

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

**ESTUDIO ELECTROENCEFALOGRÁFICO DE LAS  
ALTERACIONES DE VIGILIA Y SUEÑO EN RATAS  
SOMETIDAS A PESTICIDAS**

**TESIS DOCTORAL:**

Presentada por: Rut Victorio Muñoz. Licenciada en Medicina y Cirugía. Especialista en Neurofisiología Clínica.

Dirigida por: Dra. Carmina Montoliu

Dr. Vicente Felipo Orts

Dra. Paula Cases Bergón

DOCTORADO EN MEDICINA

Abril 2017



FUNDACIÓN INVESTIGACION CLÍNICO DE VALENCIA-  
INCLIVA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE (CIPF)  
UNIVERSIDAD DE VALENCIA  
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

Estudio electroencefalográfico de las alteraciones de vigilia y  
sueño en ratas sometidas a pesticidas.

**Tesis Doctoral**

Presentada por: Rut Victorio Muñoz. Licenciada en Medicina y  
Cirugía. Especialista en Neurofisiología Clínica.

Dirigida por: Dra. Carmina Montoliu

Dr. Vicente Felipo

Dra. Paula Cases

ABRIL, 2017



La Dra. **Carmina Montoliu Félix**, Investigadora del INCLIVA y Profesora del Departamento de Patología (Área de Histología, Universidad de Valencia,

El Dr. **Vicente Felipo Orts**, Licenciado de Ciencias Químicas y especialista en Bioquímica, Investigador Jefe del Laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe,

La Dra. **Paula Cases Bergón**, Médico especialista en Neurofisiología Clínica, Jefa de Servicio del Hospital Clínico Universitario de Valencia,

**CERTIFICAN:**

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D<sup>a</sup>. Rut Victorio Muñoz, titulada ***“Estudio electroencefalográfico de las alteraciones de vigilia y sueño en ratas sometidas a pesticidas”***, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

En Valencia, abril de 2017

Fdo. C. Montoliu

Fdo. V. Felipo

Fdo. P. Cases



## **AGRADECIMIENTOS:**

- A mis hijos Lucía y Jorge, y a mi marido Andrés, porque vosotros sois mi vida.
- A mis padres, porque con vuestro esfuerzo y sobre todo con vuestro amor, me habéis convertido en la persona que soy. Sin vosotros nada de esto hubiese sido posible.
- A mi hermana, por estar siempre a mi lado.
- A toda mi familia en general. Sabéis que os adoro.
- A mis directores de tesis por todo el apoyo y la paciencia que me habéis prestado durante este largo camino.
- Y por supuesto, a todos y cada uno de los que habéis hecho posible la realización de este trabajo.

Gracias de todo corazón.





- *Yo tenía un príncipe azul.*
  - ¿Y cómo era?
- *Pues era el hombre más lindo del mundo.*
  - ¿Y te quería?
- *Sí, me amaba desde el primer día que me vio.*
  - No te creo.
- *Es real, me amaba y yo a él.*
  - ¿En serio? ¿Cómo se llamaba?
- *Tenía un nombre, pero yo le decía “papá”*

***A ti, siempre.***





<b>IV.RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
1.- Diferencias entre machos y hembras sin exposición a pesticidas (Análisis cualitativo) .....	64
2.- Diferencias entre machos y hembras expuestos a pesticidas (Análisis cualitativo).....	67
3.- Análisis espectral. Diferencias entre machos y hembras sin exposición a pesticidas (Análisis cuantitativo) .....	75
4.- Análisis espectral. Resultados en ratas macho expuestas a pesticidas (Análisis cuantitativo).....	81
5.- Análisis espectral. Resultados en ratas hembra expuestas a pesticidas (Análisis cuantitativo).....	90
<b>V.DISCUSIÓN .....</b>	<b>101</b>
<b>VI.CONCLUSIONES .....</b>	<b>113</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>117</b>

## **ABREVIATURAS:**

- **ACh:** Acetilcolina.
- **AChE:** Enzima acetilcolinesterasa.
- **BHE:** Barrera Hematoencefálica.
- **CARB:** Carbaril.
- **Cl-:** Cloro.
- **CPF:** Clorpirifos
- **CYP:** Cipermetrín.
- **DA:** Dopamina.
- **EEG:** Electroencefalograma.
- **EMG:** Electromiograma.
- **END:** Endosulfán.
- **EOG:** Electrooculograma.
- **FSH:** Hormona folículo-estimulante .
- **GABA:** Ácido gamma-aminobutírico.
- **GH:** Hormona del crecimiento.
- **HVA:** Ácido homovalínico.
- **IL-1 $\beta$ :** Interleucina-1 $\beta$ .
- **LH:** Hormona luteinizante.
- **$\mu$ V:** microvoltios.
- **PA:** Potencia absoluta.
- **PR:** Potencia relativa.
- **PRL:** Prolactina.
- **SEM:** Error Estándar de la Media.
- **SN:** Sistema Nervioso.
- **SNC:** Sistema Nervioso Central.
- **TDAH:** Trastorno de atención e hiperactividad.
- **TEA:** Trastorno del espectro autista.

- **TNF- $\alpha$** : Factor de necrosis tumoral alfa.
- **TSH**: Hormona estimulante de la tiroides.
- **VLPO**: Núcleo preóptico-ventrolateral.
- **5-HT**: Serotonina.

## **I.- INTRODUCCIÓN**

# **I.- INTRODUCCIÓN**

## **1.- PESTICIDAS Y NEUROTOXICIDAD DURANTE EL DESARROLLO**

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

El uso de sustancias químicas (pesticidas) en agricultura y en el hogar para combatir diferentes plagas, práctica muy generalizada sobre todo a partir de la década de los 80, fue una revolución agrícola, no solo por su bajo coste económico, sino por su alta efectividad, tanto que llegó a ser una práctica habitual como medida preventiva. Sin embargo esta práctica no sólo asocia beneficios, sino también una serie de perjuicios en los ecosistemas y graves consecuencias para la salud humana.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), pesticida es “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o



animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos”.

Según su actividad, estos compuestos se clasifican en herbicidas, insecticidas, molusquicidas, fungicidas y roenticidas, y por tanto no sólo son útiles en la industria agrícola, sino también a nivel doméstico, donde se usan con frecuencia para eliminar insectos y roedores.

Debido a que la mayoría de los pesticidas dirigen su efecto hacia el sistema nervioso de los insectos y que éste comparte similitud con el sistema nervioso de los humanos, los pesticidas son especialmente peligrosos por su neurotoxicidad, siendo mucho más agresivos sus efectos cuanto más temprana en el desarrollo es la exposición (Ortega et al, 2005).

Neurotoxicidad se define como un cambio estructural o una alteración funcional del sistema nervioso debido a una exposición a un agente químico, biológico o físico (Philbert et al, 2000). La neurotoxicidad que ocurre durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) implica una serie de alteraciones conductuales, neurofisiológicas, cambios morfológicos, alteraciones

neurocitológicas y neuroquímicas, que pueden presentarse en la descendencia de las madres expuestas a sustancias neurotóxicas durante la gestación y la lactancia (Gómez-Chavarín et al, 2013).

El desarrollo del sistema nervioso (SN) comienza en las primeras semanas de gestación, con una serie de procesos que ocurren con una secuencia predeterminada y que son dependientes unos de otros, por lo que la alteración de uno de ellos también puede afectar a las fases posteriores. Esto explicaría la importancia del periodo y la duración de exposición en la organogénesis e histogénesis cerebral y la expresión de estos efectos en fases más tardías e incluso de la vida adulta.

Las células del sistema nervioso (neuronas) forman conexiones y crean circuitos interconectados que son regulados por mecanismos de apoptosis neuronal. Esta actividad continúa a lo largo de la infancia y la adolescencia. La secuencia del desarrollo incluye diferentes fases: división, migración, diferenciación, sinaptogénesis, apoptosis y mielinización.

Los efectos producidos por estas sustancias neurotóxicas dependen de múltiples factores, entre los que destacan:

- Tipo de sustancia y/o sus metabolitos activos.
- Periodo y duración de la exposición

- Patrón de distribución en el sistema nervioso.
- Dosis y concentración de la sustancia.
- Capacidad específica para interferir en las diferentes fases del desarrollo del sistema nervioso.

Un grupo de expertos de la Universidad de California Davis en un estudio publicado en *Environmental Health Perspectives* en junio de 2014, llevó a cabo una investigación que mostró una clara relación entre embarazo, pesticidas y autismo. Demostraba que las mujeres embarazadas que viven cerca de campos de cultivo donde se utilizan los pesticidas, tienen hasta un 66% más riesgo de que sus hijos nazcan con trastornos del espectro autista. Según los investigadores, esta relación se hace más fuerte cuando la exposición a los pesticidas se produce durante el segundo y tercer trimestre de embarazo.

Las sustancias neurotóxicas llegan al feto cruzando la barrera placentaria, estructura que se ha considerado, de manera errónea, protectora, que bloquea el paso de estas sustancias tóxicas. La placenta es una estructura que permite el paso de nutrientes entre dos compartimentos, sin descartar la posibilidad de que también permita el paso de otro tipo de sustancias (drogas como el etanol, cocaína y heroína). Haadeed y Siegel en 1989 detectaron retraso en el crecimiento y microcefalia en recién nacidos

de madres que consumieron cocaína durante el embarazo. Sin embargo, a fecha actual, existen muy pocos estudios sobre los riesgos que tiene la exposición de sustancias neurotóxicas durante la gestación y lactancia. (Haadeed y Siegel, 1989)

El paso a través de la placenta de sustancias neurotóxicas puede realizarse mediante transporte activo, transporte facilitado y por difusión pasiva. La placenta humana tiene un gran número de enzimas que colaboran en la transformación de xenobióticos en metabolitos potencialmente tóxicos (Pasanen, 1999) y se ha visto que en la exposición prenatal a pesticidas en los roedores altera la expresión de isoformas de la citocromo P450, enzimas que regulan las moléculas que modulan el crecimiento, la diferenciación y las funciones neuroendocrinas (Johri et al, 2006).

En el SNC adulto, las neurotoxinas deben cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) para ejercer su efecto. Algunas neurotoxinas tras ser administradas en madres gestantes, pueden cruzar rápidamente la placenta, llegar a la circulación fetal a través del cordón umbilical y atravesar fácilmente la BHE aún en desarrollo e inmadura.

La susceptibilidad durante el desarrollo a neurotóxicos para el SNC se debe a diversos factores, como son las

diferencias en el metabolismo enzimático que van apareciendo durante la gestación, la tasa de excreción, la afinidad específica de unión a proteínas y la selectividad que tiene la BHE del feto para permitir o bloquear el paso de determinadas sustancias, por lo que es importante saber los cambios de la BHE que originan la neurotoxicidad y por lo tanto la disfunción neurológica.

Durante la ontogénesis, la generación de los diferentes tipos de neuronas y glía se realiza por cambios sucesivos en las células progenitoras cuya proliferación y supervivencia está controlada por moléculas y sustancias del microambiente. Entre estas se encuentran los neurotransmisores que en estadios tempranos del desarrollo cerebral influyen de manera importante, aunque su participación no está aún bien definida (Mourek, 2010). Es durante esta etapa cuando el SNC es más vulnerable a los daños inducidos por agentes químicos ambientales, ya que en la transición de neuroblasto a neuronas maduras, las células mantienen transitoriamente un grado de plasticidad fenotípica, y para ello, es necesario que exista un microambiente adecuado, para definir con mucha precisión sus funciones.

La tasa máxima de neurogénesis se da casi exclusivamente durante la ontogenia del cerebro y continúa después del nacimiento pero en menor

proporción. Los neuroblastos lesionados durante la ontogénesis por exposición a neurotóxicos pueden perder su plasticidad o capacidad de regeneración neuronal, alterando de manera permanente el funcionamiento del SNC produciendo un daño neuronal severo y cambios conductuales, sin que ello comprometa la viabilidad y crecimiento de la persona.

En muchos mamíferos, existe un periodo de crecimiento acelerado del cerebro, donde se establecen los procesos esenciales de la transformación del cerebro inmaduro del feto/neonato en el cerebro maduro (Denker,1997). En animales de laboratorio como ratones y ratas este periodo es completamente neonatal y comprende la tercera y cuarta semana de vida posnatal, mientras que en el humano este periodo se inicia durante el primer trimestre de gestación y continua hasta el primer año de vida. Por lo tanto, si durante este periodo el cerebro se somete a la exposición de neurotoxinas puede haber una afectación importante del desarrollo del SNC (Eriksson, 1997; Pelé, 2013)

Por tanto, destacar que la exposición intraútero es particularmente importante debido a diversos factores:

- La placenta no es una barrera efectiva contra los neurotóxicos ambientales.

