



FACULTAT D'ENOLOGIA
Universitat Rovira i Virgili



Efectos a largo plazo de la exposición temprana al clorpirifós sobre la vía colinérgica en ratones transgénicos apoE4

Trabajo de Fin de Grado – Biotecnología

Universidad Rovira i Virgili – junio 2018

MARÍA CRUZ COBO

Tutorizado por

LAIA GUARDIA ESCOTÉ

MARIA CABRÉ BARGALLÓ

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a Teresa la oportunidad de realizar la estancia de prácticas que me ha permitido desarrollar este trabajo y acercarme un poco más al extraordinario y a la vez complejísimo mundo de la neurología. En particular, a mis tutoras Laia y Maria, por su indudable paciencia, su constante apoyo y por aportar más que un granito de arena en la organización de este trabajo. Gracias, además, por cada consejo, profesional y personal, por asesorarme del presente y del futuro y hacer que tenga un poco menos de miedo de seguir el camino hacia el Doctorado (aunque aún quede mucho por andar). Gracias a Pia y Judith, por la compañía, por hacerme un hueco en su pequeño laboratorio y por alimentar mi curiosidad y espíritu científico. Gracias a Jordi, por su risa, alegría y simpatía a cualquier hora del día.

Paralelamente, también agradezco a cada profesor de la universidad las enseñanzas que me han aportado y me han ayudado a desarrollar este trabajo con la sensación de estar un paso más cerca de ser Biotecnóloga. En especial, y en mayúsculas, a Ximena, por todo su tiempo y su dedicación, y por ese empujoncito que necesitaba en este sprint final.

Gracias a cada una de las personas que me llevo conmigo tras estos 4 años de ir escalando, tropezando, sufriendo, pero también disfrutando de la llegada a la cima. Gracias por hacerme sentir que puedo seguir adelante.

Gracias sin dudarlo a mi familia, incluso con la que no comparto sangre. En especial, a mi madre, porque sé que va a llorar cuando lea esto, igual que lloró cuando le nombré la palabra “Alzheimer” en mi TFG. Gracias por pellizcarme el alma en cada párrafo. Os quiero a rabiar.

Gracias a todo el que ha estado, aun sin estar, y me ha hecho sentir que el esfuerzo siempre merece la pena. Que yo puedo, debo y quiero.

Resumen

El clorpirifós (CPF) es uno de los pesticidas organofosfatados más usados a nivel mundial. Su acción insecticida se basa en la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), que deriva en un síndrome colinérgico y posteriormente la muerte del insecto. La exposición a este insecticida se ha relacionado con numerosas patologías, como la Enfermedad de Alzheimer (EA). La EA es la demencia senil más común en el mundo, cuyos mayores factores de riesgo son la edad y la posesión del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (APOE4). El genotipo apoE4 está asociado con déficits en la compensación del sistema colinérgico en el hipocampo, una de las zonas cerebrales más afectadas en pacientes con EA. Daños en el hipocampo y una disminución en la actividad del sistema colinérgico se asocian al deterioro cognitivo propio de la EA, desarrollando problemas relacionados con el aprendizaje y la memoria espacial. El objetivo de este estudio es estudiar los efectos a largo plazo derivados de la exposición temprana al CPF en ratones machos y hembras, así como determinar la influencia del genotipo apoE4. Para ello, se ha evaluado la expresión de 9 genes de la vía colinérgica en el hipocampo de ratones de 9 meses de edad, tras una exposición postnatal (10-15 días de edad) al CPF. Los resultados obtenidos se corroboran con estudios anteriores, donde se expone una evidente diferencia entre machos y hembras. Este estudio muestra diferencias significativas en los individuos apoE4, sugiriendo alteraciones basales en el sistema colinérgico, ligadas a este genotipo. Asimismo, el efecto del CPF difiere significativamente entre ambos genotipos, y ambos sexos.

Palabras clave: Clorpirifós, apoE4, vía colinérgica, exposición temprana, efectos a largo plazo, hipocampo

Abstract

Chlorpyrifos (CPF) is one of the most used organophosphate pesticides in the world. Its action is based on the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), which results in a cholinergic syndrome and subsequently the death of the insect. The exposure to this insecticide has been linked to numerous pathologies, such as Alzheimer's disease (AD). AD is the most common senile dementia in the world, whose major risk factors are age and the $\epsilon 4$ allele of apolipoprotein E (APOE4). The genotype apoE4 is associated with deficits in the compensation of the cholinergic system in the hippocampus, one of the most affected brain areas in AD patients. Damage to the hippocampus and a decrease in the activity of the cholinergic system are associated with cognitive impairment (characteristic of AD), developing problems related to learning and spatial memory. The aim of this study is to study the long-term effects of early exposure to CPF in male and female mice, as well as to determine the influence of the apoE4. For this purpose, the expression of 9 cholinergic genes was evaluated in the hippocampus of 9-month-old mice after postnatal exposure to CPF. The results obtained corroborated previous studies, exposing a difference between males and females. This study shows significant differences in the apoE4 individuals, suggesting basal alterations in the cholinergic system, linked to this genotype. Also, the effect of the CPF differs significantly between both genotypes and both sexes.

Keywords: Chlorpyrifos, apoE4, cholinergic pathway, early exposure, long-term effects, hippocampus

ÍNDICE

Agradecimientos	2
Resumen.....	3
Abstract	4
ÍNDICE.....	5
Datos del centro	6
1. Introducción	7
1.2 Clorpirifós.....	8
1.2.1 Características y uso.....	8
1.2.2 Vías de exposición	9
1.2.3 Impacto y patologías derivadas.....	9
1.3 Sistema colinérgico: vía de la acetilcolina	10
1.4 Enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer.....	12
1.4.1 Patogénesis de la EA.....	13
1.4.2 Tratamiento.....	15
1.5 Estudios previos	15
2. Hipótesis y objetivos	16
3. Metodología y plan de trabajo.....	17
3.1 Animales.....	17
3.2 Compuesto químico	18
3.3 Diseño experimental	18
3.4 Extracción de ARN	20
3.5 Síntesis de ADNc.....	21
3.6 Evaluación de la expresión génica – real time qPCR.....	21
3.7 Tratamiento de datos y análisis estadístico	23
3.7.1 Análisis de Componentes Principales (ACP).....	24
3.7.2 ANOVA y Post-hoc (Tukey)	24
4. Resultados	25
4.1 Machos	25
4.2 Hembras	28
5. Discusión	30
6. Conclusiones.....	35
7. Bibliografía	37
9. Autoevaluación	41

Datos del centro

Este TFG se ha desarrollado a partir de una estancia de prácticas en el **Grupo de investigación en Neurocomportamiento y Salud (NEUROLAB)**, en la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili (URV), en Reus, Tarragona. NEUROLAB es uno de los 3 grupos de investigación que consolidan el **Centro de Tecnología Ambiental, Alimentaria y Toxicológica (TecnATox)**, junto con el Laboratorio de Toxicología y Salud Medioambiental (LTSM), y el Grupo de Análisis y Gestión Ambiental (TecnATox - IISPV).

TecnATox es un centro de investigación e innovación, adscrito desde el 2008 en la Red de apoyo a la Innovación Tecnológica, de ACCIÓ. Su actividad investigadora se desarrolla entorno a los tóxicos medioambientales y alimentarios y de sus efectos (riesgos y/o beneficios) sobre la salud humana. Es un centro multidisciplinario que cuenta con más de 30 investigadores de diversas especialidades, al servicio tanto del sector público como del privado (TecnATox - URV).

NEUROLAB es un grupo del área de salud pública coordinado por María Teresa Colomina (TecnATox - URV). Está financiado por distintos tipos de subvenciones, procedentes del Estado y de la Unión Europea. Comprende numerosas líneas de investigación:

- Cambios metabólicos y obesidad relacionados con tóxicos medioambientales
- Caracterización conductual de modelos animales, estudios cognitivos y psicopatología
- Factores que influyen en el consumo y deshabituación de drogas de abuso
- Neurodegeneración: factores de vulnerabilidad
- Neuroinflamación y trastornos del desarrollo
- **Efectos de pesticidas organofosforados sobre la salud mental y los trastornos del neurodesarrollo.** Dentro de esta línea, se encuentra el proyecto en el que se basa este TFG: *“Cambios Neuroconductuales y metabólicos en ratones transgénicos APOE expuestos postnatalmente a clorpirifos. Posible implicación de la microbiota y la neuroinflamación”* (PSI2014-55785-C2-2-R). Dicho proyecto tiene prevista una duración de 3 años y ha estado financiado por el Estado con 90000€.

1. Introducción

Desde hace décadas se han desarrollado diversos productos para satisfacer necesidades agrícolas, médicas o industriales, cuyo uso excesivo podría suponer un riesgo para la salud y el medio ambiente. Entre los distintos efectos perjudiciales de estas sustancias están los efectos neurotóxicos. Un **agente neurotóxico** puede definirse como un producto –natural o sintético– capaz de causar diversos efectos adversos en el sistema nervioso central (SNC) o periférico (SNP), o en órganos sensoriales (Peris-Sampedro, 2015). La neurotoxicidad depende de la dosis, tiempo de exposición y la ‘sensibilidad’ del individuo expuesto. Los efectos pueden ser transitorios o permanentes, desde náuseas, mareos, trastornos del aprendizaje, memoria o déficit de atención, pasando por una modificación del estado de ánimo y la conducta social, hasta incluso convulsiones, parálisis respiratoria y muerte (Salazar, 2011; Vela, et al., 2003).

1.1 Organofosforados: Concepto y aplicaciones

Los **compuestos organofosforados (OP)** son compuestos orgánicos degradables, ésteres del ácido fosfórico y derivados (**Figura 1**), que pueden clasificarse como agentes neurotóxicos. Están presentes en multitud de productos de nuestro día a día. Se usan como aditivos de petróleo, disolventes, barnices, aislantes eléctricos, colorantes, impermeabilizantes, etc. Son principalmente usados en **plaguicidas**. También se han desarrollado agentes nerviosos (como arma química) basados en OP. Su elevada distribución en la sociedad y el fácil alcance a estos compuestos ha provocado un elevado número de intoxicaciones (Fernández, et al., 2010).

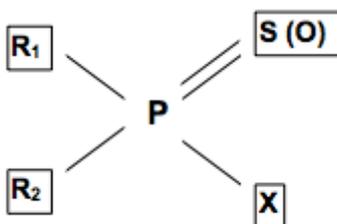


Figura 1 | Estructura química general de los OP. R₁ y R₂ pueden ser grupo alquil-, alcoxi-, alquiltio-, amido-. X puede ser grupo haluro, fenoxi, tiofenoxi, fosfato, carboxilato, etc.

1.2 Clorpirifós

1.2.1 Características y uso

El **clorpirifós (CPF)**, O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridil)fosforotionato, es un **insecticida OP** ampliamente usado para el control de plagas tanto en áreas agrícolas como urbanas, especialmente en países desarrollados. Debido a su estructura (**Figura 2**) es soluble en disolventes orgánicos e insoluble en agua. Su acción insecticida se basa en la **inhibición irreversible de la acetilcolinesterasa**, esencial en el SNC (ver [apartado 1.3](#)). Esto provoca la acumulación de acetilcolina en el espacio sináptico, lo que deriva en una sobreestimulación de los receptores colinérgicos, un colapso del sistema nervioso (síndrome colinérgico) y finaliza con la muerte del insecto.

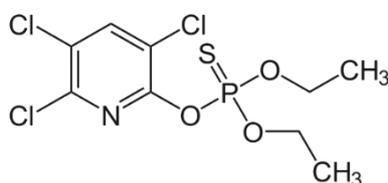


Figura 2| Estructura química del clorpirifós

Se adhiere rápidamente a plantas, suelos y aguas, aunque tiene persistencia relativamente corta en el medio ambiente (entre 6h y 3 días) debido a las diversas vías de degradación posibles (Basaure García, 2017).

