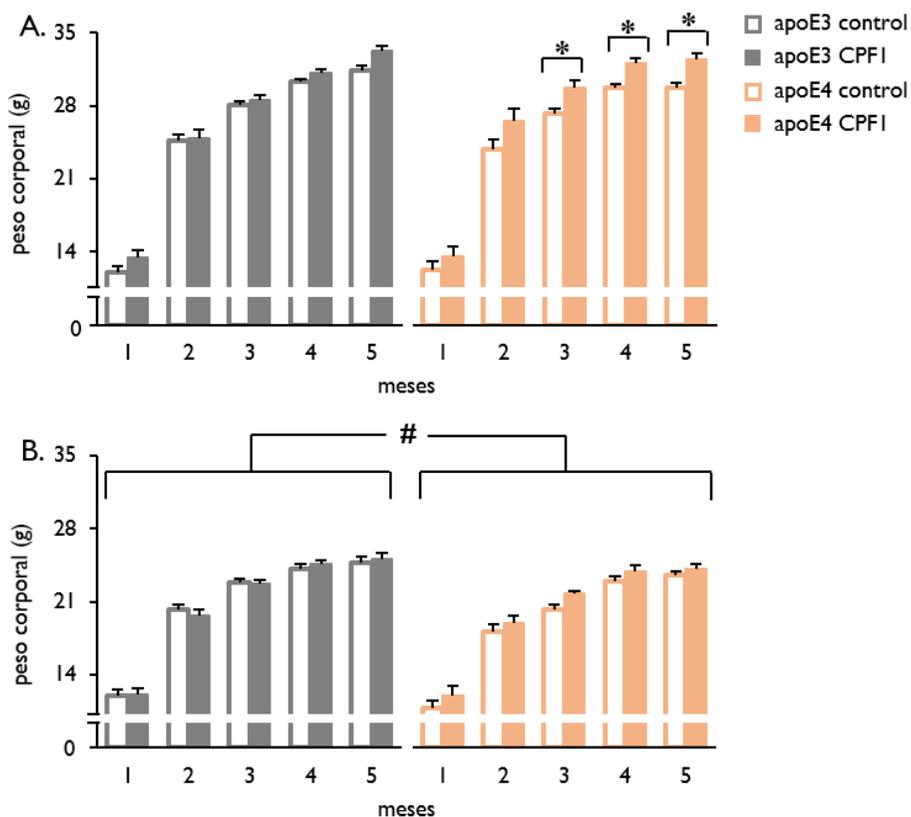


Figura 26. Peso corporal de las camadas de machos (A) y hembras (B) de ambos genotipos, controles y tratados, desde el primer a quinto mes de vida. Diferencias entre apoE4 controles y tratados, están representados con uno asterisco y entre hembras apoE3 y apoE4 con el símbolo # a $p < 0,05$.

2. Discusión

En esta primera fase experimental se estudiaron los efectos inmediatos y a corto plazo causados por una exposición postnatal a CPF y la modulación producida por el genotipo apoE, en ambos sexos, sobre variables de crecimiento y maduración a nivel físico. Además, se estudió la expresión de genes relacionados con sistemas de detoxificación en hígado y el sistema colinérgico en cerebro, y la actividad ChE como marcador de exposición a CPF a nivel bioquímico.

Desarrollo físico, motor y sexual de las camadas

Durante el desarrollo, todos los animales manifestaron una evolución física, en maduración y crecimiento, acorde a lo esperado. Sin embargo, se observaron diferencias entre genotipos: las camadas apoE3 presentaron un mayor número de crías; el peso al DPN 4 fue superior en machos apoE4; entre el DPN 4-10, las hembras apoE3 crecieron más que apoE4; y la apertura de ojos se produjo antes en apoE4. Por otro lado, CPF promovió un retraso en la apertura de ojos, un empeoramiento neuromotor y un ligero retraso en el desarrollo sexual de los machos.

Los efectos de apoE sobre el tamaño de la camada no habían sido reportados previamente. En un trabajo anterior, nuestro laboratorio realizó una completa caracterización del genotipo apoE y su influencia en el periodo de desarrollo (Reverte et al., 2014a). Concretamente, sobre este parámetro Reverte et al. (2014a) no observaron diferencias significativas entre genotipos, sin embargo los autores registraron que las 28 camadas apoE3 analizadas alcanzaron un promedio de 8,5 crías vs las 7,6 de apoE4, siendo cifras relativamente similares a las obtenidas en este estudio. En este sentido, nuestros resultados confirmarían una relación entre tamaño de camada y el genotipo apoE. El hecho de que los sujetos del genotipo apoE4 presenten un metabolismo lipídico alterado (Arbones-Mainar et al., 2008; Gregg et al., 1986; Salameh et al., 2016), podría influir en el tamaño de camada. Así, por ejemplo, se ha observado que la hipercolesterolemia durante la gestación disminuye el tamaño de la camada y aumenta el número de pérdidas post-implantación, en ratas (De Assis et al., 2003), indicando la importancia de los lípidos en términos de reproducción y/o fertilidad. Por

otro lado, el tamaño de la camada podría influir en la diferencia de peso observada el DPN 4 en apoE4, puesto que las camadas de este genotipo presentaron un peso superior únicamente a esta edad. En línea con nuestros resultados, diversos estudios han demostrado que individuos de camadas más pequeñas pesan significativamente más al nacer, respecto los de camadas más grandes (Chahoud and Paumgartten, 2009; Deter et al., 2007; Epstein, 1978; Hager et al., 2012; Koskela, 1998; Reading, 1966). El tamaño de la camada también debería contribuir en el crecimiento postnatal, tal y como se ha descrito en varios estudios (Chahoud and Paumgartten, 2009; Galler and Turkewitz, 1975; Hager et al., 2012). No obstante, las hembras apoE3 crecieron más rápido entre el periodo DPN 4-10, que sus congéneres apoE4. De hecho, como se discutirá más adelante, las hembras apoE3 seguirán presentando un mayor peso respecto las apoE4, después del destete. Este resultado sugiere que el factor genotipo influye, en mayor medida, en el crecimiento de los animales, que el propio tamaño de camada.

El día de la apertura de ojos es otro parámetro en que existen diferencias según el genotipo apoE. En este estudio se reveló que los individuos apoE4 abren sus ojos 1 día antes que apoE3, entretanto Reverte et al. (2014a) encontraron que este proceso en las crías apoE2 se producía antes que sus pares apoE3 y apoE4, sin repercusiones en estos últimos dos genotipos. Esta discrepancia, entre ambos trabajos, podría ser debida a la escala de puntuación utilizada para analizar el mismo parámetro; mientras que Reverte et al. (2014a) registraron todo el progreso, desde una pequeña apertura hasta la completa apertura de ambos ojos, en esta ocasión se registró sólo un punto, describiéndose la edad de apertura ocular como el día en que se observaba el primer ojo abierto. Siguiendo con esta variable, el tratamiento con CPF provocó un leve retraso en la apertura ocular. Diversos autores han concluido que la población infantil presenta una vulnerabilidad especial hacia los efectos nocivos de un tóxico (Au, 2002; Grandjean and Landrigan, 2014; Moser et al., 1998). Igualmente, existen estudios que no han evidenciado efectos por exposiciones a CPF sobre animales en desarrollo (Mattsson, 2000; Maurissen et al., 2000). De hecho, un estudio no encontró alteraciones en la edad de apertura ocular, después de la exposición a diversas dosis de CPF (0,3, 1 a 5 mg/kg/día) (Maurissen et al., 2000). Este grupo realizó sus estudios con ratas en exposiciones perinatales que iban desde el día prenatal 6 hasta el DPN 10. La

discrepancia con los presentes resultados, podría ser debida a que nuestros animales se encontraban en periodo de tratamiento cuando observamos el efecto de CPF, por lo que sería un efecto inmediato sobre el ritmo de desarrollo de los ojos, y no un efecto tardío o a largo plazo. Si bien, hace algunos años, dos estudios evidenciaron que niños expuestos *in utero* a CPF nacían con anomalías oftálmicas (Sherman, 1999, 1996), no se tiene hasta el momento información de que una exposición postnatal produjese un retraso del día medio de apertura de ojos, en ratones. El proceso de apertura de ojos se considera como un signo externo de maduración normal del SNC en vertebrados. Por este motivo, para el estudio de teratógenos es esencial examinar el normal desarrollo de este órgano (Strömland et al., 2002).

De igual modo, el deterioro de la capacidad neuromotora manifestada por las crías, en respuesta al tratamiento con CPF, se observó un día después de la última dosis administrada. Los resultados de Moser (2000), registrados 24 h después de una dosis única de 20 mg/kg, revelaron una disminución de la actividad motora, por medio de pruebas para testar reflejos y la respuesta sensorimotora. Cabe resaltar que la dosis utilizada por este autor fue muy superior a la del presente estudio. También, como consecuencia de una exposición prenatal, se ha observado hiporreflexia en el DPN 1 y DPN 3, por dosis repetidas de 25 mg/kg/día (Chanda and Pope, 1996) y en el DPN 15, por dosis repetidas de 6 mg/kg/día (Venerosi et al., 2009). En nuestro trabajo, el tratamiento postnatal provocó un efecto medio sobre el desarrollo neuromotor. Esto sugeriría que el periodo de desarrollo, escogido para el tratamiento en este estudio, es sensible para la adquisición de habilidades motoras. Algunas áreas del SNC no están completamente desarrolladas en ratas y ratones en la ventana postnatal tardía, de hecho la sinaptogénesis alcanza su máximo el DPN 15, mientras que la mielinización comienza entre los DPN 7-17, completándose entre los DPN 90-100 (Dobbing and Sands, 1979; Watson et al., 2006). Por lo que la administración de CPF desde el DPN 10 al 15 podría interferir en el desarrollo neuromotor por distintos mecanismos.

Por otra parte, si bien en nuestro estudio CPF provocó un retraso no significativo en el descenso testicular, estudios en humanos han relacionado exposiciones a CPF en periodo prenatal con casos de criptorquidia (Sherman, 1999, 1996). Además, otros

trabajos en ratas adultas han confirmado que exposiciones subcrónicas a CPF pueden incrementar los niveles de estrés oxidativo, generando daño a nivel tisular en los testículos (Elsharkawy et al., 2014; Mandal and Das, 2011). En ratones se ha observado que el aumento de la señal cannabinoide, inducido por CPF, produce la apoptosis de las células testiculares de Sertoli y Leydig, sugiriendo este mecanismo como el responsable del deterioro del sistema reproductor masculino (Noro et al., 2013).

Expresión génica

El estudio de la expresión génica en hígado y cerebro se llevó a cabo para identificar diferencias entre genotipos apoE, diferencias entre sexos y los efectos provocados por el tratamiento postnatal con CPF de forma inmediata, así como la reversión o mantenimiento de dichos efectos a DPN 30, 15 días después de la última exposición. Puesto que el periodo estudiado comprende el desarrollo y maduración de sistemas enzimáticos en hígado y de sistemas de neurotransmisión en cerebro, la edad ha sido un factor significativo mostrando diferencias importantes entre el día 15 y 30 del periodo postnatal en prácticamente todos los genes evaluados.

A nivel hepático todos los genes determinados alcanzaron la mayor expresión el DPN 15. En tanto, la única diferencia entre sexos se observó en la expresión de BChE. Asimismo, entre genotipos se encontraron diferencias en la expresión BChE, en general y de PON1 sólo el DPN 15. También se observaron modificaciones en la expresión génica, debidas a la exposición a CPF en PON2 y PON3 en los sujetos apoE3.

A nivel cerebral, el VAcHT presentó la mayor expresión el DPN 15 y el tratamiento con CPF modificó su expresión sólo en los individuos apoE3. La expresión de ChAT, M2 y M3 fue mayor el DPN 30. Además, se observó que la expresión de M2 en las hembras-CPF1, se asemeja a los valores presentados por los machos 15 días después del tratamiento. También, el tratamiento modificó la expresión de M5 sólo en las hembras apoE3. En tanto, la isoforma AChE-S presentó su mayor expresión el DPN 15, y se observó un efecto del genotipo apoE sobre la expresión de ambas isoformas de AChE.

En hígado, apoE presentó una mayor expresión el DPN 15, siendo el único efecto observado sobre este gen. El estudio de Hall et al. (1995) mostró que la expresión de apoE en hígado de rata era detectable desde el día 19 prenatal hasta alcanzar los niveles de un adulto el DPN 5. Sin embargo, un trabajo anterior observó que la máxima expresión de apoE se presenta entre el DPN 10-22 (Mangeney et al., 1989). El hígado de un ratón y una rata va adquiriendo la capacidad funcional de la edad adulta desde los últimos días de la etapa prenatal hasta el DPN 28 (Moscovitz and Aleksunes, 2013). Por lo cual, nosotros consideramos que la expresión observada en este estudio concuerda con este perfil de maduración propio del hígado.

La expresión de BChE presentó un patrón temporal similar, estando en línea con otros estudios (Lepage et al., 1985; Michalek et al., 1988). También se observó que las hembras presentaron una mayor expresión de BChE respecto los machos. En población humana, se ha descrito que los hombres presentan mayor actividad BChE que las mujeres (Darreh-Shori et al., 2006; Stojanov et al., 2011; Zimmer et al., 2012). Mientras que otro estudio reveló que la actividad de BChE es mayor en las mujeres en periodo prepuberal y menor en el postpuberal, sugiriéndose un papel importante del estatus hormonal (Lepage et al., 1985). Además, una mayor actividad BChE se ha relacionado con una mayor masa corporal (Brock and Brock, 1993). En nuestro estudio, los datos obtenidos sobre la expresión de este gen podrían estar relacionados con el estatus hormonal, ya que nuestras determinaciones se realizaron en el periodo prepuberal (Semaan and Kauffman, 2015). De hecho, nosotros no encontramos diferencias entre sexos en la actividad ChE plasmática. Asimismo, consideramos poco probable el efecto del peso, puesto que durante este periodo no pudimos observar diferencias significativas sobre este parámetro. Sería interesante realizar análisis adicionales en los DPN 45 o 60, para valorar la expresión en el periodo postpuberal. De hecho, la expresión de la PON1 en hembras es mayor que en machos al DPN 40 y 45, no obstante antes de ese periodo, la expresión es similar entre ambos sexos (Cheng and Klaassen, 2012). También, se observaron diferencia en la expresión génica de la BChE, en función del genotipo apoE. Los sujetos apoE3 expresaron más BChE que apoE4. Hasta ahora, no existen estudios que hayan analizado la expresión de este gen entre sujetos jóvenes de diferentes genotipos apoE. Si bien, investigaciones epidemiológicas en adultos mayores con EA han

confirmado que los niveles de esta proteína, como también su actividad en el líquido céfalorraquídeo, están disminuidos en personas portadoras de la apoE4 (Darreh-Shori et al., 2011, 2006). No podemos comparar esta evidencia con nuestros resultados, puesto que no sabemos si realmente la disminución de BChE que observan estos autores se debe a algún tipo de compensación por la patología de base. Igualmente, los presentes datos sobre la expresión de BChE en individuos jóvenes estarían sugiriendo que las diferencias entre ambos genotipos serían observables desde edades tempranas.

Por otra parte, las tres paraoxonasas mostraron una mayor expresión el DPN 15 que el DPN 30, concordando con lo observado en diversos estudios en ratones, donde se ha observado que la máxima expresión es el DPN 15 para PON1, disminuyendo gradualmente hasta la adolescencia (Cheng and Klaassen, 2012; Li et al., 1997); entre el DPN 7-21 para la expresión de PON2; y el DPN 21 para la expresión de PON3 (Garrick et al., 2016). Sin embargo, la expresión de PON1 respondió a un patrón de maduración específico en cada genotipo. Por su parte apoE3 presentó una mayor expresión de este gen el DPN 15 que apoE4, igualándose ambos genotipos al DPN 30. PON1 es la más abundante de las paraoxonasas, y es la única que interviene en la metabolización de CPF (Furlong et al., 2016). Cabe la posibilidad de que apoE4, en particular, experimentara una expresión mayor días antes o días después del DPN 15. Igualmente, se puede considerar que apoE4 no presente jamás un nivel de expresión como el de apoE3, y que el observado el DPN 15 sea el nivel máximo de expresión de PON1 para este genotipo. Esto podría explicar por qué apoE4 se vería más afectado a largo plazo a estímulos que generan estrés oxidativo como lesiones o exposición a tóxicos. La valoración conjunta de los resultados de la expresión de PON1 y BChE podría reflejar que los individuos apoE3 poseen un mecanismo de defensa mejor adaptado a los OPs, en comparación a los portadores del genotipo apoE4. En cualquier caso, estos datos deben tomarse con cautela, ya que no disponemos de niveles de actividad PON1 para estos sujetos.

Por otro lado, se observó que los machos apoE3-control respecto al resto de grupos presentaron una leve diferencia, aunque no significativa, en la expresión de PON2 al DPN 15, por lo que nuestros resultados de PON2 deben ser analizados con prudencia. Sin embargo, la interacción entre genotipo apoE y CPF fue más evidente en PON3, con

un incremento de la expresión de este marcador en los sujetos apoE3, mediado por el insecticida. Es bien sabido que ambas paraoxonasas desempeñan una función antioxidante (Furlong et al., 2016). Por otra parte, existe evidencia suficiente que destaca el efecto de CPF sobre la formación de ROS en varios órganos y líneas celulares (Chiapella et al., 2013; Cometa et al., 2007; Crumpton et al., 2000; Garcia et al., 2005; Lee et al., 2012; Ma et al., 2013). El estudio de Garcia et al. (2005) sugirió que la formación de ROS podría contribuir en los efectos neurotóxicos debidos a la exposición a CPF en periodo postnatal a largo plazo. No existen estudios que evidencien una relación entre la expresión de PON3 y CPF, aunque en un estudio se indica el aumento de la expresión de PON2 por tratamiento con CPF (Jasna et al., 2014). Desde este contexto, se podría sugerir que el aumento de ROS inducido por CPF favorecería la expresión de moléculas como PON2 y PON3. Curiosamente, apoE4 no respondió de la misma manera a CPF, lo cual puede ser debido a que los individuos portadores de apoE4 no presentan el mismo perfil de defensa antioxidante que los apoE3.

El sistema colinérgico tiene un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso. La liberación de ACh influye en procesos de neurogénesis, crecimiento y guía axonal, formación y estabilización de contactos sinápticos, y establecimiento de redes neurales. En este sentido, tanto la ChAT como la VAcHT, involucradas en la síntesis y almacenamiento de la ACh, se expresan desde el periodo embrionario en las neuronas colinérgicas, al igual que mAChRs, nAChRs y AChE (Abreu-Villaça et al., 2011).

De igual modo, dentro del periodo estudiado, cada uno de los componentes presentó un patrón de maduración específico. Los resultados de nuestro estudio muestran que el VAcHT presentó una mayor expresión el DPN 15 que el DPN 30. Diversos estudios han revelado que la máxima expresión de VAcHT en rata se presenta durante las dos primeras semanas de vida, disminuyendo hasta alcanzar los niveles de adulto el DPN 21 (Aubert et al., 1996; Sun et al., 1997). Estas observaciones son similares a nuestros resultados. Sin embargo, el tratamiento con CPF disminuyó la expresión de VAcHT en apoE3 en el DPN 15, manteniéndose este efecto 15 días después del tratamiento. Investigaciones anteriores han evidenciado que tanto una exposición prenatal como postnatal pueden disminuir los niveles de VAcHT, en ratas, observándose este efecto

hasta 30 días después de la exposición (Richardson and Chambers, 2005, 2004). Otro trabajo también comprobó que el OP -diisopropilfluorofosfato (DFP)- y el carbamato -fisostigmina- reducían la expresión de VAcHT *in vitro* (Kaufer et al., 1999). En conjunto parece que los datos apuntan a un efecto que podría perdurar en el tiempo y explicar algunas disfunciones asociadas al sistema colinérgico, a largo plazo. En nuestro caso, se podría sugerir que los individuos portadores de apoE3 serían más sensibles al efecto provocado por CPF sobre este marcador. Una disminución de VAcHT podría resultar en una menor liberación de ACh al espacio sináptico, ejerciendo un efecto protector bajo los efectos del tóxico CPF. No obstante, si se mantiene a largo plazo dejaría un sistema hipofuncional. Muy pocos estudios han relacionado el genotipo apoE con VAcHT. En un estudio con ratones *knockout* apoE, se observó que los niveles de VAcHT están disminuidos un 50% en neuronas del prosencéfalo basal (Kleinfeld et al., 1998). También se ha revelado una disminución de expresión de VAcHT por la edad, en ratones transgénicos apoE, siendo más pronunciada en el genotipo apoE4 (Dolejší et al., 2016). Estas evidencias junto con nuestros resultados sugerirían que el genotipo apoE puede influir sobre las fluctuaciones de este marcador colinérgico en el SNC.

Por otro lado, sólo la edad influyó en la expresión de la ChAT. Este gen presentó su mayor expresión el DPN 30. En línea con lo observado, diversos estudios han revelado que la expresión de la ChAT llega a los niveles de adulto a la tercera semana de vida en ratas y ratones (Descarries et al., 2005; Ninomiya et al., 2001; Sun et al., 1997).

La expresión de M1 y M4 no reveló diferencias significativas entre el DPN 15-30, mientras que M2 y M3 mostraron una mayor expresión el DPN 30, estos datos se asemejan a los descritos por Wall et al. (1992) que además indica que los receptores mAChRs M1, M2, M3 y M4 presentan una alta densidad entre el DPN 20-50 y que M5 conserva una menor densidad desde el nacimiento, sin cambios considerables, coincidiendo también con nuestras observaciones.

En relación a los receptores mAChRs y CPF, las hembras-CPFI mostraron un aumento de la expresión de M2, 15 días después del tratamiento, presentando niveles similares al de los machos. Rhodes et al. (2004) también observaron diferencias entre sexos después

de una exposición a CPF en la ventana postnatal tardía. Estos autores indican que la unión de ACh a M2 en el DPN 60 aumentó en hipocampo, mesencéfalo y tronco cerebral en hembras; y en corteza frontal en machos. Otros autores han mostrado que diversos componentes del sistema colinérgico se pueden afectar por la exposición postnatal a CPF, como por ejemplo la actividad de ChAT (Dam et al., 1999; Richardson and Chambers, 2005, 2004, 2003; Slotkin et al., 2001) y la unión de colina en el recaptador de colina (Dam et al., 1999; Richardson and Chambers, 2004; Slotkin et al., 2001), sin aparentes signos de intoxicación colinérgica. Asimismo, estas variaciones también han sido observadas tras la exposición prenatal a dosis similares a las usadas en este estudio, en ratas adolescentes y adultas jóvenes (Qiao et al., 2003). Algunos autores han sugerido que la exposición temprana a CPF podría estar reduciendo la actividad tónica de las proyecciones colinérgicas, induciendo una regulación del receptor M2, coincidiendo en que dichas alteraciones son sexo dimórficas (Rhodes et al., 2004; Slotkin et al., 2001). En nuestro caso, el tratamiento con CPF tiende a igualar los niveles de expresión entre sexos. Sería interesante analizar si esta equivalencia observada entre machos y hembras-CPF se mantiene en el tiempo, o si aparecen efectos retardados a lo largo de la vida.

En tanto, las hembras apoE3 exhibieron un leve aumento de expresión de M5 inducido por el tratamiento con CPF en el DPN 15. Numerosos estudios han valorado los efectos de exposiciones a CPF sobre la unión a receptores mAChRs, revelando una disminución inmediata después o a lo largo del periodo de tratamiento (Guo-Ross et al., 2007; Huff et al., 1994; Liu et al., 1999; Zhang et al., 2002; Zheng et al., 2000). Sin embargo, no se tiene información acerca de cambios en la expresión de M5 provocados por la exposición a CPF hasta la fecha. Durante el periodo de desarrollo, cada uno de los receptores mAChRs modulan los efectos de ACh sobre la proliferación, diferenciación y supervivencia neural (Abreu-Villaça et al., 2011), Por lo que se necesitarían estudios más profundos para ver las repercusiones de este aumento de la expresión de M5 en las hembras apoE3.

Con respecto a la expresión de las isoformas de la AChE, se observó que la AChE-S cumple con un patrón de maduración específico, presentando una mayor expresión el

DPN 15. Oriol and Kofman (2015) observaron que la expresión de AChE-S aumenta con la edad en C57BL/6, mientras que la AChE-R disminuía en el periodo DPN 4-10. Esta observación está acorde con nuestros resultados. De hecho, todos los cambios encontrados en la expresión de los componentes del sistema colinérgico a lo largo del desarrollo son consistentes con el período de intensa sinaptogénesis colinérgica en los roedores, que ocurre durante las 3 primeras semanas de vida (Dobbing and Sands, 1979).

La expresión de las isoformas AChE se vio influenciada por el genotipo apoE. Los sujetos apoE3 expresaron más AChE-S que apoE4, mientras que los apoE4 expresaron la AChE-R en mayor medida. En condiciones normales, se expresa más la isoforma AChE-S, sin embargo, las neuronas corticales y del hipocampo, frente a una inhibición de la AChE o tras estímulos externos nocivos, responden aumentando la expresión de AChE-R mediante *splicing* alternativo (Härtl et al., 2011; Soreq and Seidman, 2001), en nuestro caso los sujetos apoE4 presentan una mayor actividad ChE cerebral por lo que esta expresión aumentada de la AChE-R no iría en el mismo sentido. Diversos artículos indican que el genotipo apoE4 confiere una capacidad antioxidante débil (Colton et al., 2005; Villasana et al., 2016; Young et al., 2005). De este modo, una posible explicación a nuestros resultados sobre apoE4 a nivel cerebral sería que el incrementado estrés oxidativo, inherente de este grupo, produzca un incremento en la expresión de AChE-R. Posiblemente, esta diferencia de expresión de las diferentes isoformas de AChE sea un mecanismo que interfiera en la funcionalidad del sistema colinérgico entre ambos genotipos. Asimismo, esto se podría vincular a diversas investigaciones que han manifestado una relación importante del genotipo apoE4 y una hipofuncionalidad del sistema colinérgico (Chapman et al., 2000; Dolejší et al., 2016; Reverte et al., 2016; Siegel et al., 2011). Por otro lado, el tratamiento con CPF no aumentó la expresión de ninguna de las isoformas de AChE, ni en apoE3 ni apoE4. Este dato tampoco se corresponde con los datos reportados en un estudio que encuentra un incremento de la expresión de AChE-R en ratas adultas expuestas a CPF (López-Granero et al., 2013b). Una posible explicación es que los efectos observados durante el desarrollo difieran de los efectos en adultos. De hecho, en dos estudios en los que se administró CPF durante el periodo postnatal, no se detectaron diferencias a este nivel (Jameson et al., 2006; Oriol and Kofman, 2015).

Las diferencias observadas en este sistema podrían estar relacionadas con déficits funcionales a largo plazo, incluso con distintas respuestas a re-exposiciones con CPF o al tratamiento con fármacos agonistas o antagonistas del sistema colinérgico. Estos efectos a largo plazo deberían ser estudiados en un futuro.

Actividad ChE

La actividad ChE, tanto en plasma como en cerebro aumento con la edad entre el periodo DPN 15-30 en todos los sujetos. En plasma, se observó una inhibición significativa de ChE como efecto del tratamiento con CPF. A su vez, se observaron diferencias entre genotipos en la actividad ChE cerebral principalmente en el DPN 15.

Asimismo, CPF modificó la actividad ChE plasmática de todas las crías 4 h después de la última dosis de CPF, con un 50% de inhibición. La BChE plasmática es el biomarcador por excelencia para revelar intoxicaciones por CPF (Lockridge, 2015), constituyendo casi el 100% de la ChE plasmática en humanos (Ecobichon and Stephens, 1973), mientras que la proporción AChE:BChE es de un 50:50 en rata y ratón (Timchalk et al., 2006). Además, puede presentarse una inhibición de ChE plasmática de hasta el 70% en humanos, sin haber signos de intoxicación colinérgica (Nolan et al., 1984; Savolainen, 2001). Por otro lado, se sabe que CPF provoca una mayor inhibición de la ChE plasmática que de la cerebral. Así por ejemplo, utilizando un modelo farmacocinético se demostró en ratas de 17 días de vida, que la inhibición de la AChE cerebral era sólo de un 2,1% a las 3 h de recibir una dosis de 1 mg/kg de CPF, mientras la actividad ChE plasmática había descendido un 22% (Timchalk et al., 2007, 2006). Los estudios de Ricceri et al. (2006, 2003), realizados en ratones, evidenciaron una inhibición ChE en sangre, junto con una nula modificación de ChE cerebral. Esto es comparable a los datos proporcionados por Carr et al. (2014) los cuales revelan inhibición ChE y carboxilesterasa en suero, sin inhibición ChE cerebral en animales expuestos a CPF 0,5 mg/kg/día durante el período DPN 10-16. En conjunto, nuestros resultados y los reportados por otros autores respaldan el hecho de que la inhibición producida por CPF es mayor en la ChE plasmática que la cerebral. Por lo tanto, se puede suponer que, en este estudio, no se alcanzó una evidente toxicidad colinérgica en SNC.

En cerebro, los individuos apoE4 presentaron mayor actividad ChE que los apoE3. Investigaciones en humanos han señalado un incremento de la actividad de esta enzima en pacientes EA portadores del genotipo apoE4 (Eggers et al., 2006; Soininen et al., 1995). Un aumento de AChE total puede ser causado por una mayor expresión de AChE-R (Härtl et al., 2011). Por lo que se podría sugerir que una mayor actividad de ChE cerebral en apoE4 sería relativa a la mayor expresión de AChE-R observada en estos individuos. Tampoco se puede descartar que sea un hecho puntual del DPN 15 debido a un patrón de maduración específico de apoE4 sobre esta enzima. Evaluar la expresión y la actividad ChE en diferentes periodos de la vida sería interesante, para definir mejor un perfil específico para cada genotipo.

Por otro lado, la inhibición ChE plasmática sólo se mantiene a los 30 días en apoE3, esto podría sugerir una sensibilidad especial a CPF en este genotipo.

Peso corporal del primer a quinto mes

Se observó una clara diferencia del peso entre machos y hembras desde el 2º mes de vida, como también un mayor peso en las hembras apoE3 desde el destete. Por otra parte, los machos apoE4-CPF1 presentaron un aumento significativo de su peso corporal desde el tercer mes de vida, en comparación a sus congéneres controles.

Como era de esperarse, el peso entre machos y hembras comenzó a diferenciarse post-lactancia, presentando los machos un peso superior que las hembras. En línea con estos resultados, diversos trabajos en periodo de desarrollo, realizados anteriormente en este laboratorio no han observado diferencias a este nivel entre machos y hembras, antes del destete (Fuentes et al., 2007; Reverte et al., 2014a; Ribes et al., 2010). Asimismo, después de este periodo, se comienza a evidenciar el aumento de peso característico presentando por los ratones machos (Byerly et al., 2013; Reverte et al., 2013, 2012; Ribes et al., 2010; Wainwright and Francey, 1987).

En tanto, las hembras apoE3 presentaron un peso más elevado entre el destete y el quinto mes, este dato ya se había observado en nuestro laboratorio a los 4 meses de vida (Reverte et al., 2013, 2012), y coincide con datos previos de otro laboratorio

(Grootendorst et al., 2005). Se ha descrito que los ratones portadores del genotipo apoE3 presentan una mayor adiposidad que los portadores de apoE4, manteniendo un peso corporal superior a lo largo de la vida (Arbones-Mainar et al., 2016, 2008; Segev et al., 2016). En definitiva, la deficiencia de apoE4 en el almacenamiento de lípidos, contraria a la presentada por sus pares apoE3, podría explicar en parte el bajo peso corporal manifestado por las hembras desde la adolescencia hasta la edad adulta.

El peso corporal de los machos apoE4 se modificó a causa de la exposición a CPF a partir del tercer mes de vida. Un estudio de Lassiter and Brimijoin (2008) reveló un aumento similar en ratas machos, a causa de una exposición perinatal a CPF. Estos autores sugirieron que tal exposición podría inducir una reprogramación del peso corporal, aumentando la adiposidad a largo plazo. En efecto, la programación de la función metabólica se ve alterada por una exposición a CPF en periodo neonatal (Meyer et al., 2004). Por otra parte, estudios realizados por nuestro equipo de trabajo, han revelado que una exposición crónica a CPF, en edad adulta, induce un aumento de peso en el genotipo apoE3 y en ratones C57BL/6 (Peris-Sampedro et al., 2015a, 2015b). Un estudio de Slotkin et al. (2005a) evidenció que tras una exposición temprana a CPF, ratas machos aumentaban sus niveles de insulina y triglicéridos en plasma. Acorde a esta evidencia, nuestros resultados sugieren que una exposición a CPF en periodo postnatal tardío alteraría el metabolismo de apoE4 a largo plazo. En este sentido, se observó que un consumo mantenido de una dieta rica en grasas provocaba en ratones apoE4 de 4 meses modificaciones en los niveles de triglicéridos e insulina, no así en los individuos apoE3 (Segev et al., 2016), sugiriéndose que este genotipo presenta una vulnerabilidad especial a desarrollar alteraciones a nivel metabólico.

En conclusión, estos resultados indican importantes diferencias entre genotipos en cuanto a desarrollo, expresión de componentes del sistema colinérgico y relacionados a la detoxificación de CPF. En tanto, el tratamiento con CPF entre el periodo DPN 10-15, tendría consecuencias a corto y a medio plazo. Sin embargo, nuestros hallazgos vuelven a evidenciar que tales efectos están determinados por el genotipo apoE.



Fase Experimental II

Efectos en la edad adulta

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

I. Resultados

La segunda fase experimental estudió los efectos a largo plazo de la exposición postnatal a CPF y la respuesta a una re-exposición a 2 mg/kg/día de CPF durante 8 semanas en ratones transgénicos apoE adultos de 5 meses de edad. Se valoró la evolución del peso a lo largo del periodo, glicemia en ayuno, la conducta social, el aprendizaje y memoria espacial, así como la actividad ChE (**Figura 27**). Los animales estudiados se distribuyeron en: grupo control (**control**), grupo expuesto a 1 mg/kg/día de CPF durante el periodo postnatal (**CPF1**); grupo expuesto a 2 mg/kg/día de CPF en edad adulta (**CPF2**); grupo expuesto a 1 mg/kg/día de CPF durante el periodo postnatal y re-expuestos a 2 mg/kg/día de CPF en edad adulta (**CPF1+CPF2**).

Los resultados de esta fase se presentarán en el siguiente orden:

Peso corporal e ingesta de comida: registro semanal desde el quinto a séptimo mes de vida.

Glicemia: determinación de la glucosa sanguínea al séptimo mes de vida.

Comportamiento social: socialización y preferencia por la novedad valorada en machos con la prueba de tres compartimentos de Crawley a los 15 días de re-exposición a CPF.

Aprendizaje y memoria espacial: evaluados mediante el laberinto de Barnes, en machos y hembras desde los 30 días de re-exposición a CPF.

Actividad ChE: plasmática y cerebral a los siete meses de edad

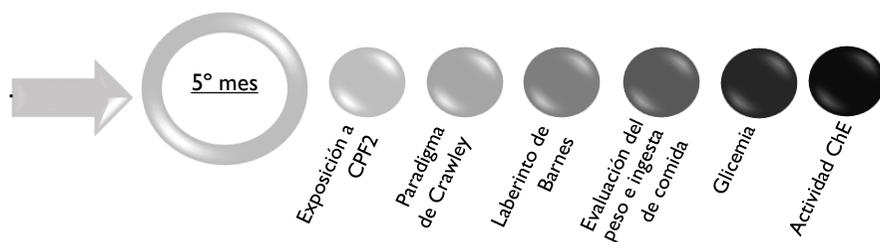


Figura 27. Esquema de la fase experimental II dentro de la línea de tiempo de la investigación.

Peso corporal e ingesta de comida

Se registró el peso corporal y la ingesta semanalmente durante 8 semanas, desde el quinto a séptimo mes de vida.

Peso corporal

Se evaluó el peso corporal de los individuos mediante un ANOVA de cuatro factores (sexo, genotipo, tratamiento postnatal y tratamiento adulto), para medidas repetidas, utilizando la edad como factor de repetición. Este análisis mostró un efecto general de la edad [$F(7,127)=91,930$, $p<0,001$], indicando que todos los sujetos aumentaron de peso, a lo largo de estas 8 semanas (Figura 28); del sexo [$F(1,148)=536,605$, $p<0,001$], mostrando que los machos pesaban más que las hembras; del genotipo [$F(1,148)=21,632$, $p<0,001$], revelando que el genotipo apoE3 presentó un mayor peso corporal; y del tratamiento postnatal [$F(1,148)=6,664$, $p=0,011$], mostrando que los sujetos expuestos durante el periodo postnatal a CPF presentaron un mayor peso corporal. También, se observaron interacciones entre la edad y el sexo [$F(7,127)=3,609$, $p=0,001$], la edad y el genotipo [$F(7,127)=6,170$, $p<0,001$], la edad y el tratamiento postnatal [$F(7,127)=2,200$, $p=0,038$], la edad y el tratamiento adulto [$F(7,127)=7,179$, $p<0,001$], la edad, el sexo y el genotipo [$F(7,127)=2,775$, $p=0,010$], la edad, el sexo y el tratamiento adulto [$F(7,127)=3,458$, $p=0,005$] y entre la edad, el sexo, el genotipo y el tratamiento adulto [$F(7,127)=2,304$, $p=0,030$].

A partir de estas observaciones, se decidió estudiar con detalle las diferencias entre grupos de tratamiento, en cada sexo y genotipo, mediante un ANOVA por cada semana (Figura 28). Este análisis no mostró diferencias entre grupos de machos apoE3 (Figura 28A), mientras que en los machos apoE4 se encontraron diferencias en todas las semanas evaluadas (primera [$F(3,38)=6,213$, $p<0,001$]; segunda [$F(3,38)=4,574$, $p=0,008$]; tercera [$F(3,38)=3,730$, $p=0,020$]; cuarta [$F(3,38)=4,246$, $p=0,012$]; quinta [$F(3,38)=3,737$, $p=0,020$]; sexta [$F(3,38)=5,683$, $p=0,003$]; séptima [$F(3,38)=9,742$, $p<0,001$]; octava [$F(3,38)=9,266$, $p<0,001$]). El análisis *post-hoc* indicó que en la primera semana el grupo CPF1 presentó un peso superior, en comparación a sus pares controles, el cual se venía arrastrando desde el tercer mes de vida. Desde la segunda semana, CPF1 - CPF2 comenzó a presentar un peso mayor que sus pares controles y a la sexta semana

estas diferencias también empezaron a observarse con CPF1. En la última semana de re-exposición, CPF1+CPF2 alcanzó el mayor peso entre todos los grupos de tratamiento (Figura 28A). En tanto, en las hembras, este análisis no mostró diferencias entre grupos de tratamiento (Figura 28B).