- Inmadurez de la barrera hematoencefálica, cuya madurez no se consigue hasta los seis meses de vida.
- Limitada capacidad de eliminación metabólica del feto, y como consecuencia de ello una mayor acumulación de las sustancias tóxicas.
- La piel de feto, muy fina, favorece la absorción de los tóxicos presentes en el líquido amniótico a través de ella.
- Tanto el tamaño cerebral como el flujo sanguíneo cerebral, en proporción al peso corporal, son mayores en el recién nacido que en el adulto, por ello esta circulación favorece una mayor distribución y consecuentemente un mayor depósito cerebral en el cerebro fetal e infantil, que en adulto.

Por todo ello, podemos concluir que el cerebro en desarrollo es más susceptible a los efectos de las sustancias neurotóxicas. La exposición a contaminantes ambientales, incluyendo los pesticidas, durante el desarrollo temprano del cerebro afecta a la función cognitiva y motora y se ha asociado con alteraciones neurológicas como alteraciones de las funciones motoras, agudeza visual, memoria a corto plazo o atención en niños (Landrigan, 2001; Bjørling et al, 2008).

## **2.- TIPOS DE PESTICIDAS**

Existen cuatro grandes familias de pesticidas desde el punto de vista químico: organofosforados, N-metil-carbamatos, organoclorados y piretroides.

### **2.1.- ORGANOFOSFORADOS: CLORPIRIFOS (CPF)**

Los compuestos organofosforados son sustancias orgánicas derivadas de la estructura química del fósforo, con múltiples usos en el campo de la medicina (tratamiento del glaucoma, miastenia gravis, ileo paralítico, tumores,...) (Khayat, 1994), de la industria (aditivos del petróleo, disolventes, colorantes, barnices, aislantes...) y también en el ámbito doméstico (insecticidas para cucarachas y hormigas).

En la agricultura su uso es fundamentalmente como insecticidas, helménticidas, acaricidas, nematocidas, fungicidas y herbicidas. Son los plaguicidas más frecuentemente usados en todo el mundo.

En 1932 se describen por primera vez los efectos nocivos de estas sustancias en los seres vivos.

Pueden producir cuatro tipos de efectos tóxicos (Menéndez, 2009):

- Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), produciendo sobreestimulación colinérgica.



- Acción tóxica directa sobre diversos parénquimas.
- Disfunción de la placa neuromuscular postsináptica.
- Inhibición de la enzima esterasa neurotóxica (ENT), produciendo una neuropatía retardada.

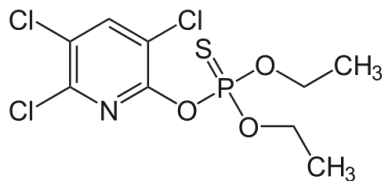
La acetilcolina actúa como neurotransmisor de las fibras autónomas preganglionares, parasimpáticas, postganglionares y algunas fibras simpáticas postganglionares. Es un neurotransmisor de la placa motora y de algunas sinapsis interneuronales SNC (Karalliedde, 1989). La enzima acetilcolinesterasa hidroliza la acetilcolina a dos fragmentos inactivos, colina y ácido acético.

La acetilcolinesterasa tiene un centro activo con dos sitios reactivos principales: un sitio aniónico (se une a la acetilcolina), y un sitio esterásico (al que se unen los compuestos organofosforados). Tras esta unión, se produce una inactivación de la acetilcolinesterasa y por lo tanto una sobreestimulación colinérgica (Tafari, 1987).

Son sustancias muy liposolubles, por lo que se acumulan en tejidos ricos en grasas, como el pániculo adiposo o el tejido nervioso, desde donde pueden ser liberados nuevamente al torrente sanguíneo, siendo eliminados por vía urinaria o fecal, en su forma activa o previa metabolización hepática.

Diversos estudios han demostrado que los organofosforados aplicados en el transcurso del embarazo se asociaron con un riesgo elevado de trastornos del espectro autista, particularmente en relación a los clorpirifos y su exposición en el segundo trimestre de gestación (Shelton, 2014).

### **Clorpirifos**



**Organofosforados:Clorpirifos (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS)**

Pesticida representativo de esta familia utilizado en el estudio. El clorpirifos (O, O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotionato, CPF) es un insecticida organofosforado cristalino, moderadamente tóxico, con una dosis letal (DL50) oral de 135-163mg/kg en ratas (Worthing y Walker, 1987).

El CPF tiene poca capacidad de inhibición de la AChE, pero da lugar a un metabolito activo oxon-clorpirifos, que se une de forma irreversible a la AChE, inhibiéndola potentemente. Esto produce la acumulación de acetilcolina en la hendidura sináptica, estimulando sus

receptores tanto muscarínicos como nicotínicos (Betancourt y Carr, 2004). También disminuyen la síntesis de ADN, independientemente de su mecanismo de acción colinérgico, lo que provoca un número deficitario de células en el cerebro en desarrollo (Campbell, 1998).

Aunque el CPF se degrada rápidamente en el medio ambiente, los niveles residuales pueden persistir largos periodos de tiempo. Es poco soluble en agua y se une rápidamente a partículas en el suelo y/o plantas. Si entra en un sistema acuático se volatiliza desde su superficie. Es susceptible a la fotodegradación, con una vida media de aproximadamente 3 días. Debido a su alta lipofilicidad tiende a acumularse en tejido graso. Se une a la albúmina plasmática, por lo que los niveles en sangre son bajos.

Actualmente su uso está limitado a la agricultura y a nivel doméstico en jardines. Prohibido desde 2008 en industria alimentaria.

La exposición aguda a altos niveles de CPF induce convulsiones, insuficiencia respiratoria, coma y muerte. Algunos estudios sugieren que la exposición a CPF en adultos puede estar relacionada con la depresión.

La exposición aguda en ratas adultas induce déficit en el aprendizaje de determinadas tareas espaciales (Cañadas et al, 2005). En el núcleo estriado de ratones adultos

tratados durante siete días con CPF subcutáneo se alteró la expresión de los genes implicados en el crecimiento y la diferenciación celular, la señalización por AMP cíclico, la síntesis y liberación de neurotransmisores y la función de receptores de neurotransmisores como la ACh y la dopamina (DA) (Torres-Altoro et al, 2011).

Aunque la neurotoxicidad aguda del CPF está mediada por la inhibición de la AChE, se ha visto deterioro cognitivo y motor en ratas mucho tiempo después de la última exposición a CPF, posiblemente por mecanismos distintos a la inhibición de la AchE (Carr et al, 2001).

Algunos mecanismos por los que los CPF producen efectos independientes de la inhibición de la AChE podrían ser la modificación covalente de proteínas a través de la unión a residuos de tirosina y lisina, la peroxidación de lípidos en el cerebro en desarrollo o la inducción de respuestas inflamatorias aumentando los niveles de citocinas.

El CPF altera la neurotransmisión colinérgica, serotoninérgica y dopaminérgica en ratas expuestas tras el nacimiento (Slotkin et al, 2006) o durante el desarrollo del embrión.

La exposición prenatal o neonatal a CPF causa diferentes alteraciones neurológicas en roedores, incluyendo

cambios en las habilidades y rendimiento del aparato locomotor (Dam et al, 2000) y alteraciones cognitivas. La exposición durante el desarrollo cerebral a pesticidas organofosforados altera la neurogénesis, esto podría explicar la persistencia de déficits en la función cognitiva a largo plazo, cuando los animales son adultos (Chen et al, 2014).

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

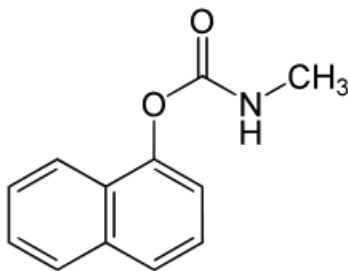
Existen estudios que afirman que los niños expuestos a clorpirifos intraútero, tienen un mayor riesgo de retraso en el desarrollo mental y motor a los 3 años, una mayor incidencia de trastornos generalizados del desarrollo como el TDAH (trastorno de atención e hiperactividad) (Rauh, 2006; Bouchard et al, 2010) y un menor peso y perímetro craneal al nacer (Whyatt, 2004). Otros estudios demuestran la asociación entre la exposición prenatal a CPF y alteraciones en el desarrollo neuroconductual, menor capacidad cognitiva en niños de 7 años y problemas de conducta, memoria a corto plazo, déficits

motores, de atención y comportamientos hiperactivos en niños de 5 años (Bouchard et al, 2011).

Sin embargo estas alteraciones neurológicas causadas por la exposición a CPF durante el desarrollo no están bien caracterizadas y los mecanismos responsables de estas alteraciones están poco estudiados.

## 2.2.- CARBAMATOS: CARBARIL (CARB)

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



Carbamatos: Carbaril (C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>)

El carbaril ((1-naftil N-metilcarbamato), CARB) se considera un insecticida de amplio espectro, con una vida media de 10 días y cuya ruta más probable de exposición es a través de la piel en el ámbito profesional. Su

carácter lipófilo asegura una penetración dérmica rápida y una absorción en la circulación sistémica (Ecobichon, 2001).

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

Estudios animales con exposición aguda a CARB han mostrado alteraciones motoras, como la disminución de la actividad motora vertical en ratas (McDaniel et al, 2007) o problemas neuromusculares severos e incoordinación motora en cerdos (Smalley et al, 1969). También se han descrito alteraciones cognitivas en ratas, como disminución en la memoria de trabajo, dosis dependiente, veinte minutos después del tratamiento con CARB (Heise

y Hudson, 1985 a, b). La exposición a CARB produce alteraciones en el cerebro de las ratas y también se han descrito cambios en el electroencefalograma. (Dési et al, 1974). Las ratas jóvenes expuestas a CARB son más susceptibles que las adultas, seguramente debido a una menor capacidad de desintoxicación en los jóvenes.

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

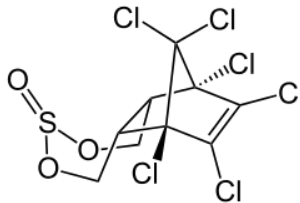
Los estudios sobre los efectos del CARB en humanos son escasos, aunque su exposición se ha asociado con un aumento del riesgo de retraso en el neurodesarrollo en niños residentes cerca de zonas de uso de carbamatos (Shelton et al, 2014) y la exposición fetal al carbamato propoxur se ha relacionado con desarrollo motor deficiente en niños de dos años (Ostrea et al, 2012).

### **2.3.- ORGANOCLORADOS: ENDOSULFÁN (END)**

Los organoclorados son compuestos químicos orgánicos en los que algunos de sus átomos de hidrógeno han sido reemplazados por átomos de cloro, usados como



pesticidas artificiales principalmente para controlar plagas de insectos.



**Organoclorados: Endosulfán (C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S)**

El endosulfán (6,7,8,9,10,10-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide) (END), es un plaguicida clasificado en la categoría de contaminante orgánico persistente y clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como moderadamente tóxico por su carácter genotóxico. Es un disruptor endocrino y su uso como pesticida está prohibido en España desde el año 2007. Sin embargo es un contaminante persistente que se sigue encontrando en cantidades significativa en el medio ambiente, animales y humanos. La vida media del END y sus metabolitos es de 0.7 a 6 años.

El END se une y bloquea el canal del cloro (Cl<sup>-</sup>) del receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA) tipo A. Es un antagonista no competitivo. Los receptores GABA son los principales neuroreceptores inhibitorios en el

cerebro de mamíferos. Cuando el GABA se une a su receptor, el canal se abre y entra el Cl<sup>-</sup> a través de un gradiente electroquímico produciendo hiperpolarización de la membrana celular e inhibición del disparo de neuronas. El END impide que el Cl<sup>-</sup> entre en las neuronas, lo que resulta en una excitación incontrolada.