Es clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “compuesto moderadamente peligroso”, de clase II, muy tóxico para animales acuáticos (WHO, 2009). En España, a pesar de que desde 2015 está prohibido su uso en diversos cultivos¹, es ampliamente usado para cultivos cítricos, platanera, uva de vinificación y diversos cereales (Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medio Ambiente, 2015).

Debido a su elevada efectividad contra plagas, fácil aplicación y bajo coste, se prevé una expansión de su uso en todo el mundo (Burke, et al., 2017).

¹ Tomate, pimiento, melón, sandía, patata, coles, alcachofa, manzana, pera, melocotón, uva de mesa, frambuesa y arándanos (Ministerio de Agricultura y Pesca y Alimentación y Medio Ambiente, 2015)

1.2.2 Vías de exposición

Las potenciales vías de intoxicación por CPF son por contacto dérmico, inhalación e ingestión. Su principal uso en cultivos hace que los trabajadores agrícolas y sus familias sean los individuos en mayor situación de riesgo (intoxicación ocupacional). Sin embargo, también hay que considerar los posibles efectos derivados de su uso en zonas urbanas (jardines, campos de golf, invernaderos, viveros, y otras zonas industriales), especialmente considerando la fácil dispersión y acumulación del CPF en suelos y aguas (Basaure García, 2017). También se generan intoxicaciones no intencionales, generalmente mediante ingestión de alimentos contaminados (Peris-Sampedro, 2015).

1.2.3 Impacto y patologías derivadas

Aunque es cierto que el CPF (y los OP en general) es menos tóxico en humanos que en insectos y otros animales, la exposición crónica a este insecticida se ha relacionado con efectos neurológicos, trastornos del desarrollo y trastornos autoinmunes, especialmente en niños. Los niños son *per se* más susceptibles y vulnerables a los químicos, debido principalmente al menor peso corporal. Comen más, beben más agua y respiran más rápido, por lo que, a un mismo nivel de exposición, tendrán más “tóxico por unidad de peso corporal” que un adulto (Rauh, 2018). Asimismo, exposiciones a niveles sub-tóxicos (que no producen síntomas de intoxicación), también generan déficits neurológicos en adultos, por lo que el CPF tiene **efecto tanto a corto como a largo plazo** (Burke, et al., 2017).

La exposición al CPF se ha asociado con una mayor susceptibilidad a desarrollar diversas enfermedades neurodegenerativas, como **párkinson** (Deveci & Karapehlivan, 2018), **esclerosis lateral amiotrófica** o **Alzheimer** (Basaure García, 2017) y otros trastornos como **TDH²** (Pallotta, et al., 2017) o **autismo** (Schmidt, et al., 2017). Paralelamente se ha asociado el CPF con un incremento del estrés oxidativo, generando daño celular e incrementando la probabilidad de desarrollar **diabetes** u **obesidad** (Basaure García, 2017). También se ha descrito su efecto como disruptor endocrino, aumentando el riesgo de padecer **cáncer de mama** (Engel, et al., 2017; Ventura, et al., 2016).

² Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad

1.3 Sistema colinérgico: vía de la acetilcolina

La **acetilcolina (ACh)** es el neurotransmisor³ usado por las neuronas colinérgicas, que se encuentran inervando casi todas las regiones del cerebro. Tiene un papel clave en el SNC y SNP, modulando funciones neurales como la atención, aprendizaje, memoria, respuesta al estrés, ciclos de sueño e información sensorial (H. Ferreira-Vieira, et al., 2016). El **sistema colinérgico (Figura 3)** comprende todas aquellas sustancias capaces de producir ACh, alterarla o mimetizar su comportamiento, así como los receptores a los que esta se une.

La ACh es sintetizada en el citoplasma de las neuronas colinérgicas a partir de acetilcoenzima A (acetil-CoA) y colina, mediante la acción de la **colin-acetiltransferasa (ChAT)**. Posteriormente, el **transportador vesicular de la acetilcolina (VAcHT)** transfiere la ACh a vesículas sinápticas, en las que se traslada hacia el espacio sináptico, donde, tras una despolarización, se libera por exocitosis y se une a sus receptores, tanto nicotínicos como muscarínicos (H. Ferreira-Vieira, et al., 2016).

Los **receptores nicotínicos (nAChR)** son canales iónicos transmembranales selectivos de cationes (K^+ , Na^+ y Ca^{2+}). Pertenecen a la superfamilia de receptores *cys-loop*, cuyos ligandos son neurotransmisores (GABA, dopamina, serotonina, **ACh**...). También pueden ser activados por la nicotina. En mamíferos, están formados por 5 subunidades, cuyas agrupaciones forman los diferentes tipos de receptores nicotínicos (difieren en características fisicoquímicas y farmacológicas como la sensibilidad por agonistas y antagonistas). Los receptores nicotínicos neuronales están formados por la combinación de las subunidades α y β . A nivel cerebral, especialmente en hipocampo, los más expresados son el **$\alpha 7$** y el **$\alpha 4\beta 2$** (Fukushima, et al., 2016; Dani, 2015). La activación de estos receptores por la unión de ACh, nicotina u otros agonistas colinérgicos provoca la apertura del canal iónico. Tras ello, hay un movimiento de cationes, que provoca despolarización de la membrana y se produce un potencial post-sináptico. Los receptores, en definitiva, transforman la señal química en impulsos eléctricos, que constituyen la información que se distribuye en el organismo (Posadas, et al., 2013).

³ Biomolécula que permite la transmisión de información entre neuronas o entre una neurona y una célula muscular o glándula, mediante la sinapsis (Ayano, 2016).

Los **receptores muscarínicos (mAChR)** se unen a proteínas G⁴ y generan una cascada de señales que modula la apertura o el cierre de canales iónicos. Pueden ser estimulados por la muscarina. Tienen 5 isoformas (M1→5). **M1**, M3 y M5 se unen a una proteína G estimuladora (Gαq), regulando positivamente la liberación de ACh, mientras que **M2** y M4 se unen a una proteína G inhibidora (Gαi), regulando negativamente la liberación de ACh (H. Ferreira-Vieira, et al., 2016).

En el espacio sináptico, el efecto de la ACh finaliza cuando se hidroliza mediante la **acetilcolinesterasa (AChE)**, formando acetato y colina, la cual se recicla (H. Ferreira-Vieira, et al., 2016). Esta enzima tiene diferentes isoformas según el *splicing* alternativo. Las más importantes en el sistema nervioso son: **AChE-R**, forma monómera soluble que se expresa en situaciones de estrés (y en pacientes con Alzheimer), y **AChE-S**, que generalmente se expresa como tetrámero anclado a la membrana, pero puede expresarse de forma soluble o anfipática en monómeros (G1), dímeros (G2) o tetrámeros (G4) (Sánchez-Chávez & Salceda, 2008; Zimmerman & Soreq, 2006).

En vertebrados, además de la AChE, existe otra forma de colinesterasa, la **butirilcolinesterasa (BChE)**, cuyo papel fisiológico ha sido estudiado desde 1940s y aún no está del todo claro. Se conoce que, en humanos, esta enzima está distribuida en casi todos los tejidos (predominantemente en plasma, hígado y células musculares y neurales), en cantidades hasta 10 veces superior a la AChE (Lockridge, 2015). A nivel cerebral, su origen es predominantemente glial (mientras que la AChE tiene origen neuronal). A pesar de que la ausencia de esta enzima no provoca alteraciones fisiológicas ni en ratones ni en humanos, recientemente se han confirmado diversas funciones (Li, et al., 2017). Entre ellas, destaca su participación en la biotransformación de sustancias como cocaína, heroína, ácido acetilsalicílico, diversos OP, etc. Concretamente, a nivel plasmático la BChE actúa rápidamente contra los OP, incluso en dosis sub-tóxicas, por lo que se emplea como biomarcador de la exposición a los OP. Además, en situaciones de deficiencia de AChE, respalda su función de hidrólisis de ACh (Basaure García, 2017; Johnson & Moore, 2012).

⁴ Las proteínas G son transductores de señales que llevan la información desde el receptor hasta las proteínas efectoras

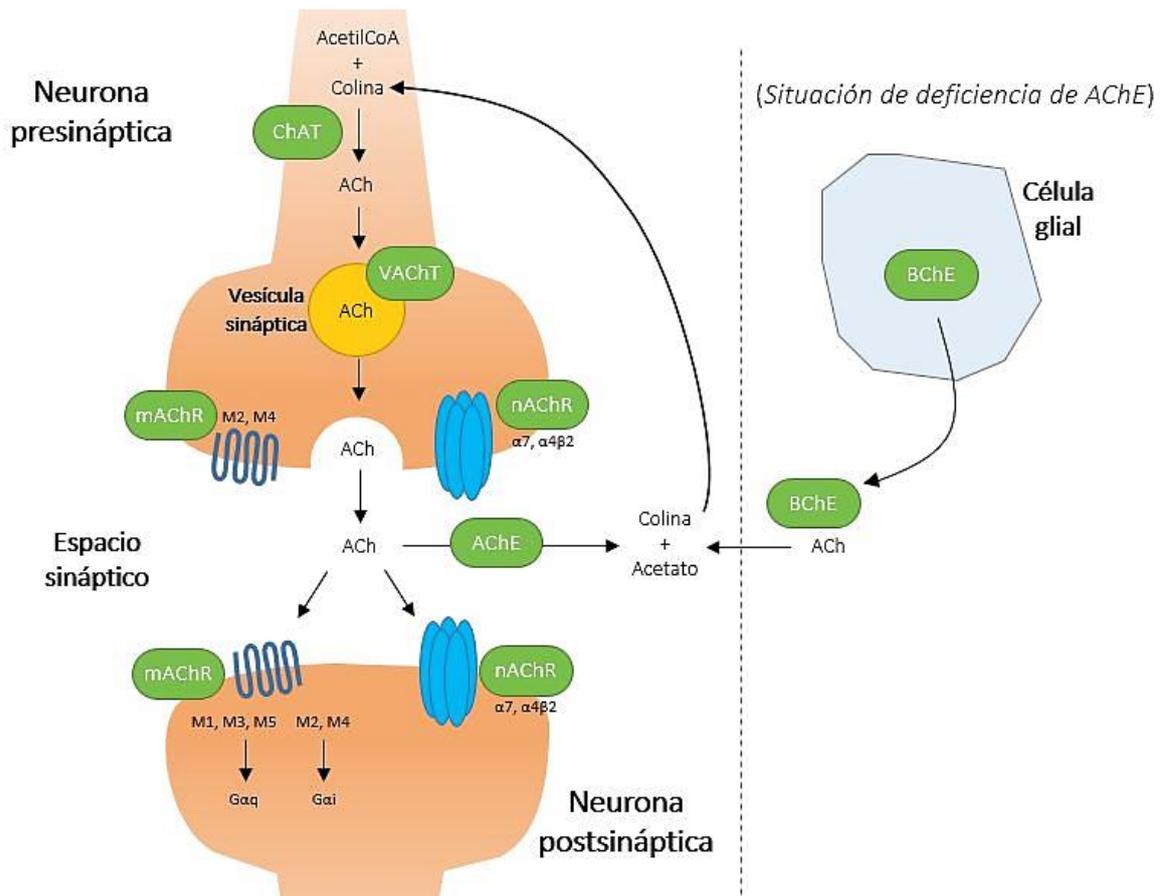


Figura 3] Vía de la acetilcolina. Imagen propia adaptada de (H. Ferreira-Vieira, et al., 2016; Basicmedicalkey, 2018)

1.4 Enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer

Las **enfermedades neurodegenerativas** son causadas por la degeneración crónica progresiva del SNC, caracterizada por la deterioración y disfunción de un elevado número de neuronas. Debido al aumento de esperanza de vida en la sociedad, estas enfermedades se han convertido en un problema esencial (Li, et al., 2017).