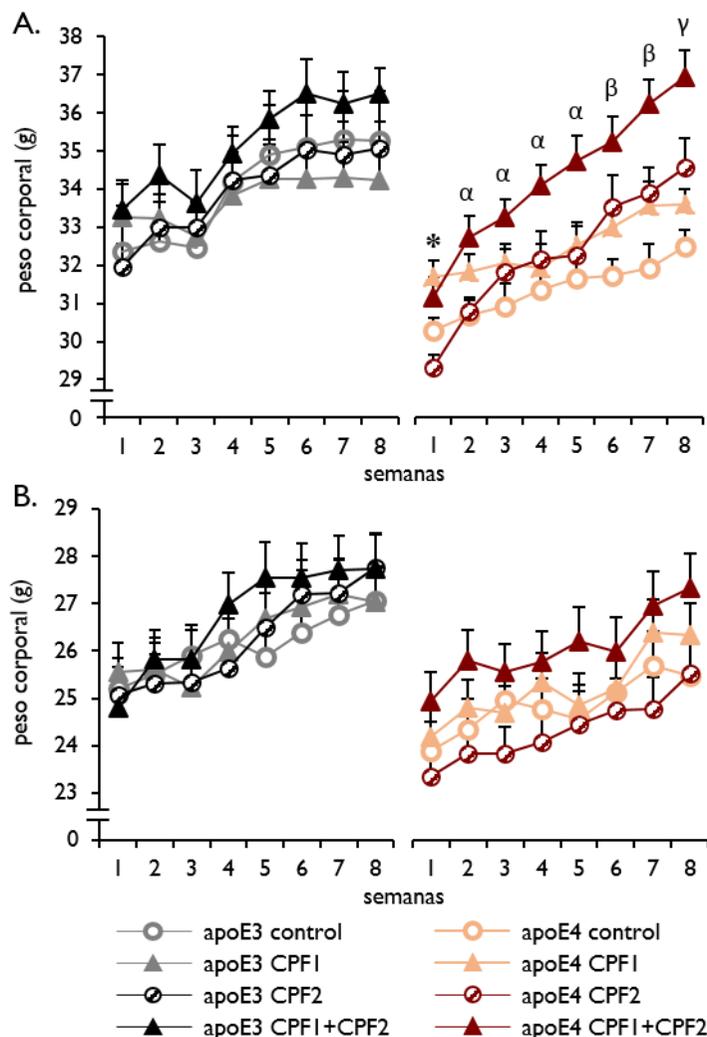


Figura 28. Peso corporal de machos (A) y hembras (B), desde el quinto a séptimo mes de vida. Diferencia entre apoE4 control y CPF1 representada con un asterisco; entre control y CPF1+CPF2 con el símbolo α ; entre control, CPF1 y CPF1+CPF2 con el símbolo β ; y entre todos los grupos de machos apoE4 con el símbolo γ , a $p < 0,05$.

Como análisis adicional, se estudió el incremento de peso obtenido a lo largo de estas 8 semanas. Mediante un ANOVA de cuatro factores (sexo, genotipo, tratamiento

postnatal y tratamiento adulto), se observó un efecto general del sexo [$F(1,148)=20,006$, $p<0,001$, $\eta^2=0,078$]; del genotipo [$F(1,148)=5,723$, $p=0,018$, $\eta^2=0,022$]; y del tratamiento adulto [$F(1,148)=47,683$, $p<0,001$, $\eta^2=0,186$]. Cada uno de estos factores explicaría un 8%, 2,2% y un 19% de la varianza, respectivamente. La **Figura 29** muestra que, en general, el incremento de peso es mayor en machos (**Figura 29A**) y en apoE4 (**Figura 29B**). Igualmente, se encontraron interacciones entre el sexo y el genotipo [$F(1,148)=10,175$, $p=0,002$, $\eta^2=0,040$], el sexo y el tratamiento adulto [$F(1,148)=10,146$, $p=0,002$, $\eta^2=0,039$], el sexo, el genotipo y el tratamiento adulto [$F(1,148)=10,641$, $p=0,001$, $\eta^2=0,042$].

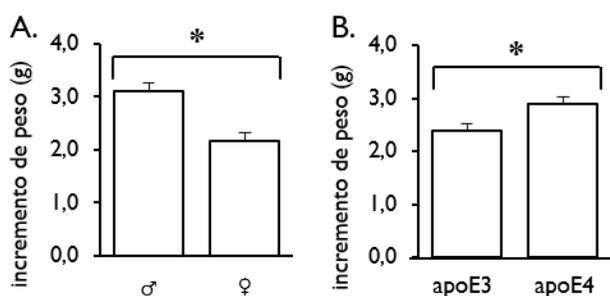


Figura 29. Efectos generales del sexo (A) y del genotipo (B) sobre el incremento de peso corporal de 8 semanas, desde el quinto a séptimo mes de vida. Diferencias están representadas con un asterisco a $p<0,05$.

Debido a las interacciones observadas se realizó un análisis adicional entre grupos de tratamiento, en función del sexo y genotipo (**Figura 30**), observándose diferencias entre machos apoE3 [$F(3,34)=5,090$, $p=0,006$], donde CPF1 presentó el menor incremento de peso (**Figura 30A**). En los machos apoE4 también se observaron diferencias [$F(3,38)=11,127$, $p<0,001$], siendo CPF2 y CPF1+CPF2 los que incrementaron mayormente de peso, en comparación al control y CPF1, respectivamente (**Figura 30A**). A su vez, también se observaron diferencias entre las hembras apoE3 [$F(3,37)=3,3262$, $p=0,033$], donde CPF1+CPF2 incrementó su peso en mayor medida que CPF1 (**Figura 30B**). No se observaron diferencias en las hembras apoE4 (**Figura 30B**). Si bien, el tratamiento adulto es un efecto general, este factor es responsable del 13% de la varianza observada en los machos apoE3 ([$F(1,34)=5,975$, $p=0,020$, $\eta^2=0,129$]), del 21% en las hembras apoE3 ([$F(1,37)=9,115$, $p=0,005$, $\eta^2=0,208$]) y del 52,5% en los machos apoE4 ([$F(1,38)=40,649$, $p<0,001$, $\eta^2=0,525$]).

En general, los resultados indican que el tratamiento en edad adulta, ya sea la primera o segunda exposición al insecticida, produce un incremento de peso general. El tratamiento postnatal causó en los machos apoE3 un crecimiento significativamente menor, efecto revertido con la re-exposición.

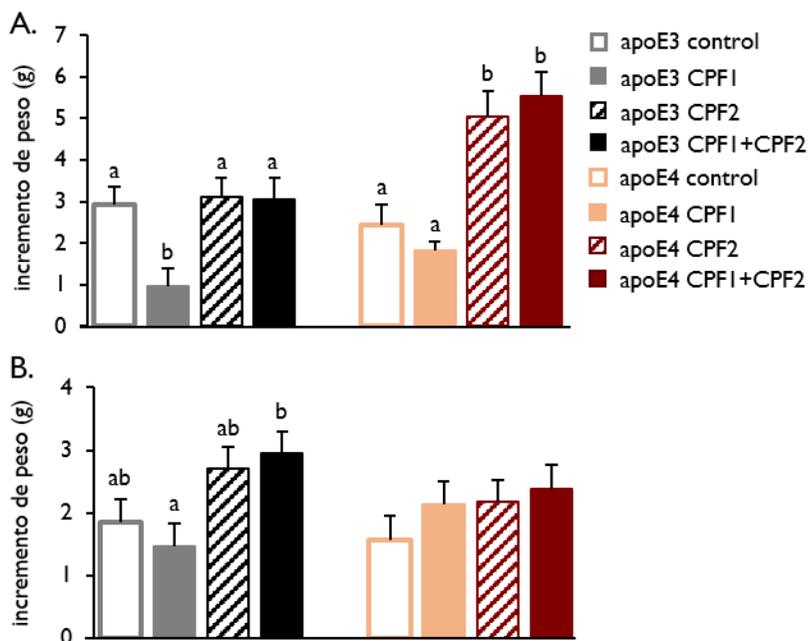


Figura 30. Incremento de peso corporal de 8 semanas, desde el quinto a séptimo mes de vida, en machos (A) y en hembras (B). Diferencias dentro de cada genotipo están representadas con distintas letras a $p < 0,05$.

Ingesta de comida

Se analizó el promedio de la ingesta de comida, durante las 8 semanas de re-exposición (Figura 31). Un ANOVA de cuatro factores (sexo, genotipo, tratamiento postnatal y tratamiento adulto) mostró un efecto general del sexo [$F(1,148)=87,451$, $p < 0,001$, $\eta^2=0,170$]; del tratamiento postnatal [$F(1,148)=4,764$, $p=0,046$, $\eta^2=0,008$]; y del tratamiento adulto [$F(1,148)=207,480$, $p < 0,001$, $\eta^2=0,403$]. Cada uno de estos factores explicaría un 17%, 0,8% y un 40,3% de la varianza, respectivamente. También, se encontraron interacciones entre el sexo y el genotipo [$F(1,148)=13,074$, $p < 0,001$, $\eta^2=0,025$], el sexo y el tratamiento postnatal [$F(1,148)=13,666$, $p < 0,001$, $\eta^2=0,027$], el genotipo y el tratamiento postnatal [$F(1,148)=5,219$, $p=0,024$, $\eta^2=0,010$] y tratamiento postnatal y el tratamiento adulto [$F(1,148)=8,692$, $p=0,004$, $\eta^2=0,017$], el sexo, el

genotipo y el tratamiento adulto [$F(1,148)=5,116, p=0,025, \eta^2=0,010$] y de todos los factores [$F(1,148)=35,264, p<0,001, \eta^2=0,070$]. A partir de estas interacciones, se realizó un ANOVA separando por cada sexo y genotipo. El análisis mostró diferencias entre grupos de tratamientos de machos apoE3 [$F(3,34)=30,004, p<0,001$], machos apoE4 [$F(3,38)=29,213, p<0,001$], hembras apoE3 [$F(3,37)=30,304, p<0,001$] y hembras apoE4 [$F(3,36)=9,973, p<0,001$]. Concretamente, en los machos apoE3, CPF1 ingirió un 10,3%, 16,2% y 12,5% menos que el control, CPF2 y CPF1+CPF2, respectivamente. Asimismo, apoE3-CPF2 ingirió un 7% más que el control. En tanto, entre machos apoE4, CPF2 consumió un 20% más comida que el control. Con respecto a las hembras apoE3, CPF2 y CPF1+CPF2 ingirieron un 16,3% y 12,6% más que el control y CPF1, respectivamente. Los grupos de hembras apoE4-CPF2 y apoE4-CPF1+CPF2 consumieron un 7,4% y 10,8% más comida que apoE4-control y apoE4-CPF1, respectivamente.

En resumen, estos datos señalan que la exposición a CPF en edad adulta produce un aumento de la ingesta de comida en todos los genotipos, tanto en machos como en hembras. En tanto, la exposición postnatal parece modular este efecto en apoE3 y en machos apoE4

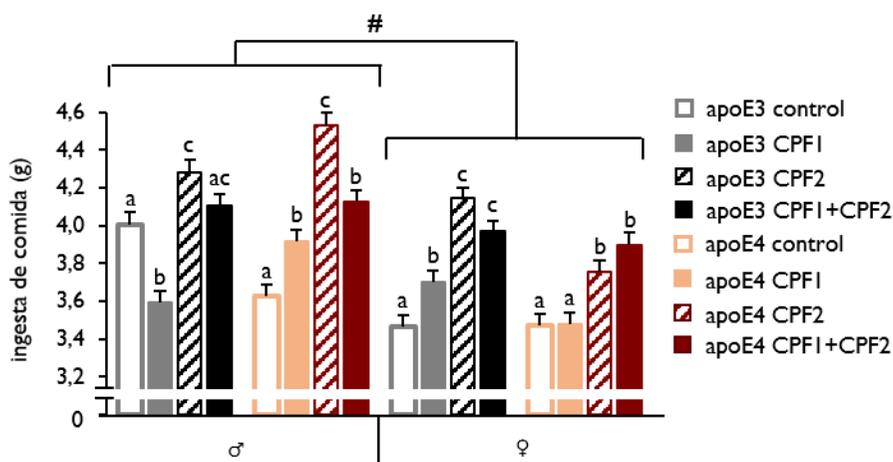


Figura 31. Ingesta de comida de 8 semanas, desde el quinto a séptimo mes de vida. Diferencias en machos apoE3, machos apoE4, hembras apoE3 y hembras apoE4, están indicadas con distintas letras a $p<0,05$.

Glicemia

Al finalizar el periodo de re-exposición a CPF, a los 7 meses de vida, se determinó la concentración de glucosa sanguínea después de un ayuno de 3 horas. A través de un ANOVA de cuatro factores (sexo, genotipo, tratamiento postnatal y tratamiento adulto) se observó un efecto general del sexo [$F(1,103)=14,317$, $p<0,001$, $\eta^2=0,088$] y del genotipo [$F(1,103)=4,050$, $p=0,047$, $\eta^2=0,025$]. Como se ilustra en la **Tabla 10**, los machos y el genotipo apoE4, presentan glicemias superiores a hembras y al genotipo apoE3, respectivamente. También se encontró un efecto general del tratamiento adulto [$F(1,103)=10,152$, $p=0,002$, $\eta^2=0,062$]. A partir de estos datos, se realizó un ANOVA para analizar diferencias entre grupos de tratamiento, en función de cada sexo y genotipo (**Tabla 11**). En las hembras apoE4 se observaron diferencias entre grupos [$F(3,24)=3,884$, $p=0,024$], siendo CPF1+CPF2 el que presentó una glicemia superior, en comparación al control. No se encontraron diferencias en hembras apoE3 ni en machos apoE3 y apoE4.

En general, los machos y el genotipo apoE4 presentaron glicemias más altas. Además, aunque el tratamiento en edad adulta incrementa los niveles de glucosa en sangre en algunos grupos, son las hembras re-expuestas apoE4 las que manifiestan una alteración significativa.

Tabla 10. Glicemias (mmol/L) de ambos sexos y genotipos

♂	♀	apoE3	apoE4	Efectos generales	
				Sexo	Genotipo
11 ± 0,2*	9,6 ± 0,2*	10 ± 0,2#	10,6 ± 0,2#	$p<0,001$	$p=0,047$

Diferencia entre sexos representada con un asterisco, y entre genotipos con el símbolo #, a $p<0,05$.

Tabla 11. Glicemias (mmol/L) de cada grupo de tratamiento

		apoE3				ANOVA
		control	CPF1	CPF2	CPF1+CPF2	
♂		10,5 ± 0,4	10,6 ± 0,6	9,9 ± 0,3	11,1 ± 0,7	$p=0,459$
♀		9,2 ± 0,4	9,6 ± 0,5	10,1 ± 0,5	8,9 ± 0,4	$p=0,295$
		apoE4				ANOVA
		control	CPF1	CPF2	CPF1+CPF2	
♂		10,4 ± 0,7	10,3 ± 0,3	12,0 ± 0,4	11,8 ± 0,6	$p=0,066$
♀		8,7 ± 0,3*	9,9 ± 0,7	10,4 ± 0,1	10,8 ± 0,3*	$p=0,024$

Diferencia entre el grupo control y CPF1+CPF2 de las hembras apoE4 está representada con un asterisco a $p<0,05$.

Comportamiento social

A los 15 días de re-exposición a CPF, se evaluó la conducta social en machos adultos con la prueba de tres compartimentos de Crawley. Este experimento se llevó a cabo en tres fases: la primera fue la habituación, donde se valoró la actividad del animal; la segunda fue la socialización, en la cual se evaluó el interés por otro animal desconocido de su misma especie; y la tercera fue la preferencia por la novedad, a fin de comparar el interés por un nuevo animal, frente al anteriormente conocido.

Habitación

Durante la fase de habituación, el animal explora libremente la cámara durante un periodo de 10 min, valorándose el tiempo que pasa en cada compartimento, la latencia de salida del compartimento central y el número de entradas a ambos compartimentos. En cuanto al tiempo en cada compartimento, analizado mediante un *t*-test de medidas relacionadas, se observó que los animales no mostraron preferencias significativas por ninguno de los compartimentos laterales ($t=-1,385$, d.f.75, $p=0,171$). Sin embargo, sí se observan diferencias entre el tiempo en que los animales permanecen en los compartimentos laterales respecto al tiempo en el que están en el compartimento central ($t=-8,671$, d.f.75, $p<0,001$), a pesar de que este compartimento tiene las mismas dimensiones que los laterales. El menor tiempo de permanencia en el compartimento central podría ser debido a la presencia de las dos aberturas laterales que posiblemente confieran una menor seguridad a los sujetos, convirtiendo este espacio en uno aversivo. No obstante, un ANOVA de tres factores (genotipo x tratamiento postnatal x tratamiento adulto), para valorar posibles efectos del genotipo o el tratamiento en el tiempo en el compartimento central y la latencia de salida de esta zona, mostró que no existían diferencias significativas.

Además, también se analizó el número de entradas en los distintos compartimentos laterales (Figura 32), como parámetro de actividad. Mediante un ANOVA de tres factores (genotipo, tratamiento postnatal y tratamiento adulto), se observó un efecto general del genotipo [$F(1,75)=14,468$, $p<0,001$, $\eta^2=0,161$], mostrando que los sujetos apoE3 realizaron un número mayor de entradas a los compartimentos laterales que los individuos apoE4. Este factor explicaría el 16% del efecto observado sobre la actividad.

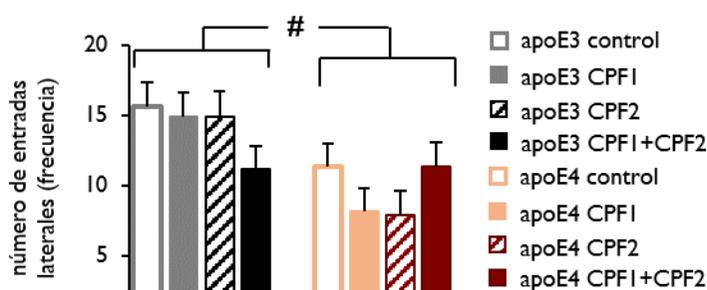


Figura 32. Número de entradas a los compartimentos laterales en la habituación de la prueba de tres compartimentos de Crawley. Diferencia entre genotipos está representada con el símbolo # a $p < 0,05$.

Socialización

En esta fase se valoró la actividad analizando la latencia de salida del compartimento central y las entradas en los compartimentos laterales; y la socialización se estudió analizando los tiempos en el compartimento social y no social, y la exploración social (cociente entre el tiempo de exploración social y el tiempo total de exploración).

La latencia de salida y entradas en los compartimentos laterales (Figura 33) se valoraron mediante un MANOVA, que mostró un efecto del genotipo [$F(2,67)=38,522$, $p < 0,001$], del tratamiento adulto [$F(2,67)=3,906$, $p = 0,025$] y una interacción del tratamiento postnatal y el tratamiento en adulto [$F(2,67)=4,776$, $p = 0,012$].

Concretamente, la latencia de salida se modificó por el genotipo [$F(1,75)=6,912$, $p = 0,011$, $\eta^2 = 0,074$], el tratamiento adulto [$F(1,75)=4,080$, $p = 0,047$, $\eta^2 = 0,043$] y una interacción del tratamiento postnatal y tratamiento adulto [$F(1,75)=9,268$, $p = 0,003$, $\eta^2 = 0,099$]. Así, el genotipo representa un 7,4%, el tratamiento adulto un 4,3% y la interacción entre tratamientos un 10%. Adicionalmente, mediante un ANOVA, se observaron diferencias entre grupos de tratamiento [$F(1,75)=3,666$, $p = 0,002$], siendo apoE4-CPF1 el grupo que tardó más tiempo en salir del compartimento central (Figura 33A).

En tanto, las entradas a los compartimentos laterales variaron en función del genotipo [$F(1,75)=55,079$, $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,413$] y el tratamiento adulto [$F(1,75)=5,497$, $p = 0,022$,

$\eta^2=0,041$]. Ambos factores explican un 41% y un 4,1% de la varianza, respectivamente. Un análisis más detallado entre los grupos de tratamiento mostró diferencias entre ellos [$F(1,75)=9,339$, $p<0,001$]. Como se ilustra en la **Figura 33B**, las diferencias están dadas principalmente entre grupos de distinto genotipo.

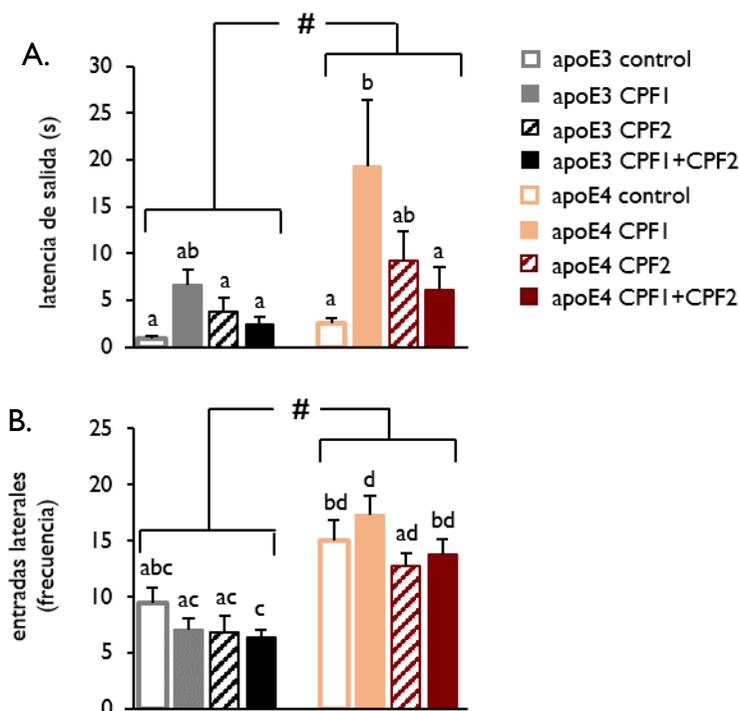


Figura 33. Actividad en la fase de socialización de la prueba de tres compartimentos de Crawley. Latencia de salida del compartimento central (A) y entradas a los compartimentos laterales (B). Diferencia entre genotipos representada con el símbolo # y entre grupos con distintas letras a $p<0,05$.

En cuanto a la socialización, mediante un *t*-test de medidas relacionadas, se constató una clara preferencia por el compartimento social ($t=4,347$, *d.f.*75, $p<0,001$).

Por otra parte, en el MANOVA de las variables de socialización, tiempo en el compartimento social y no social, se observó un efecto del genotipo [$F(2,67)=35,184$, $p<0,001$], del tratamiento adulto [$F(2,67)=8,195$, $p=0,001$] y una interacción del genotipo y el tratamiento postnatal [$F(2,67)=6,499$, $p=0,003$].

En relación al tiempo en el compartimento social, éste se modificó en función del genotipo [$F(1,75)=23,106$, $p<0,001$, $\eta^2=0,133$] y el tratamiento adulto [$F(1,75)=6,098$, $p=0,001$, $\eta^2=0,087$]. Ambos factores explicarían el 13,3% y el 8,7% de la varianza. La **Figura 34** muestra que apoE3 permaneció más tiempo en el compartimento social que apoE4. Asimismo, un análisis más detallado entre grupos de tratamientos reveló diferencias [$F(1,75)=3,664$, $p=0,002$], CPF2 y CPF1+CPF2 en apoE3 permanecieron más tiempo explorando este compartimento, en comparación con algunos grupos apoE4 y apoE3 (**Figura 34**).

Por otro lado, el análisis del tiempo en el compartimento no social mostró una interacción del genotipo y el tratamiento postnatal [$F(1,75)=9,042$, $p=0,004$, $\eta^2=0,109$]. Esta interacción explicaría el 11% del efecto observado. Adicionalmente, se realizó un ANOVA con todos los grupos de tratamiento, revelándose diferencias entre ellos [$F(7,75)=2,183$, $p=0,046$]. El análisis *post-hoc* no mostró diferencias significativas (**Figura 34**).

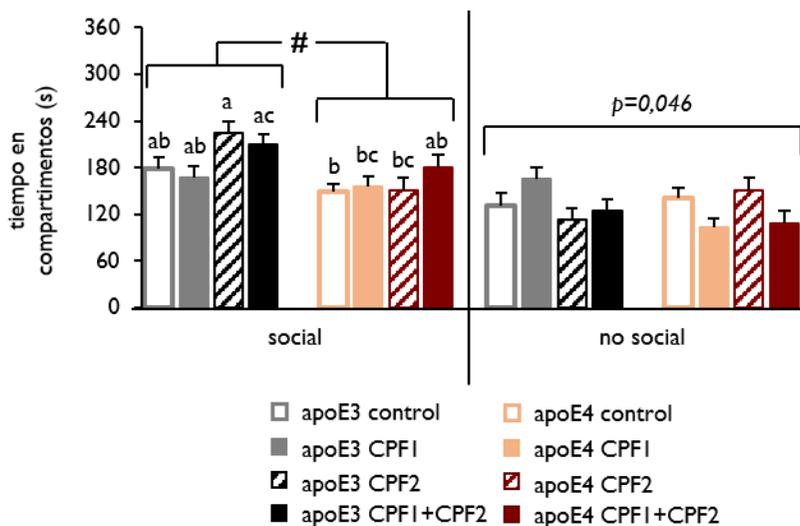


Figura 34. Tiempo en el compartimento social (animal desconocido) y no social (objeto) en la fase de socialización de la prueba de tres compartimentos de Crawley. Diferencia entre genotipos representada con el símbolo #, y entre grupos con distintas letras a $p<0,05$.

Finalmente, la variable de exploración social se estudió mediante un ANOVA de tres factores (genotipo, tratamiento postnatal y tratamiento adulto), el cual mostró una interacción entre el genotipo y el tratamiento postnatal [$F(1,75)=6,046$, $p=0,016$,

$\eta^2=0,074$], indicando que los individuos apoE3 y apoE4 presentaron una respuesta diferente hacia el estímulo social, en función de su tratamiento postnatal (Figura 35). Esta interacción explicaría un 7,4% de la varianza. El ANOVA entre grupos de tratamiento no mostró diferencias significativas [$F(7,75)=1,893, p=0,084$].

En resumen, se observó que los individuos apoE3 se demoraron menos en salir del compartimento central, atravesaron menos veces la cámara y permanecieron más tiempo explorando el elemento social, en comparación a los sujetos apoE4.

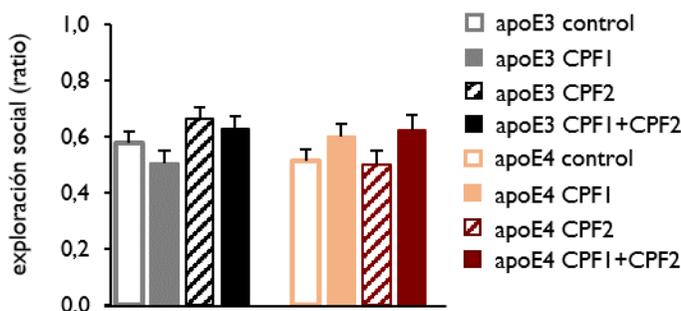


Figura 35. Exploración social en la prueba de tres compartimentos de Crawley.

Preferencia por la novedad

En esta última etapa, se volvió a evaluar la actividad mediante las variables: latencia de salida del compartimento central y entradas a los compartimentos laterales. La preferencia por la novedad se estudió analizando el tiempo en el compartimento de la novedad y del ratón conocido, y la exploración de la novedad (cociente entre el tiempo de exploración de la novedad y el tiempo total de exploración).

La latencia de salida y entradas en los compartimentos laterales (Figura 36) se valoraron mediante un MANOVA, que mostró un efecto del genotipo [$F(2,67)=81,671, p<0,001$], del tratamiento adulto [$F(2,67)=3,979, p=0,023$] y una interacción del genotipo y el tratamiento postnatal [$F(2,67)=8,606, p<0,001$]. Particularmente, la latencia de salida se alteró sólo por el tratamiento adulto [$F(1,75)=6,892, p=0,011, \eta^2=0,088$]. Este factor explicaría el 8,8% de la varianza. En la Figura 36A se muestra que CPF2 y CPF1+CPF2

tardaron menos en salir del compartimento central, siendo este efecto más evidente en los sujetos del genotipo apoE4.

En cambio, las entradas a los compartimentos variaron en función del genotipo [$F(1,75)=158,852$, $p<0,001$, $\eta^2=0,633$], revelando que los sujetos apoE4 fueron los que cruzaron más veces la cámara (Figura 36B). Este factor sería responsable de un 63,3% del efecto observado. Además, se observó una interacción del genotipo y el tratamiento postnatal [$F(1,75)=17,440$, $p<0,001$, $\eta^2=0,069$]. Un análisis más detallado mostró diferencias entre grupos de tratamiento [$F(7,75)=26,111$, $p<0,001$]. Como se ilustra en la Figura 36B las diferencias se dan principalmente entre grupos de distinto genotipo.

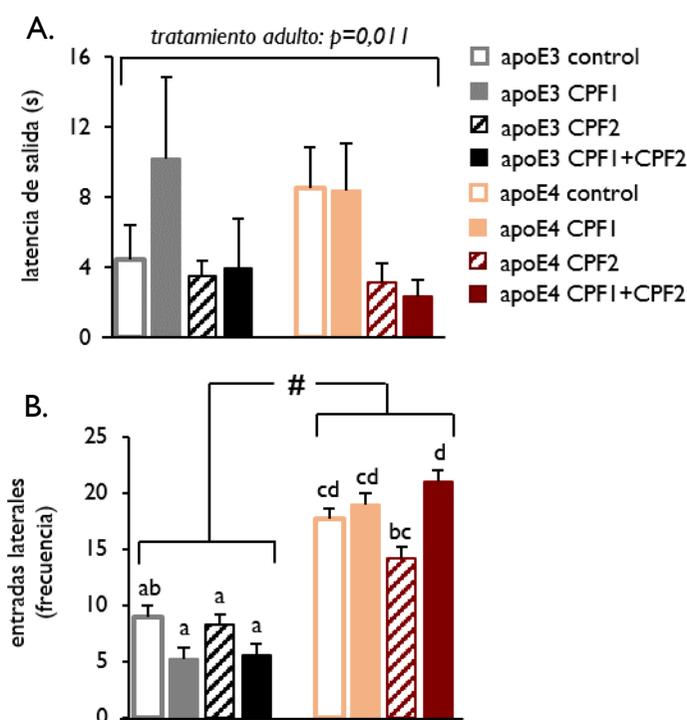


Figura 36. Actividad en la fase de preferencia por la novedad de la prueba de tres compartimentos de Crawley. Latencia de salida del compartimento central (A) y entradas a los compartimentos laterales (B). Diferencia entre genotipos representada con el símbolo # y entre grupos con distintas letras a $p<0,05$.

En cuanto a la preferencia por la novedad, mediante un t -test de medidas relacionadas, se confirmó una clara preferencia por el compartimento de la novedad ($t=2,529$, d.f.75, $p=0,014$).

En el MANOVA de las variables tiempo en el compartimento de la novedad y del animal conocido, se observó un efecto del genotipo [$F(2,67)=40,205, p<0,001$], del tratamiento adulto [$F(2,67)=3,636, p=0,032$] y una interacción del genotipo y el tratamiento adulto [$F(2,67)=3,503, p=0,036$].

Con respecto al tiempo en el compartimento de la novedad, se observó un efecto del genotipo [$F(1,75)=9,847, p=0,003, \eta^2=0,103$], del tratamiento adulto [$F(1,75)=6,723, p=0,012, \eta^2=0,070$], una interacción entre el genotipo y el tratamiento adulto [$F(1,75)=5,207, p=0,026, \eta^2=0,054$]. La **Figura 37** muestra que los sujetos apoE3 permanecieron más tiempo en el compartimento de la novedad, en comparación a sus congéneres apoE4. Adicionalmente, se realizó un ANOVA con todos los grupos de tratamiento, observándose diferencias entre ellos [$F(1,75)=3,965, p=0,001$]. El análisis *post-hoc* reveló que apoE3-CPF1 estuvo menos tiempo explorando esta zona, en comparación a otros grupos de su mismo genotipo.

Por otro lado, el análisis del tiempo en el compartimento del animal conocido mostró una interacción entre el genotipo y el tratamiento adulto [$F(1,75)=7,098, p=0,010, \eta^2=0,079$]. Un análisis más detallado entre todos los grupos reveló diferencias [$F(1,75)=3,132, p=0,006$], mostrando que apoE3-CPF1 permaneció más tiempo explorando este compartimento (**Figura 37**).

Finalmente, el parámetro de exploración de la novedad se estudió mediante un ANOVA de tres factores (genotipo, tratamiento postnatal y tratamiento adulto), el cual mostró una interacción del genotipo y el tratamiento adulto [$F(1,75)=5,775, p=0,019, \eta^2=0,068$] y una triple interacción del genotipo, el tratamiento postnatal y el tratamiento adulto [$F(1,75)=4,359, p=0,041, \eta^2=0,051$]. Por este motivo, se analizaron todos los grupos de tratamiento observándose diferencias entre ellos [$F(1,75)=2,396, p=0,030$]. El análisis *post-hoc* reveló que apoE3-CPF1 no prefirió explorar la novedad, mientras que apoE3-CPF1+CPF2 mostró el comportamiento contrario (**Figura 38**).

En general, los sujetos apoE4 continuaron presentando una mayor actividad, sin una preferencia clara por alguno de los dos elementos. En cambio, los individuos apoE3

prefirieron explorar más el elemento nuevo. En este genotipo, el efecto de CPF produjo una disminución de la exploración a la novedad, sin embargo la re-exposición de 15 días provocó una reversión de este comportamiento.

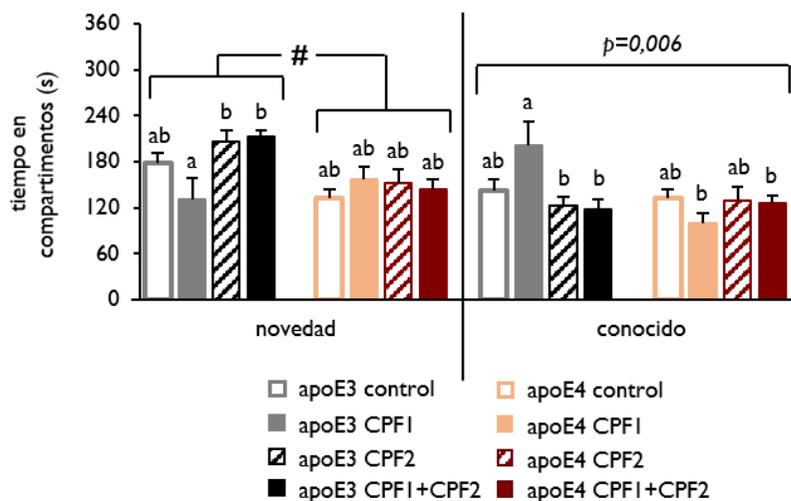


Figura 37. Tiempo en el compartimento de la novedad (animal nuevo) y de lo conocido (animal conocido) en la fase de preferencia por la novedad de la prueba de tres compartimentos de Crawley. Diferencia entre genotipos representada con el símbolo #, y entre grupos con distintas letras a $p < 0,05$.

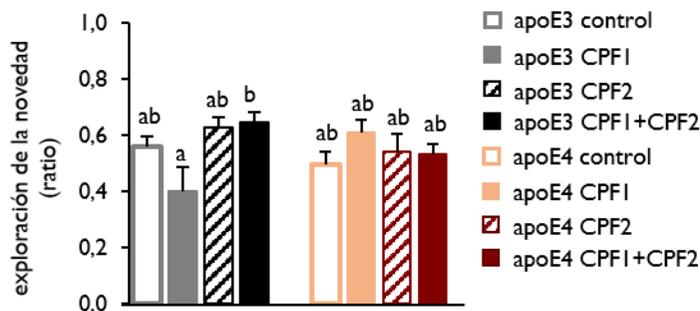


Figura 38. Exploración de la novedad en la prueba de tres compartimentos de Crawley. Diferencias entre grupos están representadas con distintas letras a $p < 0,05$.

Aprendizaje y memoria espacial

El aprendizaje y la memoria espacial se valoraron en machos y hembras mediante un laberinto de Barnes a los 6 meses de vida, a partir del día 30 de re-exposición. Esta prueba conductual se desarrolló en tres fases: la habituación al espacio, la adquisición y la retención de la tarea.

Habitación

En fase de habituación se valoró el patrón de actividad estudiando la distancia total recorrida en fracciones de tiempo, y tres variables relacionadas con el espacio central: la distancia recorrida en el centro, el tiempo de permanencia en el centro y la velocidad.

La distancia analizada en fracciones de tiempo (0 – 5 min, 5 – 10 min y 10 – 15 min) se evaluó para identificar el movimiento de los individuos a lo largo del tiempo. Mediante ANOVA de cuatro factores (sexo, genotipo, tratamiento postnatal y tratamiento adulto), para medidas repetidas, utilizando el tiempo como factor de repetición, se observó un efecto significativo del tiempo [$F(2,137)=39,700, p<0,001$], que muestra que todos los sujetos disminuyeron la exploración a lo largo del tiempo, indicando una habituación al espacio. También, se encontraron interacciones con el tiempo: tiempo y sexo [$F(2,137)=4,464, p=0,013$] y tiempo, genotipo y tratamiento postnatal [$F(2,137)=8,151, p=0,002$], lo cual indica un patrón de habituación distinto según sexo, genotipo y tratamiento postnatal. A su vez, se observó un efecto general del genotipo [$F(1,138)=8,068, p=0,005$], revelando que el genotipo apoE3 recorre más distancia que apoE4 (Figura 39A); y una interacción entre el tratamiento postnatal y tratamiento adulto [$F(1,138)=4,345, p=0,039$]. La Figura 39B muestra que CPF1+CPF2 recorrió una menor distancia en comparación al resto de grupos.