Además, el END también afecta a otros neurotransmisores como la dopamina (DA). La exposición repetida a dosis bajas de END produce hiperexcitabilidad asociada con estimulación de receptores muscarínicos de ACh, produce comportamiento agresivo, deteriora el aprendizaje activando el sistema serotoninérgico e induce hiperactividad a través de la modulación del sistema dopaminérgico (Anand et al, 1985). Otros efectos del END son el aumento de citocinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), en el plasma de ratas adultas tras la exposición oral durante 5 días (Omurtag et al, 2008)

Paul et al, (1995) estudiaron los efectos neuroconductuales y hepáticos 30 días tras la administración crónica de END vía oral en ratas adultas, comparando los efectos en machos y hembras. La coordinación motora y la actividad de la AChE no se alteraba en ninguno de los dos sexos. El aprendizaje y la memoria estaban empeorados de la misma manera en

machos y en hembras. El END estimuló la actividad espontánea más notablemente en machos que en hembras. Estos hallazgos sugieren diferencias de género en los efectos de la exposición repetida a dosis subletales de END en ratas (Paul et al, 1995).

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

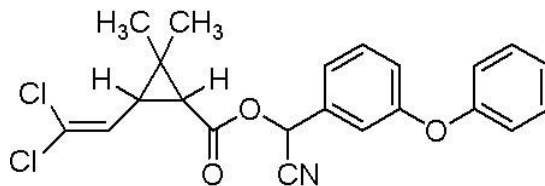
La exposición a END en el desarrollo también altera otros sistemas de neurotransmisores. Algunos estudios sugieren que los efectos del END sobre la neurotransmisión monoaminérgica son diferentes en machos y en hembras (Lafuente y Pereiro, 2013). En crías cuyas madres fueron expuestas a END durante la gestación y lactancia está alterado el metabolismo de las DA y la 5-HT y aumentado el contenido de aminoácidos y de 5-HT en la corteza prefrontal (Calabeiro et al, 2008). También se altera la función de la glándula pituitaria, afectando la secreción de la hormona luteinizante (LH), de la prolactina (PRL) y de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) implicada en el desarrollo del cerebro.

Algunos estudios concluyeron que el END inducía déficits de motivación, pero no motores y sugerían que podía

producir déficits de aprendizaje y memoria (Paul et al, 1994).

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

#### 2.4.- PIRETROIDES: CIPERMETRÍN (CYP)



Piretroides: Cipermetrin (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>)

Los piretroides son un grupo de pesticidas artificiales desarrollados para controlar las plagas de insectos. Este grupo surgió como un intento por parte del hombre de imitar los efectos insecticidas de las piretrinas naturales

obtenidas del crisantemo, que se venían usando desde 1850.

La obtención de piretrinas sintéticas se remonta a la fabricación de la Aletrina en 1949. Desde entonces su uso ha ido en aumento, en la medida en que se iba desmostrando que los demás pesticidas tenían una alta residualidad, bioacumulación y carcinogénesis (organoclorados) y por otra parte el alto efecto tóxico en mamíferos (carbamatos y organofosforados). Los piretroides, en cambio, no poseen estas desventajas y debido a las bajas cantidades de producto necesarias para combatir las plagas su costo operativo es más que conveniente.

Debido a las ventajas antes señaladas, los piretroides son actualmente una de las principales armas elegidas por los productores agropecuarios y la más importante herramienta en el combate hogareño de los mosquitos.

Su acción, como casi todos los insecticidas, es a nivel sistema nervioso, generando una alteración de la transmisión del impulso nervioso. Son neurotóxicos, actuando sobre los ganglios basales del sistema nervioso central (SNC), por medio de la modificación de la permeabilidad de la membrana celular nerviosa a varios iones, aumentando o disminuyendo su excitabilidad, provocando estímulos repetidos o inactividad prolongada.

Ni las piretrinas ni los piretroides inhiben las colinesterasas.

Se absorben bien vía gastrointestinal y respiratoria, sin embargo su absorción por la piel es muy baja. Se biotransforman rápidamente vía hepática y se eliminan vía renal. Debido a su rápida metabolización y a su pobre absorción, tienen una relativa baja toxicidad para los humanos.

En diversos estudios, los piretroides han sido moderadamente asociados con el trastorno del espectro autista inmediatamente antes de la concepción y durante el tercer trimestre (Roberts, 2013).

### **Cipermetrín:**

El cipermetrín ((R, S)-a-ciano-3-fenoxibencil-2,2-dimetil (1,R,S)-cis, trans-3-(2,2-diclorovinil ciclopropano-carboxilato, CYP) es un tipo de insecticida piretroide.

Es metabolizado y excretado rápidamente, principalmente en la orina en forma de metabolitos polares. Sin embargo, algunos estudios detectaron concentraciones de este pesticida en líquido amniótico, suero del cordón umbilical y suero materno en mujeres embarazadas y recién nacidos. Una posible explicación es que el compuesto puede ser liberado a la circulación de la sangre materna y

entrar en el ambiente fetal. Debido a su carácter lipofílico, el CYP puede ser retenido en los tejidos adiposos (Bossi et al, 2013).

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

La exposición prenatal a CYP altera la neurotransmisión monoaminérgica. Disminuye los niveles de DA y aumenta el ácido homovalínico (HVA), producto de la degradación de la DA en el núcleo estriado. Aumenta la actividad motora modulada por el sistema dopaminérgico y produce estrés oxidativo (Nasuti et al, 2007). También aumenta las concentraciones plasmáticas de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) en ratas (Santoni et al, 1999).

El CYP produce alteraciones morfológicas evidentes en las neuronas de la corteza somatosensorial, evidenciando una degeneración neuronal en ratones (Jiménez et al, 2008). La administración de CYP en ratas macho a partir del día 24 postnatal y durante 2, 3 o 6 semanas induce un aumento de mediadores inflamatorios en la corteza prefrontal e hipocampo (Maurya et al, 2016). La administración de una única dosis oral de CYP (0.1-0.5 mg/Kg) el día 10 postnatal, reduce la actividad motora en ratones y la dosis mayor altera la capacidad de adaptación a un entorno nuevo, indicando déficit cognitivo. Estos efectos se vieron meses después de la exposición a pesticidas, lo que indica que los efectos pueden ser persistentes (Lee et al, 2015b).

### **3.- ELECTROENCEFALOGRAMA (EEG). ACTIVIDAD CEREBRAL.**

La actividad eléctrica cerebral es consecuencia de corrientes iónicas generadas por procesos bioquímicos a nivel celular, y fue puesta de manifiesto tras los diversos estudios rudimentarios realizados en pequeños mamíferos, por Richard Caton en 1875. Caton investigaba la actividad eléctrica de cerebros de gatos, monos y conejos, tras aplicar estímulos periféricos con el fin de localizar áreas sensoriales. Desde entonces se abrió un



campo que fue ampliándose de forma progresiva, hasta que en 1929 Hans Berger (Berger, 1929) realizó los primeros estudios en seres humanos, acuñando el término de electroencefalograma (EEG), descubriendo el ritmo Berger (alfa de la terminología actual) y los cambios encontrados en registros de pacientes con epilepsia (1932), siendo considerado el inventor de la Electroencefalografía moderna. Desde entonces, el EEG experimentó un reconocimiento progresivo hasta ser aceptado como método de exploración de las funciones cerebrales en estados normales y patológicos.

La señal del EEG es generada básicamente por la suma de la actividad eléctrica de distintas poblaciones neuronales. Las neuronas generan potenciales eléctricos y magnéticos que pueden ser registrados a cierta distancia de sus fuentes generadoras, tanto desde la superficie de la corteza cerebral (electrocorticograma), como desde el cuero cabelludo (EEG de superficie).

Los principales responsables de las ondas registradas en el EEG son los potenciales postsinápticos, ya que poseen una mayor duración y afectan a una superficie más extensa de la membrana, haciendo posible su suma, tanto a nivel temporal como espacial. El origen de las corrientes iónicas más importantes procede de cambios de conductividad de la membrana celular, causada tanto por

procesos intrínsecos de la membrana, como por acciones sinápticas. El cambio neto resultante de estos procesos puede ser una corriente iónica tanto positiva como negativa dirigida al interior de la neurona.

Analizando la estructura de la corteza cerebral se observa que las neuronas adoptan una disposición en columnas paralelas orientadas verticalmente, por lo que las dendritas están próximas a la superficie mientras que el soma y el axón están en capas más profundas.

Las neuronas piramidales de la corteza cerebral se encuentran alineadas de forma perpendicular a la superficie, con las dendritas en paralelo, formando capas de neuronas en empalizada. A escala macroscópica, la activación sináptica de un determinado grupo neuronal dispuesto de este modo, puede tener lugar dentro de capas bien definidas y de forma sincronizada, provocando la activación de capas de dipolos. Los campos eléctricos resultantes pueden ser muy extensos si la actividad dentro de una determinada población celular se produce de una forma sincronizada.

Una propiedad fundamental de la corteza cerebral es que grupos neuronales tienden a formar circuitos locales organizados en módulos con la geometría de las columnas corticales. Estas columnas se conectan entre sí

por diferentes sistemas de fibras, que se extienden en un intervalo de distancias del orden de unos cientos de micrómetros, lo que determina la longitud característica de las interacciones corticales.

En general, se puede afirmar que el potencial eléctrico generado por una determinada población neuronal representa un promedio espacial y temporal de los potenciales generados por las distintas neuronas organizadas en esa macrocolumna. Ante una actividad sináptica, se produce un flujo de corrientes extracelulares, que pueden ser descompuestas en componentes longitudinales, paralelos al eje mayor de la neurona, y componentes transversales, que discurren de forma perpendicular a este eje. La resultante de la combinación de estos campos radiales y tangenciales, es el campo bioeléctrico registrado por el electroencefalograma, y es este, el único instrumento del que se dispone para aproximarnos realmente al funcionamiento cerebral en tiempo real (Gil-Nagel).

La actividad electroencefalográfica en vigilia, se divide según la frecuencia de los potenciales, en cuatro grupos designados con letras griegas: Alfa (8 a 13 ciclos por segundo o Hz), Beta (más de 13 Hz), Theta (4 a 7 Hz) y Delta (< 4 Hz) (Ver Figuras A y B).

# Ritmos del EEG

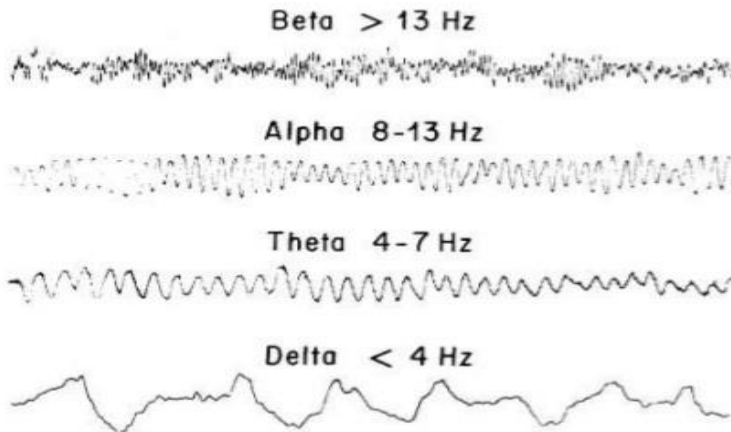


Figura A. Representación gráfica de las bandas de frecuencia en el electroencefalograma (EEG). Imagen cedida Universidad Alcalá.

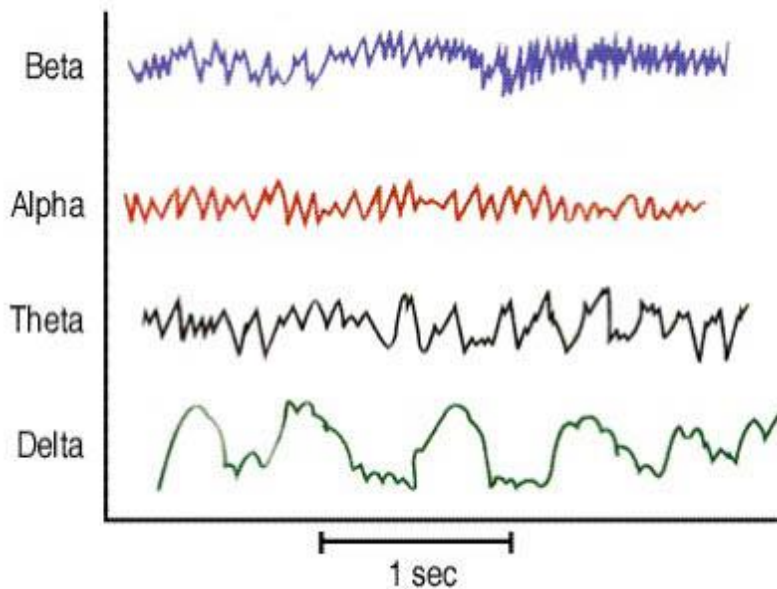


Figura B.- Representación gráfica de las bandas de frecuencias en el EEG.