La **enfermedad de Alzheimer (EA)** es la demencia senil más común, afectando a 50 millones de personas en todo el mundo (Cubinkova, et al., 2018). Uno de los primeros síntomas suele ser la pérdida de la memoria a corto plazo, seguida de confusión mental, pérdida de memoria a largo plazo, dificultades en el habla, deficiencia motriz y finalmente la muerte (H. Ferreira-Vieira, et al., 2016). El mayor factor de riesgo es la edad, aumentando exponencialmente la incidencia en personas mayores de 65 años. Es predominante en mujeres y se ve potencialmente influenciada por factores

ambientales, estilo de vida, problemas cardiovasculares y antecedentes familiares de demencia, entre otros (Cubinkova, et al., 2018; Hampel, et al., 2018).

Fisiológicamente, se caracteriza por una atrofia progresiva a nivel cerebral (**Figura 4**), debida a la pérdida neuronal y dendrítica. El hipocampo es una de las zonas más afectadas, y comienza a atrofiarse hasta 5 años antes de que pueda darse un diagnóstico de demencia. Se estima que la pérdida de volumen en esta zona es de un 3-5% por año. De esta manera, individuos “levemente” afectados de EA, presentan una pérdida del 15-25% del volumen de hipocampo (Johnson, et al., 2012). Daños en esta estructura explican los problemas de memoria (imposibilidad de formar nuevos recuerdos) y desorientación (afectación de la memoria espacial) en pacientes con EA.

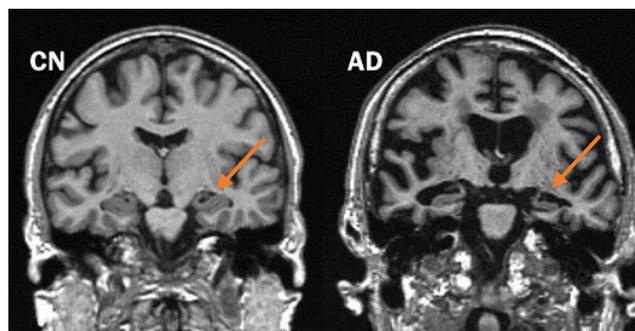


Figura 4 | Imagen por RMN de los cambios fisiológicos a nivel cerebral en la EA (AD), comparados con un sujeto sano (CN). La flecha marca el hipocampo. Fuente (Vemuri & Jack, 2010)

1.4.1 Patogénesis de la EA

En primer lugar, es importante diferenciar entre dos tipos de Alzheimer, el familiar y el esporádico. Se denomina **Alzheimer familiar** a aquel ocasionado por **mutaciones autosómicas dominantes**, concretamente en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*. También se denomina Alzheimer precoz, ya que suele aparecer antes de los 65 años. Sin embargo, solo representa un **1%** de los casos de Alzheimer. El **Alzheimer esporádico** es el más común. Su fisiopatología concreta aún no está clara, aunque se conocen muchos factores involucrados (Cubinkova, et al., 2018).

I. Placas amiloides y proteína Tau: principales componentes patológicos de la EA

Las **placas amiloides** están formadas por acumulación y precipitación del péptido β -amiloide (β A), que se forma tras la proteólisis de la Proteína Precursora Amiloidea (APP).

Sin embargo, recientemente se ha confirmado que los depósitos de proteína amiloide no se correlacionan con la pérdida de funciones cognitivas. La **proteína Tau** es una fosfoproteína que se encuentra casi exclusivamente en el SNC. Su función principal consiste en estabilizar el citoesqueleto neuronal mediante la interacción con la tubulina. Cuando la Tau se **hiperfosforila** da lugar a los “**ovillos neurofibrilares**” –agregados proteicos insolubles en las neuronas–. Varios estudios demuestran una estrecha relación entre estos ovillos y el deterioro cognitivo, siendo suficientes para causar neurodegeneración, incluso en ausencia de placas amiloides (Cubinkova, et al., 2018).

II. Sistema colinérgico en la EA

El sistema colinérgico juega un papel fundamental en la cognición y una disminución de su actividad está directamente relacionada con el deterioro cognitivo propio de las demencias, incluida la EA. La hipótesis colinérgica se centra en la pérdida progresiva de la inervación de las neuronas colinérgicas en enfermos de EA. Esta pérdida parece estar asociada a la formación de los ovillos, tras lo cual los microtúbulos (con los que interacciona la Tau) se desintegran y causa una disfunción en la sinapsis entre neuronas, finalizando con la muerte de estas (Cubinkova, et al., 2018; Hampel, et al., 2018). Paralelamente, se ha encontrado que las placas amiloides pueden ser formadas tanto por AChE como por BChE, y que inhibidores de estas enzimas reducen significativamente su acumulación (Li, et al., 2017).

III. Alelo $\epsilon 4$

Junto con la edad, poseer el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (APOE4) es el principal factor de riesgo para la EA de tipo esporádico, estando relacionado con las alteraciones de βA y Tau. Se ha demostrado que este genotipo puede influir en los mecanismos compensatorios colinérgicos; concretamente está asociado con déficits en la compensación del hipocampo (Bott, et al., 2016). La proteína apoE4 reduce la liberación de ACh en el hipocampo de ratones machos adultos (Dolejší, et al., 2016).

1.4.2 Tratamiento

Actualmente, la mayoría de los fármacos que se encuentran en el mercado⁵ actúan como inhibidores de las colinesterasas, para intentar restaurar los niveles de ACh y reducir las placas amiloides (Hampel, et al., 2018). Sin embargo, tienen diversos efectos adversos, como náuseas, vómitos, etc. (Li, et al., 2017) y su efectividad es solo a corto plazo (H. Ferreira-Vieira, et al., 2016) por lo que son necesarias nuevas estrategias para tratar esta enfermedad. Otras opciones de fármacos podrían tener como objetivo los receptores colinérgicos, u otros componentes de esta vía.

1.5 Estudios previos

Diversos estudios han analizado los efectos derivados de la exposición crónica al CPF (Pallotta, et al., 2017), así como el efecto de otros genotipos (apoE3 (Basaure García, 2017; Peris-Sampedro, 2015), Tg2576 (Salazar, 2011), etc.). Asimismo, la mayoría de los estudios se realizan únicamente con machos (por ejemplo (Dolejší, et al., 2016)), sin considerar posibles diferencias entre sexos. En fases previas de este estudio se han realizado pruebas conductuales a los ratones donde han mostrado diferencias significativas entre machos y hembras. No existen estudios previos sobre los posibles efectos a largo plazo derivados de una exposición postnatal, evaluando la influencia sobre el genotipo apoE4, en ambos sexos por separado.

⁵ Por ejemplo, Donepezil, Rivastigmina o Galantamina. No se han aprobado nuevos fármacos para la EA por la FDA desde 2003 (Hampel, et al., 2018)

2. Hipótesis y objetivos

El **clorpirifós (CPF)** es un compuesto organofosforado (OP) con acción insecticida, ampliamente utilizado tanto en áreas agrícolas como urbanas. Debido a los posibles efectos neurotóxicos de los OP, una **exposición temprana** al plaguicida CPF podría causar cambios irreversibles a nivel cerebral, causando efectos dañinos **a largo plazo** sobre el **sistema colinérgico**. Paralelamente, el **genotipo apoE4** resulta un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer, y puede afectar al sistema colinérgico en un nivel que module el efecto del CPF sobre el individuo.

Por tanto, el objetivo principal de este estudio es comprobar los posibles efectos neurotóxicos a largo plazo de la exposición temprana al CPF en ratones machos y hembras, así como la influencia del genotipo apoE4. De este objetivo general se podrían subdividir los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar las diferencias de expresión génica de la vía colinérgica entre los diferentes grupos, y evaluar si existe influencia del genotipo y/o del tratamiento con CPF.
- Determinar si las variables genotipo y/o tratamiento influyen de manera diferente según el sexo.

3. Metodología y plan de trabajo

3.1 Animales

Para este estudio se han utilizado ratones transgénicos portadores del gen humano *APOE* en lugar del gen murino⁶, suministrados por *Taconic Biosciences* (EEUU). Concretamente expresan la isoforma **apoE4** humana (Knouff, et al., 1999), siendo por tanto un modelo transgénico con factor de riesgo para la EA. Los ratones eran de la especie *Mus musculus*, con *background* genético **C57BL/6**, ampliamente usados como organismo modelo para investigaciones biomédicas y biotecnológicas, debido a que son pequeños animales con un genoma muy similar al de los humanos, de fácil manipulación e introducción de mutaciones, bajo coste y rápida gestación con elevado número de crías. Son además la cepa endogámica de ratón de laboratorio más usada para el estudio de patologías humanas.

Se usaron ratones machos y hembras. Para cada sexo se establecieron 4 grupos con una n=5 (40 individuos en total). Para definir los grupos a los que pertenecía cada individuo se usó una **nomenclatura** específica basada en 3 dígitos (**Tabla 1**). El primero corresponde al genotipo, que puede ser 5 (correspondiente a C57BL/6) o 4 (correspondiente a apoE4). El número central corresponde al tratamiento, siendo 0 los no tratados y 1 los tratados. Por último, se expresa el sexo, con un 1 los machos y un 2 las hembras.

Tabla 1 | Nomenclatura usada para definir los grupos

501/502	Grupo control C57BL/6 macho/hembra
511/512	Grupo tratado con CPF C57BL/6 macho/hembra
401/402	Grupo control apoE4 macho/hembra
411/412	Grupo tratado con CPF apoE4 macho/hembra

El estabulario donde habitaban los ratones se mantuvo a una temperatura de 22±2°C, con humedad relativa de 50±10 %, equipada con luz automática de ciclos de 12h de

⁶ La cepa concreta de los ratones transgénicos es B6.129P2-*ApoE^{tm3(APOE*4)Mae}* N8

luz/oscuridad, con comida (dieta normal) y agua *ad libitum*. El uso de estos animales y el protocolo experimental fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad Rovira i Virgili.

3.2 Compuesto químico

El compuesto usado como tratamiento es el **clorpirifós**, pesticida organofosforado inhibidor de la acetilcolinesterasa, suministrado por Sigma-Aldrich (Alemania). Dicho tóxico fue disuelto en aceite vegetal y administrado por vía *gavage* con ayuda de una micropipeta. Se aplicó una concentración de 1mg/kg/día (dosis baja pero superior a la que se estima que podríamos estar expuestos por su presencia en el ambiente).

3.3 Diseño experimental

El procedimiento llevado a cabo se muestra en la **Figura 5**.

Primeramente, cuando los ratones alcanzaron los 10-15 días de edad, se realizó la exposición al pesticida CPF (tratamiento postnatal) a los grupos correspondientes, durante 6 días consecutivos. A los grupos no tratados se les administró únicamente aceite vegetal. A los 9 meses, todos los ratones realizaron una serie de pruebas conductuales⁷ relacionadas con el aprendizaje y la memoria espacial. Tras ello, fueron sacrificados por decapitación (tras anestesia con isoflurano). Se obtuvo el cerebro de todos los ratones y se extrajo el hipocampo, trabajando en frío y de manera rápida; posteriormente se congeló a -80°C. Esta fracción se sumergió en una solución de *RNAlater*[®]-*ICE*⁸ (durante como mínimo 16h), para evitar su degradación. Posteriormente, se extrajo el ARN de las muestras para realizar una evaluación de la expresión génica.

⁷ *Morris Water Maze*: Piscina dividida en 4 cuadrantes con una plataforma en uno de ellos. Primero se evalúa la “adquisición” (tiempo que tardan en localizar la plataforma) y posteriormente se quita la plataforma y se evalúa la “retención” (preferencia por el cuadrante donde estaba la plataforma)

⁸ *RNAlater*[®]-*ICE Frozen Tissue Transition solution* (Ref. AM7030, ThermoFisher EEUU) permite preservar la integridad del ARN y evitar su degradación al manipularlo a temperatura ambiente.