A partir de las interacciones entre los factores, se realizó un análisis más detallado de la distancia total recorrida de los grupos de tratamiento, en función del sexo y genotipo, para cada fracción de tiempo. En los machos apoE3 y apoE4 no se encontraron diferencias (Figura 40A). Sin embargo, en las hembras apoE3, en la primera fracción de tiempo, se observó una diferencia entre grupos [$F(3,38)=3,545, p=0,024$], donde CPF1 exploraron mayor distancia que CPF1+CPF2 (Figura 40B). Las hembras apoE4 presentaron una tendencia no significativa entre grupos [$F(3,38)=2,848, p=0,051$] en la segunda fracción de tiempo (Figura 40B), siendo CPF1 el que se desplazó más dentro del tablero, en comparación a CPF1+CPF2.

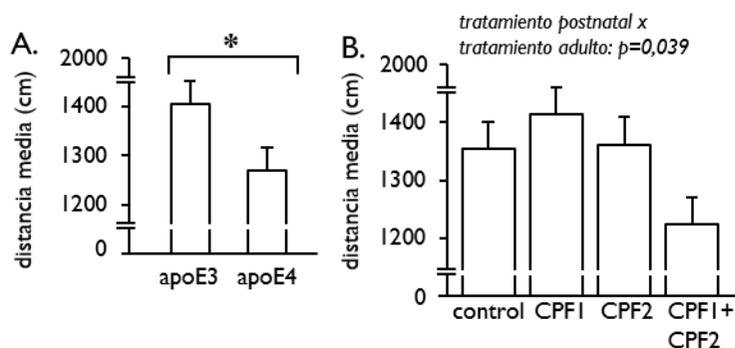


Figura 39. Efecto general del genotipo (A) y de los tratamientos (B) sobre la distancia total recorrida en la fase de habituación del laberinto de Barnes. Diferencia entre genotipos representada con un asterisco a $p < 0,05$.

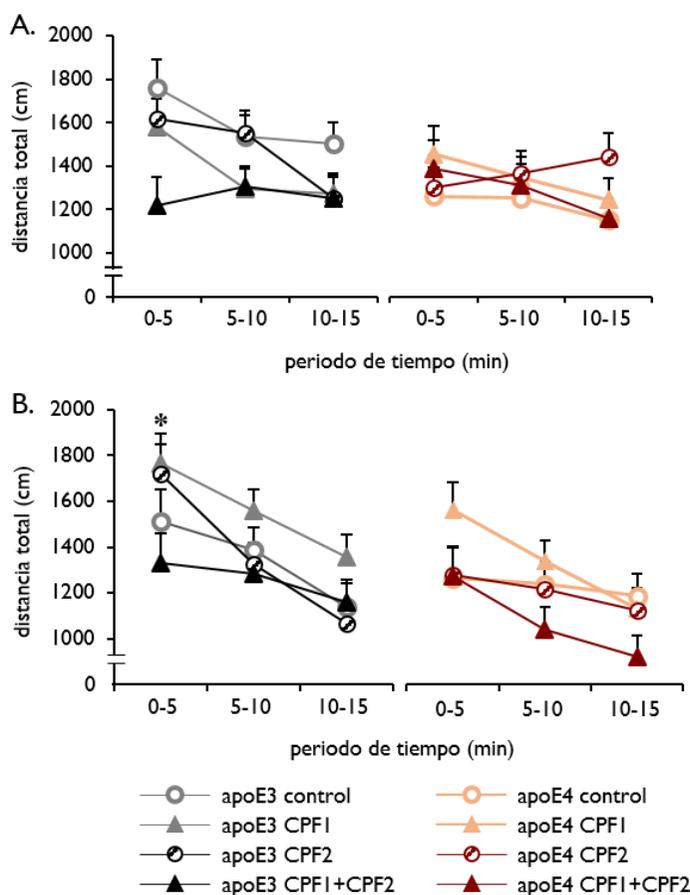


Figura 40. Distancia total recorrida en fracciones de tiempo en la fase de habituación del laberinto de Barnes en machos (A) y hembras (B). Diferencia en el primer periodo de tiempo entre hembras apoE3 CPF1 y CPF1+CPF2 representada con un asterisco a $p < 0,05$.

Por otro lado, las variables relacionadas con el espacio central se estudiaron mediante un MANOVA, que mostró un efecto del sexo [$F(2,137)=6,891$, $p=0,001$], del genotipo [$F(2,137)=51,523$, $p<0,001$], del tratamiento adulto [$F(2,137)=5,828$, $p=0,004$] y una interacción entre el tratamiento postnatal y tratamiento adulto [$F(2,137)=3,657$, $p=0,028$].

Concretamente, la distancia recorrida en el centro se modificó por el sexo [$F(1,153)=5,507$, $p=0,020$, $\eta^2=0,026$] y el genotipo [$F(1,153)=40,433$, $p<0,001$, $\eta^2=0,189$]. La **Figura 41** ilustra que las hembras y el genotipo apoE4 recorren una mayor distancia en general. Ambos factores explicarían el 2,6% y el 19% de la varianza, respectivamente. También, se encontró un efecto del tratamiento adulto [$F(1,153)=10,207$, $p=0,002$, $\eta^2=0,048$], una interacción entre el tratamiento postnatal y tratamiento adulto [$F(1,153)=10,207$, $p=0,002$, $\eta^2=0,035$]. Se analizaron las diferencias entre grupos de tratamiento mediante un ANOVA en función del sexo y genotipo. Este análisis reveló diferencias en las hembras apoE4 [$F(3,38)=7,218$, $p=0,001$], donde CPF1 alcanzó a recorrer más distancia que CPF2 y CPF1+CPF2 (**Figura 41**).

Por otra parte, el tiempo en el centro se modificó en función del sexo [$F(1,153)=13,844$, $p<0,001$, $\eta^2=0,049$], del genotipo [$F(1,153)=103,584$, $p<0,001$, $\eta^2=0,365$], del tratamiento adulto [$F(1,153)=8,295$, $p=0,005$, $\eta^2=0,029$] y de la interacción entre el genotipo y el tratamiento adulto [$F(1,153)=3,981$, $p=0,048$, $\eta^2=0,014$]. Cada uno de los factores explicaría un 5%, 37%, 2,9% y un 1,4% de la varianza, respectivamente. Como bien se observa en la **Figura 42**, el efecto más potente entre los factores es el del genotipo, dado principalmente por las hembras apoE4, las cuales permanecieron un mayor tiempo en esta zona central, sobre todo el control y CPF1.

Por último, se estudió la velocidad en el centro a través de un análisis de la varianza (ANOVA) de cuatro factores (genotipo, sexo, tratamiento postnatal y tratamiento adulto) el cual mostró un efecto general del sexo [$F(1,153)=12,557$, $p=0,001$, $\eta^2=0,045$] y el genotipo [$F(1,153)=114,678$, $p<0,001$, $\eta^2=0,415$]. Estos datos revelan que, en general, los machos y los apoE3 alcanzaron una velocidad superior (**Figura 43**). El genotipo explicaría el 41,5% del efecto observado.

En resumen, los individuos apoE3 en la habituación presentaron una mayor movilidad en el espacio completo. Por el contrario, los sujetos apoE4 exhibieron mayor actividad en la zona central. El efecto de los tratamientos con CPF fue más evidente en las hembras apoE4, donde el incremento de la actividad en el espacio central observado en CPF1 es revertido por la re-exposición a CPF.

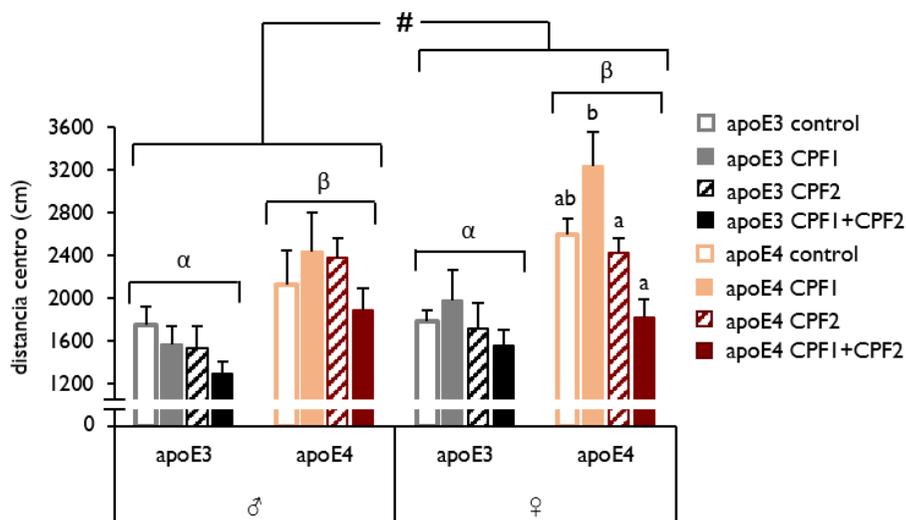


Figura 41. Distancia recorrida en el centro en la fase de habituación del laberinto de Barnes. Diferencia entre sexo representada con el símbolo #, entre genotipos con distintas letras griegas (α, β) y entre hembras apoE4 representadas con distintas letras (a,b,ab) a $p < 0,05$.

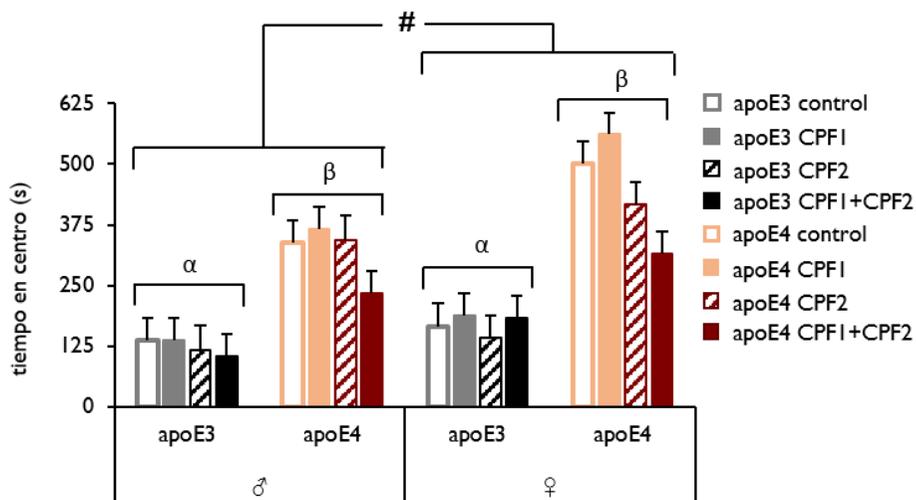


Figura 42. Tiempo de permanencia en el centro en la fase de habituación del laberinto de Barnes. Diferencia entre sexos representada con el símbolo # y entre genotipos con distintas letras griegas (α, β) a $p < 0,005$.

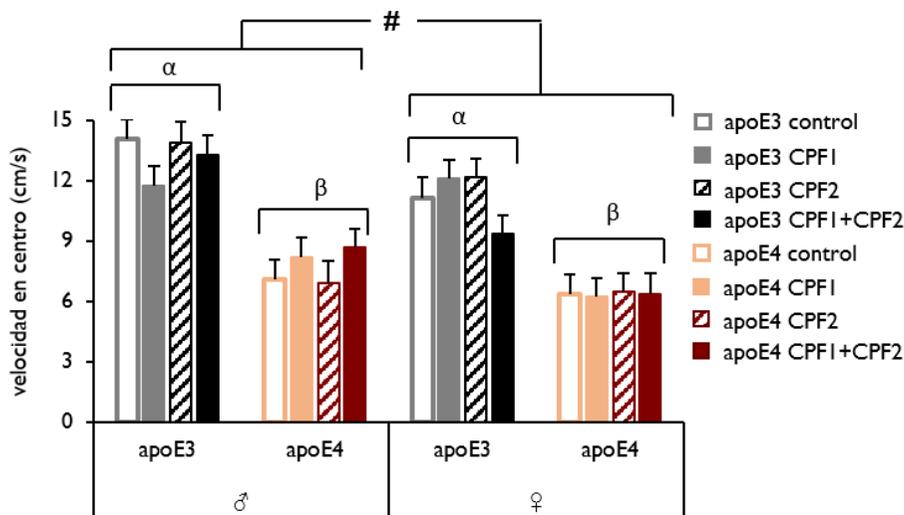


Figura 43. Velocidad en el centro, en la fase de habituación del laberinto de Barnes. Diferencia entre sexos representada con el símbolo # y entre genotipos con distintas letras griegas (α , β) a $p < 0,005$.

Adquisición

Para evaluar el aprendizaje de los animales se realizaron 9 sesiones de adquisición de la tarea. En esta fase se analizó la distancia total, el tiempo total y el uso de distintas estrategias de búsqueda en la primera y última sesión de adquisición.

Con respecto a la distancia total (Figura 44), a través de un ANOVA de cuatro factores (sexo, genotipo, tratamiento postnatal y tratamiento adulto), para medidas repetidas, utilizando la sesión como factor de repetición, se observó un efecto de la sesión [$F(8,131)=28,670$, $p < 0,001$], lo que señala que todos los sujetos acortaron las distancias recorridas a lo largo de las sesiones, indicando una mejora a lo largo del tiempo. Además, el análisis mostró interacciones de la sesión y el genotipo [$F(8,131)=2,401$, $p=0,019$], de la sesión, el sexo, el tratamiento postnatal y el tratamiento adulto [$F(8,131)=2,420$, $p=0,018$] y de la sesión, el sexo, el genotipo, el tratamiento postnatal y el tratamiento adulto [$F(8,131)=2,178$, $p=0,033$]. Asimismo, se observó un efecto general del genotipo [$F(1,138)=93,838$, $p < 0,001$] (Figura 44C), del tratamiento postnatal [$F(1,138)=5,424$, $p=0,021$], una interacción entre el sexo y el tratamiento adulto [$F(1,138)=5,287$, $p=0,023$] y una interacción entre el sexo, el genotipo y el tratamiento adulto [$F(1,138)=4,256$, $p=0,041$].

A partir de estas interacciones, se analizó con más detalle los grupos de tratamiento, en función del sexo y genotipo, para cada sesión. Como se ilustra en la **Figura 44A**, en los machos apoE4 hubo diferencias entre grupos en la primera [$F(3,38)=4,177, p=0,013$], séptima [$F(3,38)=4,164, p=0,013$] y octava [$F(3,37)=3,454, p=0,027$] sesión, donde en la primera el grupo apoE4-CPF2 recorrió una mayor distancia, y en la séptima y octava disminuyó su recorrido en comparación a los otros grupos. En los machos apoE3 no se observaron diferencias. Entre hembras apoE4 hubo diferencias en la sexta [$F(3,38)=3,251, p=0,033$] y octava [$F(3,38)=3,188, p=0,036$] sesión (**Figura 44B**). En ambas, CPF1 recorrió mayor distancia comparado al resto de grupos. No se observaron diferencias entre grupos de hembras apoE3 en ninguna sesión.

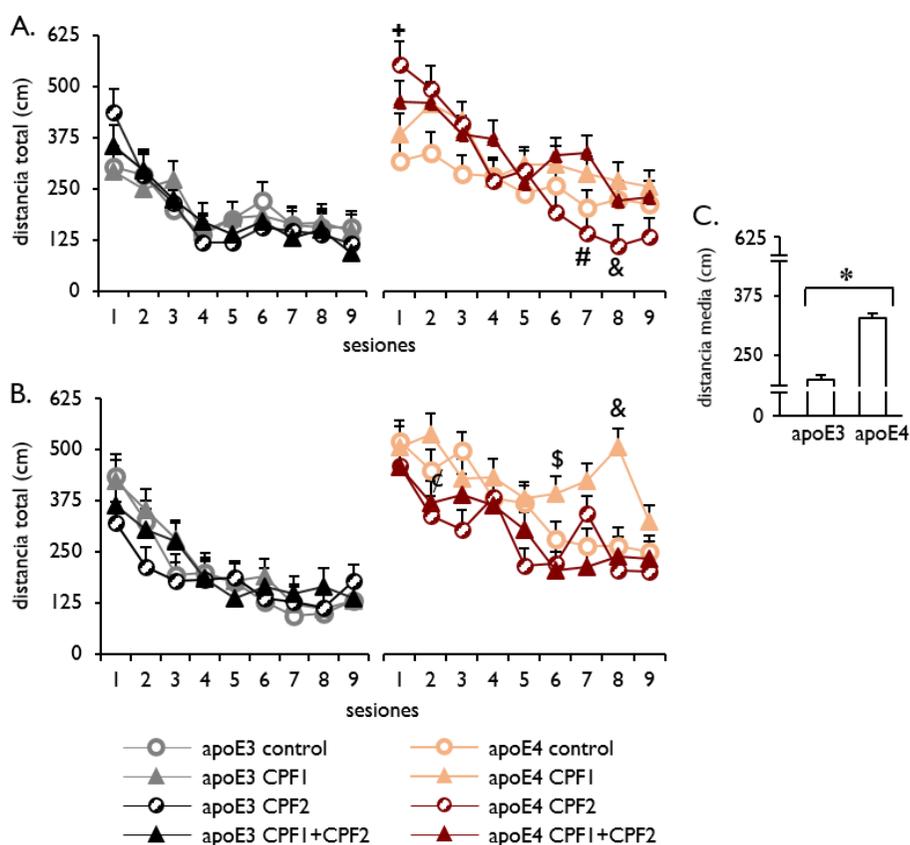


Figura 44. Distancia total recorrida en las 9 sesiones de adquisición de la prueba del laberinto de Barnes, de machos (A), hembras (B) y el efecto general del genotipo (C). En machos apoE4, diferencia entre control y CPF2 representada con el símbolo +, entre CPF2 y CPF1+CPF2 con el símbolo #, y entre CPF1 y CPF2 con el símbolo &, a $p<0,05$. En hembras apoE4, diferencia entre CPF1 y CPF1+CPF2 indicada con el símbolo \$, y entre CPF1 y CPF2 con el símbolo &, a $p<0,05$. Diferencia entre genotipos señalada con un asterisco a $p<0,001$.

Por otra parte, el tiempo total (Figura 45) mediante ANOVA de cuatro factores (sexo, genotipo, tratamiento postnatal y tratamiento adulto), para medidas repetidas, utilizando la sesión como factor de repetición, se observó un efecto de la sesión [$F(8,131)=85,044$, $p<0,001$], lo que señala que todos los sujetos disminuyeron el tiempo a lo largo de las sesiones, indicando una mejora en el rendimiento de la tarea. Además, se observaron interacciones de la sesión y el genotipo [$F(8,131)=7,000$, $p<0,001$], de la sesión y el tratamiento adulto [$F(8,131)=3,138$, $p=0,003$] y de la sesión, el sexo, el tratamiento postnatal y el tratamiento adulto [$F(8,131)=3,098$, $p=0,003$]. También, se encontró un efecto general del genotipo [$F(1,138)=162,344$, $p<0,001$] (Figura 45C), del tratamiento postnatal [$F(1,138)=4,933$, $p=0,028$], del tratamiento adulto [$F(1,138)=13,452$, $p<0,001$] y una interacción entre el genotipo y el tratamiento adulto [$F(1,138)=5,831$, $p=0,017$].

Debido a las interacciones, se realizó un análisis más detallado para estudiar diferencias entre grupos de tratamiento en función del sexo y genotipo, para cada sesión. Entre machos apoE4 se observaron diferencias entre grupos en la sexta [$F(3,38)=2,978$, $p=0,045$], séptima [$F(3,38)=4,102$, $p=0,014$] y octava [$F(3,37)=3,864$, $p=0,018$] sesión, observando que CPF2 requirió menos tiempo para realizar la tarea (Figura 45A). No se observaron diferencias en los machos apoE3. En tanto, entre los grupos de las hembras apoE4 se observaron diferencias en la segunda [$F(3,38)=3,291$, $p=0,032$], tercera [$F(3,38)=3,273$, $p=0,032$], quinta [$F(3,38)=3,617$, $p=0,022$], sexta [$F(3,38)=5,043$, $p=0,005$] y octava [$F(3,38)=3,055$, $p=0,041$] sesión (Figura 45B). CPF1 se demoró más tiempo en acabar la tarea, mientras que CPF2 realizó la tarea en un menor tiempo. En las hembras apoE3 no se observaron diferencias.

En resumen, el patrón de aprendizaje es diferente entre genotipos. Los individuos apoE3 presentaron una menor distancia recorrida y tiempo total que apoE4 (Figura 44C, 45C). En tanto, la exposición al insecticida afectó a los sujetos apoE4, CPF2 provocó una mejora en el rendimiento en ambos sexos. Sin embargo, CPF1 empeoró estos parámetros sólo en las hembras.

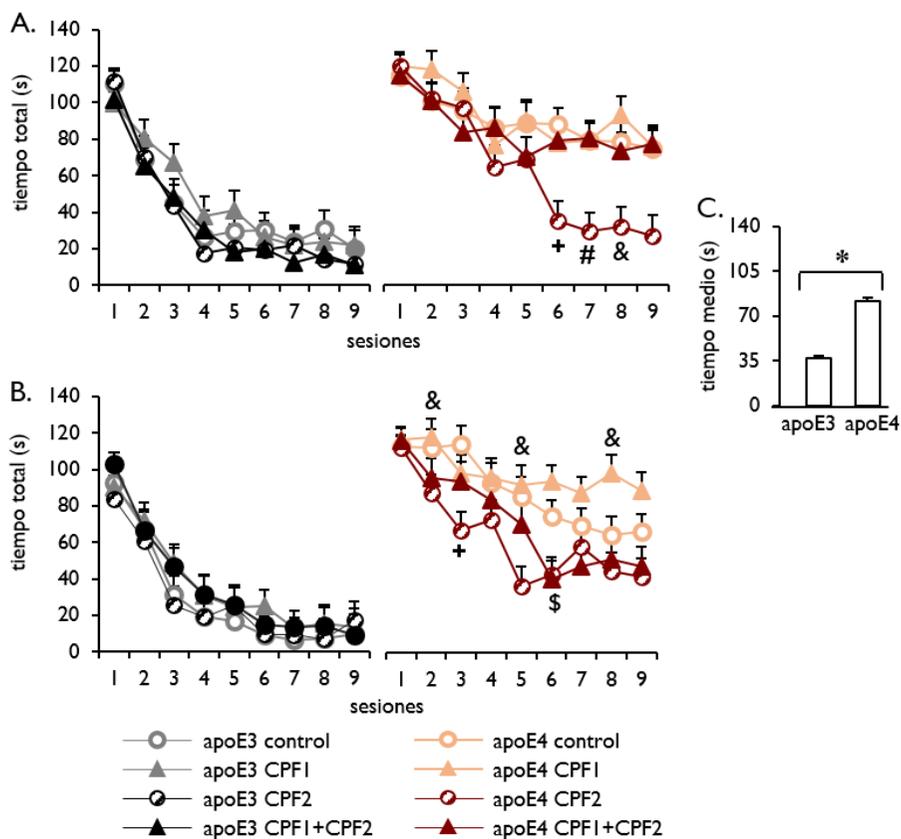


Figura 45. Tiempo total en las 9 sesiones de adquisición de la prueba del laberinto de Barnes, de machos (A) y de hembras (B). En machos apoE4, diferencia entre control y CPF2 representada con el símbolo +, entre CPF2 y el resto de grupos con el símbolo #, y entre CPF1 y CPF2 con el símbolo &, a $p < 0,05$. En hembras apoE4, diferencias entre CPF1 y CPF2 indicadas con el símbolo &, entre control y CPF2 con el símbolo +, y entre CPF1, CPF2 y CPF1+CPF2 con el símbolo \$, a $p < 0,05$.

El uso de estrategias de búsqueda aleatoria, serial y espacial (Figura 46A) de la primera y última sesión se estudiaron mediante un MANOVA. En la primera sesión se observó un efecto general del genotipo [$F(2,137)=3,769$, $p=0,012$]. Concretamente, la elección de la estrategia aleatoria se modificó por el genotipo [$F(1,153)=9,606$, $p=0,002$, $\eta^2=0,060$], siendo los sujetos apoE4 los que la usaron en mayor medida (Figura 46B). También, el uso de la estrategia serial varió en función del genotipo [$F(1,153)=9,823$, $p=0,002$, $\eta^2=0,060$], siendo los apoE3 los que más usaron esta estrategia (Figura 46B). Por último, la utilización de la estrategia espacial se afectó por una interacción entre el sexo y el genotipo [$F(1,153)=9,823$, $p=0,002$, $\eta^2=0,034$]. La Figura 46C muestra que los

machos apoE4 y las hembras apoE3 usaron en mayor medida esta estrategia sólo en la primera sesión igualándose su uso en la novena sesión.

En la última sesión también se observó un efecto general del genotipo [$F(2,137)=7,869$, $p=0,001$]. Particularmente, el uso de las estrategias aleatoria y serial se modificaron por influencia del genotipo: [$F(1,153)=7,869$, $p<0,001$, $\eta^2=0,083$] y [$F(1,153)=7,869$, $p<0,001$, $\eta^2=0,080$] respectivamente. En la **Figura 46B** se ilustra que los sujetos apoE4 continuaron usando en mayor medida la aleatoria y apoE3 mantuvieron la búsqueda serial.

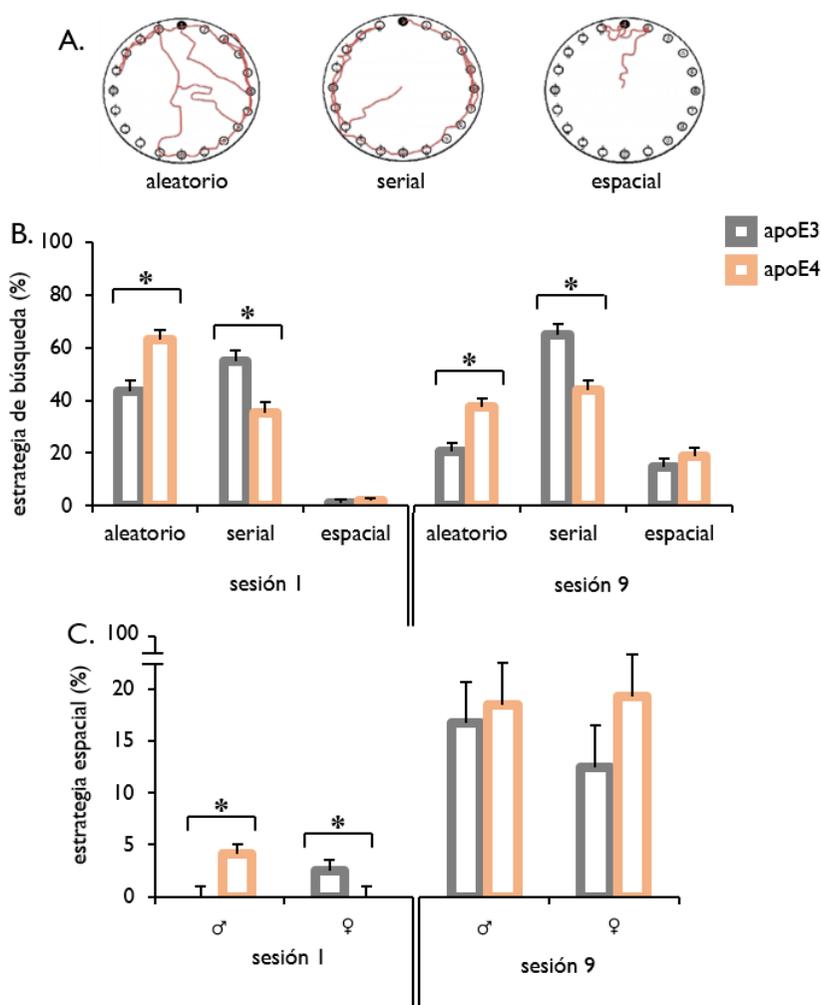


Figura 46. Uso de la estrategia de búsqueda aleatoria, serial y espacial en la primera y novena sesión de adquisición de la prueba del laberinto de Barnes. La ilustración de cada estrategia analizada (A), el efecto general del genotipo en cada estrategia (B) y la interacción del sexo y el genotipo sólo en la estrategia espacial (C). Diferencias entre genotipos están representadas con un asterisco, a $p < 0,05$.

Para observar cambios en la elección de la estrategia de búsqueda en cada grupo, se realizó un *t*-test de medidas relacionadas con la primera y la novena sesión (Figura 47, Figura 48). Así, se constató que un gran número de grupos disminuyeron el uso de la estrategia aleatoria significativamente, excepto el grupo de machos y hembras apoE3-CPF1, todos los machos apoE4, y el grupo de hembras apoE4-CPF2 (Figura 47A). La estrategia serial sólo aumentó por el grupo de machos y hembras apoE4-CPF1 y las hembras apoE3-CPF1+CPF2 (Figura 47B). La estrategia espacial sólo aumentó en el grupo de machos apoE4-CPF1, y hembras apoE4 control, CPF2 y CPF1+CPF2 (Figura 48).

En resumen, el genotipo apoE3 mantuvo la estrategia de búsqueda serial, mientras que apoE4 mantuvo la aleatoria. Ambos sexos y genotipos se igualaron en la estrategia espacial en la sesión 9. Si bien el efecto de CPF depende del genotipo, el grupo y el tratamiento, tanto machos como hembras apoE3-CPF1 no presentaron un cambio significativo por alguna estrategia en particular.

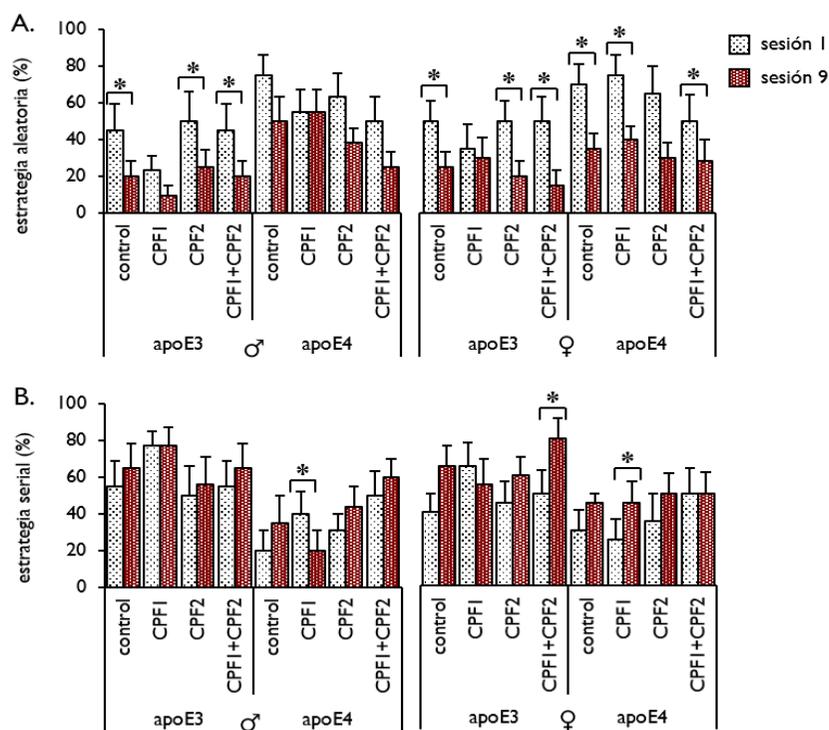


Figura 47. Uso de la estrategia de búsqueda aleatoria (A) y serial (B) en la primera y novena sesión de adquisición de la prueba del laberinto de Barnes. Diferencias en cada grupo entre sesiones representadas con un asterisco, a $p < 0,05$.

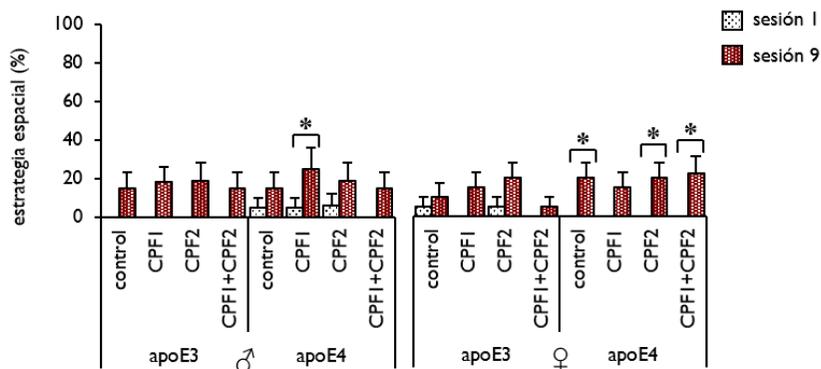


Figura 48. Uso de la estrategia de búsqueda espacial en la primera y novena sesión de adquisición de la prueba del laberinto de Barnes. Diferencias en cada grupo entre sesiones representadas con un asterisco, a $p < 0,05$.

Retención

Después de la novena sesión de adquisición, se realizó la retención de esta prueba. En esta última fase, con el fin de detectar diferencias en la memoria espacial de los sujetos, se analizó el tiempo en el cuadrante objetivo (Figura 49) y la exploración al agujero objetivo (frecuencia de entrada al agujero objetivo respecto a la frecuencia de entrada todos los agujeros).

En primer lugar, se analizó el tiempo de permanencia en el cuadrante objetivo en relación con el tiempo medio de exploración en cada cuadrante (22,5 s). Aunque todos los grupos permanecieron más tiempo del esperado en el cuadrante objetivo, mediante un *t*-test de muestra única, se observó que ningún grupo CPF1 mostró una preferencia estadísticamente significativa por este cuadrante, ni tampoco las hembras apoE4 control, CPF2 y CPF1+CPF2 (Figura 49B).

Mediante un MANOVA de las variables tiempo en el cuadrante objetivo y exploración al agujero objetivo se observó un efecto general del sexo [$F(2, 137) = 3,643, p = 0,029$], del genotipo [$F(2, 137) = 9,286, p < 0,001$] y una interacción del genotipo, el tratamiento postnatal y el tratamiento adulto [$F(2, 137) = 3,446, p = 0,035$]. Concretamente, el tiempo en el cuadrante objetivo se modificó por el genotipo [$F(1, 153) = 3,985, p = 0,048, \eta^2 = 0,025$], siendo los individuos apoE4 los que permanecen más tiempo (Figura 49B).

La exploración al agujero objetivo varió en función del sexo [$F(1, 153) = 7,282, p = 0,008, \eta^2 = 0,039$] y del genotipo [$F(1, 153) = 18,638, p < 0,001, \eta^2 = 0,100$]. La Figura 50 ilustra que

tanto machos como individuos apoE4 frecuentan más el agujero objetivo. También, se observó una interacción genotipo, tratamiento postnatal y tratamiento adulto [F(1,153)=6,879, $p=0,010$, $\eta^2=0,037$]. Debido a esto, se realizó un ANOVA para analizar en detalle los grupos de tratamiento, en función del sexo y genotipo. En este análisis adicional, se observaron diferencias entre machos apoE3 [F(3,37)=2,966, $p=0,046$], aunque el análisis *post-hoc* no reveló diferencias significativas entre grupos. En la **Figura 50** se puede observar que los CPF2 y CPF1+CPF2 frecuentaron menos el agujero objetivo que el control y CPF1. No se encontraron diferencias entre machos apoE4, hembras apoE3 ni hembras apoE4.

En resumen, los datos de la retención muestran que el tratamiento con CPF1 empeora el recuerdo, puesto que ningún grupo expuesto prefirió el cuadrante objetivo. En las hembras apoE4, CPF2 produce una mejora en el rendimiento de esta tarea. Por otra parte, si bien los machos exploran en mayor medida el agujero objetivo, esta conducta disminuyó en CPF2 y CPF1+CPF2 en apoE3.

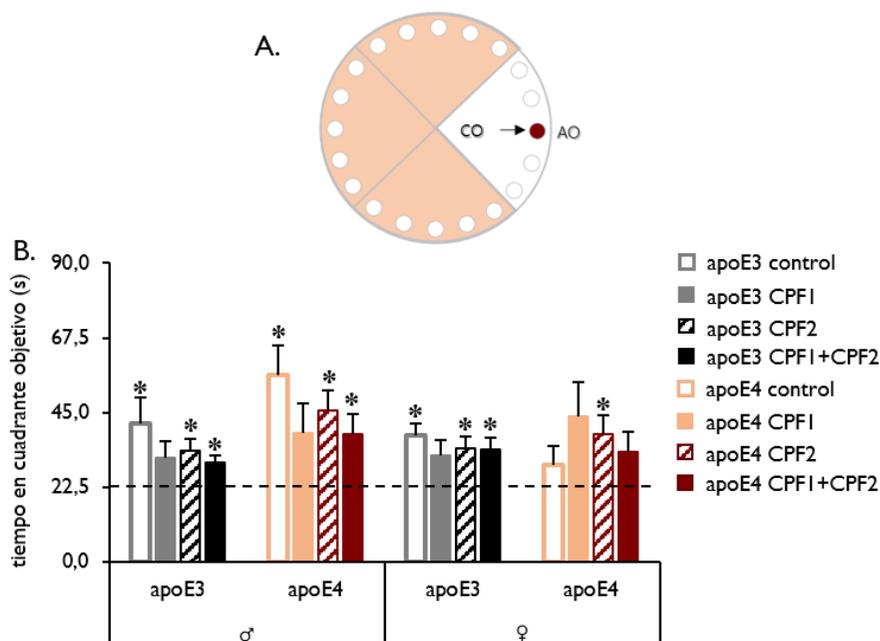


Figura 49. Esquema del cuadrante objetivo (CO) y el agujero objetivo (AO) (A) y tiempo en el cuadrante objetivo (B) de la fase de retención de la prueba del laberinto de Barnes. La línea discontinua en B representa el tiempo medio explorando cada cuadrante (22,5 s). Diferencias entre grupos de tratamiento con el tiempo medio representadas con un asterisco a $p < 0,05$.