En un adulto, el EEG de vigilia, en reposo muestra una mezcla de frecuencias, principalmente alfa y beta, con una distribución donde la actividad de la mitad anterior es más rápida (rango beta) y de baja amplitud, mientras que en regiones posteriores los potenciales son más lentos (rango alfa) y su voltaje es mayor. El estado de vigilia, puede ser apoyado en su reconocimiento EEG por la existencia de movimientos oculares rápidos y actividad miógena, esta última de aparición intermitente.

El **ritmo alfa** es una actividad de 8 a 13 Hz de frecuencia, localizado en regiones cerebrales posteriores, presente con ojos cerrados y en estado de relajación, que se atenúa o bloquea al abrir los ojos y con la actividad mental (Ver Figura C).

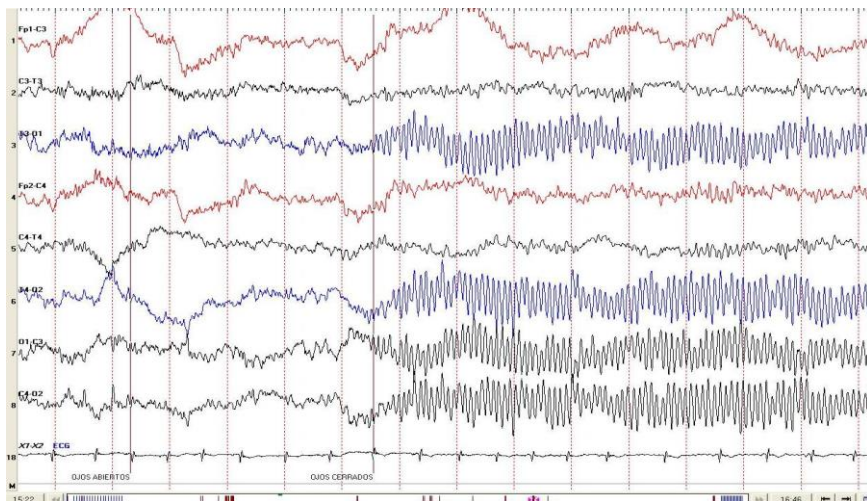


Figura C.- Reactividad a la apertura-cierre ocular en el EEG.

El ritmo alfa está compuesto por ondas regulares, monomorfas, de aspecto sinusoidal. En la infancia se observa un incremento progresivo del ritmo en regiones posteriores siendo de unos 4 Hz a los 4 meses de vida, unos 6 Hz a los 12 meses, 8 Hz a los 3 años y 9-10 Hz a los 10 años. Es a los 3 años cuando se alcanza el rango de frecuencias alfa y ya se puede hablar de ritmo alfa.

La frecuencia del ritmo alfa es menor durante la somnolencia.

La amplitud es variable, de 20 a 60  $\mu\text{V}$  (50  $\mu\text{V}$  de media). Se aceptan como normales amplitudes de 100-200  $\mu\text{V}$ , sobre todo en niños, disminuyendo con la edad. Puede existir una discreta asimetría de amplitud entre ambos hemisferios cerebrales, siendo de menor voltaje en el hemisferio izquierdo. Asimetrías mayores del 85% o la ausencia de un ritmo alfa de forma unilateral siempre se consideraran patológicos.

En cuanto a su distribución, el ritmo alfa aparece de forma simétrica, fundamentalmente en regiones occipitales, y en menor medida en regiones parietales y temporales posteriores.

El significado fisiológico del ritmo alfa es desconocido, pero parece estar relacionado con la función del sistema visual.

El **ritmo beta** es una actividad de más de 13 Hz, de amplitud baja (5-10  $\mu$ V) y simétrico en regiones homólogas de ambos hemisferios, considerando como patológica la existencia de asimetrías.

En cuanto a su distribución, el ritmo beta suele localizarse en regiones anteriores y centrales, si bien su aparición de forma generalizada puede estar generada por el tratamiento con psicofármacos o estados de alerta. Tiende a desaparecer durante el sueño profundo y ocasionalmente se incrementa durante la fase de sueño REM.

El significado fisiológico del ritmo beta no está claro, aunque parece estar en relación con la función sensitivo-motora y lo que sí es evidente es que su presencia depende de una función cerebral normal (en paciente en coma es signo de buen pronóstico)

El **ritmo theta** es una actividad de 4 a 7 Hz, constituido por ondas de morfología diversa, de escasa duración y baja amplitud.

Su distribución cerebral es en áreas temporales y se observa con creciente intensidad a medida que las personas envejecen.

## **4.- RITMOS CIRCADIANOS Y SUEÑO**

### **4.1.- CARACTERÍSTICAS DEL SUEÑO NORMAL**

El sueño es una conducta natural, periódica, transitoria, reversible e imprescindible para la vida, ya que su privación absoluta produce la muerte.

En la regulación del sueño intervienen mecanismos homeostáticos, circadianos, madurativos e individuales.

Los mecanismos homeostáticos tienden a mantener un equilibrio interno, de manera que a mayor número de horas despierto mayor necesidad de dormir. No se sabe exactamente cómo el cerebro percibe que necesita dormir pero lo que sí se sabe es que el acúmulo de adenosina (también de interleucina-1 y de prostaglandina-2), que ocurre de forma proporcional al tiempo pasado en vigilia, es capaz de inhibir las neuronas implicadas en el mantenimiento de la vigilia e inducir al sueño (McGinty, 2000). El centro de estos mecanismos está situado en el hipotálamo y en la parte anterobasal del cerebro.

Los mecanismos circadianos regulan el momento del ciclo diario en que es mejor dormir o estar en vigilia. El centro principal de este sistema son los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo que actúan como marcapasos y cuya actividad es modulada por diversos estímulos, siendo el más importante de ellos la luz



ambiental, que oscila de acuerdo a la rotación de la Tierra. La edad es otro factor importante en la regulación del sueño, ya que un recién nacido duerme alrededor de 18 horas al día, con un alto porcentaje de sueño REM, en múltiples fragmentos, que se van consolidando durante la noche y desapareciendo durante el día a medida que va madurando. En el adulto joven el sueño se concentra en un episodio nocturno de unas 7-8 horas y en el anciano el sueño nocturno está más fragmentado y contiene menos proporción de sueño lento.

#### **4.2.- FENÓMENOS CLÍNICOS DURANTE EL SUEÑO**

Durante el sueño todas las funciones fisiológicas varían en mayor o menor medida.

**Sistema Nervioso Central:** la actividad encefálica va disminuyendo con el paso de vigilia a sueño NREM, donde hay una disminución del consumo de glucosa por parte de la corteza cerebral. Sin embargo, en el sueño REM la actividad encefálica aumenta, sobre todo en las regiones relacionadas con la vía visual.

**Sistema Nervioso Periférico:** Durante el sueño se produce una disminución de la actividad motora. En el sueño NREM la actividad motora conserva un cierto grado de activación que permite los movimientos corporales. En el sueño REM predomina la atonía muscular, excepto en

músculos respiratorios y oculares (fase de movimientos oculares rápidos).

**Sistema Nervioso Autónomo:** carece de control voluntario, produciéndose durante el sueño importantes modificaciones tanto a nivel simpático como parasimpático.

En vigilia la respiración es controlada de forma voluntaria por la corteza premotora y de forma involuntaria mediante las neuronas de la región inferior del tronco cerebral. Durante el sueño disminuye la ventilación, ya que desaparece el control voluntario y aumenta el umbral sensorial, dando lugar a una hipoxemia e hipercapnia relativas que son las que regulan la frecuencia y amplitud de la respiración. En la transición vigilia-sueño la respiración es irregular, estabilizándose a medida que el sueño NREM se hace más profundo. El estímulo fundamental que controla la regulación de la respiración en esta fase es la concentración arterial de CO<sub>2</sub>. Durante el sueño REM la frecuencia respiratoria aumenta y la respiración vuelve a ser irregular.

Durante el sueño NREM la tensión arterial disminuye entre 2 y 5 mmHg, sobre todo en la fase 3 haciéndose muy estable, sin embargo en el sueño REM la tensión arterial sufre importantes variaciones y es aquí donde se

alcanzan picos de valores máximos y mínimos de la misma. La frecuencia cardíaca disminuye en el paso de la vigilia al sueño NREM y durante el sueño REM se hace irregular pudiendo alcanzar valores máximos (por encima del 30% de la basal en vigilia). Durante el sueño NREM se produce una vasodilatación activa que aumenta el aporte sanguíneo a los órganos y tejidos, que se mantiene en el sueño REM tónico, excepto en la musculatura esquelética donde se produce una vasoconstricción. En el sueño REM fásico la vasoconstricción se generaliza lo que aumenta la tensión arterial en ese periodo, haciendo más frecuente la aparición de procesos isquémicos cardíacos y accidentes cerebrovasculares en esta fase, aunque no de manera exclusiva (Calhoun, 2010).

La regulación de la temperatura corporal se produce por mecanismos independientes a los que controlan el ritmo circadiano del sueño, pero hay relación entre ellos a nivel del hipotálamo. Durante el sueño nocturno se produce una disminución de la temperatura corporal, ya que los mecanismos de la termorregulación corporal son más inestables durante el sueño NREM que durante la vigilia. Durante el sueño REM la temperatura se va equiparando a la temperatura ambiente. Las temperaturas ambientales extremas provocan interrupciones del sueño, con

despertares frecuentes, reduciéndose fundamentalmente la cantidad de sueño REM (Vaara, 2009).

**Cambios hormonales:** La producción de la hormona del crecimiento (GH) se produce durante el sueño de ondas lentas, principalmente en las primeras dos horas de sueño. La renina presenta variaciones ligadas al ciclo REM-NREM. La prolactina (PRL), gonadotropinas, la hormona folículo-estimulante (FSH), la luteinizante (LH) y las estimulante del tiroides (TSH) tienen una secreción relacionada con el estado de sueño pero no con una fase determinada. La liberación de PRL se produce durante el sueño, alcanzándose el pico máximo a la hora del inicio del mismo. Se secreta también en las siestas diurnas y se produce una secreción compensatoria tras una privación de sueño. Las gonadotropinas también se secretan durante el sueño y se inhiben con la vigilia. La TSH parece tener una relación inversa con el sueño, teniendo su pico más alto a últimas horas de la tarde y disminuyendo a lo largo de la noche. La melatonina se produce independientemente del ciclo sueño-vigilia, se libera sobre todo por la noche, siendo el factor determinante para su producción la duración del periodo de luz diario y el nivel de iluminación. Su secreción está controlada por conexiones neurales entre la retina y el hipotálamo donde el núcleo supraquiasmático tiene

receptores sensibles a la melatonina (Kunz, 2010). La luz inhibe su liberación.

**Aparato digestivo:** Los movimientos de masticación disminuyen, lo que favorece el reflujo gastroesofágico, aumentando también por la postura de decúbito. Los movimientos peristálticos permanecen igual o disminuyen. La secreción gástrica disminuye y se hace más ácida.

**Actividad sexual:** Las erecciones y la tumescencia del clítoris aumentan en sueño REM, sin ser exclusivos de éste. Esta activación es mayor en varones y no se acompaña de sueños de contenido sexual. En la práctica clínica se usa el registro de erecciones para distinguir la impotencia orgánica de la psicógena, de modo que si se registran erecciones durante el sueño, se puede descartar la causa orgánica.

Con todo ello sabemos que clínicamente el signo considerado como el mejor indicador del inicio del sueño es la sensación de somnolencia, que se acompaña de signos externos como la relajación muscular, la disminución del parpadeo espontáneo, el bostezo, la regularidad en la respiración, la dificultad para mantener los ojos abiertos y la disminución de la respuesta a estímulos. Durante la transición vigilia-sueño pueden aparecer alucinaciones cenestésicas (sensación de

caerse, dar vueltas), visuales y movimientos involuntarios de extremidades (mioclono hípico) que desaparecen en fases más profundas de sueño.

Normalmente, tras este periodo de somnolencia, se establece el sueño propiamente dicho. La conducta de un adulto dormido se caracteriza por una respiración regular y una inactividad motora, sólo interrumpida por cambios posturales cada 20-30 minutos, probablemente como sistema de protección para evitar lesiones de decúbito prolongado.

Del contenido mental durante el sueño (ensueños) no se recuerda mucho, pero en ocasiones recordamos haber soñado. Esto ocurre con frecuencia cuando despertamos en fase REM (Cajal, 1908).