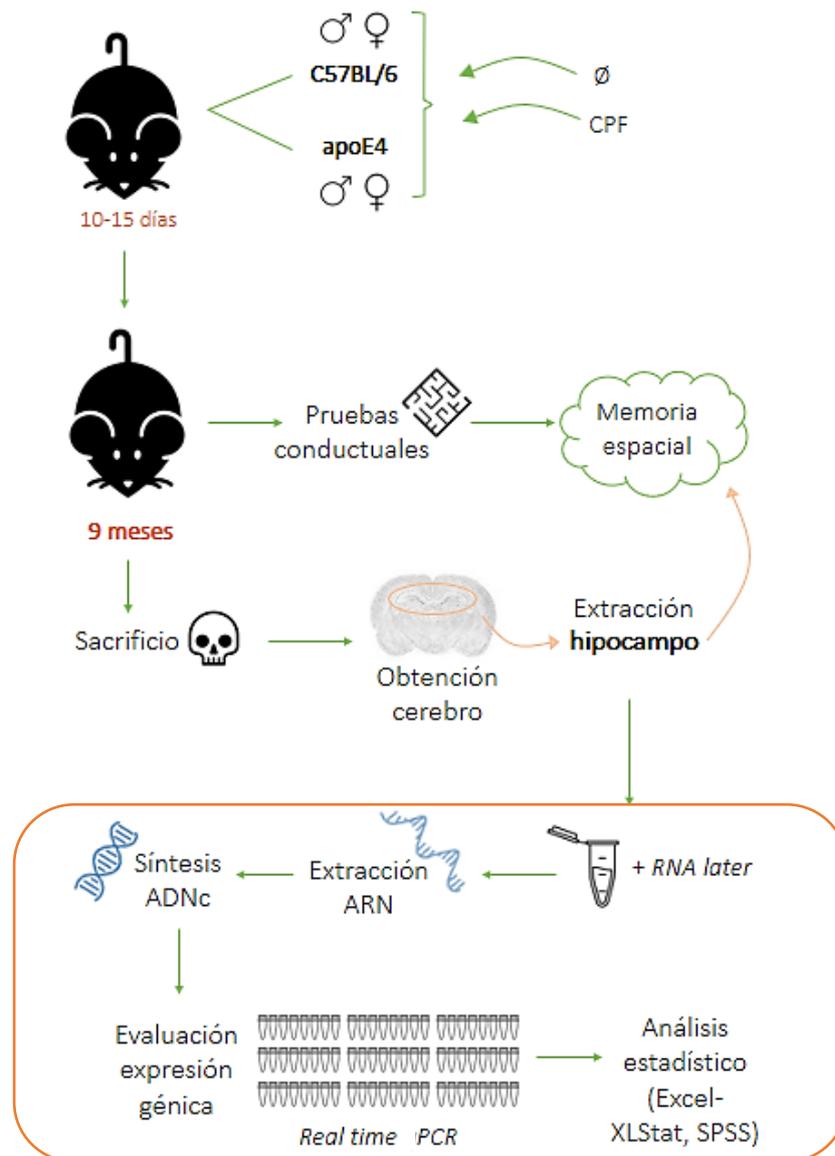


Figura 5| Procedimiento completo seguido hasta realizar la evaluación de la expresión génica. Los pasos recuadrados corresponden al trabajo realizado en el laboratorio

Trabajo en laboratorio

Durante todo el procedimiento se aseguró la asepsia y esterilidad del lugar de trabajo y del operador, mediante el uso de bata de laboratorio, guantes y una solución *RNase free* para eliminar la posible contaminación por nucleasas (*RNaseZap*® de ThermoFisher (EEUU), referencia AM9780). Las puntas de pipetas y los diferentes tubos empleados también eran libres de nucleasas.

3.4 Extracción de ARN

Todo el material utilizado aseguraba un ambiente libre de RNasas.

Para la extracción de ARN de las muestras de tejido de hipocampo de los ratones, se utilizó el **Speedtools total RNA extraction kit** de Biotools (España). Este kit se basa en un diseño de columnas que permite una extracción rápida y eficaz del ARN, con un ratio $A_{260/280}$ normalmente superior a 1,9 (para ARN puro se estima un ratio de 2).

Primeramente, se pesaron las muestras en una balanza analítica, para asegurar que no superaban los **0,03 g** (límite de saturación de las columnas). Posteriormente se procedió a la **homogenización y lisis celular**, empleando un homogeneizador de vidrio esmerilado con una solución de 350 μ l de *Lysis buffer LR* y 3,5 μ l de β -mercaptoetanol. Esta solución contiene enzimas líticas y sales caotrópicas para inactivar las RNasas y crear las condiciones idóneas para la posterior unión del ARN a la membrana de la columna. El lisado se cargó en una columna de **filtrado**, y se centrifugó⁹ 1 min, para clarificar y reducir la viscosidad. La columna se descartó y se añadieron 350 μ l de etanol 70%. Posteriormente la mezcla se cargó en una columna de **unión de ARN**, y se centrifugó 30 seg. Estas columnas disponen de una membrana de sílica donde se produce la absorción reversible de ácidos nucleicos. Tras ello, **se eliminan las sales** de la membrana mediante el *Buffer DBR* (350 μ l) y centrifugando 1 min. El **ADN** de la muestra unido a la membrana **se elimina** mediante tratamiento con *rDNasa + buffer rDNasa* (95 μ l de la mezcla 1:10). La solución se dejó incubar 15min, a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un **lavado de la columna** para eliminar los restos de posibles contaminantes. Para ello se emplearon 3 buffers de lavado: 200 μ l de *WR1*, que inactiva la *rDNasa* (se centrifuga 30 seg), 600 μ l de *WR2* (se centrifuga 30 seg) y 250 μ l de *WR2* (se centrifuga 2 min). Por último, se colocó la columna en un nuevo tubo y se **eluyó el ARN puro** añadiendo 25 μ l¹⁰ de agua libre de RNasas en la membrana (se centrifuga 1 min). Dichos tubos se almacenaron a -20 °C. Para **cuantificar la concentración** (ng/ μ l) y **pureza** (ratio $A_{260/280}$) **del ARN** se usó el espectrofotómetro *EPOCH 2 – microplate reader*, de BioTek (EEUU).

⁹ Todas las centrifugaciones se realizaron a 11000 g. Se empleó la *Spectrafuge 24D*, de Labnet (EEUU).

¹⁰ El protocolo requería 60 μ l. Sin embargo, un menor volumen asegura mayor concentración de ARN

3.5 Síntesis de ADNc

Durante el procedimiento se mantuvieron todos los reactivos y muestras en frío.

Se utilizó el **Maxima First Strand cDNA Kit for RT-qPCR**, de ThermoScientific (EEUU). Este kit utiliza la Transcriptasa inversa Maxima, capaz de sintetizar ADNc a elevadas temperaturas, a partir de muestras de ARN de entre 1pg-5µg. Cada tubo de PCR contenía 4 µl de *5X Reaction Mix* y 2 µl de *Maxima Enzyme Mix*.

El volumen de cada muestra de RNA se adaptó para que hubiera **1 µg**, teniendo en cuenta la concentración cuantificada anteriormente. Por último, se añadió H₂O libre de nucleasas, hasta un volumen final de 20 µl. El programa establecido en el termociclador se muestra en la **Figura 6j**Error! No se encuentra el origen de la referencia..

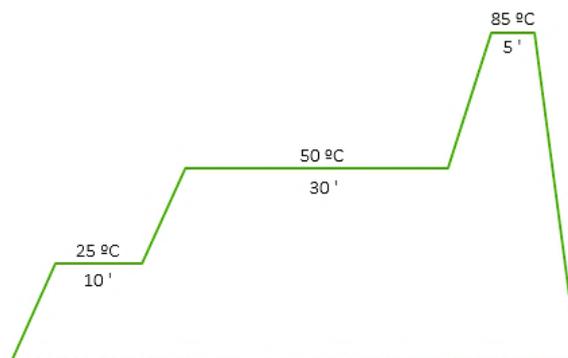


Figura 6j Programa del termociclador establecido para la RT-qPCR

Finalmente, las muestras de ADNc se diluyen en 40 µl de H₂O libre de nucleasas, quedando una concentración final de 0,016 µg/µl.

3.6 Evaluación de la expresión génica – *real time* qPCR

Durante el procedimiento se mantuvieron todos los reactivos y muestras en hielo. Para realizar dicha evaluación se empleó el *Rotor-Gene Q*, de Qiagen (Alemania), y su correspondiente *software*.

Se evaluó la expresión de **9 genes de la vía colinérgica**: *mAChR-M1*, *mAChR-M2*, *nAChR-α4*, *nAChR-α7*, *VACHT*, *CHAT*, *AChE-S*, *AChE-R*, *BChE*, y se empleó **GAPDH** como gen constitutivo. De cada uno de estos genes se sintetizaron los correspondientes *primers* (**Tabla 2**), por ThermoFisher (EEUU).

Tabla 2 | Secuencia de *primers* usados para el análisis de expresión génica

<i>Gen</i>	Forward primer	Reverse primer	<i>Referencia</i>
<i>mAChR-M1</i>	TGACAGGCAACCTGCTGGTGCT	AATCATCAGAGCTGCCCTGCGG	(Laspas, et al., 2015)
<i>mAChR-M2</i>	CGGACCACAAAAATGGCAGGCAT	CCATCACCACCAGGCATGTTGT TGT	(Laspas et al. 2015)
<i>nAChR-α4</i>	GTTCTATGACGGAAGGGTGCAGT GGACA	GGGATGACCAGCGAGGTGGAC GGGATGAT	(Léna, et al., 1999)
<i>nAChR-α7</i>	GTGGAACATGTCTGAGTACCCCG GAGTGAA	GAGTCTGCAGGCAGCAAGAATA CCAGCA	(Léna et al. 1999)
<i>VACht</i>	TCACTCACTTGGCTTTGAGC	GGTTCATCAAGCAGCACATC	(Yamamuro & Aizawa, 2010)
<i>CHAT</i>	TGTCATCGTGGCCTGCTGCAA	CTCGCTCCTCCCGTCTGACGT	(García-Gómez, et al., 2015)
<i>AChE-S</i>	CTGAACCTGAAGCCCTTAGAG	CCGCCTCGTCCAGAGTAT	(Dori et al. 2011)
<i>AChE-R</i>	GAGCAGGGAATGCACAAG	GGGGAGGTGGAGAAGAGAG	(Dori et al. 2011)
<i>BChE</i>	TAGCACAATGTGGCCTGTCT	ATTGCTCCAGCGATGAAATC	(García-Gómez et al. 2015)
<i>GAPDH</i>	ACAACCTTGGCATTGTGGAA	GATGCAGGGATGATGTTCTG	(Yao, et al., 2016)

Se utilizó el kit **Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)**, de Thermo Fisher (referencia K0222), que asegura elevada reproducibilidad, sensibilidad y especificidad en el estudio de la expresión génica. La mix es una solución que contiene la polimerasa, los dNTPs y los *buffers* correspondientes, así como el fluorocromo *SYBR Green*, optimizados para la qPCR. Cada tubo de PCR contenía 12,5 μ l de la mix, el volumen correspondiente de cada *primer* para obtener una concentración final de 0,3 μ M, 2 μ l de muestra de ADNc (se añaden al final) y H₂O libre de nucleasas, hasta un volumen final de 25 μ l. Cada muestra se realiza por duplicado. Posteriormente, se colocan los tubos en el rotor (**Figura 7**) en el orden correspondiente. El programa del termociclador se configura mediante el *software* de *Rotor-Gene Q*, seleccionando el protocolo “*three-step cycling*”. La configuración establecida se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3 | Programa establecido para la *real time* PCR

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	95	600
Ciclo		
Desnaturalización	95	15
Alineamiento	65*	30
Extensión	72	30

* Se establece una temperatura de 65°C marcando la opción *touchdown*, de manera que por cada ciclo disminuirá 1°C, durante un total de 5 ciclos. La temperatura final será 60°C.