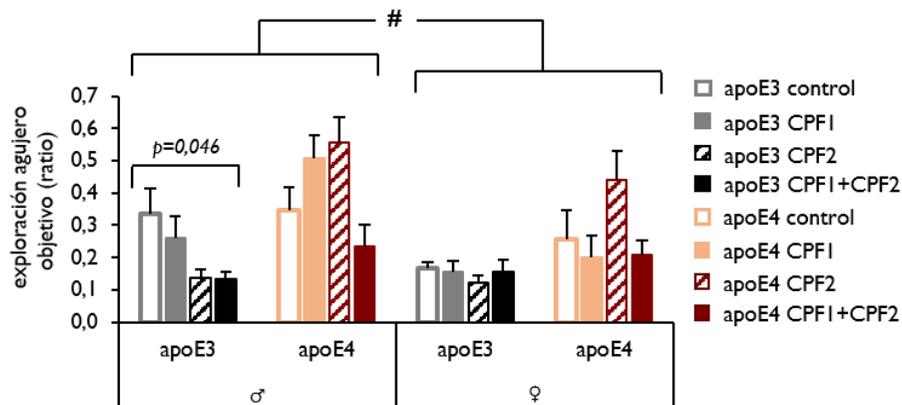


Figura 50. Exploración del agujero objetivo de la fase de retención de la prueba del laberinto de Barnes. Diferencia entre sexos está representada con el símbolo # a $p < 0,05$.

Actividad ChE

La actividad ChE se determinó en plasma y en cerebro, en la corteza frontal y en estriado, en animales de 7 meses, después de 3 horas de ayuno (Figura 51). Mediante un MANOVA se observó un efecto del genotipo [$F(3,71)=8,345$, $p < 0,001$], del tratamiento adulto [$F(3,71)=1103,450$, $p < 0,001$], y una interacción entre el sexo y el tratamiento adulto [$F(3,71)=16,455$, $p < 0,001$].

Concretamente, la actividad ChE plasmática (Figura 51A) se modificó sólo por el tratamiento adulto [$F(1,88)=3298,949$, $p < 0,001$, $\eta^2=0,946$]. Este factor explicó el 95% de la varianza. Adicionalmente, un análisis adicional mostró diferencias entre los distintos grupos de tratamiento [(3,88)=394,550, $p < 0,001$]. CPF2 presentó una inhibición de un 83,8% respecto al control, mientras que CPF1+CPF2 de un 79,6% respecto al CPF1.

La actividad ChE en la corteza frontal (Figura 51B) también se alteró por el tratamiento adulto [$F(1,88)=6,854$, $p=0,011$, $\eta^2=0,074$]. Este factor sólo explicaría el 7,4% del efecto observado. Un ANOVA mostró diferencias entre grupos de tratamiento [(3,88)=3,130, $p=0,030$], indicando que la actividad ChE aumentó significativamente en el CPF2, con un 32,3% respecto a la actividad del control.

La Figura 51C muestra los resultados de la actividad ChE en estriado, la cual varió en función del genotipo [$F(1,88)=6,966$, $p=0,010$, $\eta^2=0,060$], del tratamiento adulto

[$F(1,88)=12,691$, $p=0,001$, $\eta^2=0,111$] y por una interacción entre el sexo, el genotipo y el tratamiento adulto [$F(1,88)=4,004$, $p=0,048$, $\eta^2=0,035$]. Estos datos indican que los sujetos apoE4 presentaron mayor actividad ChE que los sujetos apoE3 y que el tratamiento con CPF en adultos produce una disminución de la actividad ChE. Un análisis más detallado, en función del sexo y genotipo, mostró diferencias entre grupos de tratamiento de los machos apoE4 [(1,22)=13,867, $p<0,001$]. CPF2 presentó una inhibición de un 71,1% respecto al control, mientras que CPF1+CPF2 un 57,7% menos respecto CPF1.

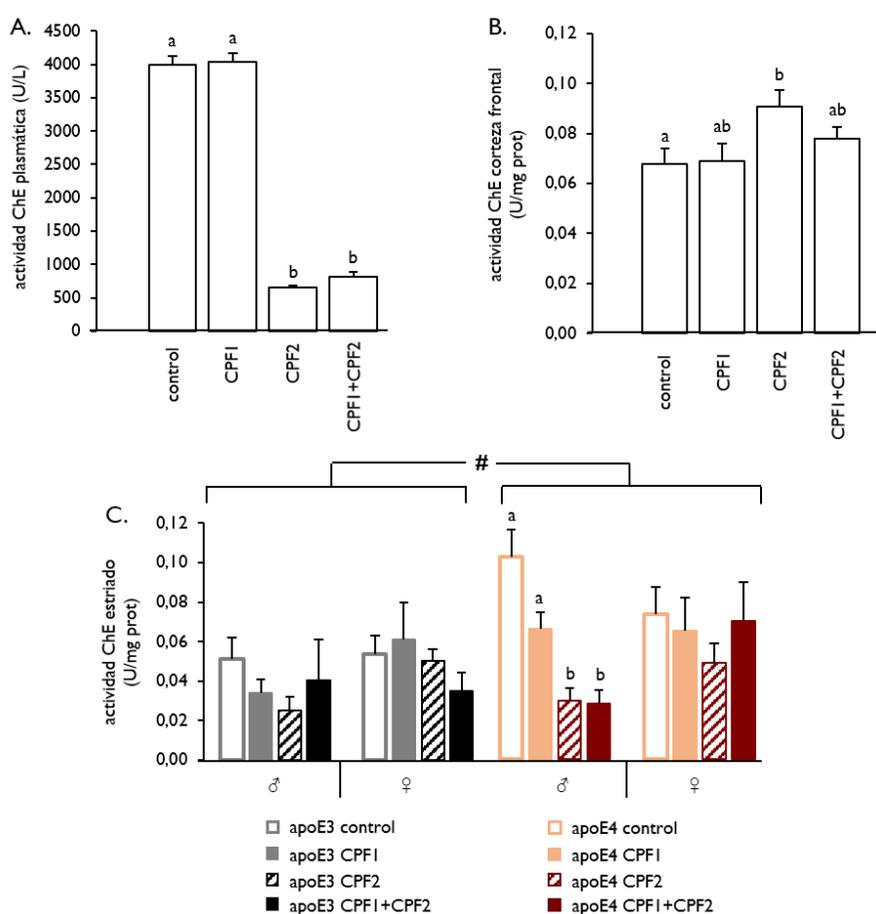


Figura 51. Actividad de la enzima colinesterasa (ChE) plasmática (A) en la corteza frontal (B) y en el núcleo estriado (C) al séptimo mes de vida. Diferencia entre genotipos representada con el símbolo # y entre grupos de tratamiento con distintas letras a $p<0,05$.

2. Discusión

En esta segunda fase experimental se estudiaron los efectos a largo plazo causados por una exposición temprana a CPF y la respuesta a una re-exposición de 8 semanas durante la edad adulta, observando la modulación producida por el genotipo apoE, en ambos sexos.

Peso corporal

En nuestro estudio, los cambios de peso relacionados con la edad y el sexo se han mantenido de acuerdo a lo esperado, mostrándose un mayor peso a lo largo de los meses y un mayor peso en machos respecto a hembras. También, se ha observado que las hembras presentan en general un peso más estable que los machos. En relación al genotipo, los sujetos apoE3 han mostrado un peso superior a los apoE4, este dato concuerda también con la literatura existente.

La proteína apoE es crucial en el metabolismo lipídico y la homeostasis energética (Hatters et al., 2006). Diversos estudios han concluido que la apoE humana puede desempeñar un papel importante en la regulación del peso corporal (Elosua et al., 2003; Volcik et al., 2006). A nivel empírico, se ha observado que apoE es importante para el acúmulo de la grasa corporal, las dietas ricas en grasas producen un mayor aumento de la grasa corporal y del tamaño de adipocitos en ratones *wild type*, que en un modelo de ratones *knockout* apoE (Gao et al., 2007; Karagiannides et al., 2008). Cada isoforma del genotipo apoE se ha relacionado con un índice de masa corporal, siguiendo el orden apoE2 > apoE3 > apoE4, en ambos sexos y a distintas edades (Reverte et al., 2013, 2012; Tejedor et al., 2014; Volcik et al., 2006), concordando con los presentes resultados.

Por otro lado, los efectos del tratamiento postnatal y adulto muestran efectos diferentes en función del sexo y del genotipo. En general, los grupos que recibieron tratamiento durante la edad adulta son los que muestran un mayor peso, siendo este efecto especialmente relevante en machos apoE4 y hembras apoE3. Los efectos del tratamiento postnatal no son tan evidentes, cabe destacar un menor aumento de peso en los sujetos apoE3 expuestos a CPF durante el periodo postnatal, que sería revertido por la re-

exposición a CPF durante la vida adulta. En este sentido, apoE podría influir también en los efectos metabólicos producidos por CPF. En nuestro caso sólo los machos apoE4-CPF1 venían arrastrando un peso superior. Un estudio de Lassiter and Brimijoin (2008) reveló un aumento similar en ratas machos, a causa de una exposición perinatal a CPF. Otros estudios han informado de aumentos de peso corporal causados por exposiciones a CPF en edad adulta (Ehrich et al., 2004; Meggs and Brewer, 2007; Peris-Sampedro et al., 2015a, 2015b). Desde hace años, la obesidad y la contaminación ambiental han sido vinculadas, relacionándose la exposición a determinadas sustancias y el aumento de peso (Baillie-Hamilton and Phil, 2002). Hallazgos recientes demuestran que tales sustancias, denominadas "obesógenos", aumentarían los depósitos de grasas y, por sus características lipofílicas, incrementarían su propia retención (Darbre, 2017). CPF aumenta la adiposidad tanto por exposición en edad temprana (Lassiter and Brimijoin, 2008) como por exposición en edad adulta (Meggs and Brewer, 2007). Por lo tanto, se podría considerar a CPF como un obesógeno, capaz de inducir a la larga a un incremento de sus efectos adversos mediante un aumento de los depósitos de grasa.

Igualmente, los cambios observados en el peso corporal desde el quinto a séptimo mes están relacionados con la ingesta. Así, el menor crecimiento observado en los machos apoE3-CPF1 se corresponde con un menor consumo de comida. Por lo cual, estos resultados podrían estar reflejando que una exposición a CPF en edad temprana podría alterar el metabolismo energético y/o las conductas alimentarias. Hasta la fecha, no existen estudios que muestren curvas de crecimiento más allá de los primeros 100 a 120 días de vida, previa intoxicación a bajas dosis en el periodo de desarrollo (Lassiter and Brimijoin, 2008; Slotkin et al., 2005a).

Siguiendo con el consumo de comida, todos los animales expuestos a la dieta suplementada con CPF aumentaron la ingesta dentro del periodo de re-exposición. En concordancia con estos resultados, los estudios de Peris-Sampedro et al. (2015a, 2015b) revelaron que el incremento de la ingesta es independiente del genotipo. Los autores relacionaron este efecto con un aumento de la grelina acilada en sujetos adultos expuestos a CPF (Peris-Sampedro et al., 2015b). Se sabe que la BChE en humanos desacila la grelina pudiendo modular indirectamente roles fisiológicos propios de esta

hormona, como la ingesta de comida (De Vriese et al., 2004). En ratones, la grelina es desacilada por la carboxilesterasa (Li et al., 2005) y a su vez la carboxilesterasa es inhibida por CPF (Cole et al., 2014; Cometa et al., 2007). Por lo cual, una exposición a CPF podría desencadenar un aumento de la ingesta de comida por el aumento de la grelina acilada.

Si bien, el aumento de consumo de comida podría ser un mecanismo que estaría induciendo el incremento de peso corporal, el control del peso no es simplemente el resultado del balance entre el aporte y el gasto energético (Baillie-Hamilton and Phil, 2002). De hecho, en dicho control participan múltiples mecanismos metabólicos y conductuales que permiten al cuerpo mantener un peso estable durante periodos de tiempo relativamente largos (Harris, 1990). Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con CPF modificaría la homeostasis energética a lo largo de la vida, siendo más susceptible un genotipo por sobre otro. En ese contexto, los sujetos apoE3 mostrarían más efectos tras una re-exposición, mientras que los machos apoE4 expuestos a CPF durante la vida adulta incrementarían su peso, independiente del tratamiento postnatal recibido. En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, Peris-Sampedro et al. (2015a) observaron que los machos del genotipo apoE3 aumentaban de peso por una exposición crónica a CPF 2 mg/kg/día a través de la dieta, siendo este efecto menor en apoE4. Esta discrepancia entre resultados, podría deberse a diferencias dentro de ambos protocolos, puesto que en nuestro estudio el grupo control fue expuesto a aceite de girasol, como vehículo, durante el periodo postnatal. Cabe la posibilidad de que esta exposición modificara parámetros metabólicos tanto en apoE3 como en apoE4.

Glicemia

La evaluación de la glicemia reveló que, en general, los machos presentaron glicemias mayores que las hembras. Con respecto al genotipo apoE, apoE4 presentó niveles superiores de glucosa en la sangre que los sujetos apoE3.

Para garantizar la función normal del organismo, el cuerpo humano depende de un control estricto de sus niveles de glucosa en sangre. Esto se logra mediante la acción de

determinadas hormonas y neuropéptidos liberados principalmente desde el cerebro, el páncreas, el hígado, el intestino, así como también desde el tejido adiposo y muscular (Röder et al., 2016). En humanos, las mujeres presentan menores glicemias y mayores niveles de ácidos grasos libres en plasma después de un ayuno corto (Blaak, 2008) o prolongado (Soeters et al., 2007). De igual modo, mujeres jóvenes y ancianas presentan menores concentraciones plasmáticas de glucosa, que hombres de las mismas edades (Basu et al., 2006). En nuestro estudio observamos diferencias entre machos y hembras en este mismo sentido.

Igualmente, se observó un efecto del genotipo apoE sobre los niveles de glucosa en los ratones estudiados. En esta misma línea, varias investigaciones han demostrado que la glucosa en sangre es mayor en individuos portadores de apoE4 que apoE3 (Scuteri et al., 2005; Stiefel et al., 2001). Un estudio de Arbones-Mainar et al. (2008) reveló que ratones transgénicos portadores de la apoE4 se mantienen más delgados bajo una dieta rica en carbohidratos y grasas, pero comienzan a desarrollar antes una intolerancia a la glucosa que sus congéneres apoE3. Los autores también observaron que los adipocitos que expresan la apoE4 no son tan eficientes metabolizando los lípidos postprandiales y la glucosa (Arbones-Mainar et al., 2008). El tejido adiposo cumple una serie de roles, uno de ellos es el de proveer un correcto balance energético al organismo, si éste falla, se puede provocar una resistencia a la insulina, desencadenando cambios metabólicos importantes (Laclaustra et al., 2007; Ritchie and Connell, 2007). Un adipocito poco funcional en apoE4 podría contribuir a las diferencias observadas entre ambos genotipos.

Por otro lado, aunque todos los grupos apoE expuestos a CPF durante la vida adulta muestran niveles altos de glucosa en sangre, el tratamiento con CPF sólo incrementó de forma significativa la glicemia en hembras apoE4 re-expuestas durante la edad adulta. Existen pocos estudios que hayan indagado el efecto de CPF sobre la homeostasis de la glucosa en edad adulta, y todos ellos muestran un incremento de la glicemia tras la exposición a CPF (Acker and Nogueira, 2012; Elsharkawy et al., 2013; Peris-Sampedro et al., 2015b). Recientemente, se ha publicado un trabajo donde se expone la alta prevalencia de diabetes en personas de una zona rural de la India directamente expuestas a OPs, entre ellos CPF (Velmurugan et al., 2017). Además, varios estudios indican que

la exposición a OPs causa hiperglicemia debido a la estimulación de la glucogenólisis y la gluconeogénesis en el hígado, provocando la liberación de glucosa en la sangre (Gupta, 1974; Matin et al., 1990). Un trabajo de Elsharkawy et al. (2013) mostró que CPF, después de 3 meses de exposición, induce hiperglicemia y una alteración significativa en la distribución del glucógeno hepático. Los niveles de glucosa incrementados en nuestro estudio, sólo evidentes en apoE4, podrían también ser debidos a estos efectos directos de CPF.

Comportamientos sociales

El ratón es una especie altamente social. La interacción social y el reconocimiento de congéneres permiten establecer jerarquías o identificar nuevas parejas (Berry and Bronson, 1992). En nuestro estudio, la prueba de tres compartimentos de Crawley (Crawley, 2004; Moy et al., 2004) nos ha permitido valorar conductas de preferencia social, de reconocimiento o memoria social y de preferencia por la novedad. Esta prueba consta de tres fases que fueron analizadas de forma independiente. Una primera valoración general mostró una clara preferencia de los ratones por el estímulo social y por la novedad, de acuerdo con la conducta esperada en estos animales.

Durante la primera fase de habituación al espacio nuevo, se observó una mayor actividad exploratoria por parte de los individuos apoE3. En la fase de socialización también fue este genotipo apoE3 el que presentó una mayor preferencia por el compartimento social. En tanto, en la fase de la novedad, también fue el genotipo apoE3 el que mostró más interés por el sujeto nuevo. Por otro lado, el tratamiento postnatal disminuyó las conductas de socialización y preferencia por la novedad sólo en el genotipo apoE3. A su vez, la re-exposición al tóxico produce en algunos casos un efecto contrario a la exposición postnatal.

La actividad se analizó mediante las variables latencia de salida del compartimento central y el número de entradas a los compartimentos laterales. Este último parámetro mostró que, en general, apoE3 explora más la cámara en la habituación. En cambio, los individuos apoE4 presentaron una menor actividad, posiblemente porque la cámara les provocó cierto grado de ansiedad al ser un ambiente nuevo. Si bien, en algunos contextos la

ansiedad puede inducir a un aumento de la actividad para escapar del estímulo aversivo, en otros puede generar conductas de congelamiento o disminución de la actividad general (Pawlak et al., 2008). De hecho, diversos estudios han revelado que los ratones transgénicos apoE4 muestran niveles más bajos de actividad y un fenotipo más ansioso que los otros genotipos apoE (Meng et al., 2017; Reverte et al., 2014b, 2013, 2012; Siegel et al., 2012). Por lo que no se descarta que el primer contacto con la cámara de Crawley haya desencadenado altos niveles de ansiedad en estos sujetos.

No obstante, en las siguientes fases, es apoE4 el genotipo que aumenta su actividad mientras que apoE3 disminuye su actividad inespecífica durante la fase social y de novedad y aumenta el tiempo de exploración en los compartimentos sociales. Esta conducta de apoE4 puede ser debida a su mayor nivel de ansiedad, ahora influida por los estímulos sociales.

Sobre las dos variables de actividad analizadas, CPF contribuyó principalmente a las diferencias observadas en la latencia de salida en la fase de la novedad. Así, mientras que el tratamiento en edad adulta disminuyó el tiempo de salida del compartimento central en apoE4, el grupo apoE3-CPF1 mostró una latencia alta, igualándose a la manifestada por apoE4-control y apoE4-CPF1. Este resultado podría ser debido a una dificultad en el inicio de la acción, induciendo una reacción más lenta en apoE3, mediado por CPF1. En este sentido, se ha relacionado la exposición a plaguicidas OPs y enfermedad de Parkinson (Sánchez-Santed et al., 2016). Un síntoma característico en las personas con la enfermedad de Parkinson es la bradiquinesia, que es la lentitud en los movimientos voluntarios e involuntarios con una dificultad para comenzarlos y terminarlos, alterándose el tiempo de reacción frente a determinados estímulos (Akamatsu et al., 2008; Mazzoni et al., 2007; Nakashima et al., 1993). Este síntoma está fuertemente ligado a una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, con la consecuente disminución del neurotransmisor a nivel de núcleo estriado (Hughes et al., 1992). Diversos estudios han revelado que CPF disminuye los niveles de dopamina en el núcleo estriado (Karen et al., 2001; Moreno et al., 2008; Savy et al., 2015; Slotkin et al., 2002), como también aumenta el metabolismo de este neurotransmisor después de una exposición postnatal (Eells and Brown, 2009). Por lo que no se descartaría una alteración

de los niveles de dopamina en este núcleo, por parte de CPF en los sujetos apoE3. Por otra parte, en un estudio anterior de nuestro laboratorio realizado en hembras, no se observaron diferencias en los niveles de dopamina en el núcleo estriado entre los diferentes genotipos apoE, aunque se encontró una disminución de dopamina en la corteza frontal de los ratones apoE4 (Reverte et al., 2016). Niveles bajos de dopamina en esta área se han asociado a pacientes con TDAH (del Campo et al., 2011). Por lo cual, se necesitarían más estudios para poder relacionar el retraso en el inicio del movimiento de los individuos apoE4, junto con el aumento de la actividad inespecífica, a posibles alteraciones del sistema dopaminérgico en la corteza frontal o en el estriado, o para relacionarlas con una conducta de congelamiento influenciada por ansiedad.

La fase de socialización cuantifica el acto de acercarse y permanecer próximo a un congénere desconocido vs evitar este encuentro, prefiriendo otro ambiente con un estímulo no-social (Moy et al., 2004). En esta fase, el genotipo apoE3 prefirió el estímulo social más que apoE4. Hasta la fecha, no existen trabajos en los cuales se caracterice la interacción social y los diferentes genotipos apoE. Un comportamiento social normal revelaría una mayor preferencia por el estímulo social, lo que implica motivación social y un comportamiento de afiliación (Kaidanovich-Beilin et al., 2011). Por lo cual, la falta de interés en apoE4 indicaría un comportamiento social anormal, que difiere de lo que se observa en los ratones en general. En materia de comportamiento social, se tiene en cuenta que los portadores del genotipo apoE4 son más agresivos, esto se ha observado en humanos pacientes de EA (Craig et al., 2004; van der Flier et al., 2006) y en ratones transgénicos (Chan and Shea, 2007). El poco interés social podría conllevar a un aislamiento social, dando lugar a un aumento de la agresividad (Matsumoto et al., 2005; Yokota et al., 2016). Esta hipótesis podría ser estudiada en un paradigma donde se observaran las relaciones intra-grupo dentro del ambiente cotidiano, existiendo la posibilidad de que apoE4 presente algún tipo de aislamiento social.

Cabe recalcar que según la evolución del genotipo apoE, apoE4 presenta el denominado gen ancestral en el género homo. Aunque, la isoforma apoE3 estaba presente en el *Homo neanderthalensis*, la predominancia de este genotipo en la población se produjo a partir del *Homo sapiens* (Corbo and Scacchi, 1999). Los antecesores del *Homo sapiens* llevaban

una vida nómada, expuestos a múltiples condiciones adversas. En cambio, con la economía agrícola del *Homo sapiens* aumentaron las comunidades y el sedentarismo, naciendo la necesidad de generar redes de apoyo para la colaboración mutua entre individuos de la misma especie (Corbo and Scacchi, 1999). En este contexto, el genotipo apoE3 podría resultar favorecido, no sólo por características metabólicas, sino también por características conductuales.

La exposición a CPF1 provocó que apoE3 permaneciera más tiempo en el compartimento no social, a diferencia de sus pares del mismo genotipo. Contrario a nuestros resultados, Ricceri et al. (2003) no observaron efectos por una exposición a CPF, en la ventana postnatal tardía, sobre las conductas de afiliación social y/o conductas no sociales al DPN 45, en machos. Del mismo modo, otros análisis sobre la conducta social en machos y CPF no han podido revelar comportamientos anormales (De Felice et al., 2014; Mullen et al., 2013; United States Environmental Protection Agency - EPA, 2014; Venerosi et al., 2012). Estas discrepancias pueden ser debidas a que el genotipo apoE, especialmente apoE3, confiera una mayor sensibilidad al tóxico. Así, los efectos que no han podido ser observados en un ratón *wild type*, si son posibles de observar en estos individuos. Por lo cual, para este tipo de análisis, el modelo transgénico utilizado en el presente estudio podría ser un buena herramienta para estudiar efectos sobre las conductas sociales después de exposiciones a CPF.

El poco interés social que presenta apoE3-CPF1 está en línea con lo observado en la tercera fase del paradigma de Crawley. Cuando se analizó la preferencia por la novedad, este grupo fue el que presentó una menor preferencia por el individuo nuevo y mayor tiempo con el individuo conocido. Sorprendentemente, los individuos apoE3-CPF1+CPF2 presentaron el efecto contrario, eligieron explorar el individuo nuevo antes que el conocido. A partir de nuestros resultados cabe resaltar varios puntos. En primer lugar, el efecto de CPF1 en apoE3 sobre la conducta social es relevante, y podría ser debida a múltiples cambios neuroquímicos, la dopamina y la motivación social y recompensa (Kohls et al., 2012), por alteraciones en el sistema serotoninérgico y su respuesta a las señales ambientales y sociales (Muller et al., 2016), por una variación en la expresión de las hormonas vasopresina y oxitocina y su función en la identificación

social (Young, 2002) o por la interacción entre el sistema serotoninérgico y estos dos últimos neuropéptidos (Thompson et al., 2007; Vacher et al., 2002). Además de los trabajos citados, otros estudios también revelan alteraciones de la señal dopaminérgica, mediadas por CPF en el núcleo estriado (Eells and Brown, 2009; Karen et al., 2001; Moreno et al., 2008; Savy et al., 2015; Slotkin et al., 2002). Numerosos estudios han descrito cambios significativos en la neurotransmisión serotoninérgica, por exposiciones a este insecticida en periodo prenatal y postnatal temprano (Aldridge et al., 2005a, 2005b; Slotkin and Seidler, 2005), y postnatal tardío (Aldridge et al., 2004; Slotkin and Seidler, 2008). Asimismo, Tait et al. (2009) describieron una disminución en la expresión de vasopresina en machos expuestos a CPF en la ventana postnatal tardía. En segundo lugar, en concordancia con nuestros resultados, el trabajo de Karvat and Kimchi (2014) mostró que el aumento de ACh, mediante un tratamiento con donepezilo, un inhibidor reversible de la AChE, incrementa la preferencia por los encuentros sociales y mejoraba la interacción social en un modelo animal de autismo. Estos autores atribuyen este efecto a la mejora de la flexibilidad cognitiva, causada por el propio medicamento (Karvat and Kimchi, 2014). Si bien se conoce que el sistema colinérgico cumple un rol importante evaluando el valor que genera un nuevo estímulo ambiental (Pepeu and Giovannini, 2004), se sabe poco sobre sus posibles implicaciones en conductas sociales. Por otro lado, nuestros resultados muestran que tras 15 días de una nueva exposición a CPF en edad adulta, el grupo apoE3-CPF1 respondió con una reversión de su desinterés por lo social y la novedad, presentando niveles similares que sus congéneres apoE3. Un reciente estudio de nuestro laboratorio observó que la inhibición ChE cerebral alcanzada por una exposición crónica a CPF es mayor en la primera semana que en la octava (Basaure et al., 2017), por lo que cabe esperar que, en estos 15 días, se obtuviera una inhibición ChE apta para producir un aumento de ACh en estos sujetos. Igualmente, este resultado sigue reforzando la evidencia de que apoE3 es el genotipo más afectado por exposiciones a CPF en edad adulta (Peris-Sampedro et al., 2016, 2015a).

Aprendizaje y memoria espacial

El aprendizaje y la memoria se estudiaron mediante la prueba de laberinto de Barnes, que permitió valorar la actividad a un ambiente nuevo durante la fase de habituación, el

aprendizaje durante la fase de adquisición y la memoria durante la fase de retención. En las tres fases analizadas se observó una fuerte influencia del genotipo en general y del tratamiento con CPF, en grupos específicos. Durante la habituación el sujeto apoE3, explora más el tablero completo, mientras que sus pares apoE4 se mantienen explorando más el espacio central. En tanto, la re-exposición a CPF afectó disminuyendo la actividad en general, efecto que sería más evidente en las hembras apoE4.

La habituación se analizó para detectar diferencias en la actividad locomotora a lo largo de 15 min y el grado de ansiedad que les confería el tablero. *Reverte et al. (2012)* observaron, en una prueba de campo abierto, que los sujetos apoE3 exploraron más la zona central que apoE4 y apoE2, lo que se atribuyó a una menor ansiedad manifestada por apoE3. Asimismo, un reciente estudio ha evidenciado diferencias considerables entre genotipos apoE, en la actividad total y central en un campo abierto, observándose una mayor ansiedad en ratones jóvenes machos transgénicos apoE4, en comparación a apoE3 (*Meng et al., 2017*). En el presente estudio, los ratones apoE4 exploraron en mayor medida el espacio central. En un campo abierto, la zona central es el espacio más desprotegido, sin resguardo para el animal, por lo cual la tendencia a permanecer cerca de las paredes es un claro signo de ansiedad (*Choleris et al., 2001; Prut and Belzung, 2003*). En nuestro caso, es probable que los individuos apoE4 eviten la zona periférica, porque la consideren potencialmente peligrosa, ya que a diferencia de un campo abierto, el laberinto de Barnes no tiene paredes laterales y es un tablero elevado. De acuerdo con este punto, las observaciones de *Hartman et al. (2001)* sugieren que apoE4 discrimina más rápido los potenciales peligros asociados a un espacio abierto que apoE3. Por otro lado, la zona periferia del laberinto de Barnes presenta a lo largo de todo el perímetro una serie de agujeros que podrían favorecer un mayor tiempo de exploración. En nuestro estudio, parece que los sujetos apoE3 muestran una mayor preferencia por la exploración de estos agujeros. Este dato estaría en concordancia con los resultados obtenidos en la prueba de *Crawley*, donde el genotipo apoE3 parece estar más interesado por la exploración de ambientes nuevos. Cabe remarcar que será difícil comparar nuestros datos de actividad con otros estudios que hayan utilizado otras pruebas como el campo abierto por las diferencias entre los aparatos utilizados.

Asimismo, las diferencias observadas entre sexos y entre genotipos en el espacio central podrían estar relacionados con un patrón de exploración distinto.

El efecto de CPF fue específico para las hembras apoE4, CPF1 incrementó la distancia recorrida, mientras que CPF1+CPF2 la disminuyó. Estos resultados podrían estar sugiriendo que CPF altera la actividad y/o ansiedad sólo en las hembras de este genotipo, y que los efectos derivados de las exposiciones postnatales son distintos de los observados tras exposiciones en adultos. En estudios empíricos de exposiciones neonatales a CPF, donde se ha valorado ansiedad y actividad, los datos dependen del periodo de exposición. Así, se ha sugerido que una exposición prenatal incrementa la ansiedad (Braquenier et al., 2010; Venerosi et al., 2010) mientras que una exposición en la ventana postnatal tardía, la disminuye (Ricceri et al., 2006; Venerosi et al., 2008). En tanto, hay resultados contradictorios sobre el efecto en la actividad después de un tratamiento postnatal tardío, mientras algunos autores encuentran una mayor actividad en ambos sexos (Dam et al., 2000; Ricceri et al., 2003), otros muestran una disminución (Levin et al., 2001; Venerosi et al., 2008) y algunos no han observado diferencias (Ricceri et al., 2006). Estas inconsistencias entre resultados pueden ser debidas al uso de diferentes protocolos para estudiar actividad.

A su vez, también existe un gran debate sobre exposiciones en edad adulta. En este caso, se ha informado que CPF aumenta o disminuye la actividad en función de la dosis administrada y el tiempo transcurrido entre la exposición y la valoración conductual (Peris-Sampedro et al., 2014; Salazar et al., 2011), diversos estudios no han encontrado diferencias a este nivel con dosis de 1 mg/kg/día por 5 días (Savy et al., 2015), de 2 – 10 mg/kg/día por 10 días (Chen et al., 2014) o de 5 mg/kg/día por 1 mes (Basaure et al., 2017; Yan et al., 2012). Estas discrepancias con los presentes resultados, pueden ser debidas a que todos los trabajos mencionados han sido realizados sólo con machos, sin valoración del genotipo apoE. Asimismo, la respuesta observada en las hembras apoE4 en esta ocasión fue sólo a causa de la exposición previa al tóxico.

Durante la adquisición, se observó que el genotipo apoE3 presentó un mejor aprendizaje respecto apoE4. De hecho, CPF alteró las curvas de aprendizaje sólo de este genotipo.

Así, los machos apoE4-CPF2 mostraron el mejor rendimiento y las hembras apoE4-CPF1 el peor. En tanto, la estrategia utilizada por ambos genotipos también fue disímil, apoE3 eligió la serial y apoE4 la aleatoria y el tratamiento produjo que los tratados apoE3-CPF1 no cambiaran su estrategia de búsqueda dentro de las 9 sesiones. Finalmente, en la retención, todos los grupos expuestos a CPF1 permanecieron un tiempo menor en el cuadrante objetivo. Sin embargo, el tratamiento en edad adulta provocó un mejor recuerdo en las hembras apoE4. Por otro lado, si bien los machos exploraron en mayor medida el agujero objetivo, en los machos apoE3-CPF2 y CPF1+ CPF2 este parámetro disminuyó.

Se observó un efecto importante del genotipo apoE en la adquisición. Los resultados previos de nuestro laboratorio han confirmado que machos y hembras apoE4 presentan un rendimiento deficiente en la adquisición de pruebas de navegación espacial en el MWM (Reverte et al., 2013) y el laberinto de Barnes (Peris-Sampedro et al., 2015a). Estos trabajos son uno de los tantos que evidencian, en modelos transgénicos, la influencia negativa del genotipo apoE4 sobre el aprendizaje (Bour et al., 2008; Hou et al., 2015; Leung et al., 2012; Salomon-Zimri et al., 2014), confirmando las observaciones de estudios epidemiológicos en la misma línea de investigación (Berteau-Pavy et al., 2007; Greenwood et al., 2005; Mayeux et al., 2001; Nilsson et al., 2002; Reitz and Mayeux, 2009; Wolk et al., 2010). De hecho, este deterioro en edades relativamente jóvenes ha sido referido en varios trabajos previos (Adeosun et al., 2014; Greenwood et al., 2005; Mayeux et al., 2001; Peris-Sampedro et al., 2015a; Reverte et al., 2013, 2012; Rodriguez et al., 2013). Algunos autores han sugerido que este déficit de apoE4 es debido a diferencias basales del sistema colinérgico (Blain et al., 2006; Marchant et al., 2010; Reverte et al., 2016; Yun et al., 2005), aunque otros estudios no han podido encontrar alteraciones a este nivel en el genotipo apoE4, ni en humanos (Corey-Bloom et al., 2000; Reid et al., 2001), ni en ratones transgénicos (Bronfman et al., 2000; Siegel et al., 2010). De igual manera, los presentes resultados se deben examinar con detención, puesto que en la adquisición los más afectados por CPF fueron los individuos del genotipo apoE4, por lo que el sistema colinérgico podría estar, en parte, modulando esta conducta. En efecto, los machos apoE4 presentaron una mejora de su rendimiento con la exposición a CPF en edad adulta. Esto podría confirmar la asociación entre este genotipo y un

sistema colinérgico disfuncional, siendo más evidente en los machos, dato que coincide con una mayor inhibición de la ChE cerebral en este subgrupo. Igualmente, no se pueden descartar otros posibles mecanismos y/o sistemas comprometidos en la mejora del desempeño en apoE4.

A su vez, entre machos y hembras apoE4, los diferentes tratamientos de CPF modularon de manera específica el aprendizaje de cada sexo. CPF I produjo que las hembras mantuvieran un peor rendimiento a lo largo de las sesiones, mientras que CPF I no causó el mismo efecto en los machos. Estos resultados se pueden explicar por las diferencias innatas entre sexos para resolver tareas espaciales. Estudios en hembras han demostrado que son más susceptibles a los deterioros en la memoria espacial después de lesiones y bajo tratamientos farmacológicos (Hörtnagl et al., 1993; Kolb and Cioe, 1996; Soleimani Asl et al., 2015).

Los efectos adversos de las exposiciones perinatales a CPF sobre el aprendizaje espacial y la memoria de trabajo han sido ampliamente analizados en estudios epidemiológicos (Horton et al., 2012; Rauh et al., 2011; van Wendel de Joode et al., 2016) y empíricos (Aldridge et al., 2005a; Gómez-Giménez et al., 2017; Jett et al., 2001; Johnson et al., 2009; Levin et al., 2002, 2001; Turgeman et al., 2011). En la bibliografía existente se hace énfasis en la selectividad que posee CPF para provocar efectos específicos en un sexo determinado. Es así como, en la mayoría de estudios empíricos citados se revela que los machos presentan el peor rendimiento en pruebas como el laberinto radial de 8 brazos por una exposición a 1 mg/kg/día de CPF en la ventana postnatal temprana (Aldridge et al., 2005a; Levin et al., 2001), a una dosis de 1,5 – 6 mg/kg/día desde el DPN 1-20 (Johnson et al., 2009) y también por un tratamiento de 0,1 – 1 mg/kg/día de CPF desde el día prenatal 7 hasta el DPN 21 en un MWM (Gómez-Giménez et al., 2017). En las hembras el efecto fue una mejora en el rendimiento (Aldridge et al., 2005a; Johnson et al., 2009; Levin et al., 2001) o no se encontraron diferencias entre controles y tratadas (Gómez-Giménez et al., 2017). Si bien esta evidencia parece contradecirse con la nuestra, lo cierto es que ninguno de estos trabajos ha abordado el genotipo como un posible factor de modulación. Por lo cual, nuestros resultados podrían deberse a que el genotipo apoE modularía de manera diferencial los efectos de CPF, evidenciando una

clara vulnerabilidad en las hembras portadores del alelo $\epsilon 4$ para las exposiciones postnatales. Aunque todavía no está del todo claro el mecanismo concreto por el cual CPF provoca esta diferenciación entre sexos, es cierto que este insecticida interviene en la diferenciación neuronal, la sinaptogénesis y la expresión génica, afectando, además del sistema colinérgico, la transmisión serotoninérgica y dopaminérgica, de una manera sexo dimórfica (Aldridge et al., 2004; De Felice et al., 2014; Levin et al., 2001; Slotkin et al., 2005b, 2001; Venerosi et al., 2012).