En condiciones generales, en un adulto normal, un episodio de sueño finaliza de forma espontánea aproximadamente unas 7-8 horas tras su inicio, pasando al estado de vigilia, pero permaneciendo durante unos 60 minutos en un estado de lentitud psicomotora variable conocido como "inercia del sueño" (Roennenberg, 2003).

#### **4.3.- CAMBIOS ELECTROFISIOLÓGICOS: FASES DEL SUEÑO**

Gracias al desarrollo del electroencefalograma (EEG) en 1929 por el psiquiatra Hans Berger, se empezó a registrar

la actividad eléctrica cerebral sobre el cuero cabelludo y sus diversas variaciones (Loomis, 1937). En esta actividad eléctrica cerebral se identifican cuatro tipos de ritmos biológicos caracterizados por su frecuencia, tipografía y reactividad: ritmo alfa (8-13 Hz, localizado en regiones posteriores, durante la vigilia tranquila y con los ojos cerrados), ritmo beta (más de 13 Hz, aparece en áreas frontales y en vigilia activa), ondas theta (4-7 Hz) y ondas delta (<4 Hz).

En 1937, Loomis y cols. observaron cambios típicos en la actividad eléctrica cerebral durante el sueño y el incremento de la proporción de ondas lentas a medida que el sueño se hacía más profundo. Posteriormente en 1968, Rechtschaffen y Kales establecieron los primeros criterios que facilitaron el estudio de los cambios de actividad eléctrica cerebral durante el sueño y que, desde entonces, se han venido empleando en los laboratorios de sueño para el estadiaje y la realización del hipnograma. Mediante el registro de las señales biológicas fundamentales (EEG, EMG (electromiograma) y EOG (electrooculograma) se pueden identificar las fases del sueño y los episodios de vigilia.

#### ***4.3.1.-GRAFOELEMENTOS DEL SUEÑO:***

- **ONDAS LENTAS:** de amplia distribución, más llamativas en regiones posteriores. Conforme el sueño se

va haciendo más profundo, se van haciendo más sincronas, de mayor amplitud y menor frecuencia.

- **ONDAS AGUDAS POSITIVAS OCCIPITALES (POSTS):** ondas monofásicas y triangulares, de moderada amplitud y polaridad positiva, de aparición en regiones occipitales, de forma aislada o repetidas de forma arrítmica entre 1 y 6 por segundo.

- **ONDAS AGUDAS DE VÉRTEX (ondas V):** son ondas de polaridad negativa, amplias, aisladas, bilaterales y sincronas, de máxima amplitud en el vértice (Cz).

- **HUSOS DEL SUEÑO:** son trenes rítmicos de ondas rápidas (ritmo sigma), de menor amplitud que las ondas V, de predominio en derivaciones centrales (Cz, C3 y C4), con una duración entre 0.5 y 2-3 segundos, considerados como el marcador electrofisiológico de la interrupción a nivel del tálamo de la transmisión sensorial desde el exterior a la corteza.

- **COMPLEJOS K:** consisten en una onda lenta polimorfa de alto voltaje, de localización central, seguida o precedida de ondas rápidas de bajo voltaje semejantes a los husos del sueño.

- **ONDAS EN DIENTES DE SIERRA:** son típicas de la fase REM y se observan en áreas centrales.



#### **4.3.2.- FASES DEL SUEÑO**

En la macroestructura del sueño se distinguen distintas fases. Rechtschaffen y Kales definieron cinco fases, denominadas N1, N2, N3, N4 y REM (del inglés rapid eye movements o movimientos oculares rápidos)

- **FASE N1:** caracterizada por actividad de bajo voltaje y frecuencias mixtas, theta (entre 2 y 7 Hz) y alfa (que debe ser menor del 50% del trazado), registrándose las ondas de vértex y ondas agudas positivas occipitales.

- **FASE N2:** caracterizada por la aparición de complejos K y husos de sueño, con una actividad de fondo en el EEG más lenta que en la N1.

Tanto en la fase N1 como en la N2, se observan movimientos oculares lentos y la actividad tónica es menor que en la vigilia relajada.

- **FASE N3:** caracterizada por la presencia de una moderada proporción (20-50%) de ondas muy lentas (igual o menor de 2Hz) y de gran amplitud (>75 microvoltios)

- **FASE N4:** caracterizada por actividad de ondas lentas en más del 50% del trazado. En la práctica se suelen considerar conjuntamente las fases N3 y N4 como sueño profundo o lento (sueño de ondas lentas), sin

demostrarse ninguna diferencia fisiológica entre ambos estadios. En estas fases no hay movimientos oculares perceptibles y el tono muscular continúa presente, aunque muy disminuido

*En el año 2007, con revisiones en años posteriores, la Asociación Americana de Medicina del Sueño (AASM) estableció nuevos criterios para realizar el estadiaje del sueño, unificándose las fases N3 y N4, por lo que esta última desapareció. Así se establecen 4 fases de sueño (N1, N2, N3 y REM)*

- **FASE REM:** se caracteriza por la aparición de movimientos oculares rápidos con atonía muscular. El EEG es de bajo voltaje y con frecuencias similares a la N1. Pueden aparecer ondas de morfología en dientes de sierra. Aproximadamente aparece a los 90 minutos de haberse iniciado el sueño. En esta fase ocurren los sueños más vividos y de contenido abigarrado. La respiración, la frecuencia cardíaca y la tensión arterial son regulares en el sueño N-REM, pero se hacen irregulares en el sueño REM.

El sueño normal en el adulto está formado por una sucesión de 3-4 ciclos de sueño, de alrededor de 100 minutos de duración. En cada ciclo hay una etapa de sueño no-REM (NREM) seguido de una etapa de sueño

REM. El sueño NREM va haciéndose más profundo desde la fase N1 hasta la N3, volviendo a ser superficial en relación con cambios posturales. Antes de la transición a sueño REM suele haber un cambio breve de N3 a N2. La cantidad de sueño REM aumenta en los últimos ciclos de sueño y el sueño de ondas lentas es mayor en la primera mitad de la noche. La distribución habitual aproximada es de un 5% de fase N1, un 55% de fase N2, un 20% de fase N3 (antes N3 y N4), y un 20% de fase REM. Conforme se envejece el porcentaje de N3 y REM disminuye, de forma que la mayoría del sueño se realiza a expensas de estadios de sueño más superficiales.

En las ratas existen notables similitudes con el sueño de los humanos. El sueño se concentra en una de las fases del ciclo luz-oscuridad (en su periodo de actividad, que en este caso es el nocturno); el sueño NREM, rico en ondas lentas tipo delta de gran amplitud, se concentra en la primera mitad del periodo de sueño y el sueño REM caracterizado por ondas rápidas de bajo voltaje paradójicamente similares a las de vigilia, se concentran en la segunda mitad. Al observar su distribución dentro de las 24 horas (Vivaldi, 1994), el NREM con alta densidad de ondas delta, alcanza su máximo al comienzo del periodo de sueño y luego decae exponencialmente. La

distribución del REM es sinusoidal alcanzando un máximo en la segunda mitad del periodo de sueño.

#### **4.4.- CAMBIOS EN LOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN.**

A lo largo de la historia se han realizado multitud de trabajos destinados a determinar las estructuras cerebrales y los sistemas de neurotransmisores involucrados en la regulación de la vigilia y el sueño (Franco et al, 2012).

El patrón de actividad en los principales sistemas de neurotransmisión cerebral durante la vigilia se modifica completamente durante el sueño NREM y vuelve a cambiar durante el sueño REM, con sistemas muy activos en un estado y completamente inactivos en otro. El cambio entre la vigilia y el sueño lo inicia el núcleo preóptico-ventrolateral (VLPO) del hipotálamo (Saper, 2001), que es el único lugar del cerebro que incrementa su actividad durante dicha transición, mientras que está inactivo en plena vigilia. Sus neuronas que son inhibitorias, usan GABA y galanina y están conectadas directa o indirectamente de forma recíproca (Gallopin, 2000) con los principales núcleos del tronco, cerebro anterior basal e hipotálamo implicados en el control de la vigilia y el sueño: locus coeruleus, rafe dorsal, tuberomamilar del hipotálamo, núcleos colinérgicos del

cerebro anterior basal y del tegmento pedúnculo pontino y laterodorsal (PPT/LDT) y probablemente hipocretinérgicos. Todos estos núcleos, cada uno con un neurotransmisor específico (noradrenalina, serotonina, histamina, acetilcolina e hipocretina, respectivamente) tienen característicamente una gran actividad en vigilia que disminuye durante el sueño NREM y llega al mínimo durante el sueño REM. Durante el sueño REM se produce en el tronco cerebral una inhibición máxima de los sistemas aminérgicos junto con una gran actividad en el sistema colinérgico, cuyo resultado es, de un lado, la activación de un sistema inhibitor del tono muscular en la formación reticular bulbar, que produce la parálisis de la musculatura estriada voluntaria (excepto el diafragma), y de otro la activación talamocortical con desincronización del EEG y descargas pontogeniculo-occipitales asociadas a los movimientos oculares rápidos típicos de esta fase.

El sistema hipocretina (u orexina) es un sistema neurotransmisor excitatorio cuyas neuronas se localizan en el hipotálamo posterior, cerca del fórnix y conectan con los principales núcleos implicados en el control del sueño y la vigilia, así como con la corteza cerebral (Peyron, 2004) y el asta anterior de la médula.



## **II.- OBJETIVOS**

## **II.-OBJETIVOS**

La exposición a pesticidas ambientales durante el desarrollo se ha asociado a un aumento de la incidencia de retraso en el desarrollo psicomotor en niños y de patologías como el síndrome de TDAH o trastornos del espectro autista (TEA). Una de las características de estas enfermedades son las alteraciones del sueño. Sin embargo no se conoce si la exposición a pesticidas durante el desarrollo podría producir dichas alteraciones.

Debido a que los procesos biológicos implicados en la neurogénesis y maduración del Sistema Nervioso son similares en las distintas especies de mamíferos, se pueden esperar efectos análogos de la exposición a pesticidas durante el desarrollo en ratas y humanos, ya que los compuestos pueden llegar al cerebro de manera y concentración similares.

El objetivo general de este trabajo es analizar mediante la realización de electroencefalogramas si la exposición de ratas durante el desarrollo a diferentes pesticidas induce alteraciones del ciclo sueño-vigilia y de la calidad del sueño.

Se han descrito diferencias de género tanto en los efectos neurotóxicos de los pesticidas como en la estructura y



alteraciones del sueño. Por ello, se realiza el estudio separadamente en machos y hembras y se analizan las diferencias entre ellos.

Por otra parte, las alteraciones encontradas en el electroencefalograma podrían resultar útiles como biomarcadores de exposición a pesticidas neurotóxicos.

Los objetivos concretos han sido:

1. Analizar la estructura del sueño en ratas expuestas durante el desarrollo a cuatro pesticidas de cuatro familias químicas diferentes.
2. Realizar el análisis espectral en las distintas fases del ciclo sueño-vigilia, en hipocampo y corteza prefrontal en las ratas expuestas a estos pesticidas durante el desarrollo.
3. Analizar las diferencias de género que puedan existir en la macroestructura y microestructura del sueño, tanto en animales control como en los expuestos a pesticidas.



### **III.-MATERIAL Y MÉTODOS**

### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **1.- ANIMALES**

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

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

Todos los procedimientos con animales fueron supervisados y aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal, siguiendo la legislación española

“Protección de los Animales Utilizados para Experimentos y Otros Propósitos Científicos” y de acuerdo con las normas de la Unión Europea para la protección de animales utilizados con fines científicos, Directiva 2010/63/EU.