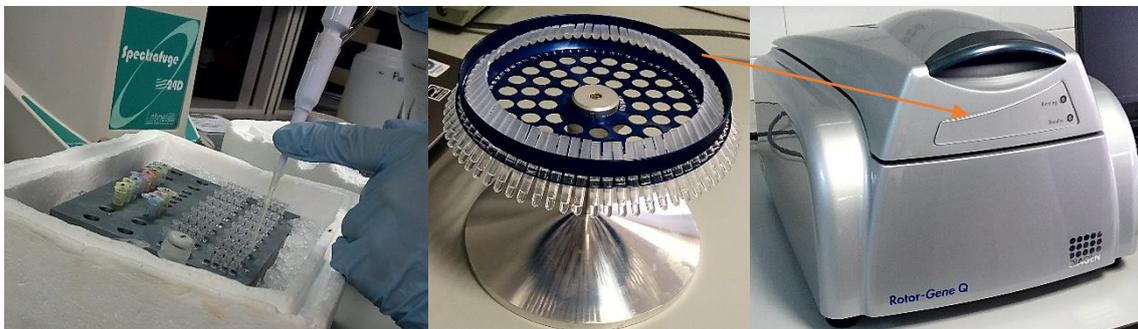


Figura 7 | Preparación de tubos para la *real time* qPCR, posterior colocación en el rotor y equipo utilizado.

El *software* del *Rotor-Gene Q* aporta los datos de *Cycle threshold* (**Ct**), es decir, el número de ciclos de PCR tras los que la fluorescencia del *SYBR Green* supera el umbral establecido para dicho fluorocromo. Este valor es inversamente proporcional a la expresión relativa del gen.

3.7 Tratamiento de datos y análisis estadístico

Los datos de Ct obtenidos previamente, mediante Excel, se expresan como “*fold change*” usando el **método $2^{-\Delta\Delta Ct}$** ⁽¹¹⁾, que permite una cuantificación relativa de la expresión de cada gen en comparación al GAPDH (control endógeno). De estos datos se hace un análisis de **outliers** con SPSS, los cuales se eliminan.

¹¹ $\Delta Ct = Ct$ del gen – Ct GAPDH. Posteriormente se hace un promedio de los controles de cada sexo (501 y 502). $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ – promedio. Por último, se realiza la potencia negativa en base 2.

Se realizan 2 análisis estadísticos: Análisis de Componentes Principales y ANOVA. En concreto, se realizan tres análisis ANOVA de un factor (para grupo, genotipo y tratamiento), complementados con *post-hoc* Tukey, y un análisis ANOVA multifactorial (para genotipo*tratamiento). Machos y hembras se analizan por separado.

3.7.1 Análisis de Componentes Principales (ACP)

Realizado con XLStat en Excel. Es un análisis descriptivo que permite disminuir el número de variables, calculando un nuevo número de variables basado en combinaciones lineales entre las anteriores (se excluyen las que tengan menos influencia a la hora de establecer diferencias entre los individuos). De esta manera, nos quedaríamos con 2 factores –en este caso– que pueden explicar como mínimo el 50% de la variabilidad existente entre las muestras. Se obtiene gráfico de observaciones y círculo de correlaciones.

3.7.2 ANOVA y *Post-hoc* (Tukey)

Realizado con SPSS. El ANOVA es el análisis de la varianza de un factor, que compara varios grupos en una variable cuantitativa. Es una generalización, es decir, nos permite determinar si existen diferencias significativas en un gen mediante el nivel de significación. Si es $\leq 0,05$, significa que existen diferencias significativas entre los grupos (inter-grupos).

El *post-hoc* aporta una tabla de comparaciones múltiples donde se comparan los diferentes grupos 2 a 2. Los grupos cuyas medias difieren a nivel de 0,05 son los que presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí (más concreto que la tabla ANOVA). Solo puede realizarse si existen más de 2 grupos, por lo que para los ANOVA de genotipo y tratamiento no se realiza esta tabla.

4. Resultados

Los resultados se expresan usando la nomenclatura descrita [en metodología](#).

Los resultados del ACP muestran diferencias en la expresión génica entre sexos (Figura 8), por lo que, confirmando lo observado tras las pruebas conductuales, se realiza el análisis de manera independiente para cada sexo.

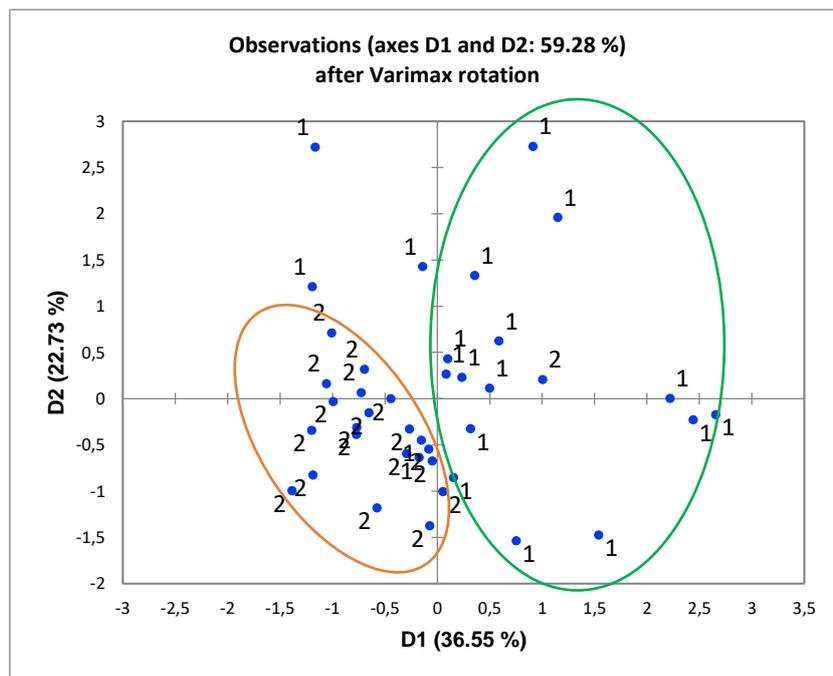


Figura 8| Agrupación de machos (valor 1, elipse verde) y hembras (valor 2, elipse naranja) tras ACP. Algunos puntos quedan excluidos de las elipses para definir de manera más sencilla las agrupaciones (engloban una mayoría). El factor D1 (eje X) explica un 36,55% de la variabilidad entre muestras; el D2 (eje y) un 22,73% (Total 59,28%)

4.1 Machos

Tras el análisis ANOVA para el **factor grupo**, se concluye que hay diferencias significativas inter-grupo en la expresión de los genes **AChE-R** (Sig. 0,002), **mAChR-M2** (Sig. 0,017) y **VAcHT** (Sig. 0,041). Analizando la tabla de comparaciones múltiples, solo se observan diferencias significativas en el gen **AChE-R** (**Figura 9A**), entre los grupos 501 y 401, así como 511 y 401. Entre los grupos 511 y 411 no hay una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,074$), pero puede observarse cierta tendencia de aumento en el genotipo apoE4. Para los genes **mAChR-M2** (**Figura 9B**) y **VAcHT** (**Figura 9C**) en el *post-hoc* no se observan diferencias significativas entre ninguno de los grupos, pero el p valor entre algunos de ellos es muy cercano a 0,05.

Tras el ANOVA para el **factor genotipo**, se observa que los genes **AChE-R** y **VAcHt** presentan un aumento significativo de expresión en los individuos apoE4 (**Figura 10**), lo que confirma los resultados observados para el factor grupo.

En cuanto al **factor tratamiento**, existe una disminución significativa de la expresión de **AChE-R** tras la exposición al CPF. Para el gen **AChE-S** no se obtienen diferencias significativas, pero su p valor es muy cercano a 0,05 y visualmente puede observarse una tendencia de disminución de su expresión (**Figura 11**).

Respecto al ANOVA **genotipo*tratamiento**, los resultados muestran diferencias significativas en los genes **mAChR-M2** (Sig. 0,026) y **CHAT** (Sig. 0,017). Como puede observarse en la **Figura 12**, para ambos genes hay un aumento de expresión en los individuos C57BL/6 tras la exposición al CPF respecto a los no tratados, mientras que, por el contrario, disminuye su expresión en los apoE4 expuestos al CPF.

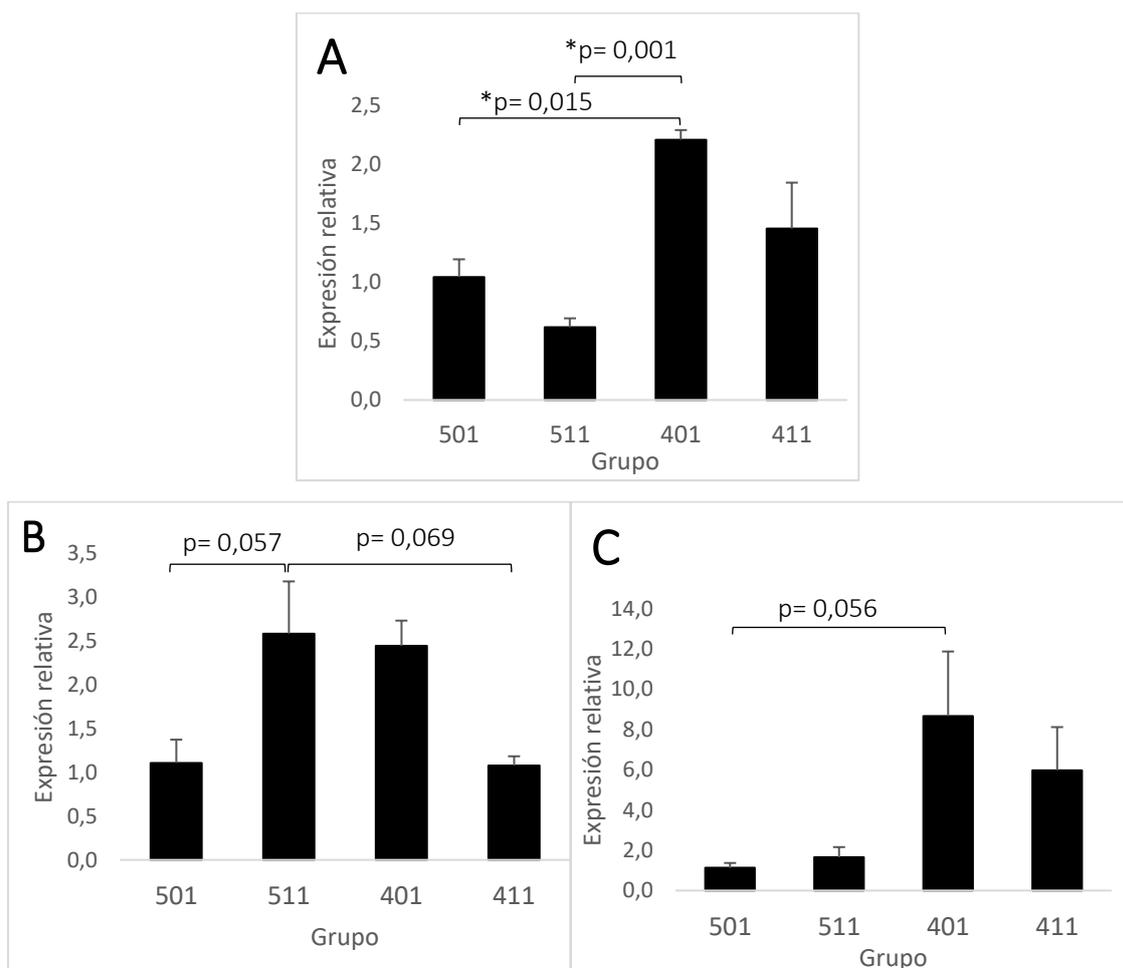


Figura 9| Promedio de la expresión relativa \pm error estándar, en función del grupo, de los genes AChE-R (A), mAChR-M2 (B) y VAcHt (C), en machos. Se muestra p valor (*= $p \leq 0,05$)