A su vez, la estrategia elegida como la más frecuente fue diferente entre genotipos durante la adquisición, aunque el uso de la estrategia espacial fue similar. La transición de usar estrategias no espaciales independientes del hipocampo, como la serial y la aleatoria, a la estrategia espacial dependiente de hipocampo, requiere utilizar las señales visuoespaciales externas para localizar la caja de escape (Harrison et al., 2006; O'Leary and Brown, 2012). Ahora bien, que la estrategia espacial no sea la más utilizada por los ratones, no necesariamente afectará el desempeño en la retención. De hecho, se ha observado un aumento de la estrategia serial por sobre la espacial en individuos controles sin problemas en la retención (Semenova et al., 2012; Yoder and Kirby, 2014). Nuestros resultados concuerdan con lo observado por Peris-Sampedro et al. (2015a), que señalaron una alta frecuencia en el uso de estrategias aleatorias por parte de los machos apoE4 y de la estrategia serial por machos apoE3. Rodríguez et al. (2013) sugieren que el pobre desempeño por parte de jóvenes ratones transgénicos apoE4 en el laberinto de Barnes se debe a que estos presentan una densidad dendrítica inferior en la corteza medial entorrinal, respecto los sujetos apoE3. Del mismo modo, es sabido que la navegación espacial depende, entre otras, de áreas como el hipocampo y la corteza entorrinal (Foster and Knierim, 2012; Lipton and Eichenbaum, 2008; Sasaki et al., 2015; Wolbers and Hegarty, 2010), por lo que se necesitaría investigar si entre apoE3 y apoE4 existen más diferencias en tales regiones, a nivel molecular, morfológico, o electrofisiológico.

Por otra parte, la retención de la prueba se realizó 24 h después de la última sesión de adquisición, donde todos los grupos expuestos postnatalmente a CPF presentaron una mala retención. A su vez, las hembras apoE4-CPF2 mostraron una mejor retención, en

comparación a los otros grupos de tratamiento. Salazar et al. (2011) observaron en un modelo transgénico de la EA una mejora en la retención del MWM por un tratamiento agudo de CPF. Por lo que se podría plantear la posibilidad que CPF en este caso, en las hembras apoE4 podría mejorar la retención debido a una sobreestimulación colinérgica, bajo el supuesto de que apoE4 posea un sistema colinérgico hipofuncional. Algo similar pasaría con los sujetos expuestos a CPF durante el periodo postnatal, ya que todos estos presentan un déficit en la retención que será revertido por la re-exposición en edad adulta. De hecho, en un estudio previo, nosotros sugerimos que el efecto beneficioso agudo que se observa con la rivastigmina -un inhibidor de la ChE- viene dado por el estado colinérgico intrínseco del individuo (Basaure et al., 2017).

Con respecto al número de visitas al agujero objetivo, los machos apoE3-CPF2 y CPF1+CPF2 presentaron una menor frecuencia. Peris-Sampedro et al. (2015a) observaron este mismo efecto en machos apoE3 expuestos a CPF en edad adulta, con la misma dosis utilizada en el presente trabajo. Por lo que ambos estudios podrían ser compatibles, avalando la idea previa de que CPF en edad adulta produciría un deterioro en la memoria de los individuos apoE3. Asimismo, se reforzaría la evidencia del daño cognitivo que supone un tratamiento crónico en bajas dosis de CPF, en sujetos que no presentan un déficit previo del sistema colinérgico (Basaure et al., 2017; López-Granero et al., 2016; Yan et al., 2012). Importante recalcar que en este parámetro se observó un fuerte efecto del sexo. Existen estudios que confirman que los machos, en este paradigma en particular, reiteran las visitas al agujero objetivo sin explorar los otros (O'Leary and Brown, 2012, 2009). Los autores de estos trabajos sugieren que esta conducta perseverativa la mantienen, no porque posean una memoria espacial más precisa, sino porque los machos presentarían una perseveración espacial más alta que las hembras (O'Leary and Brown, 2012). Para comprobar esta suposición sería necesario realizar un entrenamiento revirtiendo el sitio de la caja de escape. Recientes estudios han propuesto variados mecanismos de modulación sobre esta conducta, como por ejemplo el sistema glutaminérgico asociado al funcionamiento de la corteza prefrontal medial (Jett et al., 2017), el metabolismo de la serotonina (5-HT) disminuido y el receptor 5-HT_{2A} en la corteza orbitofrontal (Barlow et al., 2015) y la correcta regulación colinérgica del estriado (Prado et al., 2016). Puesto que en otras investigaciones hemos

observado que la ausencia de control inhibitorio de las hembras apoE4 es revertida por un mes de CPF en edad adulta (Peris-Sampedro et al., 2016; Reverte et al., 2016) y en este caso no se observaron diferencias entre las hembras apoE4 en la frecuencia de visitas al agujero, nosotros no vemos tan claro que este parámetro mida una respuesta perserverativa, de hecho podría estar respondiendo a otras conductas como la estrategia de búsqueda.

En conclusión, los presentes resultados revelaron que apoE3 adquiere bien la tarea espacial, mientras que apoE4 presenta un mal rendimiento. Sin embargo, CPF2 produce una mejora en la adquisición en los machos y una mejora en la retención de las hembras de este genotipo. En tanto, CPF1 empeora la retención en todos los grupos expuestos. Estos resultados refuerzan la idea de los efectos perjudiciales de las exposiciones tempranas a CPF y la existencia de interacciones entre la exposición a CPF el genotipo apoE y el sexo.

Actividad ChE

La actividad ChE plasmática y cerebral en sujetos adultos no se modificó por la exposición postnatal, de manera que parece poco probable que esta variable pueda estar relacionada con los efectos observados a largo plazo.

Por otro lado, una exposición moderada de 8 semanas a CPF en adultos (CPF2) produjo una inhibición significativa de la actividad ChE plasmática. En un reciente estudio observamos que a las 8 semanas de una exposición en edad adulta a CPF la actividad de esta enzima descendía de forma importante a un 18,7% (Basaure et al., 2017), pero las dosis fueron superiores a las utilizadas en este estudio. La ChE plasmática de los roedores es la suma de AChE y BChE en igual proporción, sin embargo se ha demostrado que BChE es más sensible al efecto inhibitorio de CPO en estudios *in vivo* como *in vitro*, por lo que se estima que la inhibición observada en la ChE plasmática en ratas y ratones es mediada principalmente por BChE (Timchalk et al., 2006).

A nivel cerebral la actividad ChE también se afectó por el tratamiento de CPF en edad adulta, sin embargo el efecto observado en la corteza frontal es contrario a lo esperado.

En esta área, la actividad ChE aumentó un 32,3% en el grupo expuesto a CPF2 respecto al control. Este incremento en la actividad podría ser debido a una inducción de la enzima como consecuencia de la inhibición mantenida por una exposición crónica CPF a dosis moderadas. Esta posible inducción de la enzima se ha observado en otro estudio, en cerebro anterior y posterior en el transcurso de una exposición postnatal (Oriel and Kofman, 2015). Además, otro estudio reveló que altas dosis de CPF aumentaban los niveles de AChE en cerebro anterior, hipocampo, cerebelo y cerebro completo, acompañada de una disminución de la actividad después de 4 semanas de exposición diaria vía oral (Chiappa et al., 1995). En este sentido, Peris-Sampedro et al. (2016) observaron una inhibición ChE en la corteza frontal de un 24%, independientemente del genotipo apoE, después de 1 mes de exposición a CPF. Este efecto, en la misma área, ha sido detectado por otros investigadores, a los 14 y 30 días de exposición (Middlemore-Risher et al., 2010). También se ha demostrado que diversos OPs, incluido CPF, pueden provocar una inducción de la AChE plasmática después de la inhibición de la misma (Duysen and Lockridge, 2011). AChE se ha relacionado con diversas funciones aparte de las catalíticas, como por ejemplo la regulación de la apoptosis (Soreq and Seidman, 2001). Por lo que es importante una investigación adicional para explorar con mayor precisión esta inhibición y posible inducción, y los cambios conductuales relacionados.

Por otra parte, cabe destacar que las diferencias observadas entre genotipos, son a nivel del cuerpo estriado, donde el genotipo apoE4 presenta en general una mayor actividad. Además es precisamente en este genotipo donde el tratamiento CPF2 provoca una inhibición significativa de la actividad ChE. La diferencia entre genotipos y la actividad AChE ya se había confirmado en un estudio con humanos de mediana edad (Eggers et al., 2006) en los cuales se detectó una alta actividad cortical de esta enzima en apoE4 homocigotos y heterocigotos. Asimismo, el uso de anticolinérgicos empeora varias funciones cognitivas en portadores apoE4 (López-Álvarez et al., 2015; Pomara et al., 2004). Las diferencias observadas en el aprendizaje espacial por parte de ambos genotipos podrían estar vinculadas, en cierta medida, a los altos niveles de ChE que presenta apoE4 en el estriado. Asimismo, es interesante que sólo en este grupo de individuos se observara un descenso importante de la actividad de esta enzima, como consecuencia de la exposición a CPF. Probablemente, apoE4 es un genotipo con un

sistema colinérgico más sensible a los efectos colinérgicos. En este sentido, se ha observado que la nicotina produce una mejora cognitiva en personas portadoras del genotipo apoE4 (Evans et al., 2013). Pese a esta evidencia, todavía no se observa una correlación entre mejora cognitiva y tratamiento con inhibidores de la ChE, en pacientes de EA portadores del alelo $\epsilon 4$ (Haywood and Mukaetova-Ladinska, 2006).

En conclusión, entre genotipos existen diferencias metabólicas y una clara disparidad en las conductas sociales, la actividad, el aprendizaje y la memoria espacial, que contribuirían a una vulnerabilidad distinta hacia CPF. En este sentido, apoE4 se vería más afectado por el insecticida sobre el peso corporal y la glicemia, manifestando diferencias entre ambos sexos. Igualmente, CPF en edad adulta aumenta la ingesta de comida en todos los sujetos. Con respecto a las conductas sociales, la exposición del insecticida en edad temprana disminuiría el interés sobre los estímulos sociales, sólo en el genotipo apoE3, siendo este efecto revertido por una re-exposición en edad adulta. Por otra parte, CPF en periodo postnatal afectaría el aprendizaje de las hembras apoE4 y la memoria en todos los sujetos, y a su vez CPF en edad adulta mejoraría el aprendizaje en los machos apoE4 y la memoria de las hembras de este genotipo. La actividad enzimática en estriado es diferente entre ambos genotipos, pudiendo ser la causa para los efectos específicos de CPF en cada genotipo. En conjunto, estos resultados estarían demostrando que CPF manifiesta sus efectos de forma distinta dependiendo del genotipo apoE y del sexo, existiendo una diferencia importante entre las consecuencias de una exposición postnatal y edad adulta.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

VI

Discusión General

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

El propósito de esta tesis doctoral fue estudiar la influencia del genotipo apoE sobre los efectos provocados por una exposición temprana a CPF, siendo evaluados a corto, medio y largo plazo. También se evaluó la influencia del sexo y la respuesta a una re-exposición durante la edad adulta.

En este capítulo los resultados se discuten en conjunto, para ofrecer una idea general acerca de la repercusión de la exposición a CPF en distintos momentos de la vida, en los cambios físicos, bioquímicos y conductuales que induce. Al final se indican las limitaciones del estudio y las posibles líneas de investigación a seguir en un futuro.

I. Discusión general

A lo largo de esta investigación, se observó que los genotipos apoE3 y apoE4 presentan diferencias a todos los niveles estudiados desde el nacimiento. Los periodos de desarrollo y crecimiento requieren el aporte de cantidades suficientes de lípidos que serán incorporados a las membranas celulares y, además, cumplirán múltiples funciones de señalización (Ohvo-Rekilä et al., 2002; Woollett and Heubi, 2000). Por tanto, no es de extrañar que los individuos que difieran en su eficiencia para el transporte y distribución de lípidos puedan presentar diferencias en estas etapas. En la ventana prenatal temprana, la madre es la que vehiculiza el colesterol que necesita el feto para su desarrollo. No obstante, en el último periodo prenatal, el feto es capaz de sintetizar su propio colesterol para satisfacer las demandas estructurales propias de la etapa del desarrollo (Herrera, 2002). En este sentido, nuestro estudio mostró diferencias en el tamaño de la camada, en el peso fetal al nacimiento, en el incremento de peso en las hembras durante el periodo postnatal temprano y en la maduración física, concretamente en la apertura de ojos. Si bien, el tamaño de la camada es un factor importante en el crecimiento, el mayor incremento de peso en hembras apoE3 sugiere un efecto importante de este genotipo, que podría estar ligado a diferencias en la distribución y/o metabolismo lipídico en el organismo (Woollett and Heubi, 2000).

Por otra parte, se observaron efectos generales de la exposición a CPF durante el desarrollo como el retraso en la apertura de ojos, las habilidades neuromotores y el

desarrollo sexual de los machos. En un estudio que utilizó dosis de CPF similares a las usadas en nuestro estudio durante el periodo prenatal, mostraron retrasos a largo plazo en las habilidades neuromotoras (Abou-Donia et al., 2006). En conjunto, estos datos sugieren efectos permanentes sobre estructuras relacionadas con el control motor que deberían ser estudiadas de forma más específica. Estos cambios en periodo postnatal reforzarían las evidencias respecto a la vulnerabilidad que presenta la población infantil a distintos tóxicos medioambientales (Au, 2002; Grandjean and Landrigan, 2014; Perera et al., 2006), entre ellos este insecticida (Li et al., 2012; Moser et al., 1998; United States Environmental Protection Agency - EPA, 2014).

Las diferencias entre genotipos y entre sexos se han manifestado a lo largo de las dos fases experimentales en las distintas variables estudiadas, siendo el genotipo un factor que ha contribuido de forma importante a las diferencias observadas. En este sentido, el genotipo afectó el peso a lo largo de las dos fases experimentales, los ratones apoE3 presentaron un peso superior a los apoE4, desde la etapa post-destete en hembras y a partir del quinto mes de vida en machos. Sobre esto, diversos estudios epidemiológicos han avalado que portadores del genotipo apoE4 presentan una menor masa corporal (Elosua et al., 2003; Rodríguez-Carmona et al., 2014; Tejedor et al., 2014; Volcik et al., 2006). Esto ha sido observado además en numerosas investigaciones realizadas con ratones transgénicos (Arbones-Mainar et al., 2016, 2008; Huebbe et al., 2015; Reverte et al., 2013, 2012; Segev et al., 2016). En esta línea, se ha comprobado que ambos genotipos poseen perfiles metabólicos diferentes, apoE3 acumula más tejido adiposo blanco y muestra un aumento de peso superior que apoE4, y estos últimos utilizan los lípidos como fuente de combustible, en mayor medida (Arbones-Mainar et al., 2016). Este mecanismo podría explicar diferencias en el peso corporal que se han observado en la gran mayoría de trabajos. Al mismo tiempo, la exposición a CPF en periodo postnatal provocó en el peso corporal diferentes efectos a largo plazo, en ambos genotipos. Así, los machos apoE4 tratados mantuvieron un peso superior que sus respectivos controles desde el tercer mes de vida, mientras que los machos apoE3 expuestos no mostraron este efecto. Aun con esta interacción entre genotipo y CPF, apoE3 continuó presentando un mayor peso que apoE4. Tal y como sugieren Slotkin et al. (2005a), cabe la posibilidad que la exposición a CPF en edades tempranas desencadene

efectos metabólicos a largo plazo sexo-dimórficos, siendo los machos la población más vulnerable frente a estos. Es especialmente importante el aumento de peso provocado por la exposición en edad adulta, en machos apoE4. A su vez, en todos los casos la exposición en edad adulta se ha acompañado de un incremento en la ingesta de comida, lo cual sugiere que una exposición más larga podría mostrar diferencias también en los otros grupos. Además, de los posibles cambios metabólicos asociados a las exposiciones con CPF, consideramos importante valorar posibles efectos a nivel de SNC que afecten a la conducta alimentaria.

Asimismo, ambos genotipos presentaron también diferencias en la expresión génica de varios marcadores hepáticos, apoE3 presentó mayor expresión de BChE y PONI. Puesto que, en ratones y ratas, estas enzimas alcanzan los niveles de adulto al finalizar el primer mes de vida (Moscovitz and Aleksunes, 2013) estas diferencias se podrían mantener a lo largo de la vida. Deberíamos estudiar hasta qué punto estas diferencias en expresión se relacionan con diferencias en actividad. Si esto es así, estaríamos frente a dos fenotipos con diferente capacidad para metabolizar CPF. Curiosamente, la exposición a CPF en periodo postnatal, a pesar de provocar una inhibición importante de la actividad ChE plasmática, no modificó la expresión génica de ninguna de estas dos enzimas. Sin embargo, CPF modificó la expresión del resto de paraoxonasas, presentando interacciones específicas con el genotipo apoE. En efecto, los individuos apoE3 fueron los más afectados por las consecuencias inmediatas de la exposición postnatal, ya que aumentaron la expresión de PON2 y PON3. Dado que PON2 y PON3 ejercen importantes funciones protectoras frente al estrés oxidativo (Furlong et al., 2016), un incremento en su expresión podría reflejar una respuesta al daño oxidativo generado por el tratamiento con CPF. En este sentido, la menor respuesta en apoE4 podría suponer un sistema de defensa menos eficiente, o bien, un menor efecto del tratamiento. Esto último sería compatible con un sistema colinérgico hipofuncional en apoE4 y por tanto con menor margen para la sobreestimulación provocada por CPF. Otro aspecto interesante es la relación encontrada entre los niveles de expresión de PON3 y la adiposidad (Furlong et al., 2016). Así, se debería explorar mejor si esta relación se observa en adultos con respecto a las diferencias de peso observadas en nuestro estudio.

Por otro lado, también se observaron diferencias entre genotipos sobre la actividad de la ChE cerebral tanto en edad temprana como en adultos, en ambos casos apoE4 presenta mayor actividad ChE. La actividad ChE cerebral no se modificó por el tratamiento postnatal, pero la exposición en adultos provocó una disminución de la actividad ChE en el estriado, sólo en machos del genotipo apoE4. De acuerdo con los resultados de actividad en cerebro, en edades tempranas, no observamos cambios en la expresión de las isoformas AChE-S o AChE-R debidas al tratamiento, pero si observamos un incremento de la expresión de la isoforma AChE-R y una disminución de la isoforma AChE-S en apoE4. Se ha sugerido que la AChE presenta funciones no catalíticas, desempeñando un rol importante en la formación de neuritas, la sinaptogénesis y la adhesión celular durante el neurodesarrollo (Abreu-Villaça et al., 2011; Soreq and Seidman, 2001; United States Environmental Protection Agency - EPA, 2014). Por lo que algunas de las disimilitudes entre genotipos, observadas a lo largo del desarrollo, podrían ser debidas a diferencias en la actividad ChE o expresión de las isoformas AChE. Asimismo, cabe la posibilidad de que las diferencias observadas entre apoE3 y apoE4 en la expresión génica de ambas isoformas de la AChE se mantengan a lo largo de la vida, pudiendo ser un biomarcador de estrés crónico para los portadores de apoE4. Por ejemplo, en situaciones de estrés se ha observado que la isoforma AChE-R aumenta en corteza, hipocampo, estriado y cerebelo en mamíferos sanos (Dori et al., 2011; Kaufer et al., 1998; Pick et al., 2004), sugiriéndose que ésta ejerce un papel neuroprotector (Soreq and Seidman, 2001; Zimmerman and Soreq, 2006). En un estudio reciente se ha evidenciado que la actividad AChE en estriado y la expresión de AChE-R aumentan en condiciones de estrés crónico (Valuskova et al., 2017).

Paralelamente, CPF alteró el sistema colinérgico en función del genotipo. La expresión del VACHT disminuyó como causa del tratamiento postnatal en todos los individuos apoE3. Además, este efecto se siguió observando 15 días después del tratamiento. Varios estudios han valorado la influencia de una disminución del VACHT sobre la conducta. Uno de ellos reveló déficits en la memoria de reconocimiento de objetos y memoria de reconocimiento social en ratones *knockout* con una reducción del 40% de la expresión del VACHT (Prado et al., 2006). Otro reveló que una ablación del VACHT en el prosencéfalo causaba hiperactividad y déficit en la adquisición en pruebas de memoria

espacial (Martyn et al., 2012). Ambas investigaciones han sugerido que el tono colinérgico está fuertemente ligado a los niveles de esta proteína y que, por tanto, sería un componente fundamental para el curso normal de ciertos procesos cognitivos (Prado et al., 2013). En nuestro caso, los efectos de CPF sobre la expresión del VACHT se mantuvieron por 15 días. Si esto continuara en el tiempo, es esperable que el tono colinérgico en los sujetos apoE3 tratados sea diferente al de los controles durante un largo periodo, y que por medio de una re-exposición a CPF éste se equilibraría. Esta serie de sucesos podrían estar en línea con lo observado en la prueba de conducta social, puesto que el tratamiento postnatal afectó la preferencia por las interacciones sociales en los machos apoE3, revirtiendo este comportamiento tras recibir un nuevo tratamiento de 15 días de CPF. Por lo que se podría sugerir que el VACHT es una diana para la toxicidad de CPF que traería como consecuencia deterioro a nivel de cognición social sólo en los individuos apoE3, puesto que en apoE4 no se observaron los efectos sobre este marcador, como tampoco efectos en las conductas sociales.

Importante recalcar que la señal colinérgica es fundamental en la formación y consolidación de la memoria espacial (Brazhnik et al., 2003; Deiana et al., 2011) y en la evaluación de un estímulo cuando un individuo es expuesto a una situación nueva (Pepeu and Giovannini, 2004). Ambos procesos están profundamente relacionados con los comportamientos valorados en este trabajo, por lo que no se descarta que el sistema colinérgico contribuya o sea reflejo de las diferencias entre genotipos. Así, mediante la prueba tres compartimentos de Crawley se observó que los machos apoE3 presentan un mayor nivel de interacción social y preferencia por la novedad, mientras que los apoE4 no manifiestan una clara disposición hacia un encuentro social o a la exploración de un ambiente nuevo. A su vez, en el laberinto de Barnes, tanto machos como hembras apoE4 presentaron una peor adquisición respecto a apoE3; no obstante, sólo en las hembras se distinguió un evidente deterioro en la memoria espacial. Puesto que las dos pruebas realizadas en el transcurso de este estudio evalúan conductas diferentes, estos resultados fortalecen la idea de que el genotipo apoE genera diferencias conductuales (Meng et al., 2017; Peris-Sampedro et al., 2016; Reverte et al., 2016, 2014b, 2013, 2012; Siegel et al., 2012).

Además, CPF también afectó el aprendizaje y memoria espacial, sin embargo, los efectos del tratamiento postnatal y en edad adulta, variaron en función del genotipo y del sexo. El tratamiento en edad adulta mejoró el rendimiento en la adquisición de los machos apoE4, mientras que el tratamiento postnatal promovió un empeoramiento en las hembras apoE4. En la retención, ningún ratón tratado en edad temprana recordó la tarea, mientras que el tratamiento en edad adulta favoreció la memoria de las hembras apoE4. Con respecto a las exposiciones postnatales a CPF, Qiao et al. (2003) sugirieron que éstas ejercían cambios de inicio retardado en distintos componentes de la transmisión colinérgica, independientemente de la inhibición de AChE, expresándose a largo plazo a nivel cognitivo. Por lo que no se deben descartar que otros elementos de este sistema se alteren por CPF, pudiendo ser mecanismos claves para explicar el deterioro sobre el aprendizaje en las hembras apoE4 y la memoria en todos los sujetos. En referencia a la exposición en edad adulta, el efecto inmediato se estaría evidenciando en mayor medida en apoE4, mejorando la ejecución en las tareas de aprendizaje y memoria.

Como hemos podido observar a lo largo de las dos fase experimentales las diferencias entre sexos han sido importantes y han presentado interacciones con el genotipo apoE, aunque hay pocos estudios que analicen estas diferencias. Así, existe una gran falta de información acerca de los efectos que diversos contaminantes medioambientales pueden provocar sobre la salud de las mujeres. A nivel empírico, los estudios en el campo de la neurotoxicología se realizan principalmente con machos al considerarse el ciclo hormonal propio de las hembras un factor que puede incidir en los datos obtenidos (Mitsushima, 2010; Weiss, 2011). A su vez, numerosos estudios han revelado que exposiciones a CPF en edades tempranas desencadenan efectos específicos en ambos sexos a largo plazo, tales cambios han sido observados en la señalización intracelular (Meyer et al., 2004), neuroquímico (Aldridge et al., 2004), neuroendocrino (Tait et al., 2009) y conductual (Gómez-Giménez et al., 2017; Venerosi et al., 2012) y aun así, se desconocen los mecanismos implicados en estos efectos de CPF específicos según el sexo. Por lo cual, los resultados de esta tesis doctoral avalan la necesidad de valorar ambos sexos, profundizando en la importancia de la vulnerabilidad presente en cada subpoblación hacia diversos agentes nocivos.

En conclusión, este estudio ha identificado que el rango de edad que va desde el DPN 10-15 es una ventana temporal específica para que un tóxico como CPF desencadene efectos nocivos sobre la salud. Tales efectos, a nivel bioquímico y a corto plazo se manifestarían en los portadores de apoE3, y a largo plazo sobre la ingesta de comida, conductas sociales, memoria espacial y peso corporal. Una re-exposición a CPF potencia o antagoniza estos efectos. En apoE4, los efectos de la exposición postnatal son más evidentes en el peso corporal a medio y largo plazo, especialmente en los machos; y la exposición en edad adulta supondría una mejora a nivel de aprendizaje y memoria espacial. Por lo cual, cada población exhibe una vulnerabilidad distinta frente al tóxico, dependiendo de la edad de exposición, en función de su sexo y genotipo.

2. Limitaciones y futuras direcciones

Este estudio ha sido el primero en entregar información respecto a la influencia del genotipo apoE sobre los efectos de una exposición a CPF en periodo postnatal. Por este motivo, se quiso abarcar una gran cantidad de contenidos realizando un sondeo a distintos niveles: físicos, bioquímicos y conductuales, durante los primeros 7 meses de vida de los ratones. A pesar de los resultados obtenidos, en el transcurso del estudio se encontraron diversas limitaciones. Por lo que es necesario abordarlas con la idea de ampliar el conocimiento en un futuro.

En primer lugar, no se evaluó la expresión génica de los receptores nAChRs y el recaptador de colina. Estos marcadores podrían haber dado más información sobre la modulación del genotipo apoE en los efectos de CPF sobre el sistema colinérgico y, más aún, podrían dilucidar diferencias entre apoE3 y apoE4. Si bien, se tuvo en mente la evaluación de los receptores nAChRs $\alpha 7$ y $\alpha 4$, ésta no se pudo concretar por costo. Debido a los resultados obtenidos, vemos sumamente necesario seguir profundizando en el sistema colinérgico de ambos genotipos. Por lo cual, se deberían valorar, en varios periodos de la vida, niveles de proteína, funcionalidad, actividad de ChAT y unión a receptores, caracterizando en su totalidad las posibles disimilitudes.

En segundo lugar, no se realizó la comparación de la expresión génica entre un ratón *wild type* y el modelo transgénico apoE. Debido al tiempo que supone la mantención de camadas en periodo postnatal y el costo de agregar otro grupo experimental, se nos hizo imposible incluirlo en esta tesis doctoral. Sin embargo, tenemos en cuenta la importancia de caracterizar el genotipo apoE desde la base de la cepa C57BL/6. Frente a esto, pretendemos analizar las paraoxonasas en hígado y los diversos marcadores del sistema colinérgico en ambas cepas, en un futuro. De igual modo, la idea de que ambos genotipos presenten distintos fenotipos metabolizadores para CPF podría valorarse en profundidad, determinando la expresión, actividad y niveles de PON1 y BChE a distintos periodos de la vida.

En tercer lugar, no se caracterizaron las conductas sociales de las hembras. Si bien, el estudio longitudinal inicial planteaba la evaluación de ambos sexos, fue imposible implicar a las hembras en la prueba social, puesto que no se llegó a completar cada grupo de tratamiento para este experimento. La caracterización del genotipo apoE sobre estas conductas debe ser completa, por lo que vemos necesario agregar a las hembras en esta prueba.

Frente a los resultados obtenidos, también emergen otras propuestas:

1. Los presentes resultados sobre el peso corporal de los individuos apoE3 y apoE4, después de una exposición a CPF en edad adulta no se asemejan a lo informado por Peris-Sampedro et al. (2015a). Esta discrepancia entre estudios del mismo laboratorio podría ser debida a diferencias en ambos protocolos, por lo que vemos necesario valorar las diferencias de tres grupos, incluyendo un grupo sin vehículo: control-sin aceite-periodo postnatal, control-aceite-periodo postnatal, y CPF-aceite-periodo postnatal, observando los cambios sobre el peso corporal tras una re-exposición en edad adulta.

2. El efecto que CPF promovió sobre los comportamientos sociales en apoE3 debería examinarse más a fondo. Nosotros proponemos realizar este experimento post-destete y en la adolescencia, para corroborar si este efecto se viene dando desde el periodo postnatal o se desarrolla a lo largo del tiempo. Además, frente a la reversión de este

efecto, después de la exposición en edad adulta, vemos importante valorar si se mantiene en el tiempo.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

VIII

Conclusiones

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

De los resultados obtenidos en las 2 fases experimentales se derivan las siguientes conclusiones:

1. El genotipo apoE influye en el tamaño de la camada y en el desarrollo físico de las crías. El número de crías por camada es mayor en los ratones apoE3 y la apertura de ojos se produce antes en los sujetos apoE4.
2. La exposición a clorpirifós en periodo postnatal provoca retrasos en la apertura de ojos y en el desarrollo neuromotor, independientes del sexo y el genotipo. Además, incrementa el peso de los machos apoE4 desde el tercer al quinto mes de vida.
3. La exposición a 1 mg/kg/día de clorpirifós durante el periodo del día 10 al 15 postnatal inhibe la actividad colinesterasa plasmática a corto plazo, pero no modifica la actividad colinesterasa cerebral.
4. Durante el desarrollo, la butirilcolinesterasa y la paraoxonasa-1 en hígado se expresan más en los ratones apoE3 que en los del genotipo apoE4. Además, la exposición a clorpirifós en periodo postnatal induce una mayor expresión de la paraoxonasa-3 sólo en ratones apoE3.
5. Durante el desarrollo, los sujetos del genotipo apoE3 expresan más acetilcolinesterasa-S y menos acetilcolinesterasa-R que los del genotipo apoE4. Además, la exposición a clorpirifós en periodo postnatal modifica en apoE3 la expresión del receptor muscarínico M5 a corto plazo en hembras, la expresión de receptor muscarínico M2 a medio plazo en hembras y la expresión del transportador vesicular de acetilcolina a corto y medio plazo en ambos sexos.
6. En ratones adultos, la exposición a 2 mg/kg/día de clorpirifós durante ocho semanas inhibe la actividad colinesterasa plasmática e induce un aumento de la actividad colinesterasa en la corteza frontal en todos los sujetos y una inhibición de la actividad colinesterasa en el estriado sólo en los machos apoE4.

7. La exposición a clorpirifós en edad adulta incrementa la ingesta de comida y promueve un aumento de peso que se manifiesta en los ratones apoE3 re-expuestos de ambos sexos y en los machos apoE4.

8. Los sujetos apoE4 machos adultos presentan menor preferencia social y por la novedad que los del genotipo apoE3. La preferencia por la novedad disminuye en apoE3 por la exposición a clorpirifós en periodo postnatal, mientras que la re-exposición en edad adulta revierte este efecto.

9. El genotipo apoE influye en el aprendizaje y la memoria espacial en un laberinto de Barnes. Durante la adquisición, los sujetos apoE4 presentan un peor rendimiento, mientras que sólo las hembras apoE4 muestran alteraciones en la retención de esta prueba. La exposición a clorpirifós en periodo postnatal deteriora el aprendizaje de las hembras apoE4 y la retención de todos los sujetos. La exposición a clorpirifós en edad adulta mejora el aprendizaje en machos apoE4 y la memoria en las hembras apoE4. Además, la re-exposición revierte los efectos sobre la memoria de la exposición postnatal.

Conclusión general

El genotipo apoE interviene en parámetros del desarrollo, el peso corporal, la expresión génica de marcadores de detoxificación de clorpirifós y de marcadores del sistema colinérgico, la actividad colinesterasa cerebral, las conductas sociales, el aprendizaje y la memoria espacial. Por su parte, la exposición a clorpirifós entre los días postnatales 10-15 manifiesta consecuencias a corto, medio y largo plazo. Algunas de estas se potencian o antagonizan con la re-exposición a clorpirifós en edad adulta. Sin embargo, los efectos de clorpirifós dependen del genotipo apoE, siendo las consecuencias de la exposición en periodo postnatal más evidentes en apoE3, mientras que la exposición en edad adulta afecta, en mayor medida, a apoE4. En conjunto, estos resultados advierten sobre la vulnerabilidad genética de ciertas poblaciones a este insecticida.

Bibliografía

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

Abreu-Villaça, Y., Filgueiras, C.C., Manhães, A.C., 2011. Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav. Brain Res.* 221, 367–378.

Abou-Donia, M.B., Khan, W.A., Dechkovskaia, A.M., Goldstein, L.B., Bullman, S.L., Abdel-Rahman, A., 2006. In utero exposure to nicotine and chlorpyrifos alone, and in combination produces persistent sensorimotor deficits and Purkinje neuron loss in the cerebellum of adult offspring rats. *Arch. Toxicol.* 80, 620–631.

Acevedo, S.F., Piper, B.J., Craytor, M.J., Benice, T.S., Raber, J., 2010. Apolipoprotein E4 and Sex Affect Neurobehavioral Performance in Primary School Children. *Pediatr. Res.* 67, 293–299.

Acker, C.I., Nogueira, C.W., 2012. Chlorpyrifos acute exposure induces hyperglycemia and hyperlipidemia in rats. *Chemosphere* 89, 602–608.

Adeosun, S.O., Hou, X., Zheng, B., Stockmeier, C., Ou, X., Paul, I., Mosley, T., Weisgraber, K., Wang, J.M., 2014. Cognitive deficits and disruption of neurogenesis in a mouse model of apolipoprotein E4 domain interaction. *J. Biol. Chem.* 289, 2946–59.

Akamatsu, T., Fukuyama, H., Kawamata, T., 2008. The effects of visual, auditory, and mixed cues on choice reaction in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 269, 118–125.

Aguilar-Garduña, C., Rebagliato, M., Hernández, A.F., 2014. A systematic review of neurodevelopmental effects of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure 230, 104–121.

Alavanja, M.C.R., Hoppin, J.A., Kamel, F., 2004. Health Effects of Chronic Pesticide Exposure: Cancer and Neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health* 25, 155–197.

Aldridge, J.E., Levin, E.D., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2005a. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environ. Health Perspect.* 113, 527–31.

Aldridge, J.E., Meyer, A., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2005b. Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure. *Environ. Health Perspect.* 113, 1027–31.

Aldridge, J.E., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2004. Developmental exposure to chlorpyrifos elicits sex-selective alterations of serotonergic synaptic function in adulthood: critical periods and regional selectivity for effects on the serotonin transporter, receptor subtypes, and cell signaling. *Environ. Health Perspect.* 112, 148–55.

Alexander, D.M., Williams, L.M., Gatt, J.M., Dobson-Stone, C., Kuan, S.A., Todd, E.G., Schofield, P.R., Cooper, N.J., Gordon, E., 2007. The contribution of apolipoprotein E alleles on cognitive performance and dynamic neural activity over six decades. *Biol. Psychol.* 75, 229–38.

Alharbi, K.K., Syed, R., Alharbi, F.K., Khan, I.A., 2017. Association of Apolipoprotein E Polymorphism with Impact on Overweight University Pupils. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 21, 53–57.

Ali, A. Bin, Zhang, Q., Lim, Y.K., Fang, D., Retnam, L., Lim, S.K., 2003. Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 824–829.

Arakawa, H., Arakawa, K., Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 2009. Social features of scent-donor mice modulate scent marking of C57BL/6J recipient males. *Behav. Brain Res.* 205, 138–145.

Arbones-Mainar, J.M., Johnson, L.A., Altenburg, M.K., Maeda, N., 2008. Differential modulation of diet-induced obesity and adipocyte functionality by human apolipoprotein E3 and E4 in mice. *Int. J. Obes.* 32, 1595–1605.

Arbones-Mainar, J.M., Johnson, L.A., Torres-Perez, E., Garcia, A.E., Perez-Diaz, S., Raber, J., Maeda, N., 2016. Metabolic shifts toward fatty-acid usage and increased thermogenesis are associated with impaired adipogenesis in mice expressing human APOE4. *Int. J. Obes.* 40, 1574–1581.

Arenaza-Urquijo, E.M., Gonneaud, J., Fouquet, M., Perrotin, A., Mézenge, F., Landeau, B., Egret, S., De la Sayette, V., Desgranges, B., Chételat, G., 2015. Interaction between years of education and APOE ϵ 4 status on frontal and temporal metabolism. *Neurology* 85, 1392–9.

Ashry, K.M., Abu-Qare, A.W., Saleem, F.R., Hussein, Y.A., Hamza, S.M., Kishk, A.M., Abou-Donia, M.B., 2002. Inhibition and recovery of maternal and fetal cholinesterase enzymes following a single oral dose of chlorpyrifos in rats. *Arch. Toxicol.* 76, 30–39.

Au, W.W., 2002. Susceptibility of children to environmental toxic substances. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 205, 501–3.

Aubert, I., Cécyre, D., Gauthier, S., Quirion, R., 1996. Comparative ontogenic profile of cholinergic markers, including nicotinic and muscarinic receptors, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 369, 31–55.

Avale, M.E., Chabout, J., Pons, S., Serreau, P., De Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., Bourgeois, J.-P., Maskos, U., Changeux, J.-P., Granon, S., 2011. Prefrontal nicotinic receptors control novel social interaction between mice. *FASEB J.* 25, 2145–55.

Badrane, N., Askour, M., Berechid, K., Abidi, K., Dendane, T., Zeggwagh, A., 2014. Severe oral and intravenous insecticide mixture poisoning with diabetic ketoacidosis: a case report. *BMC Res. Notes* 7, 485.

Baillie-Hamilton, P.F., Phil, B.S.D., 2002. Chemical Toxins : A Hypothesis to Explain the Global Obesity Epidemic 8, 185–192.

Barak, B., Feng, G., 2016. Neurobiology of social behavior abnormalities in autism and Williams syndrome. *Nat. Neurosci.* 19, 647–655.

Barlow, R.L., Alsiö, J., Jupp, B., Rabinovich, R., Shrestha, S., Roberts, A.C., Robbins, T.W., Dalley, J.W., 2015. Markers of Serotonergic Function in the Orbitofrontal Cortex and Dorsal Raphé Nucleus Predict Individual Variation in Spatial-Discrimination Serial Reversal Learning. *Neuropsychopharmacology* 40, 1619–1630.