### **1.1.- ADMINISTRACIÓN DE PESTICIDAS**

El día 7 de gestación (GD7), momento en el que se produce la implantación del embrión, empezamos a administrar los pesticidas una vez al día a las madres gestantes de forma oral. El pesticida se introduce en una gelatina dulce (MediGel® Sucralose de ClearH2O) que la madre se come sin ningún problema, asegurándonos por tanto que reciben la dosis diaria de pesticida. Los pesticidas fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Refs.: Endosulfán ( $\alpha+\beta=2+1$ ) PESTANAL® 32015;  $\alpha$ -Cypermethrin PESTANAL®, 45806; Chlorpyrifos PESTANAL®, 45395 y Carbaril PESTANAL®, 32055). Se disolvieron en aceite de maíz (Sigma, C8267) a la concentración adecuada para que el volumen de administración estuviera entre 50 y 300 microlitros. Basándonos en la bibliografía que hay al respecto se eligieron las dosis más bajas para las que se había descrito algún efecto. Las siguientes fueron las dosis elegidas de cada pesticida: Endosulfán: 0.5 mg/kg/día,  $\alpha$ -

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

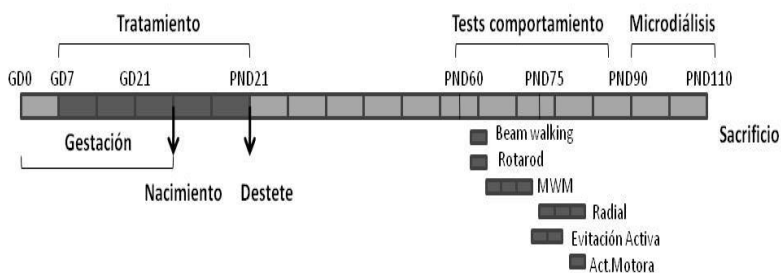
## 1.2.- DISEÑO EXPERIMENTAL

### Curso temporal del estudio

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

Los electroencefalogramas (EEG) se llevaron a cabo cuando las crías expuestas a los pesticidas eran adultos jóvenes (2-3 meses). Se analizaron separadamente machos y hembras.

Para minimizar el efecto de la camada, en todos los experimentos se mezclaron crías de al menos dos o tres madres, de cada grupo de exposición.



**Figura D.- Esquema de la progresión temporal del estudio.**

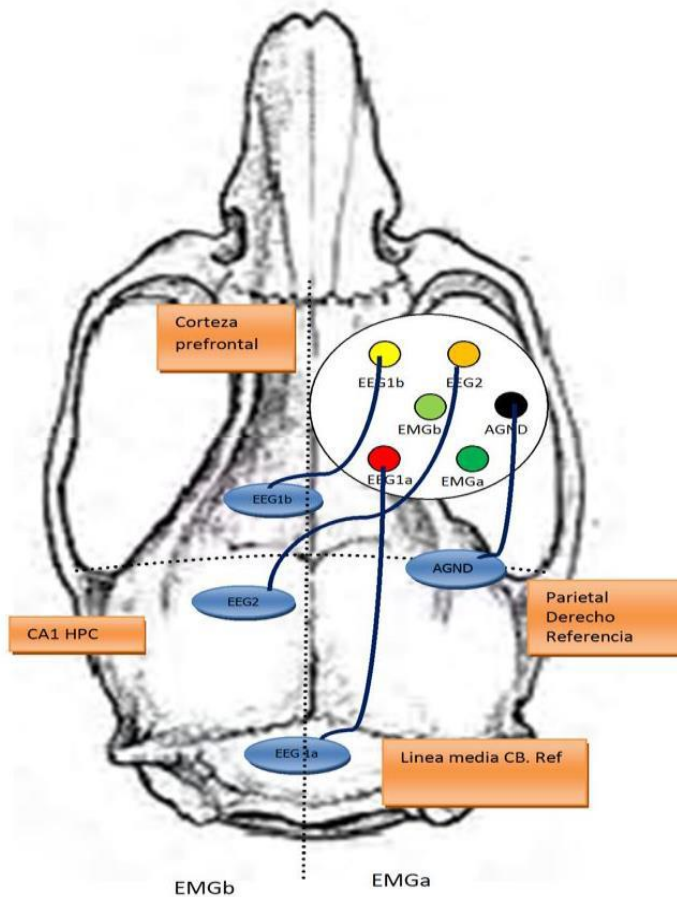
En total se han realizado seis experimentos y se ha incluido la descendencia de un total de 4-10 madres para cada parámetro de exposición. En la Figura D se muestra un esquema de la progresión temporal del estudio.

## **2.- ELECTROENCEFALOGRAMA (EEG)**

### **2.1.- IMPLANTACIÓN DE ELECTRODOS**

Se anestesiaron las ratas con Isoflurano (5% en oxígeno par inducir la anestesia; 2% para mantenerla).

Se realizó perforación craneal de aproximadamente 1 mm de diámetro sobre el área del hipocampo bajo guía estereotaxica, lo que permitió la colocación del primer electrodo de registro de acero inoxidable de 0,125 mm de diámetro, sobre el hemisferio cerebral izquierdo. Adicionalmente se implantó un electrodo de las mismas características en cortex prefrontal medial. Un electrodo de referencia común encima del cerebelo, a 1 mm posterior a la línea lambda.



**Figura E.- Representación de las coordenadas finales de los electrodos:**

**CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL**

**EEG1b:** AP 3,7 mm; ML 0,8 mm; DV -3,5mm

**HIPOCAMPO**

**EEG2:** AP -3,3 mm; ML 1,4 mm; DV -2,3 mm



## **CEREBELO MEDIO**

**EEG1a:** AP -10,5 mm; ML -1mm; DV -1 mm

**AGND:** parietal contralateral al resto, junto detrás de la sutura (tornillo)

**EMG:** musculatura cervical simétricos bilateralmente y suturados subcutáneamente para que no se muevan con cianoacrilato y tres tornillos craneales de acero.

## **2.2.- REGISTRO**

Tras la implantación de los electrodos cerebrales, los animales tuvieron 10 días de recuperación postquirúrgica y un día de habituación en la sala experimental en la que se realiza la adquisición electroencefalográfica.

Las condiciones de luz de la sala de registro fueron exactas a las de su propio animalario (12:12), iniciándose los registros EEG al comienzo del ciclo de luz (8:00 am o minutos antes) durante 48 horas separados en dos sets de datos de 24 horas continuas.

Las imágenes del vídeo fueron adquiridas sincrónicamente con el registro electroencefalográfico utilizando una cámara de vídeo modelo AP-5006, de Pinnacle Technology (Kansas, USA), controlada por el mismo software.

La señal electroencefalográfica fue adquirida usando el software Sirenia Acquisition, versión 1.8 de Pinnacle

Technology (Kansas, USA), con una ganancia de preamplificación de x10, y una ganancia de hardware x50,78, con filtros de 0,5-100 Hz para la señal electroencefalográfica, y de 10-100 Hz para la señal electromiográfica, con una frecuencia de muestreo de 200 Hz.

### 2.3.- ANÁLISIS

#### **ANÁLISIS CUALITATIVO DEL REGISTRO EEG:**

El análisis de la señal electroencefalográfica fue realizada por un médico especialista en Neurofisiología Clínica, usando el software Sirenia Score, versión 1.8, de Pinnacle Technology (Kansas, USA) con filtros de 0.03-15 Hz para la señal del electroencefalograma y de 0,03-70 Hz para la señal del electromiograma, fragmentando el registro por épocas de 10 segundos de duración.

Para el análisis de las distintas fases del sueño nos basamos en los criterios descritos por Datta y Hobson (2000):

- **Despierto (WK):** La actividad cortical del EEG presenta ondas de bajo voltaje (40-60 $\mu$ V) y de alta frecuencia (35-50 Hz). El registro EMG presenta un tono alto, de gran variabilidad, en ocasiones con

descargas bruscas de la actividad muscular secundaria a los movimientos de la musculatura cervical.

- **No REM (NREM):** La actividad del EEG presenta una progresiva lentificación de su frecuencia e incremento de su amplitud. En general, la actividad cortical presenta baja frecuencia (0,1-10 Hz) y una elevada amplitud (200-400  $\mu$ V). Sobre esta actividad, en ocasiones, se pueden reconocer husos del sueño (10-14 Hz) sobrepuestos a ondas delta (1-4 Hz). El tono muscular del registro EMG es más bajo que en la etapa WK, y en ocasiones puede estar ausente.
- **REM:** Durante el sueño REM, la actividad del EEG se caracteriza por una frecuencia alta (20-40 Hz) con baja amplitud global (50-80  $\mu$ V). El registro EMG muestra atonía muscular, donde frecuentemente se puede llegar a registrar interferencia del electrocardiograma.

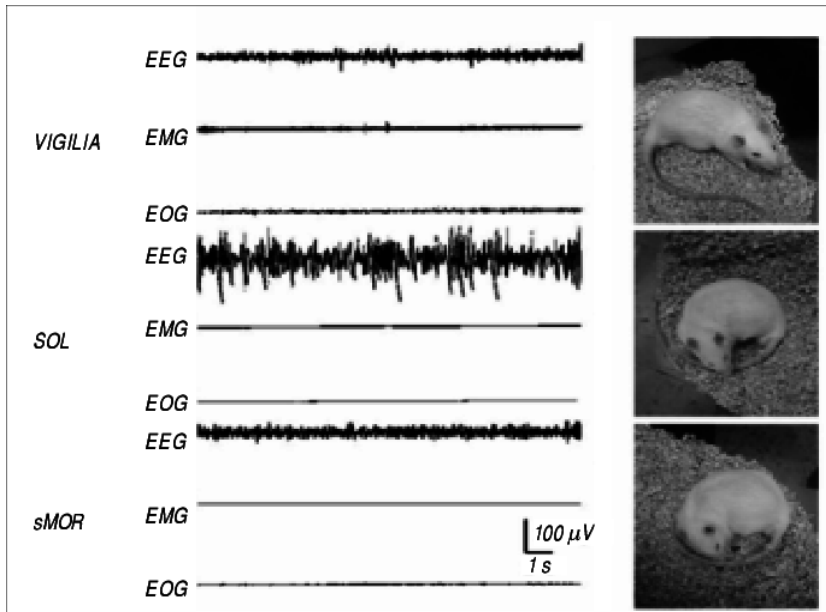


Figura 6.-Registro poligráfico de rata adulta. Se muestra la actividad cortical (EEG), del músculo del cuello (EMG) y movimientos oculares (EOG), así como la postura típica de la rata en cada etapa (Vigilia; NREM (en la figura SOL) y REM (en la figura, sMOR). Franco et al, 2012)

### **ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL REGISTRO EEG:**

El análisis cuantitativo se realizó en el rango de 1 a 26,5 Hz para la Frecuencia Media Dominante (MDF) y las potencias relativas de las ondas Delta, Theta, Alpha y Beta. La actividad Delta se calculó con frecuencias comprendidas entre 1,0-3,4Hz; la actividad Theta de 3,5 a 7,4 Hz; la actividad Alpha de 7,5 a 13,4 Hz y la actividad Beta de 13,5 a 26,5 Hz. La potencia relativa se expresó como porcentajes de la potencia total, con base a lo descrito por Amodio et al (1999).

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Los análisis estadísticos fueron realizados con los programas estadísticos Statistical Package for the Social Sciences 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y GraphPad Prism 6, considerando un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

En el estudio comparativo de machos y hembras controles, se utilizó el test t-student, excepto para el estudio de las distintas bandas de frecuencias que se analizaron con una ANOVA de 2 vías, donde las variables eran banda y sexo.

En el estudio comparativo de ratas expuestas a pesticidas, para el análisis de las distintas bandas de frecuencias se utilizó un análisis ANOVA de dos vías, en las que las variables eran el pesticida y la banda de frecuencia. El resto de datos fueron analizados con una ANOVA de una vía.



## **IV.-RESULTADOS**

## IV.- RESULTADOS

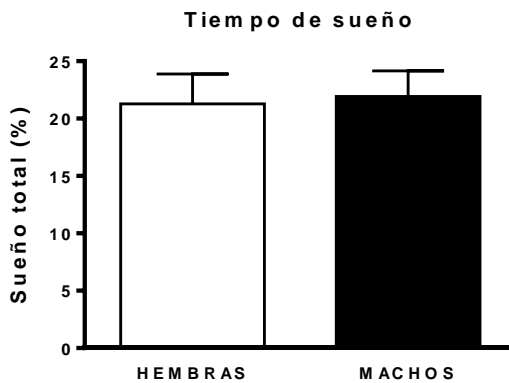
Para realizar el análisis comparativo se analizaron los registros polisomnográficos de los modelos animales, según su sexo (machos o hembras) y según la exposición a los diferentes pesticidas durante la gestación/lactancia, obteniendo los siguientes grupos:

- Machos grupo control (VH)
- Machos expuestos a pesticidas organoclorados (endosulfán- END)
- Machos expuestos a pesticidas piretroides (cipermetrín- CYP)
- Machos expuestos a pesticidas carbamatos (carbaril - CARB)
- Machos expuestos a pesticidas organofosforados (clopirifos- CPF)
- Hembras grupo control (VH)
- Hembras expuestas a pesticidas organoclorados (endosulfán- END)
- Hembras expuestas a pesticidas carbamatos (carbaril- CARB)



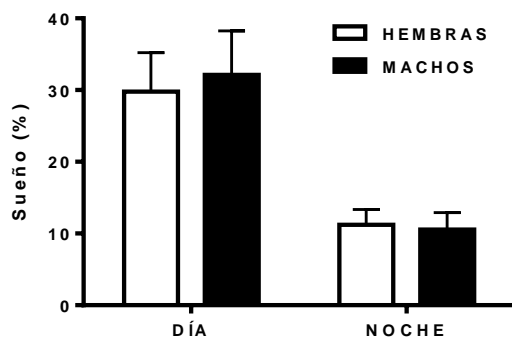
## 1.- Diferencias entre machos y hembras sin exposición a pesticidas (Análisis cualitativo).