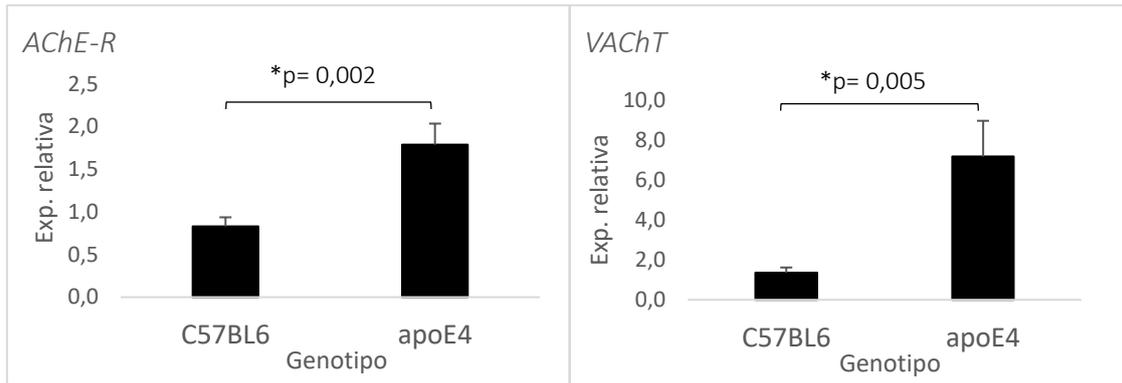


Figura 10 | Promedio de la expresión relativa \pm error estándar, en función del genotipo, de los genes AChE-R (IZQ) y VAcHT (DCHA), en machos. Se muestra p valor (*= $p \leq 0,05$)

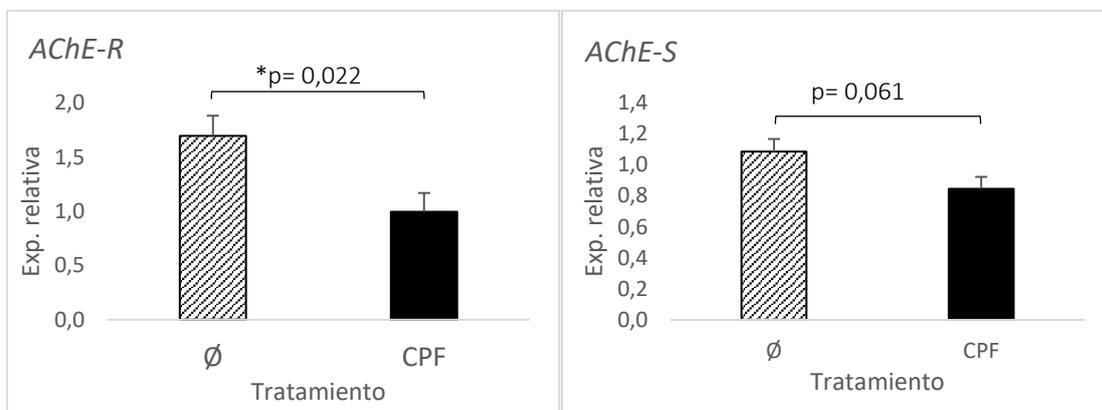


Figura 11 | Promedio de la expresión relativa \pm error estándar, en función del tratamiento, de los genes AChE-R (IZQ) y AChE-S (DCHA), en machos. Se muestra p valor (*= $p \leq 0,05$)

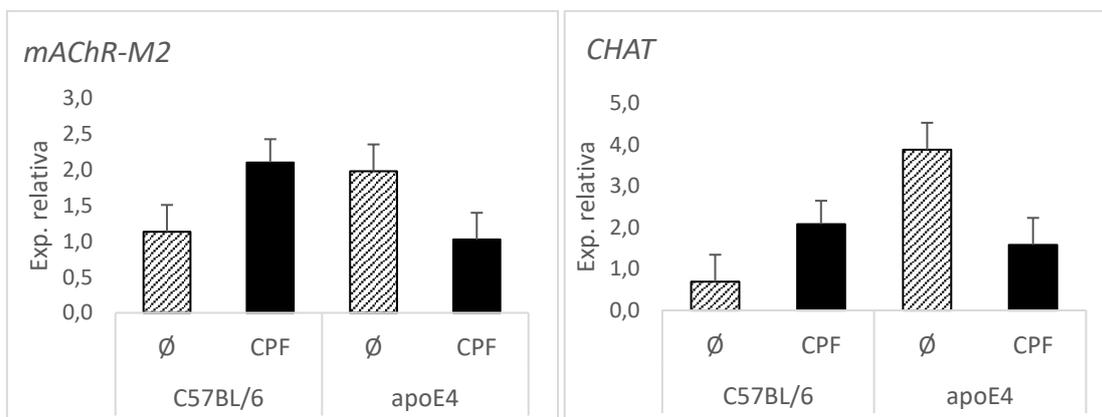


Figura 12 | Promedio de la expresión relativa \pm error estándar, en función del genotipo*tratamiento, de los genes mAChR-M2 (IZQ) y CHAT (DCHA), en machos.

4.2 Hembras

Tras el análisis ANOVA para el **factor grupo**, se concluye que hay diferencias significativas inter-grupo en la expresión de los genes **AChE-S** (Sig. 0,038) y **BChE** (Sig. 0,027). Analizando la tabla *post-hoc*, solo se observan diferencias significativas en el gen **AChE-S** (**Figura 13A**), entre los grupos 502 y 402 (indicando una influencia del genotipo). Entre los grupos 502 y 512 el p valor es muy cercano a 0,05, por lo que podría considerarse una posible influencia del tratamiento. Para el gen **BChE** (**Figura 13B**) no se observan diferencias significativas entre ninguno de los grupos, siendo el p valor más cercano al 0,05 el existente entre los grupos 512 y 412.

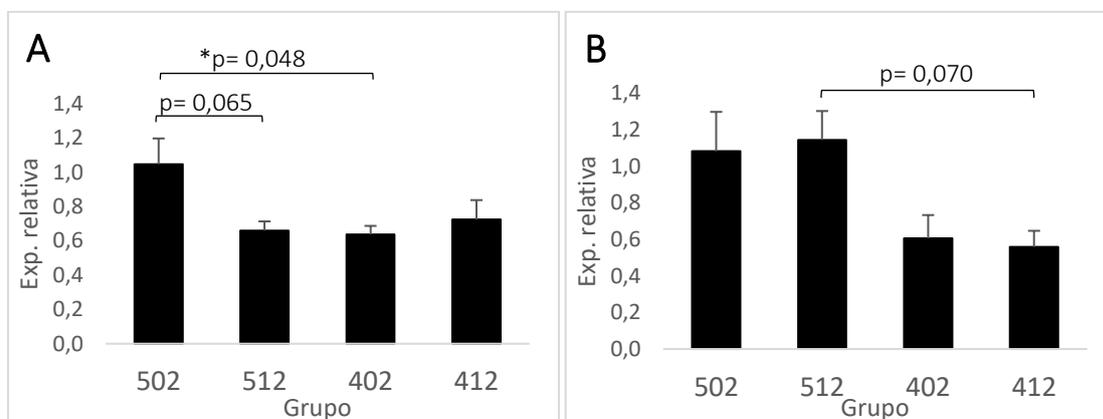


Figura 13 | Promedio de la expresión relativa \pm error estándar, en función del grupo, de los genes **AChE-S** (A) y **BChE** (B), en hembras. Se muestra p valor (*= $p \leq 0,05$)

Mediante un ANOVA para el **factor tratamiento** se concluye que no hay diferencias significativas, a pesar de la posible tendencia descrita para el gen **AChE-S**.

Respecto al ANOVA para el **factor genotipo**, se observa una disminución de expresión del gen **BChE** en los individuos apoE4, confirmando la tendencia observada tras el ANOVA factor grupo. Por otro lado, aumenta significativamente la expresión de **nAChR- α 4** en estos individuos (**Figura 14**).

En cuanto al ANOVA **genotipo*tratamiento** tampoco hay diferencias significativas, pero en el gen **nAChR- α 7** (**Figura 15**) se observa cierta tendencia a aumentar la expresión en los individuos C57BL/6 tras la exposición al CPF, mientras que, por el contrario, disminuye su expresión en los apoE4 expuestos al CPF, con un nivel de significancia del 0,054.

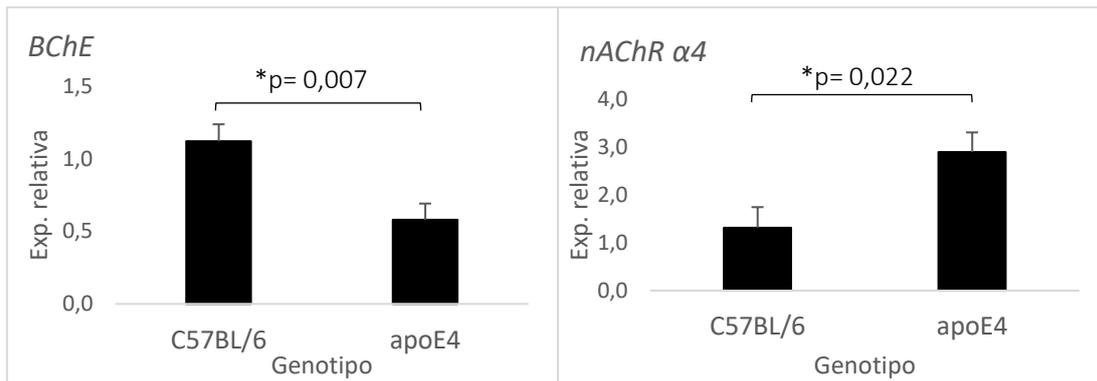


Figura 14 | Promedio de la expresión relativa \pm error estándar, en función del genotipo, de los genes BChE (IZQ) y nAChR- $\alpha 4$ (DCHA), en hembras. Se muestra p valor (*= $p \leq 0,05$)

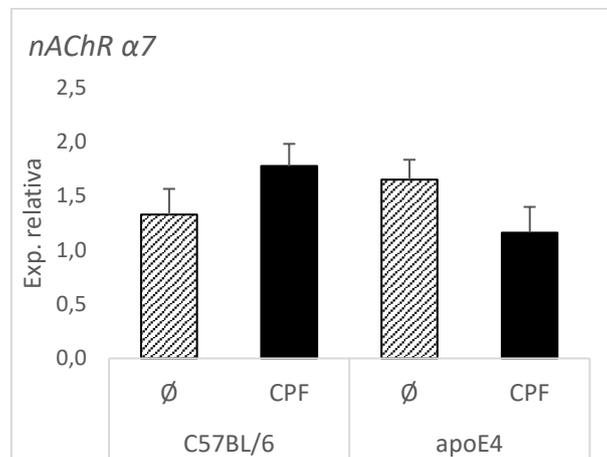


Figura 15 | Promedio de la expresión relativa \pm error estándar, en función del genotipo*tratamiento, del gen nAChR- $\alpha 7$, en hembras.

5. Discusión

Tras el análisis de los resultados obtenidos, puede destacarse la influencia del **genotipo** en la expresión de los genes involucrados en la vía colinérgica, así como en la respuesta a una exposición a tóxicos. De igual manera, hemos observado una evidente diferencia entre ambos **sexos**, tanto en los grupos control como en los tratados, así como en el patrón de respuesta ante el **tratamiento**. Esto corrobora resultados obtenidos anteriormente, donde se han observado diferencias entre sexos, sobre todo a nivel de comportamiento, en aspectos relacionados con aprendizaje y memoria espacial (involucrados en el hipocampo) (Monfort, et al., 2015; Saucier, et al., 2008).

Respecto a los **machos**, hemos encontrado diferencias de expresión mayoritariamente en 4 genes, *AChE-R*, *mAChR-M2*, *CHAT* y *VACHT*.