Barber, D., Hunt, J., Ehrich, M., 2001. Inhibition of calcium-stimulated ATPase in the hen brain P2 synaptosomal fraction by organophosphorus esters: relevance to delayed neuropathy. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 63, 101–113.

Barnes, C., 1979. Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 74–104.

Basaure, P., Peris-Sampedro, F., Cabre, M., Reverte, I., Colomina, M.T., 2017. Two cholinesterase inhibitors trigger dissimilar effects on behavior and body weight in C57BL/6 mice: The case of chlorpyrifos and rivastigmine. *Behav. Brain Res.* 318, 1–11.

Basu, R., Dalla Man, C., Campioni, M., Basu, A., Klee, G., Toffolo, G., Cobelli, C., Rizza, R.A., 2006. Effects of Age and Sex on Postprandial Glucose Metabolism: Differences in Glucose Turnover, Insulin Secretion, Insulin Action, and Hepatic Insulin Extraction. *Diabetes* 55, 2001–2014.

Bayrami, M., Hashemi, T., Malekirad, A.A., Ashayeri, H., Faraji, F., Abdollahi, M., 2012. Electroencephalogram, cognitive state, psychological disorders, clinical symptom, and oxidative stress in horticulture farmers exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Ind. Health* 28, 90–96.

Benke, G.M., Murphy, S.D., 1975. The influence of age on the toxicity and metabolism of methyl parathion and parathion in male and female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31, 254–69.

Berger-Sweeney, J., 2003. The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: important questions and potential answers. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 401–411.

Berry, R.J., Bronson, F.H., 1992. Life history and bioeconomy of the house mouse. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 67, 519–50.

Berteau-Pavy, F., Park, B., Raber, J., 2007. Effects of sex and APOE epsilon4 on object recognition and spatial navigation in the elderly. *Neuroscience* 147, 6–17.

Bird, C.M., Burgess, N., 2008. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 182–194.

Blaak, E., 2008. Sex differences in the control of glucose homeostasis. *Curr. Opin. Clin Nutr. Metab Care* 11, 500–504.

Blain, J.F., Sullivan, P.M., Poirier, J., 2006. A deficit in astroglial organization causes the impaired reactive sprouting in human apolipoprotein E4 targeted replacement mice. *Neurobiol. Dis.* 21, 505–514.

Boesch-Saadatmandi, C., Pospissil, R.T., Graeser, A.C., Canali, R., Boomgaarden, I., Doering, F., Wolfram, S., Egert, S., Mueller, M.J., Rimbach, G., 2009. Effect of quercetin on paraoxonase 2 levels in RAW264.7 macrophages and in human monocytes - Role of quercetin metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 4168–4177.

Bott, J.B., Cosquer, B., Héraud, C., Zerbinatti, C., Kelche, C., Cassel, J.C., Mathis, C., 2013. Reduced plasticity and mild cognitive impairment-like deficits after entorhinal lesions in hAPP/APOE4 mice. *Neurobiol. Aging* 34, 2683–2693.

Bour, A., Grootendorst, J., Vogel, E., Kelche, C., Dodart, J.C., Bales, K., Moreau, P.H., Sullivan, P.M., Mathis, C., 2008. Middle-aged human apoE4 targeted-replacement mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks. *Behav. Brain Res.* 193, 174–182.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.

Braquenier, J.-B., Quertemont, E., Tirelli, E., Plumier, J.-C., 2010. Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 234–9.

Braun, A.A., Amos-Kroohs, R.M., Gutierrez, A., Lundgren, K.H., Seroogy, K.B., Skelton, M.R., Vorhees, C. V., Williams, M.T., 2015. Dopamine depletion in either the dorsomedial or dorsolateral striatum impairs egocentric Cincinnati water maze performance while sparing allocentric Morris water maze learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 118, 55–63.

Brazhnik, E.S., Muller, R.U., Fox, S.E., 2003. Muscarinic Blockade Slows and Degrades the Location-Specific Firing of Hippocampal Pyramidal Cells. *J. Neurosci.* 23.

Brimijoin, S., Chen, V.P., Pang, Y.P., Geng, L., Gao, Y., 2016. Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis. *Chem. Biol. Interact.* 259, 271–275.

Brimijoin, S., Koenigsberger, C., 1999. Cholinesterases in neural development: new findings and toxicologic implications. *Environ. Health Perspect.* 59–64.

Brock, A., Brock, V., 1993. Factors Affecting Inter-individual Variation in Human Plasma Cholinesterase Activity : Body Weight , Height , Sex , Genetic Polymorphism and Age. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 99, 93–99.

Bronfman, F.C., Tesseur, I., Hofker, M.H., Havekens, L.M., Van Leuven, F., 2000. No evidence for cholinergic problems in apolipoprotein E knockout and apolipoprotein E4 transgenic mice. *Neuroscience* 97, 411–8.

Brothers, L., 1990. The social brain: a project for integrating primate behavior and neurophysiology in a new domain. *Concept Neurosci.* 1, 27–51.

Bunce, D., Anstey, K.J., Burns, R., Christensen, H., Easteal, S., 2011. Does possession of apolipoprotein E ε4 benefit cognitive function in healthy young adults? *Neuropsychologia* 49, 1693–1697.

Buratti, F.M., De Angelis, G., Ricceri, L., Venerosi, A., Calamandrei, G., Testai, E., 2011. Foetal and neonatal exposure to chlorpyrifos: Biochemical and metabolic alterations in the mouse liver at different developmental stages. *Toxicology* 280, 98–108.

Burger, H.G., Dudley, E.C., Robertson, D.M., Dennerstein, L., 2002. Hormonal changes in the menopause transition. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 257–75.

Byerly, M.S., Swanson, R.D., Wong, G.W., Blackshaw, S., Song, J., 2013. Stage-Specific Inhibition of TrkB Activity Leads to Long-Lasting and Sexually Dimorphic Effects on Body Weight and Hypothalamic Gene Expression. *PLoS One* 8, e80781.

Cardona, D., López-Granero, C., Cañadas, F., Llorens, J., Flores, P., Pancetti, F., Sánchez-Santeda, F., 2013. Dose-dependent regional brain acetylcholinesterase and acylpeptide hydrolase inhibition without cell death after chlorpyrifos administration. *J. Toxicol. Sci.* 38, 193–203.

Carr, R.L., Adams, A.L., Kepler, D.R., Ward, A.B., Ross, M.K., 2013. Induction of endocannabinoid levels in juvenile rat brain following developmental chlorpyrifos exposure. *Toxicol. Sci.* 135, 193–201.

Carr, R.L., Chambers, H.W., Guarisco, J.A., Richardson, J.R., Tang, J., Chambers, J.E., 2001. Effects of repeated oral postnatal exposure to chlorpyrifos on open-field behavior in juvenile rats. *Toxicol. Sci.* 59, 260–7.

Carr, R.L., Graves, C.A., Mangum, L.C., Nail, C.A., Ross, M.K., 2014. Low level chlorpyrifos exposure increases anandamide accumulation in juvenile rat brain in the absence of brain cholinesterase inhibition. *Neurotoxicology* 43, 82–89.

Casey, B.J., Glatt, C.E., Lee, F.S., 2015. Treating the Developing versus Developed Brain: Translating Preclinical Mouse and Human Studies. *Neuron* 86, 1358–68.

Casida, J.E., Nomura, D.K., Vose, S.C., Fujioka, K., 2008. Organophosphate-sensitive lipases modulate brain lysophospholipids, ether lipids and endocannabinoids. *Chem. Biol. Interact.* 175, 355–364.

Casida, J.E., Quistad, G.B., 2004. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 983–98.

Casida, J.E., Quistad, G.B., 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.* 43, 1–16.

Ccancapa, A., Masiá, A., Andreu, V., Picó, Y., 2016. Spatio-temporal patterns of pesticide residues in the Turia and Júcar Rivers (Spain). *Sci. Total Environ.* 540, 200–10.

Chahoud, I., Paumgarten, F.J.R., 2009. Influence of litter size on the postnatal growth of rat pups: is there a rationale for litter-size standardization in toxicity studies? *Environ. Res.* 109, 1021–1027.

Chakraborti, T.K., Farrar, J.D., Pope, C.N., 1993. Comparative neurochemical and neurobehavioral effects of repeated chlorpyrifos exposures in young and adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46, 219–224.

Chambers, H.W., 1992. Organophosphorus Compounds: An Overview, in: *Organophosphates Chemistry, Fate, and Effects*. pp. 3–17.

Chan, A., Shea, T.B., 2007. Effects of dietary supplementation with N-acetyl cysteine, acetyl-L-carnitine and S-adenosyl methionine on cognitive performance and aggression in normal mice and mice expressing human ApoE4. *Neuromolecular Med.* 9, 264–9.

Chanda, S.M., Mortensen, S.R., Moser, V.C., Padilla, S., 1997. Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an in vitro and in vivo comparison. *Fundam. Appl. Toxicol.* 38, 148–57.

Chanda, S.M., Pope, C.N., 1996. Neurochemical and neurobehavioral effects of repeated gestational exposure to chlorpyrifos in maternal and developing rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53, 771–776.

Chang, L., Douet, V., Bloss, C., Lee, K., Pritchett, A., Jernigan, T.L., Akshoomoff, N., Murray, S.S., Frazier, J., Kennedy, D.N., Amaral, D.G., Gruen, J., Kaufmann, W.E., Casey, B.J., Sowell, E., Ernst, T., S.C., Jernigan, T.L., McCabe, C., Chang, L., Akshoomoff, N., Newman, E., Dale, A.M., Ernst, T., Dale, A.M., Zijl, P. Van, Kuperman, J., Murray, S., Bloss, C., Appelbaum, M., Gamst, A., Thompson, W., Keating, B., Amaral, D., Kaufmann, W., Zijl, P. Van, Mostofsky, S., Casey, B.J., Ruberry, E.J., Powers, A., Rosen, B., Kenet, T., Frazier, J., Kennedy, D., Gruen, J., 2016. Gray matter maturation and cognition in children with different APOE ϵ genotypes. *Neurology* 87, 585–94.

Chapman, S., Sabo, T., Roses, A., Michaelson, D., 2000. Reversal of presynaptic deficits of apolipoprotein E-deficient mice in human apolipoprotein E transgenic mice. *Neuroscience* 97, 419–424.

Chen, W.Q., Zhang, Y.Z., Yuan, L., Li, Y.-F., Li, J., 2014. Neurobehavioral evaluation of adolescent male rats following repeated exposure to chlorpyrifos. *Neurosci. Lett.* 570, 76–80.

Cheng, X., Klaassen, C.D., 2012. Hormonal and chemical regulation of paraoxonases in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 342, 688–95.

Chiappa, S., Padilla, S., Koenigsberger, C., Moser, V., Brimijoin, S., 1995. Slow accumulation of acetylcholinesterase in rat brain during enzyme inhibition by repeated dosing with chlorpyrifos. *Biochem. Pharmacol.* 49, 955–963.

Chiapella, G., Flores-Martín, J., Ridano, M.E., Reyna, L., Magnarelli de Potas, G., Panzetta-Dutari, G.M., Genti-Raimondi, S., 2013. The organophosphate chlorpyrifos disturbs redox balance and triggers antioxidant defense mechanisms in JEG-3 cells. *Placenta* 34, 792–798.

Choleris, E., Thomas, A.W., Kavaliers, M., Prato, F.S., 2001. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 235–60.

Clapcote, S.J., Lipina, T. V., Millar, J.K., Mackie, S., Christie, S., Ogawa, F., Lerch, J.P., Trimble, K., Uchiyama, M., Sakuraba, Y., Kaneda, H., Shiroishi, T., Houslay, M.D., Henkelman, R.M., Sled, J.G., Gondo, Y., Porteous, D.J., Roder, J.C., 2007. Behavioral Phenotypes of DiscI Missense Mutations in Mice. *Neuron* 54, 387–402.

Cochran, R.C., 2002. Appraisal of Risks from Nonoccupational Exposure to Chlorpyrifos. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 121, 105–121.

Cohen, R.M., Podruchny, T.A., Bokde, A.L.W., Carson, R.E., Herscovitch, P., Kiesewetter, D.O., Eckelman, W.C., Sunderland, T., 2003. Higher in vivo muscarinic-2 receptor distribution volumes in aging subjects with an apolipoprotein E-4 allele. *Synapse* 49, 150–156.

Cole, T.B., Jampsa, R.L., Walter, B.J., Arndt, T.L., Richter, R.J., Shih, D.M., Tward, A., Lusia, A.J., Jack, R.M., Costa, L.G., Furlong, C.E., 2003. Expression of human paraoxonase (PON1) during development. *Pharmacogenetics* 13, 357–64.

Cole, T.B., Li, W.F., Co, A.L., Hay, A.M., MacDonald, J.W., Bammler, T.K., Farin, F.M., Costa, L.G., Furlong, C.E., 2014. Repeated Gestational Exposure of Mice to Chlorpyrifos Oxon Is Associated with Paraoxonase I (PON1) Modulated Effects in Maternal and Fetal Tissues. *Toxicol. Sci.* 141, 409–422.

Colton, C.A., Brown, C.M., Vitek, M.P., 2005. Sex steroids, APOE genotype and the innate immune system. *Neurobiol. Aging* 26, 363–72.

Cometa, M.F., Buratti, F.M., Fortuna, S., Lorenzini, P., Volpe, M.T., Parisi, L., Testai, E., Meneguz, A., 2007. Cholinesterase inhibition and alterations of hepatic metabolism by oral acute and repeated chlorpyrifos administration to mice. *Toxicology* 234, 90–102.

Corbo, R.M., Scacchi, R., 1999. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a “thrifty” allele? *Ann. Hum. Genet.* 63, 301–310.

Corder, E.H., Ghebremedhin, E., Taylor, M.G., Thal, D.R., Ohm, T.G., Braak, H., 2004. The biphasic relationship between regional brain senile plaque and neurofibrillary tangle distributions: modification by age, sex, and APOE polymorphism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 24–8.

Corey-Bloom, J., Tiraboschi, P., Hansen, L.A., Alford, M., Schoos, B., Sabbagh, M.N., Masliah, E., Thal, L.J., 2000. E4 allele dosage does not predict cholinergic activity or synapse loss in Alzheimer’s disease. *Neurology* 54, 403–6.

Costa, L.G., 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin. Chim. Acta* 366, 1–13.

Costa, L.G., McDonald, B.E., Murphy, S.D., Omenn, G.S., Richter, R.J., Motulsky, A.G., Furlong, C.E., 1990. Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 103, 66–76.

Costa, L.G., Vitalone, A., Cole, T.B., Furlong, C.E., 2005. Modulation of paraoxonase (PON1) activity 69, 541–550.

Craig, D., Hart, D.J., McCool, K., McIlroy, S.P., Passmore, A.P., 2004. Apolipoprotein E e4 allele influences aggressive behaviour in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 1327–1330.

Crawley, J.N., 2004. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 10, 248–258.

Crumpton, T.L., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2000. Is oxidative stress involved in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos? *Dev. Brain Res.* 121, 189–195.

Dam, K., Garcia, S.J., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 1999. Neonatal chlorpyrifos exposure alters synaptic development and neuronal activity in cholinergic and catecholaminergic pathways. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 116, 9–20.

Dam, K., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2000. Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 121, 179–87.

Darbre, P.D., 2017. Endocrine Disruptors and Obesity. *Curr. Obes. Rep.* 6, 18–27.

Darreh-Shori, T., Brimijoin, S., Kadir, A., Almkvist, O., Nordberg, A., 2006. Differential CSF butyrylcholinesterase levels in Alzheimer's disease patients with the ApoE epsilon4 allele, in relation to cognitive function and cerebral glucose metabolism. *Neurobiol. Dis.* 24, 326–333.

Darreh-Shori, T., Modiri, N., Blennow, K., Baza, S., Kamil, C., Ahmed, H., Andreasen, N., Nordberg, A., 2011. The apolipoprotein E4 allele plays pathological roles in AD through high protein expression and interaction with butyrylcholinesterase. *Neurobiol. Aging* 32, 1236–1248.

Das, A., Dikshit, M., Nath, C., 2005. Role of molecular isoforms of acetylcholinesterase in learning and memory functions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 89–99.

De Angelis, S., Tassinari, R., Maranghi, F., Eusepi, A., Di Virgilio, A., Chiarotti, F., Ricceri, L., Pesciolini, A. V., Gilardi, E., Moracci, G., Calamandrei, G., Olivieri, A., Mantovani, A., 2009. Developmental Exposure to Chlorpyrifos Induces Alterations in Thyroid and Thyroid Hormone Levels Without Other Toxicity Signs in CdI Mice. *Toxicol. Sci.* 108, 311–319.

De Assis, S.M.A., Seguro, A.C., Helou, C.M.B., S.M.A., de A., A.C., S., C.M.B., H., 2003. Effects of maternal hypercholesterolemia on pregnancy and development of offspring. *Pediatr. Nephrol.* 18, 328–334.

De Blasi, S., Montesanto, A., Martino, C., Dato, S., De Rango, F., Bruni, A.C., Mari, V., Feraco, E., Passarino, G., 2009. APOE polymorphism affects episodic memory among non demented elderly subjects. *Exp. Gerontol.* 44, 224–7.

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. *Neurotoxicol. Teratol.* 46, 32–9.

de Gavelle, E., de Lauzon-Guillain, B., Charles, M.-A., Chevrier, C., Hulin, M., Sirot, V., Merlo, M., Nougadère, A., 2016. Chronic dietary exposure to pesticide residues and associated risk in the French ELFE cohort of pregnant women. *Environ. Int.* 92–93, 533–542.

De Vriese, C., Gregoire, F., Lema-Kisoka, R., Waelbroeck, M., Robberecht, P., Delporte, C., 2004. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: Identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 145, 4997–5005.

Deiana, S., Platt, B., Riedel, G., 2011. The cholinergic system and spatial learning. *Behav. Brain Res.* 221, 389–411.

del Campo, N., Chamberlain, S.R., Sahakian, B.J., Robbins, T.W., Tauscher, J., Halldin, C., al., et, 2011. The Roles of Dopamine and Noradrenaline in the Pathophysiology and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol. Psychiatry* 69, e145–e157.

Dennis, N.A., Browndyke, J.N., Stokes, J., Need, A., Burke, J.R., Welsh-Bohmer, K.A., Cabeza, R., 2010. Temporal lobe functional activity and connectivity in young adult APOE varepsilon4 carriers. *Alzheimers. Dement.* 6, 303–11.

Descarries, L., Aznavour, N., Hamel, E., 2005. The acetylcholine innervation of cerebral cortex: new data on its normal development and its fate in the hAPP_{SW,IND} mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 112, 149–162.

Deter, J., Cosson, J.-F., Chaval, Y., Charbonnel, N., Morand, S., 2007. The intestinal nematode *Trichuris arvicolae* affects the fecundity of its host, the common vole *Microtus arvalis*. *Parasitol. Res.* 101, 1161–1164.

Dobbing, J., Sands, J., 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* 3, 79–83.

Dolejší, E., Liraz, O., Rudajev, V., Zimčík, P., Doležal, V., Michaelson, D.M., 2016. Apolipoprotein E4 reduces evoked hippocampal acetylcholine release in adult mice. *J. Neurochem.* 136, 503–9.

Dong, L.M., Weisgraber, K.H., 1996. Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 271, 19053–7.

Dong, L.M., Wilson, C., Wardell, M.R., Simmons, T., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Agard, D.A., 1994. Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. *J. Biol. Chem.* 269, 22358–65.

Dori, A., Oriel, S., Livneh, U., Duek, O., Lin, T., Kofman, O., 2011. Acetylcholinesterase inhibitor pretreatment alters stress-induced expression of acetylcholinesterase transcripts in the mouse brain. *Neuroscience* 183, 90–98.

Doura, M.B., Gold, A.B., Keller, A.B., Perry, D.C., 2008. Adult and periadolescent rats differ in expression of nicotinic cholinergic receptor subtypes and in the response of these subtypes to chronic nicotine exposure. *Brain Res.* 1215, 40–52.

Duysen, E.G., Lockridge, O., 2011. Induction of plasma acetylcholinesterase activity in mice challenged with organophosphorus poisons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 255, 214–220.

Eaton, D.L., Daroff, R.B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L.G., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W.C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R., Spencer, P.S., 2008. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Crit. Rev. Toxicol.* 38 Suppl 2, 1–125.

European Chemicals Agency - ECHA, 2008. Chlorpyrifos [WWW Document]. *Saf. Hazards*. URL <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/68566> (accessed 2.2.17).

Ecobichon, D.J., Stephens, D.S., 1973. Perinatal development of human blood esterases. *Clin. Pharmacol. Ther.* 14, 41–47.

Eells, J.B., Brown, T., 2009. Repeated developmental exposure to chlorpyrifos and methyl parathion causes persistent alterations in nicotinic acetylcholine subunit mRNA expression with chlorpyrifos altering dopamine metabolite levels. *Neurotoxicol. Teratol.* 31, 98–103.

Egert, S., Rimbach, G., Huebbe, P., 2012. ApoE genotype: from geographic distribution to function and responsiveness to dietary factors. *Proc. Nutr. Soc.* 71, 410–424.

Eggers, C., Herholz, K., Kalbe, E., Heiss, W.-D., 2006. Cortical acetylcholine esterase activity and ApoE4-genotype in Alzheimer disease. *Neurosci. Lett.* 408, 46–50.

Ehrich, M., 1998. Organophosphates, in: Wexler, P. (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology*. San Diego, CA: Academic Press., pp. 467–471.

Ehrich, M., Hancock, S., Ward, D., Holladay, S., Pung, T., Flory, L., Hinckley, J., Jortner, B.S., 2004. Neurologic and immunologic effects of exposure to corticosterone, chlorpyrifos, and multiple doses of tri-ortho-tolyl phosphate over a 28-day period in rats. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 67, 431–57.

Eisenberg, D.T.A., Kuzawa, C.W., Hayes, M.G., 2010. Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: Climate, local adaptations, and evolutionary history. *Am. J. Phys. Anthropol.* 143, 100–111.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.

Elosua, R., Demissie, S., Cupples, L.A., Meigs, J.B., Wilson, P.W.F., Schaefer, E.J., Corella, D., Ordovas, J.M., 2003. Obesity Modulates the Association among APOE Genotype, Insulin, and Glucose in Men. *Obes. Res.* 11, 1502–1508.

Elsharkawy, E., Yahia, D., El-Nisr, N., 2014. Chlorpyrifos Induced Testicular Damage in Rats: Ameliorative Effect of Glutathione Antioxidant. *Environ. Toxicol.* 29, 1011–9.

Elshourbagy, N., Liao, W., Mahley, R., Taylor, J., 1985. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 203–7.

Epstein, H.T., 1978. The effect of litter size on weight gain in mice. *J. Nutr.* 108, 120–3.

European Food Safety Authority - EFSA, 2015. Refined risk assessment regarding certain maximum residue levels (MRLs) of concern for the active substance chlorpyrifos. *EFSA J.* 13, 4142.

Evans, S., Dowell, N.G., Tabet, N., Tofts, P.S., King, S.L., Gray, M., Rusted, J.M., 2013. Nicotine effects on attentional reorienting in mid-age adults, and interactions with apolipoprotein E status. *J. Psychopharmacol.* 27, 1007–1014.

Fang, L., Zhang, S., Chen, Z., Du, H., Zhu, Q., Dong, Z., Li, H., 2015. Risk assessment of pesticide residues in dietary intake of celery in China. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 73, 578–86.

Feng, F., Lu, S.-S., Hu, C.-Y., Gong, F.-F., Qian, Z.-Z., Yang, H.-Y., Wu, Y.-L., Zhao, Y.-Y., Bi, P., Sun, Y.-H., 2015. Association between apolipoprotein E gene polymorphism and depression. *J. Clin. Neurosci.* 22, 1232–1238.

Fiedler, N., Rohitrattana, J., Siri Wong, W., Suttiwan, P., Ohman Strickland, P., Ryan, P.B., Rohlman, D.S., Panuwet, P., Barr, D.B., Robson, M.G., 2015. Neurobehavioral effects of exposure to organophosphates and pyrethroid pesticides among Thai children. *Neurotoxicology* 48, 90–9.

Forero, D.A., López-León, S., González-Giraldo, Y., Dries, D.R., Pereira-Morales, A.J., Jiménez, K.M., Franco-Restrepo, J.E., 2016. APOE gene and neuropsychiatric disorders and endophenotypes: A comprehensive review. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 9999:1–17

Fortenberry, G.Z., Meeker, J.D., Sánchez, B.N., Barr, D.B., Panuwet, P., Bellinger, D., Schnaas, L., Solano-González, M., Ettinger, A.S., Hernandez-Avila, M., Hu, H., Tellez-Rojo, M.M., 2014. Urinary 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPY) in pregnant women from Mexico City: Distribution, temporal variability, and relationship with child attention and hyperactivity. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217, 405–412.

Foster, D.J., Knierim, J.J., 2012. Sequence learning and the role of the hippocampus in rodent navigation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 294–300.

Fuentes, S., Colomina, M.T., Vicens, P., Franco-Pons, N., Domingo, J.L., 2007. Concurrent Exposure to Perfluorooctane Sulfonate and Restraint Stress during Pregnancy in Mice: Effects on Postnatal Development and Behavior of the Offspring. *Toxicol. Sci.* 98, 589–598.

Gao, J., Katagiri, H., Ishigaki, Y., Yamada, T., Ogihara, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Kanzaki, M., Yamamoto, T.T., Ishibashi, S., Oka, Y., 2007. Involvement of Apolipoprotein E in Excess Fat Accumulation and Insulin Resistance. *Diabetes* 56, 24–33.

Fu, P., Sun, W., Zhang, Z., 2016. Molecular cloning, expression and characterization of acylpeptide hydrolase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene* 580, 8–16.

Furlong, C.E., Cole, T.B., Jarvik, G.P., Pettan-Brewer, C., Geiss, G.K., Richter, R.J., Shih, D.M., Tward, A.D., Lusic, A.J., Costa, L.G., 2005. Role of paraoxonase (PON1) status in pesticide sensitivity: genetic and temporal determinants. *Neurotoxicology* 26, 651–9.

Furlong, C.E., Marsillach, J., Jarvik, G.P., Costa, L.G., 2016. Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? *Chem. Biol. Interact.* 259, 51–62.

Galler, J.R., Turkewitz, G., 1975. Variability of the effects of rearing in a large litter on the development of the rat. *Dev. Psychobiol.* 8, 325–331.

Garcia, S.J., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2005. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: Targeting glial cells, in: *Environmental Toxicology and Pharmacology*. pp. 455–461.

García-Ayllón, M.S., Seguí, D., Perales, M., López-Hurtado, E., Prieto, J.J., Sáez-Valero, J., 2003. Acetylcholinesterase level and molecular isoforms are altered in brain of Reelin Orleans mutant mice. *J. Neurochem.* 87, 773–9.

García-Gómez, B.E., Fernández-Gómez, F.J., Muñoz-Delgado, E., Buée, L., Blum, D., Vidal, C.J., 2015. mRNA Levels of ACh-Related Enzymes in the Hippocampus of THY-Tau22 Mouse: A Model of Human Tauopathy with No Signs of Motor Disturbance. *J. Mol. Neurosci.* 1–5.

Garrick, J.M., Dao, K., de Laat, R., Elsworth, J., Cole, T.B., Marsillach, J., Furlong, C.E., Costa, L.G., 2016. Developmental expression of paraoxonase 2. *Chem. Biol. Interact.* 259, 168–174.

Geer, L., Cardello, N., Dellarco, M., Leighton, T., Zenzian, R., Roberts, J., Buckley, T., 2004. Comparative Analysis of Passive Dosimetry and Biomonitoring for Assessing Chlorpyrifos Exposure in Pesticide Workers. *Ann. Occup. Hyg.* 48, 683–695.

Giau, V. Van, Bagyinszky, E., An, S.S.A., Kim, S.Y., 2015. Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 11, 1723–37.

Giménez, O., Caixàs, A., 2004. Ghrelin: From Growth Hormone Secretion To Energy Balance Regulation. *Endocrinol. y Nutr.* 51, 464–472.

Giordano, G., Tait, L., Furlong, C., Cole, T., Kavanagh, T., Costa, L., 2013. Gender differences in brain susceptibility to Oxidative stress are mediated by levels of paraoxonase-2 (PON2) expression. *Free Radic Biol Med* 58, 98–108.

Godfrey, M.E., Wojcik, D.P., Krone, C.A., 2003. Apolipoprotein E genotyping as a potential biomarker for mercury neurotoxicity. *J. Alzheimers. Dis.* 5, 189–95.

Gómez-Giménez, B., Llansola, M., Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Malaguarnera, M., Agusti, A., Felipo, V., 2017. Sex-dependent effects of developmental exposure to different pesticides on spatial learning. The role of induced neuroinflammation in the hippocampus. *Food Chem. Toxicol.* 99, 135–148.

Gonzalez-Alzaga, B., Hernandez, A.F., Rodriguez-Barranco, M., Gomez, I., Aguilar-Garduño, C., Lopez-Flores, I., Parron, T., Lacasaña, M., 2015. Pre- and postnatal exposures to pesticides and neurodevelopmental effects in children living in agricultural communities from South-Eastern Spain. *Environ. Int.* 85, 229–237.

González-Castro, T.B., Tovilla-Zárate, C.A., Hernández-Díaz, Y., Fresán, A., Juárez-Rojop, I.E., Ble-Castillo, J.L., López-Narváez, L., Genis, A., Hernández-Alvarado, M.M., 2015. No association between ApoE and schizophrenia: Evidence of systematic review and updated meta-analysis. *Schizophr. Res.* 169, 355–68.

Gonzalez, V., Huen, K., Venkat, S., Pratt, K., Xiang, P., Harley, K.G., Kogut, K., Trujillo, C.M., Bradman, A., Eskenazi, B., Holland, N.T., 2012. Cholinesterase and paraoxonase (PON1) enzyme activities in Mexican-American mothers and children from an agricultural community. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 22, 641–8.

Gordon, I., Grauer, E., Genis, I., Sehayek, E., Michaelson, D.M., 1995. Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 199, 1–4.

Gould, E., Woolf, N.J., Butcher, L.L., 1991. Postnatal development of cholinergic neurons in the rat: I. Forebrain. *Brain Res. Bull.* 27, 767–89.

Grandjean, P., Landrigan, P.J., 2014. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol.* 13, 330–338.

Granon, S., Faure, P., Changeux, J.-P., 2003. Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9596–601.

Grassi, J., Vigny, M., Massoulié, J., 1982. Molecular forms of acetylcholinesterase in bovine caudate nucleus and superior cervical ganglion: solubility properties and hydrophobic character. *J. Neurochem.* 38, 457–69.

Greenwood, P.M., Lambert, C., Sunderland, T., Parasuraman, R., 2005. Effects of Apolipoprotein E Genotype on Spatial Attention, Working Memory, and Their Interaction in Healthy, Middle-Aged Adults: Results From the National Institute of Mental Health's BIOCARD Study. *Neuropsychology* 19, 199–211.

Gregg, R.E., Zech, L.A., Schaefer, E.J., Stark, D., Wilson, D., Brewer, H.B., 1986. Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans. *J. Clin. Invest.* 78, 815–821.

Griffin, P., Mason, H., Heywood, K., Cocker, J., 1999. Oral and dermal absorption of chlorpyrifos: a human volunteer study. *Occup. Environ. Med.* 56, 10–3.

Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., Soreq, H., 1999. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.* 264, 672–86.

Grootendorst, J., Bour, A., Vogel, E., Kelche, C., Sullivan, P.M., Dodart, J.-C., Bales, K., Mathis, C., 2005. Human apoE targeted replacement mouse lines: h-apoE4 and h-apoE3 mice differ on spatial memory performance and avoidance behavior. *Behav. Brain Res.* 159, 1–14.

Guardino, X., Obiols, J., Rosell, M.G., Farran, A., Serra, C., 1998. Determination of chlorpyrifos in air, leaves and soil from a greenhouse by gas-chromatography with nitrogen-phosphorus detection, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 823, 91–6.

Guo-Ross, S.X., Chambers, J.E., Meek, E.C., Carr, R.L., 2007. Altered Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtype Binding in Neonatal Rat Brain following Exposure to Chlorpyrifos or Methyl Parathion. *Toxicol. Sci.* 100, 118–127.

Gupta, P.K., 1974. Malathion induced biochemical changes in rat. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)*. 35, 191–4.

Guzmán, Y.F., Tronson, N.C., Jovasevic, V., Sato, K., Guedea, A.L., Mizukami, H., Nishimori, K., Radulovic, J., 2013. Fear-enhancing effects of septal oxytocin receptors. *Nat. Neurosci.* 16, 1185–7.

Hager, R., Cheverud, J.M., Wolf, J.B., 2012. Genotype-dependent responses to levels of sibling competition over maternal resources in mice. *Heredity (Edinb)*. 108, 515–520.

Hall, G.P., Redgrave, T.G., Yeoh, G.C.T., 1995. The ontogeny of apolipoprotein expression in rat liver mRNA levels in developing liver and cultured fetal rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 228, 332–336.

Harris, R.B., 1990. Role of set-point theory in regulation of body weight. *FASEB J.* 4, 3310–8.

Harrison, F.E., Reiserer, R.S., Tomarken, A.J., McDonald, M.P., 2006. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learn. Mem.* 13, 809–19.

Harrison, F.E., Hosseini, A.H., McDonald, M.P., 2009. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav. Brain Res.* 198, 247–251.

Härtl, R., Gleinich, A., Zimmermann, M., 2011. Dramatic increase in readthrough acetylcholinesterase in a cellular model of oxidative stress. *J. Neurochem.* 116, 1088–1096.

Hartman, R.E., Wozniak, D.F., Nardi, A., Olney, J.W., Sartorius, L., Holtzman, D.M., 2001. Behavioral phenotyping of GFAP-*apoE3* and -*apoE4* transgenic mice: *apoE4* mice show profound working memory impairments in the absence of Alzheimer's-like neuropathology. *Exp. Neurol.* 170, 326–44.

Hatters, D.M., Peters-Libeu, C.A., Weisgraber, K.H., 2006. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem. Sci.* 31, 445–54.

Hauser, P.S., Narayanaswami, V., Ryan, R.O., 2011. Apolipoprotein E: From lipid transport to neurobiology. *Prog. Lipid Res.* 50, 62–74.

Haywood, W.M., Mukaetova-Ladinska, E.B., 2006. Sex influences on cholinesterase inhibitor treatment in elderly individuals with Alzheimer's disease. *Am. J. Geriatr. Pharmacother.* 4, 273–86.

Heiderstadt, K.M., Vandenbergh, D.J., Gyekis, J.P., Blizard, D.A., 2014. Communal nesting increases pup growth but has limited effects on adult behavior and neurophysiology in inbred mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 53, 152–60.

Hellström-Lindahl, E., Gorbounova, O., Seiger, A., Mousavi, M., Nordberg, A., 1998. Regional distribution of nicotinic receptors during prenatal development of human brain and spinal cord. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 108, 147–60.

Herrera, E., 2002. Lipid Metabolism in Pregnancy and its Consequences in the Fetus and Newborn. *Endocrine* 19, 43–56.

Holler, T., Berse, B., Cermak, J.M., Diebler, M.F., Blusztajn, J.K., 1996. Differences in the developmental expression of the vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 212, 107–10.

Holmes, A., Wrenn, C.C., Harris, A.P., Thayer, K.E., Crawley, J.N., 2002. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes, Brain Behav.* 1, 55–69.

Hörtnagl, H., Hansen, L., Kindel, G., Schneider, B., el Tamer, A., Hanin, I., 1993. Sex differences and estrous cycle-variations in the AF64A-induced cholinergic deficit in the rat hippocampus. *Brain Res. Bull.* 31, 129–34.

Horton, M.K., Kahn, L.G., Perera, F., Barr, D.B., 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.* 34, 534–541.

Hou, X., Adeosun, S.O., Zhang, Q., Barlow, B., Brents, M., Zheng, B., Wang, J., 2015. Differential contributions of ApoE4 and female sex to BACE1 activity and expression mediate A β deposition and learning and memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 7, 207.

- Huang, Y., 2006. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Neurology* 66, S79–S85.
- Huang, Y., Mahley, R., 2014. Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer's Diseases. *Neurobiol. Dis.* 72, 3–12.
- Huang, Y., Weisgraber, K.H., Mucke, L., Mahley, R.W., 2004. Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* 23, 189–204.
- Huebbe, P., Dose, J., Schloesser, A., Campbell, G., Glüer, C.C., Gupta, Y., Ibrahim, S., Minihane, A.M., Baines, J.F., Nebel, A., Rimbach, G., 2015. Apolipoprotein E (APOE) genotype regulates body weight and fatty acid utilization-Studies in gene-targeted replacement mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 334–343.
- Huff, R.A., Corcoran, J.J., Anderson, J.K., Abou-Donia, M.B., 1994. Chlorpyrifos oxon binds directly to muscarinic receptors and inhibits cAMP accumulation in rat striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269, 329–35.
- Hughes, A.J., Daniel, S.E., Kilford, L., Lees, A.J., 1992. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55, 181–4.
- Icenogle, L., Christopher, N.C., Blackwelder, W.P., Caldwell, D.P., Qiao, D., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., Levin, E.D., 2004. Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 95–101.
- Jameson, R., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2006. Nonenzymatic Functions of Acetylcholinesterase Splice Variants in the Developmental Neurotoxicity of Organophosphates: Chlorpyrifos, Chlorpyrifos Oxon, and Diazinon. *Environ. Health Perspect.* 115, 65–70.
- Jasna, J.M., Anandbabu, K., Bharathi, S.R., Angayarkanni, N., 2014. Paraoxonase enzyme protects retinal pigment epithelium from chlorpyrifos insult. *PLoS One* 9, 1–10.
- Jett, D.A., Navoa, R. V., Beckles, R.A., McLemore, G.L., 2001. Cognitive Function and Cholinergic Neurochemistry in Weanling Rats Exposed to Chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 174, 89–98.
- Jett, D.A., Richardson, J.R., 2009. Neurotoxic Pesticides, in: *Clinical Neurotoxicology: Syndromes, Substances, Environments*. Elsevier Inc., pp. 491–499.
- Jett, J.D., Bulin, S.E., Hatherall, L.C., McCartney, C.M., Morilak, D.A., 2017. Deficits in cognitive flexibility induced by chronic unpredictable stress are associated with impaired glutamate neurotransmission in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 346, 284–297.
- Johnson, F.O., Chambers, J.E., Nail, C.A., Givaruangawat, S., Carr, R.L., 2009. Developmental chlorpyrifos and methyl parathion exposure alters radial-arm maze performance in juvenile and adult rats. *Toxicol. Sci.* 109, 132–42.