En el análisis porcentual del sueño total las hembras duermen un  $21.3 \pm 2.6\%$  y los machos una  $21.9 \pm 2.2\%$ , por lo que no se observaron diferencias significativas (Ver Figura 1).



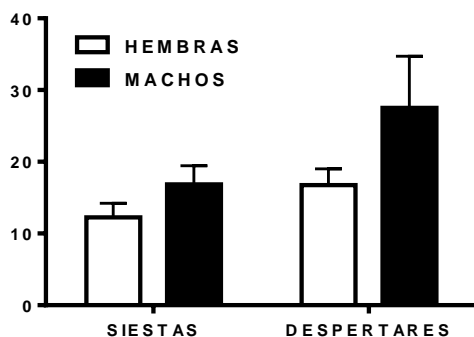
**Figura 1. Proporción porcentual del sueño total en hembras y machos.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para analizar el total del tiempo dormido. Los valores representan la media  $\pm$  SEM del número de ratas analizadas. La figura muestra el porcentaje de sueño total en ratas de ambos sexos (hembras y machos).

En el análisis cualitativo del electroencefalograma, se observa un mayor porcentaje de sueño diurno que nocturno en ambos sexos, sin diferencias significativas entre ambos. El sueño diurno representa un  $29.8 \pm 5.4\%$  en hembras frente a un  $32.1 \pm 6\%$  en machos, mientras que el sueño nocturno representa un  $11.2 \pm 2.1\%$  en hembras frente a un  $10.6 \pm 2.3\%$  en machos (Ver Figura 2).

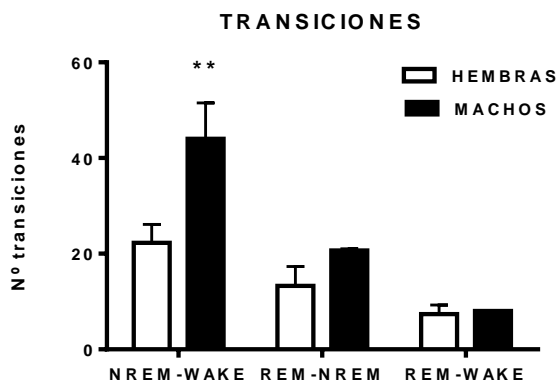


**Figura 2. Proporción porcentual del sueño total en hembras y machos con su distribución diurna y nocturna.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para analizar el total del tiempo dormido durante el día y durante la noche en ambos sexos. Los valores representan la media  $\pm$  SEM del número de ratas analizadas. La Figura muestra el porcentaje de sueño total en ratas de ambos sexos (hembras y machos) distribuido en sueño diurno y nocturno.

Se analizó el número de despertares durante el sueño y el número de siestas durante la noche, comprobándose una discreta tendencia a un mayor número de ambas en machos, sin ser el resultado estadísticamente significativo. El número de siestas durante la noche es de  $12.3 \pm 2$  veces en hembras y  $16.8 \pm 2.6$  veces en machos y el número de despertares durante el sueño es de  $16.8 \pm 2.3$  veces en hembras y de  $27.5 \pm 7.2$  veces en machos. Posteriormente se analizó en número de transiciones de estadios de sueño (REM y NREM) a estadio de despierto (WK), observándose un aumento de los mismos en la fase de NREM a WK en machos, siendo esta estadísticamente significativa (Ver Figuras 3 y 4).

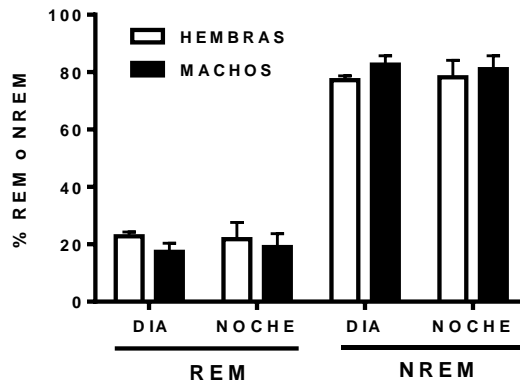


**Figura 3. Número de despertares durante el sueño diurno y número de siestas durante la noche en machos y hembras.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para analizar el total del tiempo dormido durante el día y durante la noche en ambos sexos. Los valores representan la media  $\pm$  SEM del número de ratas analizadas. La Figura muestra el número de siestas durante el periodo nocturno y el número de despertares durante el tiempo de sueño.



**Figura 4. Número de transiciones entre estadios del sueño (NREM y REM) a estadio de despierto (WK) en machos y hembras.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) y posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del número de transiciones de estadios del sueño y estadio de despierto, para determinar el número de despertares. Los valores representan la media  $\pm$  SEM del número de ratas analizadas en ambos sexos. La figura muestra el número de transiciones entre diferentes estadios del sueño y estadio de despierto, en hembras y machos. Los resultados con diferencias estadísticamente significativas se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

El análisis proporcional de fases durante el sueño muestra un mayor porcentaje de sueño NREM tanto en el sueño nocturno como diurno, sin existir diferencias significativas entre ambos sexos (Ver Figura 5).

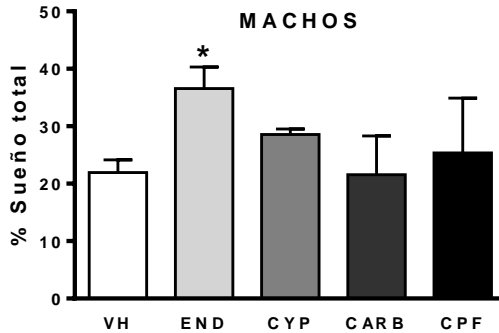


**Figura 5. Proporción porcentual de sueño REM y NREM durante el día y la noche, en ambos sexos.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) y posteriormente se realizó un análisis cuantitativo de la proporción de sueño en las fases REM y NREM del total del tiempo dormido durante el día y durante la noche, para ambos sexos. La Figura muestra el porcentaje de ambos estadios y su distribución nocturna y diurna para hembras y machos.

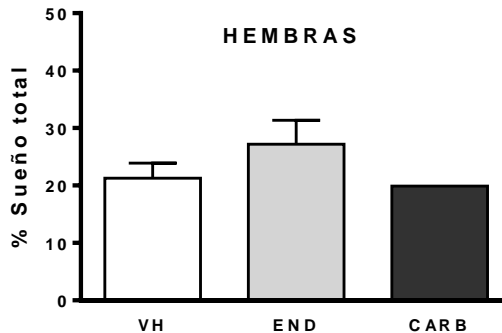
## 2.- Diferencias entre machos y hembras expuestos a diferentes pesticidas (Análisis cualitativo).

En el análisis porcentual del sueño total los machos control duermen un  $21.9 \pm 2.2\%$ , los expuestos a endosulfán un  $36.6 \pm 3.8\%$ , los expuestos a cipermetrín un  $28.6 \pm 1$ , los expuestos a carbaril un  $21.6 \pm 6.7$  y los expuestos a clorpirifos un  $25.4 \pm 9.5$  (Ver Figura 6). Las hembras control duermen un  $21.3 \pm 2.6\%$ , las expuestas a

endosulfán un  $27.2 \pm 4.1\%$  y la expuesta a carbaril un  $19.9 \pm 0$  (Ver figura 7)



**Figura 6. Proporción porcentual del sueño total en machos expuestos a pesticidas.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para analizar el total del tiempo dormido. Los valores representan la media  $\pm$  SEM del número de ratas analizadas. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco (\* $p < 0.05$ ). La Figura muestra el porcentaje de sueño total en ratas machos expuestas a los distintos pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfán; CYP: cipermetrín; CARB: carbaril; CPF: clorpirifos). Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

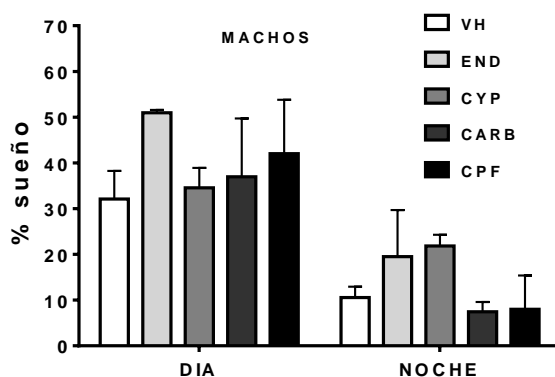


**Figura 7.- Proporción porcentual del sueño total en hembras expuestas a pesticidas.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para analizar el total del tiempo dormido. Los valores representan la media  $\pm$  SEM del número de ratas analizadas. La Figura muestra el porcentaje de sueño total en ratas hembras control y expuestas a los distintos pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril).

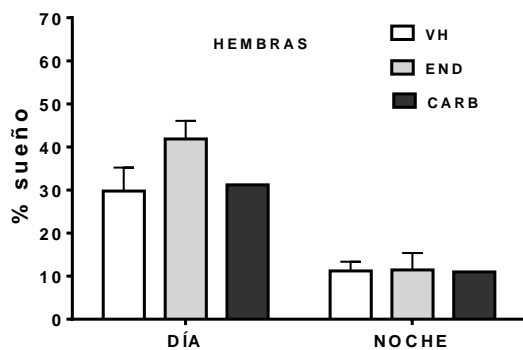
En el análisis cuantitativo del electroencefalograma, se observa un mayor porcentaje de sueño diurno que nocturno en ambos sexos, sin diferencias significativas entre ambos, aunque en la exposición a endosulfán comparado con el grupo control, existe una tendencia a un mayor porcentaje de sueño, tanto diurno (machos y hembras, como nocturno (machos), sin ser los resultados estadísticamente significativos (Ver Figuras 8 y 9).

En machos, el sueño diurno del grupo control representa un  $32.1 \pm 6.1\%$  y el sueño nocturno un  $10.6 \pm 2.4\%$  ; en expuestos a endosulfán el sueño diurno es de un  $50.9 \pm 0.6\%$  y el nocturno de un  $19,5 \pm 10.2\%$  ; en expuestos a cipermetrín el sueño diurno es de un  $34.6 \pm 4.4\%$  y el nocturno de un  $21.8 \pm 2.4\%$ ; en expuestos a carbaril el sueño diurno es de un  $37.0 \pm 1.2\%$  y el nocturno de un  $7.5 \pm 2.2\%$  y en expuestos a clorpirifos el sueño diurno es de un  $42.0 \pm 11.8\%$  y el nocturno de  $8.0 \pm 7.4\%$  (Ver Figura 8).

En hembras, el porcentaje de sueño diurno del grupo control es de un  $29.8 \pm 5.4\%$  y el nocturno de un  $11.2 \pm 2.1\%$ ; en expuestas a endosulfán el sueño diurno representa un  $41.9 \pm 4.2\%$  y el nocturno un  $11.4 \pm 3.9\%$  y en la expuesta a carbaril el sueño diurno es de un  $31.2\%$  y el nocturno es de un  $11\%$ . (Ver Figura 9)



**Figura 8. Proporción porcentual del sueño total en machos control y expuestos a pesticidas, con su distribución diurna y nocturna.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para analizar el total del tiempo dormido durante el día y durante la noche en ratas machos control y expuestas a diferentes pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfán; CYP: cipermetrín; CARB: carbaril; CPF: clorpirifos). Los valores representan la media  $\pm$  SEM del número de ratas analizadas. La Figura muestra el porcentaje de sueño total en ratas macho expuestas a pesticidas distribuido en sueño diurno y nocturno.