Para el gen ***AChE-R*** existen diferencias entre los controles de ambos **genotipos**, estando aumentada su expresión en los individuos apoE4, lo que indica que ya hay diferencias significativas a nivel basal (sin ningún tratamiento) entre ambos genotipos. Estos datos se confirman posteriormente con el ANOVA para el factor genotipo. Este gen se sobreexpresa en situaciones de estrés (Zimmerman & Soreq, 2006), como estrés oxidativo o tras exposición a tóxicos (Perrier, et al., 2005), por lo que se podría sugerir que el genotipo apoE4 está ligado a un “estrés intrínseco”. En otros estudios también se confirma esta diferencia basal entre genotipos, aumentando en los individuos apoE4 respecto a los control (comparación con apoE3, (Basaure, et al., 2018)). Por otro lado, se ha encontrado una expresión elevada de esta colinesterasa en el hipocampo de pacientes de EA post-mortem (Berson, et al., 2008), lo que podría confirmar su relación con el genotipo apoE4 (ligado a esta enfermedad). Curiosamente, al analizar los efectos tras el **tratamiento** con CPF, vemos que hay una reducción de la expresión de este gen, alcanzando los niveles del control, lo cual no corresponde con resultados obtenidos anteriormente (Basaure, et al., 2018; Perrier, et al., 2005). Está reducción podría deberse a una compensación intrínseca del animal como respuesta al estrés, o a la implicación de otros factores que regulen esta expresión, por lo que serían necesarios más estudios al respecto. Asimismo, hay que considerar que este gen codifica para una colinesterasa, por lo que es una posible diana para el CPF, cuya acción es inhibitoria.

También hay que tener en cuenta que otras dosis, tanto menores como mayores, podrían tener efectos diferentes. En concreto, en el estudio de (Jameson, et al., 2007) se obtuvo que dosis de 1mg/kg de CPF (como la usada en este estudio) no tuvieron apenas efecto, mientras que dosis de 0,5 y 2 mg/kg aumentaban la expresión de *AChE-R*, siendo más significativo en machos.

Para el gen que codifica para el **receptor muscarínico M2** se han encontrado diferencias inter-grupo, debidas a un efecto “simultáneo” del **genotipo y tratamiento**. En primer lugar, puede observarse una diferencia basal entre genotipos, estando aumentada su expresión en los individuos apoE4, lo que coincide con estudios anteriores (Dolejší, et al., 2016). Este receptor, en el hipocampo, se encuentra a nivel presináptico y actúa como autorreceptor. De esta manera, su función no es tanto excitatoria sino moduladora (H. Ferreira-Vieira, et al., 2016; Zhang, et al., 2002), regulando negativamente la liberación de ACh. Por lo tanto, un aumento de la expresión de este gen indicaría menor liberación de ACh. Asimismo, se ha sugerido que estos receptores podrían estar involucrados en un aumento de la producción de β A (H. Ferreira-Vieira, et al., 2016). La ausencia de ACh así como la formación de placas amiloides son características propias de los pacientes con EA, los cuales presentan la isoforma apoE4, lo que podría sugerir que tanto la disminución del neurotransmisor como la formación de estas placas están ligadas a un aumento en la expresión de *mAChR-M2*, inducido por el genotipo apoE4. Por tanto, este receptor podría servir como potencial diana de acción de un fármaco para la EA. Paralelamente, los resultados muestran que los individuos de ambos genotipos responden de manera significativamente diferente al tratamiento con CPF, observándose un aumento de expresión en los individuos C57BL/6 (asemejándose a los apoE4 control) y, curiosamente, disminuyendo en los individuos apoE4 (asemejándose a los C57BL/6 control). El aumento de expresión corroboraría el efecto neurotóxico del CPF, mientras que la disminución en los individuos apoE4 podría explicarse por un mecanismo compensatorio a nivel colinérgico. Estudios anteriores han sugerido que los OPs, y en concreto el CPF, pueden unirse directamente a los mAChR pares, regulando indirectamente la cantidad de ACh y disminuyendo la toxicidad provocada por la inhibición de las colinesterasas (Carvajal Ruiz, 2011). Por ello, sería

interesante continuar investigando estos aspectos, y aprovechar estos mecanismos compensatorios para el desarrollo de un fármaco más específico y seguro.

Para el gen **CHAT** hemos encontrado el mismo patrón de expresión observado para el *mAChE-M2*, es decir, se da un aumento de expresión en los individuos apoE4, que se “revierte” (asemejándose a los niveles control C57BL/6) tras el tratamiento con CPF, al contrario que en los individuos C57BL/6. Esto nos sigue corroborando la idea de que existe una diferencia basal entre ambos **genotipos** y que el genotipo apoE4 está asociado a una desregulación del sistema colinérgico, tal como han apuntado otros estudios (Hampel, et al., 2018; Schliebs & Arendt, 2011). De esta manera, sería interesante investigar si también existen mecanismos compensatorios que regulen la expresión de este gen, y poder utilizarlo como diana terapéutica para enfermedades neurodegenerativas que presentan síndrome colinérgico, como la EA.

En cuanto al **VACHT**, su expresión está significativamente aumentada en los individuos **apoE4**, lo que podría deberse, de nuevo, a un sistema colinérgico deficiente. En este estudio no se han observado efectos del tratamiento con CPF, para ninguno de los genotipos evaluados. En otros estudios (Basaure, et al., 2018) se ha encontrado una disminución de la expresión de este gen tras un tratamiento prenatal y postnatal con CPF en los individuos control, mientras que en los apoE4 no se observaron diferencias en el tratamiento. Sin embargo, dicho estudio analiza el efecto a las 2 semanas, mientras en el presente estudio se analiza a los 9 meses, lo cual podría indicar que los efectos a **largo plazo** difieren de los obtenidos a corto plazo. Asimismo, el genotipo usado como control en el estudio de (Basaure, et al., 2018) no es el C57BL/6, por lo que la influencia podría ser diferente.

Por último –en referencia a machos–, a pesar de no ser significativo, se observa cierta tendencia de disminución de la expresión de **AChE-S** tras el **tratamiento**. Es la diana principal del CPF, y varios estudios donde evalúan el efecto a corto plazo han mostrado una disminución muy significativa en la expresión de este gen tras la exposición a este plaguicida (Basaure, et al., 2018; Basaure García, 2017). Esto indicaría que la exposición temprana al CPF produce cambios irreversibles con efecto a **largo plazo** sobre este gen.

En hembras, los resultados son significativamente diferentes a los obtenidos en machos. Los genes que mayormente presentan diferencias de expresión en hembras son *AChE-S*, *BChE*, *nAChR- α 4* y *nAChR- α 7*.

Respecto al ***AChE-S***, se observa una diferencia significativa entre los grupos control de ambos **genotipos**, lo que indicaría diferencias basales. En los individuos apoE4 no se observa influencia del **tratamiento**, sin embargo, hay una tendencia a disminuir en los individuos C57BL/6 tras la exposición al CPF, asemejándose a los niveles de los apoE4. Podríamos hablar, de nuevo, de un efecto inhibitorio a largo plazo tras la exposición temprana al CPF. De esta manera, si consideramos que tras el tratamiento se alteran los niveles de expresión en los C57BL/6, estaríamos considerando que los individuos apoE4 sin tratar ya presentan esa “alteración intrínseca” debida al genotipo.

En cuanto al ***BChE***, hay una disminución de la expresión en los individuos apoE4 comparados con los C57BL/6, sugiriendo nuevamente diferencias basales referentes al **genotipo**. Estudios anteriores encontraron estas diferencias de genotipo, así como de edad, estando este gen significativamente disminuido en individuos apoE4 adultos respecto a los controles e individuos jóvenes (Dolejší, et al., 2016). Estos resultados respaldan la idea de que los cambios colinérgicos asociados a la edad se incrementan significativamente en individuos portadores del alelo ϵ 4. Otros estudios han observado en pacientes con EA una actividad disminuida de *BChE* (Darreh-Shori, et al., 2011), demostrando que el genotipo es posiblemente responsable de estos niveles alterados.

Para el gen que codifica para el **receptor nicotínico α 4**, hemos encontrado un aumento significativo de expresión en los individuos apoE4, remarcando de nuevo la influencia del **genotipo**. Este aumento de expresión podría ser una modulación del organismo para intentar captar más ACh, ya que este neurotransmisor es deficiente en pacientes con EA (ligada al genotipo apoE4), por lo que se necesitaría un efecto compensatorio. Además, se ha visto que la activación de estos receptores puede dar lugar a un aumento de la tau hiperfosforilada (H. Ferreira-Vieira, et al., 2016), estrechamente relacionada con el deterioro cognitivo propio de la EA.

Finalmente, para el **receptor nicotínico $\alpha 7$** , a pesar de no ser significativo, se observa un patrón de respuesta al CPF diferente en función del **genotipo**, aumentando la expresión en los individuos C57BL/6 (asemejándose a los control apoE4) y disminuyendo en los apoE4. Estudios anteriores (Slotkin, et al., 2004) también describieron una disminución significativa de la expresión temprana de este receptor en diferentes zonas cerebrales tras una exposición al CPF. Tras los diversos estudios de Slotkin et. al, acaban concluyendo que este receptor es un *target* específico del CPF y que existe una diferencia de base entre genotipos, que influye significativamente en la respuesta a tóxicos. En nuestro caso, no llega a ser significativo, pero podría deberse en un primer lugar a la dosis utilizada (en sus estudios usan una dosis mayor, 5mg/kg) y en segundo lugar a que su evaluación se realiza a la semana de vida mientras en nuestro estudio se realiza a los 9 meses, por lo que los efectos a **largo plazo** podrían diferir de los de corto plazo.

Este estudio presenta ciertas limitaciones que es importante tener en cuenta a la hora de plantear la validez de los resultados obtenidos. La principal limitación es el número de individuos utilizado, que no permite obtener una elevada potencia estadística, aún más importante tras la eliminación de los outliers. Por otro lado, se ha cuantificado el ARN pero en ningún momento se ha evaluado su integridad. Los materiales y kits usados, en principio, aseguran la ausencia de nucleasas y de ADN en las muestras, pero no se ha confirmado mediante ningún análisis posterior.

Por último, hay que tener en cuenta que únicamente con los resultados obtenidos tras este estudio no es posible justificar completamente la influencia de las distintas variables analizadas, ya que solo se ha evaluado el hipocampo. Esta fracción del cerebro es una de las más afectadas en pacientes con EA, y de las más inervadas por neuronas colinérgicas. Sin embargo, la actividad neuronal (y el organismo en general) comprende una interrelación entre diferentes estructuras, que podrían influir de alguna manera en la vía analizada, e incluso llegar a ser determinantes para los resultados obtenidos. Por ello, es necesario realizar este estudio en otras fracciones cerebrales para poder confirmar los resultados obtenidos a nivel global.

6. Conclusiones

De este estudio podemos concluir que el genotipo es un factor importante que puede influir en los niveles de expresión colinérgica y modular la respuesta a un tratamiento. Asimismo, se confirma que machos y hembras presentan un patrón diferenciado de expresión génica, tanto a nivel basal, como a nivel de influencia del tratamiento. Por tanto, es imprescindible tener en consideración estas variables a la hora de desarrollar un fármaco o valorar los efectos de exposición a tóxicos.

Es necesario destacar que el genotipo apoE4 conlleva una “desregulación colinérgica” de manera intrínseca. Se han observado diversos posibles mecanismos compensatorios tanto en los individuos no tratados como en los tratados con CPF, lo que merecería estudios posteriores para terminar de concluir estos hechos.