- Johnson, G., Moore, S.W., 2012. Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. *Neurochem. Int.* 61, 783–797.
- Jurewicz, J., Polańska, K., Hanke, W., 2013. Chemical exposure early in life and the neurodevelopment of children – an overview of current epidemiological evidence 20, 465–486.
- Kaidanovich-Beilin, O., Lipina, T., Vukobradovic, I., Roder, J., Woodgett, J.R., 2011. Assessment of social interaction behaviors. *J. Vis. Exp.* 0, 6–10.
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessel, T., Siegelbaum, S., Hudspeth, A., 2013. Principles of neural science, Fifth. ed. Mc Graw Hill, New York.
- Kaplan, J.G., Kessler, J., Rosenberg, N., Pack, D., Schaumburg, H.H., 1994. Sensory neuropathy associated with Dursban (chlorpyrifos) exposure. *Neurology* 44, 367.
- Karagiannides, I., Abdou, R., Tzortzopoulou, A., Voshol, P.J., Kypreos, K.E., 2008. Apolipoprotein E predisposes to obesity and related metabolic dysfunctions in mice. *FEBS J.* 275, 4796–4809.
- Karen, D.J., Li, W., Harp, P.R., Gillette, J.S., Bloomquist, J.R., 2001. Striatal dopaminergic pathways as a target for the insecticides permethrin and chlorpyrifos. *Neurotoxicology* 22, 811–7.
- Karvat, G., Kimchi, T., 2014. Acetylcholine Elevation Relieves Cognitive Rigidity and Social Deficiency in a Mouse Model of Autism. *Neuropsychopharmacology* 39, 831–840.
- Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S., Soreq, H., 1998. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature* 393, 373–377.
- Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S., Soreq, H., 1999. Anticholinesterases induce multigenic transcriptional feedback response suppressing cholinergic neurotransmission. *Chem. Biol. Interact.* 119–120, 349–360.
- Kelley, C., 1999. Cadmium therapeutic agents. *Curr. Pharm. Des.* 5, 229–40.
- Kimbrel, N.A., Hauser, M.A., Garrett, M., Ashley-Koch, A., Liu, Y., Dennis, M.F., Klein, R.C., Beckham, J.C., Beckham, J.C., 2015. Effect Of The Apoe ε4 Allele And Combat Exposure On Ptsd Among Iraq/Afghanistan-Era Veterans. *Depress. Anxiety* 32, 307–315.
- Kleinfeld, O., Diebler, M.F., Chapman, S., Oron, L., Michaelson, D.M., 1998. The effects of apolipoprotein E deficiency on brain cholinergic neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 755–62.
- Kohls, G., Chevallier, C., Troiani, V., Schultz, R.T., 2012. Social “wanting” dysfunction in autism: neurobiological underpinnings and treatment implications. *J. Neurodev. Disord.* 4, 10.

Kolb, B., Cioe, J., 1996. Sex-related differences in cortical function after medial frontal lesions in rats. *Behav. Neurosci.* 110, 1271–81.

Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289–91.

Koskela, E., 1998. Offspring growth, survival and reproductive success in the bank vole: a litter size manipulation experiment. *Oecologia* 115, 379–384.

Kukolja, J., Thiel, C.M., Eggermann, T., Zerres, K., Fink, G.R., 2010. Medial temporal lobe dysfunction during encoding and retrieval of episodic memory in non-demented APOE epsilon4 carriers. *Neuroscience* 168, 487–97.

Kypreos, K.E., Karagiannides, I., Fotiadou, E.H., Karavia, E.A., Brinkmeier, M.S., Giakoumi, S.M., Tsompanidi, E.M., 2009. Mechanisms of obesity and related pathologies: Role of apolipoprotein E in the development of obesity. *FEBS J.* 276, 5720–5728.

Laclaustra, M., Corella, D., Ordovas, J.M., 2007. Metabolic syndrome pathophysiology: The role of adipose tissue. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 17, 125–139.

Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Walczak, R., Pei, L., Wilpitz, D.C., Collins, J.O.N.L., Tontonoz, P., 2001. Autoregulation of the Human Liver X Receptor alpha Promoter. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7558–7568.

Laspas, P., Sniatecki, J.J., Brochhausen, C., Steege, A., Goloborodko, E., Kordasz, M.L., Grus, F.H., Pfeiffer, N., Gericke, A., 2015. Effect of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor on Retinal Neuron Number Studied with Gene-Targeted Mice. *J. Mol. Neurosci.* 56, 472–479.

Lasrich, D., Bartelt, A., Grewal, T., Heeren, J., 2015. Apolipoprotein E promotes lipid accumulation and differentiation in human adipocytes. *Exp. Cell Res.* 337, 94–102.

Lassiter, T.L., Barone, S., Padilla, S., 1998. Ontogenetic differences in the regional and cellular acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in the rat brain. *Dev. Brain Res.* 105, 109–123.

Lassiter, T.L., Brimijoin, S., 2008. Rats gain excess weight after developmental exposure to the organophosphorothionate pesticide, chlorpyrifos. *Neurotoxicol. Teratol.* 30, 125–130.

Latuszyńska, J., Luty, S., Raszewski, G., Tokarska-Rodak, M., Przebirowska, D., E, P.H.-M., 2001. Neurotoxic effect of dermally-applied chlorpyrifos and cypermethrin in wistar rats. *Ann. Agric. Environ. Med.* 8, 163–170.

Lauder, J.M., Schambra, U.B., 1999. Morphogenetic roles of acetylcholine. *Environ. Health Perspect.* 65–9.

Lee, D.H., Jung, K.Y., Choi, Y.H., Cheon, Y.J., 2014. Body mass index as a prognostic factor in organophosphate-poisoned patients. *Am. J. Emerg. Med.* 32, 693–6.

Lee, I., Eriksson, P., Fredriksson, A., Buratovic, S., Viberg, H., 2015. Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and biomolecular studies on chlorpyrifos and carbaryl. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 288, 429–438.

Lee, J.E., Park, J.H., Shin, I.C., Koh, H.C., 2012. Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 263, 148–162.

Lee, P.A., Guo, S.S., Kulin, H.E., 2001. Age of puberty: data from the United States of America. *APMIS* 109, 81–8.

Lee, S., Poet, T.S., Smith, J.N., Busby-Hjerpe, A.L., Timchalk, C., 2010. Effect of in vivo nicotine exposure on chlorpyrifos pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats. *Chem. Biol. Interact.* 184, 449–457.

Lee, S., Poet, T.S., Smith, J.N., Hjerpe, L., Gunawan, R., Timchalk, C., 2011. Impact of repeated nicotine and alcohol coexposure on in vitro and in vivo chlorpyrifos dosimetry and cholinesterase inhibition. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 74, 1334–50.

Lepage, L., Schiele, F., Gueguen, R., Siest, G., 1985. Total cholinesterase in plasma: biological variations and reference limits. *Clin. Chem.* 31, 546-550.

Leung, L., Andrews-Zwilling, Y., Yoon, S.Y., Jain, S., Ring, K., Dai, J., Wang, M.M., Tong, L., Walker, D., Huang, Y., 2012. Apolipoprotein E4 Causes Age- and Sex-Dependent Impairments of Hilar GABAergic Interneurons and Learning and Memory Deficits in Mice. *PLoS One* 7, e53569.

Levey, A.I., Kitt, C.A., Simonds, W.F., Price, D.L., Brann, M.R., 1991. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* 11, 3218–26.

Levi, O., Jongen-Relo, A.L., Feldon, J., Roses, A.D., Michaelson, D.M., 2003. ApoE4 impairs hippocampal plasticity isoform-specifically and blocks the environmental stimulation of synaptogenesis and memory. *Neurobiol. Dis.* 13, 273–282.

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. *Neurotoxicol. Teratol.* 24, 733–741.

Levin, E.D., Addy, N., Nakajima, A., Christopher, N.C., Seidler, F.J., Slotkin, T. A., 2001. Persistent behavioral consequences of neonatal chlorpyrifos exposure in rats. *Dev. Brain Res.* 130, 83–89.

Li, A., Lowe, K., McIntosh, L.J., Mink, P.J., 2012. Evaluation of epidemiology and animal data for risk assessment: chlorpyrifos developmental neurobehavioral outcomes. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 15, 109–84.

Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E.G., Masson, P., Lockridge, O., 2005. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem. Pharmacol.* 70, 1673–1684.

Li, G., Bien-Ly, N., Andrews-Zwilling, Y., Xu, Q., Bernardo, A., Ring, K., Halabisky, B., Deng, C., Mahley, R.W., Huang, Y., 2009. GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice. *Cell Stem Cell* 5, 634–45.

Li, W., Matthews, C., Distech, C., Costa, L., Furlong, C., 1997. Paraoxonase (PON1) gene in mice: sequencing, chromosomal localization and developmental expression. *Pharmacogenetics* 7, 137–44.

Li, W.F., Costa, L.G., Richter, R.J., Hagen, T., Shih, D.M., Tward, A., Lulis, A.J., Furlong, C.E., 2000. Catalytic efficiency determines the in-vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. *Pharmacogenetics* 10, 767–79.

Linardaki, Z.I., Orkoulas, M.G., Kokkosis, A.G., Lamari, F.N., Margarity, M., 2013. Investigation of the neuroprotective action of saffron (*Crocus sativus* L.) in aluminum-exposed adult mice through behavioral and neurobiochemical assessment. *Food Chem. Toxicol.* 52, 163–70.

Lipton, P.A., Eichenbaum, H., 2008. Complementary roles of hippocampus and medial entorhinal cortex in episodic memory. *Neural Plast.* 2008, 258467.

Liu, J., Olivier, K., Pope, C.N., 1999. Comparative neurochemical effects of repeated methyl parathion or chlorpyrifos exposures in neonatal and adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158, 186–96.

Liu, J., Parsons, L., Pope, C.N., 2015. Comparative effects of parathion and chlorpyrifos on endocannabinoid and endocannabinoid-like lipid metabolites in rat striatum. *Neurotoxicology* 50, 20–27.

Liu, Y., Yu, J.-T., Wang, H.-F., Han, P.-R., Tan, C.-C., Wang, C., Meng, X.-F., Risacher, S.L., Saykin, A.J., Tan, L., 2015. APOE genotype and neuroimaging markers of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 86, 127–34.

Lockridge, O., 2015. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol. Ther.* 148, 34–46.

López-Álvarez, J., Zea Sevilla, M.A., Agüera Ortiz, L., Fernández Blázquez, M.Á., Valentí Soler, M., Martínez-Martín, P., 2015. Effect of anticholinergic drugs on cognitive impairment in the elderly. *Rev. Psiquiatr. y Salud Ment. (English Ed)*. 8, 35–43.

López-Granero, C., Cañadas, F., Cardona, D., Yu, Y., Giménez, E., Lozano, R., Avila, D.S., Aschner, M., Sánchez-Santed, F., 2013a. Chlorpyrifos-, diisopropylphosphorofluoridate-, and parathion-induced behavioral and oxidative stress effects: are they mediated by analogous mechanisms of action? *Toxicol. Sci.* 131, 206–16.

López-Granero, C., Cardona, D., Giménez, E., Lozano, R., Barril, J., Aschner, M., Sánchez-Santed, F., Cañadas, F., 2014. Comparative study on short- and long-term

behavioral consequences of organophosphate exposure: relationship to AChE mRNA expression. *Neurotoxicology* 40, 57–64.

López-Granero, C., Cardona, D., Giménez, E., Lozano, R., Barril, J., Sánchez-Santed, F., Cañadas, F., 2013b. Chronic dietary exposure to chlorpyrifos causes behavioral impairments, low activity of brain membrane-bound acetylcholinesterase, and increased brain acetylcholinesterase-R mRNA. *Toxicology* 308, 41–9.

López-Granero, C., Ruiz-Muñoz, A.M., Nieto-Escámez, F.A., Colomina, M.T., Aschner, M., Sánchez-Santed, F., 2016. Chronic dietary chlorpyrifos causes long-term spatial memory impairment and thigmotaxic behavior. *Neurotoxicology* 53, 85–92.

López-León, S., Janssens, A.C.J.W., González-Zuloeta Ladd, A.M., Del-Favero, J., Claes, S.J., Oostr, B.A., van Duijn, C.M., 2008. Meta-analyses of genetic studies on major depressive disorder. *Mol. Psychiatry* 13, 772–785.

Loy, R., Sheldon, R.A., 1987. Sexually dimorphic development of cholinergic enzymes in the rat septohippocampal system. *Brain Res.* 431, 156–60.

Lukas, M., de Jong, T.R., 2017. Conspecific Interactions in Adult Laboratory Rodents: Friends or Foes?, in: Wöhr, M., Krach, S. (Eds.), *Social Behavior from Rodents to Humans: Neural Foundations and Clinical Implications*. Springer International Publishing, Cham, pp. 3–24.

Lukaszewicz-Hussain, A., 2013. Serum glucose concentration in subacute intoxication with chlorpyrifos - organophosphate insecticide. *Med. Pr.* 64, 527–31.

Lund Karlsen, R., 1981. Reference values for erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase activities in children, implications for organophosphate intoxication. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 41, 301–302.

Ma, P., Wu, Y., Zeng, Q., Gan, Y., Chen, J., Ye, X., Yang, X., 2013. Oxidative damage induced by chlorpyrifos in the hepatic and renal tissue of Kunming mice and the antioxidant role of vitamin E. *Food Chem. Toxicol.* 58, 177–183.

Mackay, D., Giesy, J.P., Solomon, K.R., 2014. *Fate in the Environment and Long-Range Atmospheric Transport of the Organophosphorus Insecticide, Chlorpyrifos and Its Oxon*. Springer International Publishing, pp. 35–76.

Madziar, B., Shah, S., Brock, M., Burke, R., Lopez-Coviella, I., Nickel, A.-C., Cakal, E.B., Blusztajn, J.K., Berse, B., 2008. Nerve growth factor regulates the expression of the cholinergic locus and the high-affinity choline transporter via the Akt/PKB signaling pathway. *J. Neurochem.* 107, 1284–93.

Mahley, R.W., Rall, S.C., 2000. Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1, 507–537.

Malekirad, A.A., Faghieh, M., Mirabdollahi, M., Kiani, M., Fathi, A., Abdollahi, M., 2013. Neurocognitive, mental health, and glucose disorders in farmers exposed to organophosphorus pesticides. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 64, 1–8.

Mandal, T.K., Das, N.S., 2011. Correlation of testicular toxicity and oxidative stress induced by chlorpyrifos in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 1529–1539.

Mangeny, M., Cardot, P., Lyonnet, S., Coupe, C., Benarous, R., Munnich, A., Girard, J., Chambaz, J., Bereziat, G., 1989. Apolipoprotein-E-gene expression in rat liver during development in relation to insulin and glucagon. *Eur. J. Biochem.* 181, 225–230.

Manoharan, I., Boopathy, R., Darvesh, S., Lockridge, O., 2007. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Clin. Chim. Acta* 378, 128–135.

Mansour, S., Mossa, A., 2010. Adverse effects of lactational exposure to chlorpyrifos in suckling rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 29, 77–92.

Marchant, N.L., King, S.L., Tabet, N., Rusted, J.M., 2010. Positive effects of cholinergic stimulation favor young APOE epsilon4 carriers. *Neuropsychopharmacology* 35, 1090–6.

Marsillach, J., Costa, L.G., Furlong, C.E., 2016. Paraoxonase-I and Early-Life Environmental Exposures. *Ann. Glob. Heal.* 82, 100–10.

Marsillach, J., Mackness, B., Mackness, M., Riu, F., Beltrán, R., Joven, J., Camps, J., 2008. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-I, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 146–57.

Martyn, A.C., De Jaeger, X., Magalhaes, A.C., Kesarwani, R., Goncalves, D.F., Raulic, S., Guzman, M.S., Jackson, M.F., Izquierdo, I., MacDonald, J.F., Prado, M. a. M., Prado, V.F., 2012. Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the forebrain causes hyperactivity and deficits in spatial memory and long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 17651–17656.

Massoulié, J., 2002. The Origin of the Molecular Diversity and Functional Anchoring of Cholinesterases. *Neurosignals* 11, 130–143.

Massoulié, J., Anselmet, A., Bon, S., Krejci, E., Legay, C., Morel, N., Simon, S., 1999. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chem. Biol. Interact.* 119–120, 29–42.

Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* 41, 31–91.

Matin, M.A., Sattar, S., Husain, K., 1990. The role of adrenals in diazinon-induced changes in carbohydrate metabolism in rats. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 41, 347–56.

Mattsson, J.L., 2000. Lack of Differential Sensitivity to Cholinesterase Inhibition in Fetuses and Neonates Compared to Dams Treated Perinatally with Chlorpyrifos. *Toxicol. Sci.* 53, 438–446.

Matsumoto, K., Pinna, G., Puia, G., Guidotti, A., Costa, E., 2005. Social isolation stress-induced aggression in mice: a model to study the pharmacology of neurosteroidogenesis. *Stress* 8, 85–93.

Maurissen, J., Hoberman, A., Garman, R., Hanley, T., 2000. Lack of Selective Developmental Neurotoxicity in Rat Pups from Dams Treated by Gavage with Chlorpyrifos. *Toxicol. Sci.* 57, 250–263.

Mayeux, R., Small, S.A., Tang, M., Tycko, B., Stern, Y., 2001. Memory performance in healthy elderly without Alzheimer's disease: effects of time and apolipoprotein-E. *Neurobiol. Aging* 22, 683–9.

Mazzoni, P., Hristova, A., Krakauer, J.W., 2007. Behavioral/Systems/Cognitive Why Don't We Move Faster? Parkinson's Disease, Movement Vigor, and Implicit Motivation. *J. Neurosci.* 27, 7105–7116.

Meggs, W.J., Brewer, K.L., 2007. Weight Gain Associated with Chronic Exposure to Chlorpyrifos in Rats. *Toxicol. Investig.* 3, 89–93.

Ménard, C., Gaudreau, P., Quirion, R., 2015. Signaling Pathways Relevant to Cognition-Enhancing Drug Targets, in: *Handbook of Experimental Pharmacology*. pp. 59–98.

Meng, F.-T., Zhao, J., Fang, H., Zhang, L.-F., Wu, H.-M., Liu, Y.-J., 2017. Upregulation of Mineralocorticoid Receptor in the Hypothalamus Associated with a High Anxiety-like Level in Apolipoprotein E4 Transgenic Mice. *Behav. Genet.* doi:10.1007/s10519-017-9843-5

Meshorer, E., Erb, C., Gazit, R., Pavlovsky, L., Kaufer, D., Friedman, A., Glick, D., Ben-Arie, N., Soreq, H., 2002. Alternative Splicing and Neuritic mRNA Translocation Under Long-Term Neuronal Hypersensitivity. *Science* 295, 508–512.

Meshorer, E., Soreq, H., 2006. Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosci.* 29, 216–224.

Meuling, W.J.A., Ravensberg, L.C., Roza, L., van Hemmen, J.J., 2005. Dermal absorption of chlorpyrifos in human volunteers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 78, 44–50.

Meyer, A., Seidler, F.J., Aldridge, J.E., Slotkin, T.A., 2005. Developmental exposure to terbutaline alters cell signaling in mature rat brain regions and augments the effects of subsequent neonatal exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 154–166.

Meyer, A., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2004. Developmental effects of chlorpyrifos extend beyond neurotoxicity: critical periods for immediate and delayed-onset effects on cardiac and hepatic cell signaling. *Environ. Health Perspect.* 112, 170–8.

Michalek, H., Pintor, A., Fortuna, S., Bisso, G.M., 1988. Brain choline acetyltransferase and muscarinic receptor sites, brain and liver cholinesterases in precocial *Acomys cahirinus* and altricial rat during post-natal development. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 40, 543–51.

Middlemore-Risher, M., Buccafusco, J., Terry, A., 2010. Repeated exposures to low-level chlorpyrifos results in impairments in sustained attention and increased impulsivity in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 415–424.

Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, 2017. Registro de productos fitosanitarios. [WWW Document] URL <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidadvegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp> (accessed 2.5.17)

Miodovnik, A., 2011. Environmental Neurotoxicants and Developing Brain 58–77.

Mitsushima, D., 2010. Sex Differences in the Septo-Hippocampal Cholinergic System in Rats: Behavioral Consequences. pp. 57–71.

Mondadori, C.R.A., de Quervain, D.J.-F., Buchmann, A., Mustovic, H., Wollmer, M.A., Schmidt, C.F., Boesiger, P., Hock, C., Nitsch, R.M., Papassotiropoulos, A., Henke, K., 2007. Better Memory and Neural Efficiency in Young Apolipoprotein E 4 Carriers. *Cereb. Cortex* 17, 1934–1947.

Montgomery, M.P., Kamel, F., Saldana, T.M., Alavanja, M.C.R., Sandler, D.P., 2008. Incident diabetes and pesticide exposure among licensed pesticide applicators: Agricultural Health Study, 1993-2003. *Am. J. Epidemiol.* 167, 1235–46.

Moreno, M., Cañadas, F., Cardona, D., Suñol, C., Campa, L., Sánchez-Amate, M.C., Flores, P., Sanchez-Santed, F., 2008. Long-term monoamine changes in the striatum and nucleus accumbens after acute chlorpyrifos exposure. *Toxicol. Lett.* 176, 162–7.

Moriguchi, S., Tagashira, H., Sasaki, Y., Yeh, J.Z., Sakagami, H., Narahashi, T., Fukunaga, K., 2014. CaMKII activity is essential for improvement of memory-related behaviors by chronic rivastigmine treatment. *J. Neurochem.* 128, 927–37.

Mortensen, S.R., Hooper, M.J., Padilla, S., 1998. Rat brain acetylcholinesterase activity: Developmental profile and maturational sensitivity to carbamate and organophosphorus inhibitors. *Toxicology* 125, 13–19.

Moscovitz, J.E., Aleksunes, L.M., 2013. Establishment of Metabolism and Transport Pathways in the Rodent and Human Fetal Liver. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 23801–23827.

Moser, V., 2000. Dose-response and time-course of neurobehavioral changes following oral chlorpyrifos in rats of different ages. *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 713–723.

Moser, V.C., Chanda, S.M., Mortensen, S.R., Padilla, S., 1998. Age- and Gender-Related Differences in Sensitivity to Chlorpyrifos in the Rat Reflect Developmental Profiles of Esterase Activities. *Toxicol. Sci.* 46, 211–222.

Moser, V.C., Padilla, S., 1998. Age- and Gender-Related Differences in the Time Course of Behavioral and Biochemical Effects Produced by Oral Chlorpyrifos in Rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 149, 107–119.

Moser, V.C., Phillips, P.M., McDaniel, K.L., Marshall, R.S., Hunter, D.L., Padilla, S., 2005. Neurobehavioral effects of chronic dietary and repeated high-level spike exposure to chlorpyrifos in rats. *Toxicol. Sci.* 86, 375–86.

Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2016. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch. Toxicol.* 91, 549-599.

Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2013. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 157–177.

Moy, S.S., Nadler, J.J., Perez, A., 2004. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains : an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain Behav.* 3, 287–302.

Mullen, B.R., Khialeeva, E., Hoffman, D.B., Ghiani, C. a, Carpenter, E.M., 2013. Decreased reelin expression and organophosphate pesticide exposure alters mouse behaviour and brain morphology. *ASN Neuro* 5, e00106.

Muller, C.L., Anacker, A.M.J., Veenstra-VanderWeele, J., 2016. The serotonin system in autism spectrum disorder: From biomarker to animal models. *Neuroscience* 321, 24–41.

Muñoz-Quezada, M.T., Lucero, B.A., Barr, D.B., Steenland, K., Levy, K., Ryan, P.B., Iglesias, V.P., Alvarado, S., Concha, C., Rojas, E., Vega, C., 2013. Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides : A systematic review. *Neurotoxicology* 39, 158–168.

Muñoz-Quezada, M.T., Lucero, B.A., Iglesias, V.P., Muñoz, M.P., Cornejo, C.A., Achu, E., Baumert, B., Hanchey, A., Concha, C., Brito, A.M., Villalobos, M., 2016. Chronic exposure to organophosphate (OP) pesticides and neuropsychological functioning in farm workers : a review. *Int. J. Occup. Environ. Health* 1–12.

Muñoz-Quezada, M.T., Lucero, B.A., Iglesias, V.P., Levy, K., Muñoz, M.P., Achú, E., Cornejo, C.A., Concha, C., Brito, A.M., Villalobos, M., 2017. Exposure to organophosphate (OP) pesticides and health conditions in agricultural and non-agricultural workers from Maule, Chile. *Int. J. Environ. Health Res.* 27, 82–93.

Myklebost, O., Rogne, S., 1986. The gene for human apolipoprotein C1 is located 4.3 kilobases away from the apolipoprotein E gene on chromosome 19. *Hum. Genet.* 73, 286–9.

Nakashima, K., Shimoyama, R., Takahashi, K., 1993. Paired choice reaction tasks in patients with Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 87, 178–83.

Nathan, B.P., Nannapaneni, S., Gairhe, S., Nwosu, I., Struble, R.G., 2007. The distribution of apolipoprotein E in mouse olfactory epithelium. *Brain Res.* 1137, 78–83.

National Center for Biotechnology Information, 2017. Chemical and Physical Properties [WWW Document]. NIH. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2730#section=Chemical-and-Physical-Properties> (accessed 2.5.17).

National Research Council - NCR, 1993. Pesticides in the Diets of Infants and Children. Washington, DC.

Neal-Kluever, A., Aungst, J., Gu, Y., Hatwell, K., Muldoon-jacobs, K., Liem, A., Ogungbesan, A., Shackelford, M., 2014. Infant toxicology : State of the science and considerations in evaluation of safety. *FOOD Chem. Toxicol.* 70, 68–83.

Neumann, I.D., 2008. Brain Oxytocin: A Key Regulator of Emotional and Social Behaviours in Both Females and Males. *J. Neuroendocrinol.* 20, 858–865.

Nichol, K., Deeny, S.P., Seif, J., Camaclang, K., Cotman, C.W., 2009. Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in APOE epsilon4 mice. *Alzheimers. Dement.* 5, 287–94.

Nilsson, L.-G., Nyberg, L., Bäckman, L., 2002. Genetic variation in memory functioning. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 841–8.

Ninomiya, Y., Koyama, Y., Kayama, Y., 2001. Postnatal development of choline acetyltransferase activity in the rat laterodorsal tegmental nucleus. *Neurosci. Lett.* 308, 138–40.

Nolan, R.J., Rick, D.L., Freshour, N.L., Saunders, J.H., 1984. Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73, 8–15.

Nomura, D.K., Hudak, C.S.S., Ward, A.M., Burston, J.J., Issa, R.S., Fisher, K.J., Abood, M.E., Wiley, J.L., Lichtman, A.H., Casida, J.E., 2008. Monoacylglycerol lipase regulates 2-arachidonoylglycerol action and arachidonic acid levels. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 18, 5875–5878.

Noro, Y., Tomizawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., Abe, K., Kamijima, M., 2013. Anticholinesterase insecticide action at the murine male reproductive system. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 23, 5434–5436.

O’Leary, T.P., Brown, R.E., 2012. The effects of apparatus design and test procedure on learning and memory performance of C57BL/6j mice on the Barnes maze. *J. Neurosci. Methods* 203, 315–324.

O’Leary, T.P., Brown, R.E., 2009. Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer’s disease. *Behav. Brain Res.* 201, 120–7.

Ohvo-Rekilä, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., Slotte, J.P., 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* 41, 66–97.

Oriel, S., Kofman, O., 2015. Strain dependent effects of conditioned fear in adult C57Bl/6 and Balb/C mice following postnatal exposure to chlorpyrifos: relation to expression of brain acetylcholinesterase mRNA. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 110.

Padilla, S., Marshall, R.S., Hunter, D.L., Oxendine, S., Moser, V.C., Southerland, S.B., Mailman, R.B., 2005. Neurochemical effects of chronic dietary and repeated high-level acute exposure to chlorpyrifos in rats. *Toxicol. Sci.* 88, 161–171.

Page, D., Miotliński, K., Gonzalez, D., Barry, K., Dillon, P., Gallen, C., 2014. Environmental monitoring of selected pesticides and organic chemicals in urban stormwater recycling systems using passive sampling techniques. *J. Contam. Hydrol.* 158, 65–77.

Pastorino, L., Lu, K.P., 2006. Pathogenic mechanisms in Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 545, 29–38.

Patin, A., Hurlmann, R., 2015. Social Cognition, in: *Cognitive Enhancement*. Springer International Publishing, pp. 271–303.

Pawlak, C.R., Ho, Y.-J., Schwarting, R.K.W., 2008. Animal models of human psychopathology based on individual differences in novelty-seeking and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1544–1568.

Peña, C., Carter, D., Ayala-Fierro, F., 2001. *Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program website at <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>

Pepeu, G., Giovannini, M.G., 2004. Changes in Acetylcholine Extracellular Levels During Cognitive Processes. *Learn. Mem.* 11, 21–27.

Perera, F., Viswanathan, S., Whyatt, R., Tang, D., Miller, R.L., Rauh, V., 2006. Children's environmental health research--highlights from the Columbia Center for Children's Environmental Health. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1076, 15–28.

Peris-Sampedro, F., Basaure, P., Reverte, I., Cabré, M., Domingo, J.L., Colomina, M.T., 2015a. Chronic exposure to chlorpyrifos triggered body weight increase and memory impairment depending on human apoE polymorphisms in a targeted replacement mouse model. *Physiol. Behav.* 144, 37-45.

Peris-Sampedro, F., Cabré, M., Basaure, P., Reverte, I., Domingo, J.L., Colomina, M.T., 2015b. Adulthood dietary exposure to a common pesticide leads to an obese-like phenotype and a diabetic profile in apoE3 mice. *Environ. Res.* 142, 169–176.

Peris-Sampedro, F., Reverte, I., Basaure, P., Cabré, M., Domingo, J.L., Colomina, M.T., 2016. Apolipoprotein E (APOE) genotype and the pesticide chlorpyrifos modulate attention, motivation and impulsivity in female mice in the 5-choice serial reaction time task. *Food Chem. Toxicol.* 92, 224–235.

Peris-Sampedro, F., Salazar, J.G., Cabré, M., Reverte, I., Domingo, J.L., Sánchez-Santed, F., Colomina, M.T., 2014. Impaired retention in A β PP Swedish mice six months after oral exposure to chlorpyrifos. *Food Chem. Toxicol.* 72C, 289–294.

Perrier, N.A., Salani, M., Falasca, C., Bon, S., Augusti-Tocco, G., Massoulié, J., 2005. The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock,

organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo. *J. Neurochem.* 94, 629–638.

Pfankuch, T., Rizk, A., Olsen, R., Poage, C., Raber, J., 2005. Role of circulating androgen levels in effects of apoE4 on cognitive function. *Brain Res.* 1053, 88–96.

Pick, M., Flores-Flores, C., Soreq, H., 2004. From brain to blood: Alternative splicing evidence for the cholinergic basis of mammalian stress responses, in: *Annals of the New York Academy of Sciences.* pp. 85–98.

Pomara, N., Willoughby, L.M., Wesnes, K., Sidtis, J.J., 2004. Increased Anticholinergic Challenge-Induced Memory Impairment Associated with the APOE-ε4 Allele in the Elderly: A Controlled Pilot Study. *Neuropsychopharmacology* 29, 403–409.

Pope, C.N., Chakraborti, T., Chapman, M., Farrar, J., Arthun, D., 1991. Comparison of in vivo cholinesterase inhibition in neonatal and adult rats by three organophosphorothioate insecticides. *Toxicology* 68, 51–61.

Pope, C.N., 1999. Organophosphorus pesticides: Do they all have the same mechanism of toxicity? *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B* 2, 161–181.

Prado, V.F., Janickova, H., Al-Onaizi, M.A., Prado, M.A.M., 2016. Cholinergic circuits in cognitive flexibility. *Neuroscience.* 345, 130-141.

Prado, V.F., Martins-Silva, C., de Castro, B.M., Lima, R.F., Barros, D.M., Amaral, E., Ramsey, A.J., Sotnikova, T.D., Ramirez, M.R., Kim, H.G., Rossato, J.I., Koenen, J., Quan, H., Cota, V.R., Moraes, M.F.D., Gomez, M. V., Guatimosim, C., Wetsel, W.C., Kushmerick, C., Pereira, G.S., Gainetdinov, R.R., Izquierdo, I., Caron, M.G., Prado, M.A.M., 2006. Mice Deficient for the Vesicular Acetylcholine Transporter Are Myasthenic and Have Deficits in Object and Social Recognition. *Neuron* 51, 601–612.

Prado, V.F., Roy, A., Kolisnyk, B., Gros, R., Prado, M.A.M., 2013. Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. *Biochem. J.* 450, 265 LP-274.

Prut, L., Abramowski, D., Krucker, T., Levy, C.L., Roberts, A.J., Staufenbiel, M., Wiessner, C., 2007. Aged APP23 mice show a delay in switching to the use of a strategy in the Barnes maze. *Behav. Brain Res.* 179, 107–110.

Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33.

Qiao, D., Seidler, F.J., Abreu-Villaça, Y., Tate, C.A., Cousins, M.M., Slotkin, T.A., 2004. Chlorpyrifos exposure during neurulation: cholinergic synaptic dysfunction and cellular alterations in brain regions at adolescence and adulthood. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 148, 43–52.

Qiao, D., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2001. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos modeled in vitro: Comparative effects of metabolites and other cholinesterase inhibitors on DNA synthesis in PC12 and C6 cells. *Environ. Health Perspect.* 109, 909–913.

Qiao, D., Seidler, F.J., Tate, C.A., Cousins, M.M., Slotkin, T.A., 2003. Fetal Chlorpyrifos Exposure: Adverse Effects on Brain Cell Development and Cholinergic Biomarkers Emerge Postnatally and Continue into Adolescence and Adulthood. *Environ. Health Perspect.* 111, 536–544.

Quistad, G.B., Klintenberg, R., Casida, J.E., 2005. Blood acylpeptide hydrolase activity is a sensitive marker for exposure to some organophosphate toxicants. *Toxicol. Sci.* 86, 291–9.

Quistad, G.B., Nomura, D.K., Sparks, S.E., Segall, Y., Casida, J.E., 2002. Cannabinoid CB1 receptor as a target for chlorpyrifos oxon and other organophosphorus pesticides 135, 89–93.

Quistad, G.B., Sparks, S.E., Casida, J.E., 2001. Fatty acid amide hydrolase inhibition by neurotoxic organophosphorus pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 173, 48–55.

Raber, J., 2008. AR, apoE, and cognitive function. *Horm. Behav.* 53, 706–15.

Ramos, L., Hicks, C., Caminer, A., McGregor, I.S., 2014. Inhaled vasopressin increases sociability and reduces body temperature and heart rate in rats. *Psychoneuroendocrinology* 46, 46–51.

Ramos, L., Hicks, C., Kevin, R., Caminer, A., Narlawar, R., Kassiou, M., McGregor, I.S., 2013. Acute prosocial effects of oxytocin and vasopressin when given alone or in combination with 3,4-methylenedioxymethamphetamine in rats: involvement of the VIA receptor. *Neuropsychopharmacology* 38, 2249–59.

Rauh, V.A., 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. *Environ. Health Perspect.* 119, 1196–1201.

Rauh, V.A., Garcia, W.E., Whyatt, R.M., Horton, M.K., Barr, D.B., Louis, E.D., 2015. Prenatal exposure to the organophosphate pesticide chlorpyrifos and childhood tremor. *Neurotoxicology* 51, 80–86.

Rauh, V.A., Garfinkel, R., Perera, F.P., Andrews, H.F., Hoepner, L., Barr, D.B., Whitehead, R., Tang, D., Whyatt, R.W., 2006. Impact of Prenatal Chlorpyrifos Exposure on Neurodevelopment in the First 3 Years of Life Among Inner-City Children. *Pediatrics* 118, e1845–e1859.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 7871–7876.

Reading, A.J., 1966. Effects of Parity and Litter Size on the Birth Weight of Inbred Mice. *J. Mammal.* 47, 111–114.

Reid, R.T., Sabbagh, M.N., Thal, L.J., 2001. Does apolipoprotein E (Apo-E) genotype influence nicotinic receptor binding in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 108, 1043–1050.

Reinvang, I., Espeseth, T., Westlye, L.T., 2013. APOE-related biomarker profiles in non-pathological aging and early phases of Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37, 1322–1335.

Reitz, C., Mayeux, R., 2009. Use of genetic variation as biomarkers for Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1180, 75–96.

Reverte, I., Domingo, J.L., Colomina, M.T., 2014a. Neurodevelopmental effects of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in APOE transgenic mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 46, 10–17.

Reverte, I., Pujol, A., Domingo, J.L., Colomina, M.T., 2014b. Thyroid hormones and fear learning but not anxiety are affected in adult apoE transgenic mice exposed postnatally to decabromodiphenyl ether (BDE-209). *Physiol. Behav.* 133, 81–91.

Reverte, I., Klein, A.B., Domingo, J.L., Colomina, M.T., 2013. Long term effects of murine postnatal exposure to decabromodiphenyl ether (BDE-209) on learning and memory are dependent upon APOE polymorphism and age. *Neurotoxicol. Teratol.* 40, 17–27.

Reverte, I., Klein, A.B., Ratner, C., Domingo, J.L., Colomina, M.T., 2012. Behavioral phenotype and BDNF differences related to apoE isoforms and sex in young transgenic mice. *Exp. Neurol.* 237, 116–25.

Reverte, I., Peris-Sampedro, F., Basaure, P., Campa, L., Suñol, C., Moreno, M., Domingo, J.L., Colomina, M.T., 2016. Attentional performance, impulsivity, and related neurotransmitter systems in apoE2, apoE3, and apoE4 female transgenic mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 233, 295–308.

Reygnier, J., Lichtenberger, L., Elmhiri, G., Dou, S., Bahi-Jaber, N., Rhazi, L., Depeint, F., Bach, V., Khorsi-Cauet, H., Abdennebi-Najar, L., 2016. Inulin Supplementation Lowered the Metabolic Defects of Prolonged Exposure to Chlorpyrifos from Gestation to Young Adult Stage in Offspring Rats. *PLoS One* 11, e0164614.