Con respecto al CPF, se ha visto que influye significativamente tanto de manera conductual (afectando a la memoria espacial), como en los niveles de expresión colinérgicos, lo que confirma su acción en el hipocampo. Además, es importante destacar que los efectos sobre machos y hembras difieren significativamente, siendo más pronunciados en los machos. Asimismo, para ciertos genes se ha observado una modulación de su expresión que podría tener resultados positivos. Sin embargo, los efectos neurotóxicos derivados de la exposición al CPF son mucho más relevantes. De esta manera, sería interesante continuar investigando ciertos mecanismos de acción del CPF para establecer nuevas dianas que permitan el desarrollo de fármacos más dirigidos, específicos y seguros para enfermedades como la EA, sin los efectos neurotóxicos de los OPs, y sin los efectos secundarios de otros tratamientos actuales.

Por último, una posible limitación futura a la aplicación de estos resultados en el ámbito clínico es el hecho de que en este estudio se realiza una exposición temprana, evaluando los efectos a largo plazo. Esto supondría que el uso de estas dianas tendría más sentido como uso preventivo que como tratamiento de la enfermedad. Además, hay que tener en cuenta que la respuesta difiere considerablemente entre ambos sexos, por lo que las terapias deberían desarrollarse de una manera mucho más individual.

7. Bibliografía

- Webgrafía

Basicmedicalkey, 2018. *Cholinergic Pharmacology*. [En línea]

Disponible en: <https://basicmedicalkey.com/cholinergic-pharmacology/>

Dades generals - Recerca en Neurocomportament i salut. [En línea]

Disponible en: <http://www.urv.cat/html/grupsrecerca/general-neurolab.php>

Finançament - Recerca en Neurocomportament i salut. [En línea]

Disponible en: <http://www.urv.cat/html/grupsrecerca/finançament-neurolab.php>

TecnATox - IISPV. [En línea]

Disponible en: http://www.iispv.cat/plataformes_de_suport/laboratoris-recerca/es_tecnatox.html

TecnATox - Laboratori de Toxicologia i Salut Mediambiental (LTSM) - Salut i medi ambient - Àrees de recerca - IISPV. [En línea]

Disponible en: http://www.iispv.cat/recerca/arees_de_recerca/23/tecnatox-laboratori-de-toxicologia-i-salut-mediambiental-ltsm

TecnATox | URV. [En línea]

Disponible en: <http://www.urv.cat/es/investigacion/estructuras/centros-innovacion/tecnatox/>

-

Ayano, G., 2016. *Common Neurotransmitters: Criteria for Neurotransmitters, Key Locations, Classifications and Functions*, s.l.: s.n.

Basaure García, P. I., 2017. *INFLUENCIA DEL GENOTIPO APOE EN LA EXPRESIÓN DE EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL A CLORPIRIFÓS*, s.l.: s.n.

Basaure, P. y otros, 2018. Postnatal chlorpyrifos exposure and apolipoprotein E (APOE) genotype differentially affect cholinergic expression and developmental parameters in transgenic mice. *Food and Chemical Toxicology*, 1 8, Volumen 118, pp. 42-52.

Berson, A. y otros, 2008. Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. *Brain*, 3 12, 131(1), pp. 109-119.

Bott, J.-B. y otros, 2016. *APOE*-Sensitive Cholinergic Sprouting Compensates for Hippocampal Dysfunctions Due to Reduced Entorhinal Input. *The Journal of Neuroscience*, 5 10, 36(40), pp. 10472-10486.

Burke, R. D. y otros, 2017. Developmental neurotoxicity of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos: from clinical findings to preclinical models and potential mechanisms. *J Neurochem*, 142(2), pp. 162-177.

- Carvajal Ruiz, M. F., 2011. *Estudio de los efectos de la administración aguda del organofosforado clorpirifós sobre respuestas neurobiológicas y conductuales a etanol*. s.l.:Editorial Universidad de Almería.
- Cubinkova, V. y otros, 2018. Alternative hypotheses related to Alzheimer's disease. *Science Edition Bratisl Med J*, 119(4), pp. 210-216.
- Dani, J. A., 2015. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. En: *International Review of Neurobiology*. s.l.:Elsevier, pp. 3-19.
- Darreh-Shori, T. y otros, 2011. The apolipoprotein E ϵ 4 allele plays pathological roles in AD through high protein expression and interaction with butyrylcholinesterase. *Neurobiology of Aging*, 1 7, 32(7), pp. 1236-1248.
- Deveci, H. A. & Karapehlivan, M., 2018. Chlorpyrifos-induced parkinsonian model in mice: Behavior, histopathology and biochemistry. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1 1, Volumen 144, pp. 36-41.
- Dolejší, E. y otros, 2016. Apolipoprotein E4 reduces evoked hippocampal acetylcholine release in adult mice. *Journal of Neurochemistry*.
- Engel, L. S. y otros, 2017. Insecticide Use and Breast Cancer Risk among Farmers' Wives in the Agricultural Health Study. *Environmental Health Perspectives*, 125(9).
- Fernández, D., Mancipe, L. & Fernández, D., 2010. INTOXICACIÓN POR ORGANOFOSFORADOS. *Revista Med (UMNG)*, 18(1), pp. 84-92.
- Fukushima, K., Yamazaki, K., Miyamoto, N. & Sawada, K., 2016. Functional Characterization of Acetylcholine Receptors Expressed in Human Neurons Differentiated from Hippocampal Neural Stem/Progenitor Cells. *Journal of Biomolecular Screening*.
- García-Gómez, B. E. y otros, 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. *Journal of Molecular Neuroscience*, pp. 1-5.
- H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F. & M. Ribeiro, F., 2016. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology*, 14(1), pp. 101-115.
- Hampel, H. y otros, 2018. *The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease*, s.l.: s.n.
- Jameson, R. R., Seidler, F. J. & Slotkin, T. A., 2007. Nonenzymatic Functions of Acetylcholinesterase Splice Variants in the Developmental Neurotoxicity of Organophosphates: Chlorpyrifos, Chlorpyrifos Oxon, and Diazinon. *Environmental Health Perspectives*, 115(1), pp. 65-70.
- Johnson, G. & Moore, S. W., 2012. Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. *Neurochemistry International*, 10, 61(5), pp. 783-797.
- Johnson, K. A., Fox, N. C., Sperling, R. A. & Klunk, W. E., 2012. Brain Imaging in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1 4, 2(4), pp. a006213-a006213.
- Knouff, C. y otros, 1999. Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 1 6, 103(11), pp. 1579-1586.

- Laspas, P. y otros, 2015. Effect of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor on Retinal Neuron Number Studied with Gene-Targeted Mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, 56(2), pp. 472-479.
- Léna, C. y otros, 1999. Diversity and distribution of nicotinic acetylcholine receptors in the locus ceruleus neurons.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 10, 96(21), pp. 12126-31.
- Li, Q., Yang, H., Chen, Y. & Sun, H., 2017. *Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease*. s.l.:s.n.
- Lockridge, O., 2015. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics*, 4, Volumen 148, pp. 34-46.
- Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medio Ambiente, 2015. *RESOLUCIÓN DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN AGRARIA*, s.l.: s.n.
- Monfort, P., Gomez-Gimenez, B., Llansola, M. & Felipo, V., 2015. Gender Differences in Spatial Learning, Synaptic Activity, and Long-Term Potentiation in the Hippocampus in Rats: Molecular Mechanisms. *ACS Chemical Neuroscience*, 19 8, 6(8), pp. 1420-1427.
- Pallotta, M. y otros, 2017. Specific Effects of Chronic Dietary Exposure to Chlorpyrifos on Brain Gene Expression—A Mouse Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 11, 18(11), p. 2467.
- Peris-Sampedro, F., 2015. *APOE PHENOTYPE EXPRESSION AND ITS MODULATION BY CHLORPYRIFOS: NEW INSIGHTS INTO GENE -TOXIC INTERACTIONS*, s.l.: s.n.
- Perrier, N. A. y otros, 2005. The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 7 7, 94(3), pp. 629-638.
- Posadas, I., López-Hernández, B. & Ceña, V., 2013. Nicotinic Receptors in Neurodegeneration. *Current Neuropharmacology*, Volumen 11, pp. 298-314.
- Rauh, V. A., 2018. Polluting Developing Brains — EPA Failure on Chlorpyrifos. *New England Journal of Medicine*, 29 3, 378(13), pp. 1171-1174.
- Salazar, J. G., 2011. *EFFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICION A CLORPIRIFOS EN UN MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE*, s.l.: s.n.
- Sánchez-Chávez, G. & Salceda, R., 2008. ENZIMAS POLIFUNCIONALES: EL CASO DE LA ACETILCOLINESTERASA*. *Revista de Educación Bioquímica (REB)*, Volumen 27(2), pp. 44-51.
- Saucier, D. M. y otros, 2008. Sex differences in object location memory and spatial navigation in Long-Evans rats. *Animal Cognition*, 3 12, 11(1), pp. 129-137.
- Schliebs, R. & Arendt, T., 2011. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural Brain Research*, 10 8, 221(2), pp. 555-563.
- Schmidt, R. J. y otros, 2017. Combined Prenatal Pesticide Exposure and Folic Acid Intake in Relation to Autism Spectrum Disorder. *Environmental Health Perspectives*, 125(9).

- Slotkin, T. A. y otros, 2004. $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptors targeted by cholinergic developmental neurotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Brain Research Bulletin*, 30 9, 64(3), pp. 227-235.
- Vela, M. M., Laborda, R. & García, A. M., 2003. NEUROTOXINS: CLASSIFICATION CRITERIA AND PROVISIONAL LISTING Neurotóxicos en el ambiente laboral: criterios de clasificación y listado provisional *. *Archivos De Prevención De Riesgos Laborales*, 6(1), pp. 17-25.
- Vemuri, P. & Jack, C. R., 2010. Role of structural MRI in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2(4), p. 23.
- Ventura, C. y otros, 2016. Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2, Volumen 156, pp. 1-9.
- WHO, 2009. *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009*, s.l.: s.n.
- Yamamuro, Y. & Aizawa, S., 2010. Asymmetric regulation by estrogen at the cholinergic gene locus in differentiated NG108-15 neuronal cells. *Life Sciences*, 5 6, 86(23-24), pp. 839-843.
- Yao, Q. y otros, 2016. Blastomere removal from cleavage-stage mouse embryos alters placental function, which is associated with placental oxidative stress and inflammation. *Scientific Reports*, 4, Volumen 6, p. 25023.
- Zhang, W. y otros, 2002. Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice.. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 1 3, 22(5), pp. 1709-17.
- Zimmerman, G. & Soreq, H., 2006. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell and Tissue Research*, 27 11, 326(2), pp. 655-669.

9. Autoevaluación

El desarrollo de este TFG ha sido toda una aventura. La experiencia ha sido totalmente enriquecedora, desde el momento de comenzar las prácticas hasta el día de hoy, y estoy segura de que todos los aprendizajes que he consolidado los recordaré en años posteriores. He de reconocer que antes de comenzar la estancia de prácticas tenía cierto miedo a lo que me enfrentaba. El mundo de la neurología, casi totalmente nuevo para mí, pero tan cercano a mi vida personal. Sin embargo, todos los miedos se disiparon durante los primeros días en el laboratorio, donde me aportaron un ambiente más que acogedor y me hicieron sentirme una más en el equipo. En este estudio, como en la mayoría de hoy en día, la mayor parte del trabajo no ha estado centrado en obtener los datos, sino en saber tratarlos estadísticamente y analizar su relevancia. Sin dudarlo, ha sido el punto más complejo de todo el desarrollo, junto con la necesidad de condensar toda la información en unos pocos párrafos. Aun así, la parte experimental ha sido un punto crucial donde he aprendido la importancia de mantener la esterilidad y asepsia en todo momento. También he comprendido que cometer un error en según qué punto del transcurso del experimento puede ser irreversible y suponer tener que empezar desde 0, lo que conlleva no solo una pérdida considerable de tiempo, sino de materiales (reactivos, animales, etc.). En general, ha sido una experiencia que me ha permitido aprender de lo bueno y de lo malo, y seguir formándome como persona y como biotecnóloga.