Rhodes, M.C., Seidler, F.J., Qiao, D., Tate, C.A., Cousins, M.M., Slotkin, T.A., 2004. Does pharmacotherapy for preterm labor sensitize the developing brain to environmental neurotoxicants? Cellular and synaptic effects of sequential exposure to terbutaline and chlorpyrifos in neonatal rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 203–17.

Ribes, D., Fuentes, S., Torrente, M., Colomina, M.T., Domingo, J.L., 2010. Combined effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and maternal restraint stress on hypothalamus adrenal axis (HPA) function in the offspring of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243, 13–18.

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. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191, 189–201.

Ricceri, L., Venerosi, A., Capone, F., Cometa, M.F., Lorenzini, P., Fortuna, S., Calamandrei, G., 2006. Developmental Neurotoxicity of Organophosphorous

Pesticides: Fetal and Neonatal Exposure to Chlorpyrifos Alters Sex-Specific Behaviors at Adulthood in Mice. *Toxicol. Sci.* 93, 105–113.

Richardson, J.R., Chambers, J.E., 2005. Effects of Repeated Oral Postnatal Exposure to Chlorpyrifos on Cholinergic Neurochemistry in Developing Rats. *Toxicol. Sci.* 84, 352–359.

Richardson, J.R., Chambers, J.E., 2004. Neurochemical effects of repeated gestational exposure to chlorpyrifos in developing rats. *Toxicol. Sci.* 77, 83–90.

Riedel, B.C., Thompson, P.M., Brinton, R.D., 2016. Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 160, 134–147.

Ritchie, S.A., Connell, J.M.C., 2007. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 17, 319–326.

Röder, P. V, Wu, B., Liu, Y., Han, W., 2016. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp. Mol. Med.* 48, e219.

Rodriguez, G.A., Burns, M.P., Weeber, E.J., Rebeck, G.W., 2013. Young APOE4 targeted replacement mice exhibit poor spatial learning and memory, with reduced dendritic spine density in the medial entorhinal cortex. *Learn. Mem.* 20, 256–66.

Rodríguez-Carmona, Y., Pérez-Rodríguez, M., Gómez-Valdez, E., López-Alavez, F.J., Hernández-Armenta, C.I., Vega-Monter, N., Leyva-García, G., Monge-Cázares, T., Barrera Valencia, D., Balderas Monroy, M., Pfeffer, F., Meléndez, G., Pérez Lizaur, A.B., Pardío, J., Tejero, M.E., 2014. Association between apolipoprotein e variants and obesity-related traits in Mexican school children. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* 7, 243–251.

Rohlman, D.S., Anger, W.K., Lein, P.J., 2011. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology.* 32, 268–276.

Roldán-Tapia, L., Parrón, T., Sánchez-Santed, F., 2005. Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphate pesticides. *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 259–66.

Rosenblat, M., Draganov, D., Watson, C.E., Bisgaier, C.L., La Du, B.N., Aviram, M., 2003. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 468–74.

Roses, A.D., 1996. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A rapidly expanding field with medical and epidemiological consequences. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 802, 50–7.

Ross, R.A., Brockie, H.C., Fernando, S.R., Saha, B., Razdan, R.K., Pertwee, R.G., 1998. Comparison of cannabinoid binding sites in guinea-pig forebrain and small intestine. *Br. J. Pharmacol.* 125, 1345–51.

Ross, S.M., McManus, I.C., Harrison, V., Mason, O., 2013. Neurobehavioral problems following low-level exposure to organophosphate pesticides: a systematic and meta-analytic review. *Crit. Rev. Toxicol.* 43, 21–44.

Rossner, S., Kues, W., Witzemann, V., Schliebs, R., 1993. Laminar expression of m1-, m3- and m4-muscarinic cholinergic receptor genes in the developing rat visual cortex using in situ hybridization histochemistry. Effect of monocular visual deprivation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 11, 369–78.

Rossner, S., Kumar, A., Witzemann, V., Schliebs, R., 1994. Development of laminar expression of the m2 muscarinic cholinergic receptor gene in rat visual cortex and the effect of monocular visual deprivation. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 77, 55–61.

Rusted, J.M., Evans, S.L., King, S.L., Dowell, N., Tabet, N., Tofts, P.S., 2013. APOE e4 polymorphism in young adults is associated with improved attention and indexed by distinct neural signatures. *Neuroimage* 65, 364–373.

Salameh, T.S., Rhea, E.M., Banks, W.A., Hanson, A.J., 2016. Insulin resistance, dyslipidemia, and apolipoprotein E interactions as mechanisms in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Exp. Biol. Med.* 241, 1676–1683.

Salazar, J.G., Ribes, D., Cabré, M., Domingo, J.L., Sanchez-Santed, F., Colomina, M.T., 2011. Amyloid β peptide levels increase in brain of A β PP Swedish mice after exposure to chlorpyrifos. *Curr. Alzheimer Res.* 8, 732–40.

Salehi, A., Dubelaar, E.J., Mulder, M., Swaab, D.F., 1998. Aggravated decrease in the activity of nucleus basalis neurons in Alzheimer's disease is apolipoprotein E-type dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11445–9.

Salomon-Zimri, S., Boehm-Cagan, A., Liraz, O., Michaelson, D.M., 2014. Hippocampus-related cognitive impairments in young apoE4 targeted replacement mice. *Neurodegener. Dis.* 13, 86–92.

Samsam, T.E., Hunter, D.L., Bushnell, P.J., 2005. Effects of chronic dietary and repeated acute exposure to chlorpyrifos on learning and sustained attention in rats. *Toxicol. Sci.* 87, 460–468.

Sánchez-Santed, F., Colomina, M.T., Herrero Hernández, E., 2016. Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex* 74, 417–426.

Sanghi, R., Pillai, M.K.K., Jayalekshmi, T.R., Nair, A., 2003. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 73–76.

Sasaki, T., Leutgeb, S., Leutgeb, J.K., 2015. Spatial and memory circuits in the medial entorhinal cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 32, 16–23.

Saunders, M., Magnanti, B.L., Correia Carreira, S., Yang, A., Alamo-Hernández, U., Riojas-Rodríguez, H., Calamandrei, G., Koppe, J.G., Kraymer von Krauss, M., Keune, H., Bartonova, A., 2012. Chlorpyrifos and neurodevelopmental effects: a literature review and expert elicitation on research and policy. *Environ. Health 11 Suppl 1*, S5.

Savolainen, K., 2001. Chapter 50 – Understanding the Toxic Actions of Organophosphates, in: *Handbook of Pesticide Toxicology*. pp. 1013–1041.

Savy, C.Y., Fitchett, A.E., McQuade, R., Gartside, S.E., Morris, C.M., Blain, P.G., Judge, S.J., 2015. Low-level repeated exposure to diazinon and chlorpyrifos decrease anxiety-like behaviour in adult male rats as assessed by marble burying behaviour. *Neurotoxicology* 50, 149–156.

Schiele, F., De Bacquer, D., Vincent-Viry, M., Beisiegel, U., Ehnholm, C., Evans, A., Kafatos, A., Martins, M.C., Sans, S., Sass, C., Visvikis, S., De Backer, G., Siest, G., 2000. Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project. *Atherosclerosis* 152, 475–88.

Schliebs, R., Arendt, T., 2011. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav. Brain Res.* 221, 555–563.

Schuh, R.A., Lein, P.J., Beckles, R.A., Jett, D.A., 2002. Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: altered phosphorylation of Ca²⁺/cAMP response element binding protein in cultured neurons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 176–85.

Scuteri, A., Najjar, S.S., Muller, D., Andres, R., Morrell, C.H., Zonderman, A.B., Lakatta, E.G., 2005. apoE4 allele and the natural history of cardiovascular risk factors. *AJP Endocrinol. Metab.* 289, E322–E327.

Seeger, T., Fedorova, I., Zheng, F., Miyakawa, T., Koustova, E., Gomeza, J., Basile, A.S., Alzheimer, C., Wess, J., 2004. M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity. *J. Neurosci.* 24, 10117–27.

Segall, Y., Quistad, G.B., Sparks, S.E., Nomura, D.K., Casida, J.E., 2003. Toxicological and structural features of organophosphorus and organosulfur cannabinoid CBI receptor ligands. *Toxicol. Sci.* 76, 131–7.

Segev, Y., Livne, A., Mints, M., Rosenblum, K., 2016. Concurrence of High Fat Diet and APOE Gene Induces Allele Specific Metabolic and Mental Stress Changes in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front. Behav. Neurosci.* 10, 170.

Seidler, F.J., Slotkin, T.A., 2011. Developmental neurotoxicity targeting hepatic and cardiac sympathetic innervation: effects of organophosphates are distinct from those of glucocorticoids. *Brain Res. Bull.* 85, 225–30.

Semaan, S., Kauffman, A., 2015. Daily successive changes in reproductive gene expression and neuronal activation in the brains of pubertal female mice. *Mol Cell Endocrinol* 0, 84–97.

Semenova, S., Contet, C., Roberts, A.J., Markou, A., 2012. Mice lacking the beta4 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor show memory deficits, altered anxiety- and depression-like behavior, and diminished nicotine-induced analgesia. *Nicotine Tob. Res.* 14, 1346–1355.

Seripa, D., Matera, M.G., Daniele, A., Bizzarro, A., Rinaldi, M., Gravina, C., Bisceglia, L., Corbo, R.M., Panza, F., Solfrizzi, V., Fazio, V.M., Forno, G.D., Masullo, C., Dallapiccola, B., Pilotto, A., 2007. The missing ApoE allele. *Ann. Hum. Genet.* 71, 496–500.

Shen, L., Tso, P., Woods, S.C., Clegg, D.J., Barber, K.L., Carey, K., Liu, M., 2008. Brain apolipoprotein E: an important regulator of food intake in rats. *Diabetes* 57, 2092–8.

Shen, L., Wang, D.Q.-H., Tso, P., Jandacek, R.J., Woods, S.C., Liu, M., 2011. Apolipoprotein E reduces food intake via PI3K/Akt signaling pathway in the hypothalamus. *Physiol. Behav.* 105, 124–128.

Sherman, J., 1999. Chlorpyrifos (Dursban) exposure and birth defects: report of 15 incidents, evaluation of 8 cases, theory of action, and medical and social aspects. *Eur. J. Oncol.* 4, 653–659.

Sherman, J.D., 1996. Chlorpyrifos (Dursban) -Associated Birth Defects: Report of Four Cases. *Arch. Environ. Heal. An Int. J.* 51, 5–8.

Shih, D.M., Xia, Y.-R., Yu, J.M., Lusic, A.J., 2010. Temporal and tissue-specific patterns of Pon3 expression in mouse: in situ hybridization analysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 660, 73–87.

Shih, D.M., Xia, Y.R., Wang, X.P., Wang, S.S., Bourquard, N., Fogelman, A.M., Lusic, A.J., Reddy, S.T., 2007. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ. Res.* 100, 1200–1207.

Siegel, J.A., Benice, T.S., Van Meer, P., Park, B.S., Raber, J., 2011. Acetylcholine receptor and behavioral deficits in mice lacking apolipoprotein E. *Neurobiol. Aging* 32, 75–84.

Siegel, J.A., Craytor, M.J., Raber, J., 2010. Long-term effects of methamphetamine exposure on cognitive function and muscarinic acetylcholine receptor levels in mice. *Behav. Pharmacol.* 21, 602–614.

Siegel, J.A., Haley, G.E., Raber, J., 2012. Apolipoprotein E isoform-dependent effects on anxiety and cognition in female TR mice. *Neurobiol. Aging* 33, 345–358.

Silverman, J.L., Yang, M., Lord, C., Crawley, J.N., 2010. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 490–502.

Slotkin, T.A., Brown, K.K., Seidler, F.J., 2005a. Developmental exposures of rats to chlorpyrifos elicits sex-selective hyperlipidemia and hyperinsulinemia in adulthood. *Environ. Health Perspect.* 113, 1291–1294.

Slotkin, T.A., Seidler, F.J., 2005b. The alterations in CNS serotonergic mechanisms caused by neonatal chlorpyrifos exposure are permanent. *Dev. Brain Res.* 158, 115–119.

Slotkin, T.A., Cousins, M.M., Tate, C.A., Seidler, F.J., 2001. Persistent cholinergic presynaptic deficits after neonatal chlorpyrifos exposure. *Brain Res.* 902, 229–243.

Slotkin, T.A., Seidler, F.J., 2015. Prenatal nicotine alters the developmental neurotoxicity of postnatal chlorpyrifos directed toward cholinergic systems: Better, worse, or just “different?” *Brain Res. Bull.* 110, 54–67.

Slotkin, T.A., Seidler, F.J., 2008. Developmental Exposure to Terbutaline and Chlorpyrifos, Separately or Sequentially, Elicits Presynaptic Serotonergic Hyperactivity in Juvenile and Adolescent Rats. *Brain Res Bull.* 73, 301–309.

Slotkin, T.A., Skavicus, S., Levin, E.D., Seidler, F.J., 2015. Prenatal nicotine changes the response to postnatal chlorpyrifos: Interactions targeting serotonergic synaptic function and cognition. *Brain Res. Bull.* 111, 84–96.

Slotkin, T.A., Tate, C.A., Cousins, M.M., Seidler, F.J., 2002. Functional alterations in CNS catecholamine systems in adolescence and adulthood after neonatal chlorpyrifos exposure. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 133, 163–73.

Smith, J.N., Hinderliter, P.M., Timchalk, C., Bartels, M.J., Poet, T.S., 2014. A human life-stage physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic model for chlorpyrifos: development and validation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69, 580–97.

Soeters, M.R., Sauerwein, H.P., Groener, J.E., Aerts, J.M., Ackermans, M.T., Glatz, J.F.C., Fliers, E., Serlie, M.J., 2007. Gender-related differences in the metabolic response to fasting. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3646–52.

Soininen, H., Lehtovirta, M., Helisalmi, S., Linnaranta, K., Heinonen, O., Riekkinen, P., 1995. Increased acetylcholinesterase activity in the CSF of Alzheimer patients carrying apolipoprotein epsilon4 allele. *Neuroreport* 6, 2518–20.

Soleimani, A.S., Mehdizadeh, M., Hamed Shahraiki, S., Artimani, T., Joghataei, M.T., 2015. Sex differences in MDMA-induced toxicity in Sprague-Dawley rats. *Funct. Neurol.* 30, 131–7

Solomon, K.R., Williams, W.M., Mackay, D., Purdy, J., Giddings, J.M., Giesy, J.P., 2014. Properties and Uses of Chlorpyrifos in the United States, in: Giesy, J.P., Solomon, K.R. (Eds.), *Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States*. Springer International Publishing, Cham, pp. 13–34.

Soltaninejad, K., Shadnia, S., 2014. History of the Use and Epidemiology of Organophosphorus Poisoning, in: *Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds*. Springer Science & Business Media, London, pp. 25–35.

Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2, 294–302.

Steenland, K., Dick, R.B., Howell, R.J., Chrislip, D.W., Hines, C.J., Reid, T.M., Lehman, E., Laber, P., Krieg, E.F., Knott, C., 2000. Neurologic function among termiticide applicators exposed to chlorpyrifos. *Environ. Health Perspect.* 108, 293–300.

Stephens, R., Sreenivasan, B., 2004. Neuropsychological effects of long-term low-level organophosphate exposure in orchard sprayers in England. *Arch. Environ. Health* 59, 566–74.

Stewart, W.F., Schwartz, B.S., Simon, D., Kelsey, K., Todd, A.C., 2002. ApoE genotype, past adult lead exposure, and neurobehavioral function. *Environ. Health Perspect.* 110, 501–5.

Stiefel, P., Montilla, C., Muñoz-Grijalvo, O., García-Lozano, R., Alonso, A., Miranda, M.L., Pamies, E., Villar, J., 2001. Apolipoprotein E gene polymorphism is related to metabolic abnormalities, but does not influence erythrocyte membrane lipid composition or sodium-lithium countertransport activity in essential hypertension. *Metabolism* 50, 157–160.

Stojanov, M., Stefanović, A., Džingalašević, G., Mandić-Radić, S., Prostran, M., 2011. Butyrylcholinesterase activity in young men and women: Association with cardiovascular risk factors. *Clin. Biochem.* 44, 623–626.

Strömmland, K., Pinazo-Durán, M., Stromland, K., Pinazo-Duran, M.D., 2002. Ophthalmic involvement in the fetal alcohol syndrome: clinical and animal model studies. *Alcohol* 37, 2–8.

Sullivan, P.M., Han, B., Liu, F., Mace, B.E., Ervin, J.F., Wu, S., Koger, D., Paul, S., Bales, K.R., 2011. Reduced levels of human apoE4 protein in an animal model of cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* 32, 791–801.

Sullivan, P.M., Knouff, C., Najib, J., Reddick, R.L., Quarfordt, S.H., 1997. Targeted Replacement of the Mouse Apolipoprotein E Gene with the Common Human. *J. Biol. Chem.* 272, 17972–17980.

Sullivan, P.M., Mace, B.E., Maeda, N., Schmechel, D.E., 2004. Marked regional differences of brain human apolipoprotein E expression in targeted replacement mice. *Neuroscience* 124, 725–733.

Sultatos, L.G., Costa, L.G., Murphy, S.D., 1982. Factors involved in the differential acute toxicity of the insecticides chlorpyrifos and methyl chlorpyrifos in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 65, 144–52.

Sultatos, L.G., Murphy, S.D., 1983. Hepatic microsomal detoxification of the organophosphates paraoxon and chlorpyrifos oxon in the mouse. *Drug Metab. Dispos.* 11, 232–8.

Sun, X., Tian, X., Suszkiw, J.B., 1997. Reduction of vesicular acetylcholine transporter mRNA in the rat septum following lead exposure. *Neuroreport* 8, 891–894.

Suratman, S., Edwards, J.W., Babina, K., 2015. Organophosphate pesticides exposure among farmworkers: pathways and risk of adverse health effects. *Rev. Environ. Health* 30, 65–79.

Tang, J., Carr, R.L., Chambers, J.E., 1999. Changes in rat brain cholinesterase activity and muscarinic receptor density during and after repeated oral exposure to chlorpyrifos in early postnatal development. *Toxicol. Sci.* 51, 265–72.

- Tait, S., Ricceri, L., Venerosi, A., Maranghi, F., Mantovani, A., Calamandrei, G., 2009. Long-term effects on hypothalamic neuropeptides after developmental exposure to chlorpyrifos in mice. *Environ. Health Perspect.* 117, 112–116.
- Tarhoni, M.H., Lister, T., Ray, D.E., Carter, W.G., 2008. Albumin binding as a potential biomarker of exposure to moderately low levels of organophosphorus pesticides. *Biomarkers* 13, 343–363.
- Tayeb, H.O., Yang, H.D., Price, B.H., Tarazi, F.I., 2012. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 134, 8–25.
- Tejedor, M.T., Garcia-Sobreviela, M.P., Ledesma, M., Arbones-Mainar, J.M., Ramazauskienė, V., 2014. The Apolipoprotein E Polymorphism rs7412 Associates with Body Fatness Independently of Plasma Lipids in Middle Aged Men. *PLoS One* 9, e108605.
- Terry, A. V., 2012. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: Potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 134, 355–365.
- Timchalk, C., Busby, A., Campbell, J.A., Needham, L.L., Barr, D.B., 2007. Comparative pharmacokinetics of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos and its major metabolites diethylphosphate, diethylthiophosphate and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in the rat. *Toxicology* 237, 145–157.
- Timchalk, C., Kousba, A.A., Poet, T.S., 2007. An age-dependent physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for the organophosphorus insecticide chlorpyrifos in the preweaning rat. *Toxicol. Sci.* 98, 348–365.
- Timchalk, C., Nolan, R.J., Mendrala, A.L., Dittenber, D.A., Brzak, K.A., Mattsson, J.L., 2002. A Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic (PBPK/PD) Model for the Organophosphate Insecticide Chlorpyrifos in Rats and Humans 53, 34–53.
- Timchalk, C., Poet, T.S., Kousba, A.A., 2006. Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic response in preweaning rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. *Toxicology* 220, 13–25.
- Thompson, M.R., Callaghan, P.D., Hunt, G.E., Cornish, J.L., McGregor, I.S., 2007. A role for oxytocin and 5-HT1A receptors in the prosocial effects of 3,4 methylenedioxymethamphetamine (“ecstasy”). *Neuroscience* 146, 509–514.
- Tsien, J.Z., Huerta, P.T., Tonegawa, S., 1996. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87, 1327–38.
- Tudusciuc, O., Adolphs, R., 2013. Social Cognitive Neuroscience, in: *Social Cognition in Schizophrenia*. Oxford University Press, pp. 120–148.
- Turgeman, G., Pinkas, A., Slotkin, T.A., Tfilin, M., Langford, R., Yanai, J., 2011. Reversal of chlorpyrifos neurobehavioral teratogenicity in mice by allographic transplantation of adult subventricular zone-derived neural stem cells. *J. Neurosci. Res.* 89, 1185–1193.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koessaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115–e115.

United States Environmental Protection Agency – EPA, 2014. Chlorpyrifos Human Health Risk Assessment, Official Web Page Environmental Protection Agency.

Vacher, C.-M., Frétier, P., Créminon, C., Calas, A., Hardin-Pouzet, H., 2002. Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei. *J. Neurosci.* 22, 1513–22.

Valuskova, P., Farar, V., Janisova, K., Ondicova, K., Mravec, B., Kvetnansky, R., Myslivecek, J., 2017. Brain region-specific effects of immobilization stress on cholinesterases in mice. *Stress* 20, 53–60.

van der Flier, W.M., Staekenborg, S., Pijnenburg, Y.A.L., Gillissen, F., Romkes, R., Kok, A., Bouwman, F.H., Scheltens, P., 2006. Apolipoprotein E Genotype Influences Presence and Severity of Delusions and Aggressive Behavior in Alzheimer Disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 23, 42–46.

van Wendel de Joode, B., Mora, A.M., Lindh, C.H., Hernández-Bonilla, D., Córdoba, L., Wesseling, C., Hoppin, J.A., Mergler, D., 2016. Pesticide exposure and neurodevelopment in children aged 6–9 years from Talamanca, Costa Rica. *Cortex* 85, 137–150.

Velmurugan, G., Ramprasath, T., Swaminathan, K., Mithieux, G., Rajendhran, J., Dhivakar, M., Parthasarathy, A., Babu, D.D.V., Thumburaj, L.J., Freddy, A.J., Dinakaran, V., Puhari, S.S.M., Rekha, B., Christy, Y.J., Anusha, S., Divya, G., Suganya, K., Meganathan, B., Kalyanaraman, N., Vasudevan, V., Kamaraj, R., Karthik, M., Jeyakumar, B., Abhishek, A., Paul, E., Pushpanathan, M., Rajmohan, R.K., Velayutham, K., Lyon, A.R., Ramasamy, S., 2017. Gut microbial degradation of organophosphate insecticides-induces glucose intolerance via gluconeogenesis. *Genome Biol.* 18, 8.

Venerosi, A., Calamandrei, G., Ricceri, L., 2006. A social recognition test for female mice reveals behavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure. *Neurotoxicol. Teratol.* 28, 466–71.

Venerosi, A., Cutuli, D., Colonnello, V., Cardona, D., Ricceri, L., Calamandrei, G., 2008. Neonatal exposure to chlorpyrifos affects maternal responses and maternal aggression of female mice in adulthood. *Neurotoxicol. Teratol.* 30, 468–474.

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 (Berl)*. 208, 99–107.

Venerosi, A., Ricceri, L., Scattoni, M.L., Calamandrei, G., 2009. Prenatal chlorpyrifos exposure alters motor behavior and ultrasonic vocalization in CD-1 mouse pups. *Environ. Heal.* 8, 12.

Venerosi, A., Ricceri, L., Tait, S., Calamandrei, G., 2012. Sex dimorphic behaviors as markers of neuroendocrine disruption by environmental chemicals: The case of chlorpyrifos. *Neurotoxicology* 33, 1420–1426.

Venerosi, A., Tait, S., Stecca, L., Chiarotti, F., De Felice, A., Cometa, M.F., Volpe, M.T., Calamandrei, G., Ricceri, L., 2015. Effects of maternal chlorpyrifos diet on social investigation and brain neuroendocrine markers in the offspring – a mouse study. *Environ. Heal.* 14, 32.

Ventura, C., Venturino, A., Miret, N., Randi, A., Rivera, E., Núñez, M., Cocca, C., 2015. Chlorpyrifos inhibits cell proliferation through ERK1/2 phosphorylation in breast cancer cell lines. *Chemosphere* 120, 343–350.

Villasana, L.E., Weber, S., Akinyeke, T., Raber, J., 2016. Genotype differences in anxiety and fear learning and memory of WT and ApoE4 mice associated with enhanced generation of hippocampal reactive oxygen species. *J. Neurochem.* 138, 896–908.

Vincent-Viry, M., Schiele, F., Gueguen, R., Bohnet, K., Visvikis, S., Siest, G., 1998. Biological variations and genetic reference values for apolipoprotein E serum concentrations: results from the STANISLAS cohort study. *Clin. Chem.* 44, 957–65.

Volcik, K.A., Barkley, R.A., Hutchinson, R.G., Mosley, T.H., Heiss, G., Sharrett, A.R., Ballantyne, C.M., Boerwinkle, E., 2006. Apolipoprotein E Polymorphisms Predict Low Density Lipoprotein Cholesterol Levels and Carotid Artery Wall Thickness but Not Incident Coronary Heart Disease in 12,491 ARIC Study Participants. *Am. J. Epidemiol.* 164, 342–348.

Vorhees, C. V., Williams, M.T., 2014. Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J.* 55, 310–332.

Wainwright, P., Francey, C., 1987. Effect of Pre- and postweaning nutrition on dietary induced obesity in B6D2F2 mice. *Physiol. Behav.* 41, 87–91.

Wall, S., Yasuda, R., Li, M., Ciesla, W., Wolfe, B., 1992. The ontogeny of ml-m5 muscarinic receptor subtypes in rat forebrain. *Dev. Brain Res.* 66, 181–185.

Wallace, T.L., Ballard, T.M., Glavis-Bloom, C., 2015. Animal Paradigms to Assess Cognition with Translation to Humans, in: Kantak, K.M., Wettstein, J. (Eds.), *Cognitive Enhancement*. Springer International Publishing, pp. 27–57.

Walthall, K., Cappon, G.D., Hurtt, M.E., Zoetis, T., 2005. Postnatal development of the gastrointestinal system: A species comparison. *Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.* 74, 132–156.

Wang, F., Kessels, H.W., Hu, H., 2014. The mouse that roared: Neural mechanisms of social hierarchy. *Trends Neurosci.* 37, 674–682.

Wang, L., Almeida, L.E.F., Spornick, N.A., Kenyon, N., Kamimura, S., Khaibullina, A., Nouraie, M., Quezado, Z.M.N., 2015. Modulation of social deficits and repetitive

behaviors in a mouse model of autism: the role of the nicotinic cholinergic system. *Psychopharmacology (Berl)*. 232, 4303–4316.

Warner, T.A., Drugan, R.C., 2012. Morris water maze performance deficit produced by intermittent swim stress is partially mediated by norepinephrine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 101, 24–34.

Watson, C.E., Draganov, D.I., Billecke, S.S., Bisgaier, C.L., La Du, B.N., 2001. Rabbits possess a serum paraoxonase polymorphism similar to the human Q192R. *Pharmacogenetics* 11, 123–34.

Watson, R.E., Desesso, J.M., Hurtt, M.E., Cappon, G.D., 2006. Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 77, 471–484.

Weinstock, M., Groner, E., 2008. Rational design of a drug for Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitory and neuroprotective activity. *Chem. Biol. Interact.* 175, 216–21.

Weiss, B., 2011. Same sex, no sex, and unaware sex in neurotoxicology Bernard. *Neurotoxicology* 32, 509–517.

Weldon, R.H., Barr, D.B., Trujillo, C., Bradman, A., Holland, N., Eskenazi, B., 2011. A pilot study of pesticides and PCBs in the breast milk of women residing in urban and agricultural communities of California. *J. Environ. Monit.* 13, 3136–44.

Wesseling, C., van Wendel de Joode, B., Keifer, M., London, L., Mergler, D., Stallones, L., 2010. Symptoms of psychological distress and suicidal ideation among banana workers with a history of poisoning by organophosphate or n-methyl carbamate pesticides. *Occup. Environ. Med.* 67, 778–84.

Whyatt, R.M., Camann, D., Perera, F.P., Rauh, V.A., Tang, D., Kinney, P.L., Garfinkel, R., Andrews, H., Hoepner, L., Barr, D.B., 2005. Biomarkers in assessing residential insecticide exposures during pregnancy and effects on fetal growth. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 246–254.

Williams, C.L., Meck, W.H., Heyer, D.D., Loy, R., 1998. Hypertrophy of basal forebrain neurons and enhanced visuospatial memory in perinatally choline-supplemented rats. *Brain Res.* 794, 225–38.

Wisdom, N.M., Callahan, J.L., Hawkins, K.A., 2011. The effects of apolipoprotein E on non-impaired cognitive functioning: a meta-analysis. *Neurobiol. Aging* 32, 63–74.

Wolbers, T., Hegarty, M., 2010. What determines our navigational abilities? *Trends Cogn. Sci.* 14, 138–146.

Wolk, D.A., Dickerson, B.C., Weiner, M., Aiello, M., Aisen, P., Albert, M.S., Alexander, G., Anderson, H.S., Anderson, K., Apostolova, L., Arnold, S., Ashford, W., Assaly, M., Asthana, S., Bandy, D., Bartha, R., Bates, V., Beckett, L., Bell, K.L., Benincasa, A.L., Bergman, H., Bernick, C., Bernstein, M., Black, S., Blank, K., Borrie, M., Brand, C.,

Brewer, J., Brown, A.D., Burns, J.M., Cairns, N.J., Caldwell, C., Capote, H., Carlsson, C.M., Carmichael, O., Cellar, J.S., Celmins, D., Chen, K., Chertkow, H., Chowdhury, M., Clark, D., Connor, D., Correia, S., Crawford, K., Dale, A., de Leon, M.J., De Santi, S.M., DeCarli, C., deToledo-Morrell, L., DeVous, M., Diaz-Arrastia, R., Dolen, S., Donohue, M., Doody, R.S., Doraiswamy, P.M., Duara, R., Englert, J., Farlow, M., Feldman, H., Felmlee, J., Fleisher, A., Fletcher, E., Foroud, T.M., Foster, N., Fox, N., Frank, R., Gamst, A., Given, C.A., Graff-Radford, N.R., Green, R.C., Griffith, R., Grossman, H., Hake, A.M., Hardy, P., Harvey, D., Heidebrink, J.L., Hendin, B.A., Herring, S., Honig, L.S., Hosein, C., Robin Hsiung, G.-Y., Hudson, L., Ismail, M.S., Jack, C.R., Jacobson, S., Jagust, W., Jayam-Trouth, A., Johnson, K., Johnson, H., Johnson, N., Johnson, K., Johnson, K.A., Johnson, S., Kachaturian, Z., Karlawish, J.H., Kataki, M., Kaye, J., Kertesz, A., Killiany, R., Kittur, S., Koeppe, R.A., Korecka, A., Kornak, J., Kozauer, N., Lah, J.J., Laubinger, M.M., Lee, V.M.-Y., Lee, T.-Y., Lerner, A., Levey, A.I., Longmire, C.F., Lopez, O.L., Lord, J.L., Lu, P.H., MacAvoy, M.G., Malloy, P., Marson, D., Martin-Cook, K., Martinez, W., Marzloff, G., Mathis, C., Mc-Adams-Ortiz, C., Mesulam, M., Miller, B.L., Mintun, M.A., Mintzer, J., Molchan, S., Montine, T., Morris, J., Mulnard, R.A., Munic, D., Nair, A., Neu, S., Nguyen, D., Norbash, A., Oakley, M., Obisesan, T.O., Ogrocki, P., Ott, B.R., Parfitt, F., Pawluczyk, S., Pearlson, G., Petersen, R., Petrella, J.R., Potkin, S., Potter, W.Z., Preda, A., Quinn, J., Rainka, M., Reeder, S., Reiman, E.M., Rentz, D.M., Reynolds, B., Richard, J., Roberts, P., Rogers, J., Rosen, A., Rosen, H.J., Rusinek, H., Sabbagh, M., Sadowsky, C., Salloway, S., Santulli, R.B., Saykin, A.J., Scharre, D.W., Schneider, L., Schneider, S., Schuff, N., Shah, R.C., Shaw, L., Shen, L., Silverman, D.H.S., Simpson, D.M., Sink, K.M., Smith, C.D., Snyder, P.J., Spann, B.M., Sperling, R.A., Spicer, K., Stefanovic, B., Stern, Y., Stopa, E., Tang, C., Tariot, P., Taylor-Reinwald, L., Thai, G., Thomas, R.G., Thompson, P., Tinklenberg, J., Toga, A.W., Tremont, G., Trojanowki, J.Q., Trost, D., Turner, R.S., van Dyck, C.H., Vanderswag, H., Varon, D., Villanueva-Meyer, J., Villena, T., Walter, S., Wang, P., Watkins, F., Weiner, M., Williamson, J.D., Wolk, D., Wu, C.-K., Zerrate, M., Zimmerman, E.A., 2010. Apolipoprotein E (APOE) genotype has dissociable effects on memory and attentional-executive network function in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 10256–10261.

Won, Y.K., Liu, J., Olivier, K., Zheng, Q., Pope, C.N., 2001. Age-related effects of Chlorpyrifos on acetylcholine release in rat brain. *Neurotoxicology* 22, 39–48.

Woollett, L., Heubi, J.E., 2000. Fetal and Neonatal Cholesterol Metabolism, *Endotext*.

Zimmerman, G., Soreq, H., 2006. Termination and beyond: Acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res.* 326, 655–669.

World Health Organization - WHO, 2009. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard [WWW Document]. *Int. Program. Chem. Safety*. URL http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf (accessed 1.20.17).

Yamamuro, Y., Aizawa, S., 2010. Asymmetric regulation by estrogen at the cholinergic gene locus in differentiated NG108-15 neuronal cells. *Life Sci.* 86, 839–843.

Yan, C., Jiao, L., Zhao, J., Yang, H., Peng, S., 2012. Repeated exposures to chlorpyrifos lead to spatial memory retrieval impairment and motor activity alteration. *Neurotoxicol. Teratol.* 34, 442–9.

Yang, D., Lauridsen, H., Buels, K., Chi, L.-H., La Du, J., Bruun, D.A., Olson, J.R., Tanguay, R.L., Lein, P.J., 2011. Chlorpyrifos-oxon disrupts zebrafish axonal growth and motor behavior. *Toxicol. Sci.* 121, 146–59.

Yao, Q., Chen, L., Liang, Y., Sui, L., Guo, L., Zhou, J., Fan, K., Jing, J., Zhang, Y., Yao, B., 2016. Blastomere removal from cleavage-stage mouse embryos alters placental function, which is associated with placental oxidative stress and inflammation. *Sci. Rep.* 6, 25023.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134.

Yoder, R.M., Kirby, S.L., 2014. Otoconia-Deficient Mice Show Selective Spatial Deficits Ryan. *Hippocampus* 24, 1169–1177.

Yokota, S., Oshio, S., Moriya, N., Takeda, K., 2016. Social Isolation-Induced Territorial Aggression in Male Offspring Is Enhanced by Exposure to Diesel Exhaust during Pregnancy. *PLoS One* 11, e0149737.

Young, L.J., 2002. The neurobiology of social recognition, approach, and avoidance. *Biol. Psychiatry* 51, 18–26.

Young, J.G., Eskenazi, B., Gladstone, E.A., Bradman, A., Pedersen, L., Johnson, C., Barr, D.B., Furlong, C.E., Holland, N.T., 2005. Association Between In Utero Organophosphate Pesticide Exposure and Abnormal Reflexes in Neonates. *Neurotoxicology* 26, 199–209.

Yun, S.H., Park, K.A., Sullivan, P., Pasternak, J.F., LaDu, M.J., Trommer, B.L., 2005. Blockade of nicotinic acetylcholine receptors suppresses hippocampal long-term potentiation in wild-type but not apoE4 targeted replacement mice. *J. Neurosci. Res.* 82, 771–777.

Zannis, V.I., Breslow, J.L., Utermann, G., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Havel, R.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Schonfeld, G., Hazzard, W.R., Blum, C., 1982. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. *J. Lipid Res.* 23, 911–4.

Zechner, R., Moser, R., Newman, T.C., Fried, S.K., Breslow, J.L., 1991. Apolipoprotein E gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes and human adipose tissue and its regulation by differentiation and lipid content. *J. Biol. Chem.* 266, 10583–8.

Zhang, H., Liu, J., Pope, C.N., 2002. Age-related effects of chlorpyrifos on muscarinic receptor-mediated signaling in rat cortex. *Arch. Toxicol.* 75, 676–684.

Zheng, Q., Olivier, K., Won, Y.K., Pope, C.N., 2000. Comparative Cholinergic Neurotoxicity of Oral Chlorpyrifos Exposures in Prewaning and Adult Rats. *Toxicol. Sci. an Off. J. Soc. Toxicol.* 132, 124–132.

Zilkha, N., Sofer, Y., Beny, Y., Kimchi, T., 2016. From classic ethology to modern neuroethology: Overcoming the three biases in social behavior research. *Curr. Opin. Neurobiol.* 38, 96–108.

Zimmer, K.R., Lencina, C.L., Zimmer, A.R., Thiesen, F.V., 2012. Influence of physical exercise and gender on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in human blood samples. *Int. J. Environ. Health Res.* 22, 279–286.

Zimmerman, G., Soreq, H., 2006. Termination and beyond: Acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res.* 326, 655–669.

Zoicas, I., Slattery, D.A., Neumann, I.D., 2014. Brain oxytocin in social fear conditioning and its extinction: involvement of the lateral septum. *Neuropsychopharmacology* 39, 3027–35.

Zoli, M., Léna, C., Picciotto, M.R., Changeux, J.P., 1998. Identification of four classes of brain nicotinic receptors using beta2 mutant mice. *J. Neurosci.* 18, 4461–72.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS
DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS
Pia Isabel Basaure García