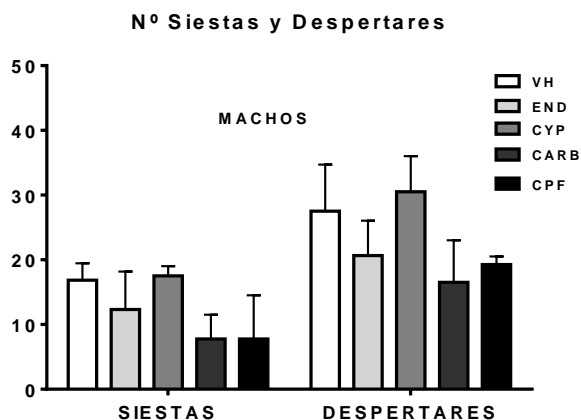
**Figura 9. Proporción porcentual del sueño total en hembras control y expuestas a pesticidas, con su distribución diurna y nocturna.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para analizar el total del tiempo dormido durante el día y durante la noche en ratas hembras control y expuestas a diferentes pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril). Los valores representan la media  $\pm$  SEM del número de ratas analizadas. La Figura muestra el porcentaje de sueño total en ratas hembra expuestas a pesticidas distribuido en sueño diurno y nocturno.

Se analizó el número de despertares durante el sueño y el número de siestas durante la noche, tanto en ratas machos como en hembras, controles y expuestas a los diferentes pesticidas, sin registrarse diferencias estadísticamente significativas en los resultados.

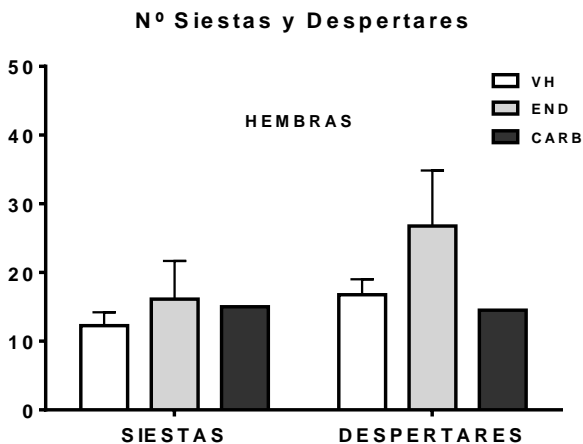
En machos, el número de siestas durante la noche en el grupo control es de  $16.8 \pm 2$  y el de despertares es de  $27.5 \pm 7.2$ ; en expuestos a endosulfán el número de siestas y de despertares es de  $12.3 \pm 5.8$  y  $20.7 \pm 5.4$  respectivamente; en expuestos a cipermetrín de  $17.5 \pm 1.5$  siestas y  $30.5 \pm 5.5$  despertares; en expuestos a carbaril de  $7.8 \pm 3.8$  siestas y  $19.3 \pm 1.3$  despertares y en expuestos a clorpirifos de  $7.8 \pm 6.8$  siestas y  $19.3 \pm 1.3$  despertares (Ver Figura 10).

En hembras, el número de siestas en el grupo control es de  $12.3 \pm 2$  y el de despertares es de  $16.8 \pm 2.3$ ; en expuestas a endosulfán el número de siestas y despertares es de  $16.1 \pm 5.6$  y de  $26.8 \pm 8.1$  respectivamente y en exposición a clorpirifos de 15 siestas y 14.5 despertares (Ver Figura 11).



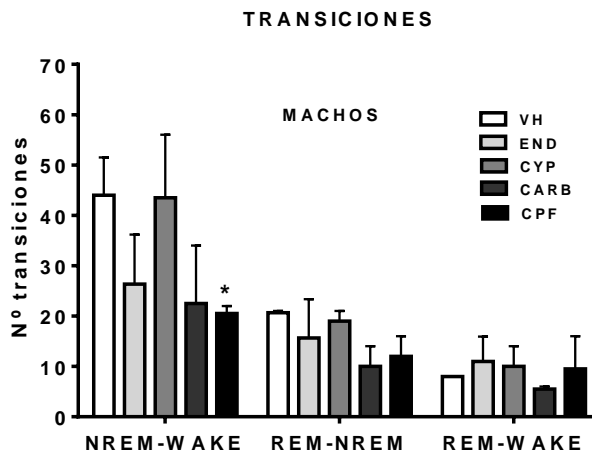


**Figura 10. Número de despertares durante el sueño diurno y número de siestas durante la noche en machos control y expuestos a pesticidas.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para analizar el total del tiempo dormido durante el día y durante la noche. Los valores representan la media  $\pm$  SEM del número de ratas analizadas. La Figura muestra el número de siestas durante el periodo nocturno y el número de despertares durante el tiempo de sueño en ratas macho control y con exposición a pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfán; CYP: cipermetrín; CARB: carbaril; CPF: clorpirifos).



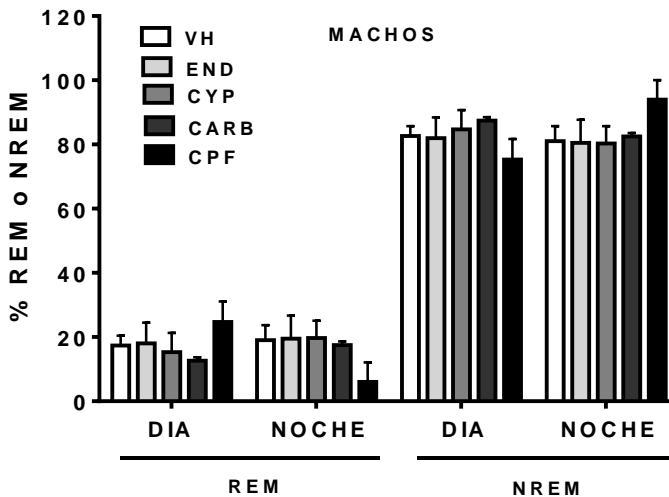
**Figura 11. Número de despertares durante el sueño diurno y número de siestas durante la noche en hembras control y expuestas a pesticidas.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) para analizar el total del tiempo dormido durante el día y durante la noche. Los valores representan la media  $\pm$  SEM del número de ratas analizadas. La Figura muestra el número de siestas durante el periodo nocturno y el número de despertares durante el tiempo de sueño en ratas hembras control y con exposición a pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril).

Posteriormente se analizó en número de transiciones de estadios de sueño (REM y NREM) a estadio de despierto (WK), registrándose un tendencia al aumento de las mismas en hembras expuestas a endosulfán, sin ser los resultados estadísticamente significativos. En machos se registra una disminución de las transiciones de fase NREM a WK en las expuestas a clorpirifos, siendo este resultado estadísticamente significativo (Ver Figuras 12 y 13).

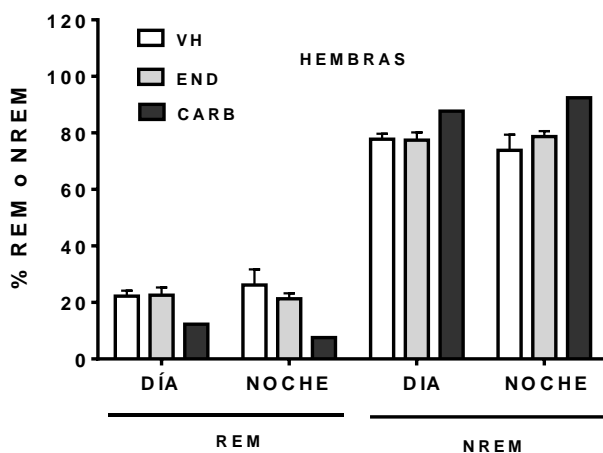


**Figura 12. Número de transiciones entre estadios del sueño (NREM y REM) a estadio de despierto (WK) en machos control y expuestos a pesticidas.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) y posteriormente se realizó un análisis cuantitativo del número de transiciones de estadios del sueño y estadio de despierto, para determinar el número de despertares. Los valores representan la media  $\pm$  SEM del número de ratas analizadas en los diferentes grupos estudiados (VH: vehículo; END: endosulfán; CYP: cipermetrín; CARB: carbaril; CPF: clorpirifos). La Figura muestra el número de transiciones entre diferentes estadios del sueño y estadio de despierto en machos control y expuestos a pesticidas. Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01).

El análisis proporcional de fases durante el sueño muestra un mayor porcentaje de sueño NREM tanto en el sueño nocturno como diurno, sin existir diferencias significativas en ambos sexos y grupos de exposición a pesticidas respecto al grupo control. (Ver Figuras 14 y 15).



**Figura 14. Proporción porcentual de sueño REM y NREM durante el día y la noche, en machos control y expuestos a pesticidas.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) y posteriormente se realizó un análisis cuantitativo de la proporción de sueño en las fase REM y NREM del total del tiempo dormido durante el día y durante la noche en machos control y expuestos a pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfán; CYP: cipermetrín; CARB: carbaril; CPF: clorpirifos). La Figura muestra el porcentaje de ambos estadios y su distribución nocturna y diurna en machos.



**Figura 15. Proporción porcentual de sueño REM y NREM durante el día y la noche, en hembras control y expuestas a pesticidas.** Se analizó el electroencefalograma cuantitativamente según los diferentes estadios (WK, REM, NREM) y posteriormente se realizó un análisis cuantitativo de la proporción de sueño en las fase REM y NREM del total del tiempo dormido durante el día y durante la noche en hembras control y expuestas a pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfan; CARB: carbaril). La Figura muestra el porcentaje de ambos estadios y su distribución nocturna y diurna en hembras.

### **3.- Análisis espectral. Diferencias entre machos y hembras sin exposición a pesticidas (Análisis cuantitativo)**

En el análisis cuantitativo de las potencias relativas de las bandas del electroencefalograma, se obtienen unas potencias durante el periodo de vigilia para ratas macho en córtex cerebral e hipocampo respectivamente de la banda delta ( $\delta$ ):  $11.6 \pm 0.4\%$  y  $8.7 \pm 0.6\%$  respectivamente; theta ( $\theta$ ):  $31.7 \pm 1.1\%$  y  $26 \pm 4.9\%$ ; alfa ( $\alpha$ ):  $27.7 \pm 1.3\%$  y  $29.6 \pm 2\%$ ; y beta ( $\beta$ ):  $28.9 \pm 2.1\%$  y  $35.7 \pm 7\%$  Respecto a

las ratas hembras, las potencias relativas durante el periodo de vigilia fueron en córtex cerebral e hipocampo respectivamente, para la banda  $\delta$ :  $16.2\pm 2.5\%$  y  $10.4\pm 1\%$ ;  $\theta$ :  $34.6\pm 0.8\%$  y  $27.2\pm 2.2\%$ ;  $\alpha$ :  $22.2\pm 2.2\%$  y  $35.9\pm 2,8\%$ ; y  $\beta$ :  $27\pm 0.7\%$  y  $26.5\pm 0.9\%$  (Ver Figuras 16 y 17).

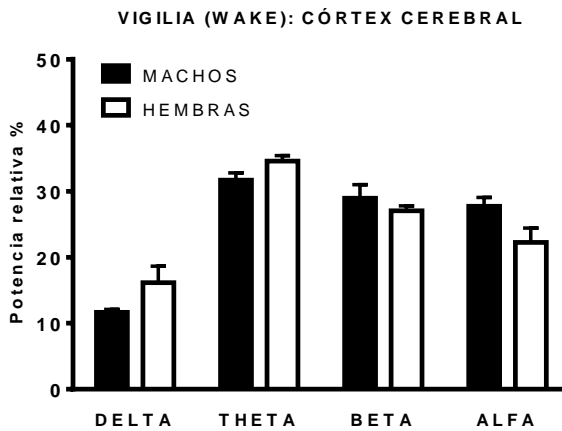
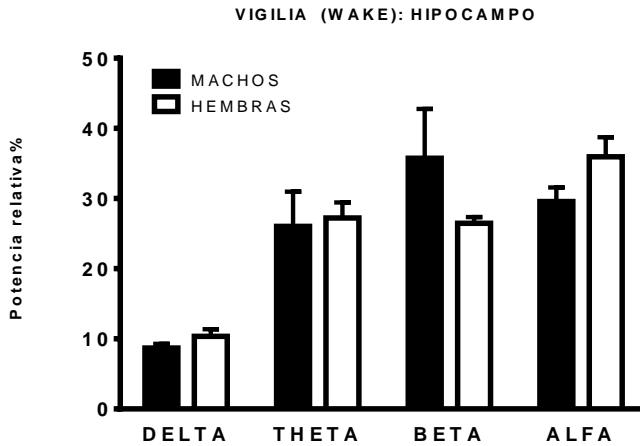


Figura 16. Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en córtex cerebral, durante el periodo de vigilia. En la Figura se representan la media  $\pm$  SEM de machos y hembras.



**Figura 17.** Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en hipocampo, durante el periodo de vigilia. En la Figura se representan la media  $\pm$  SEM de machos y hembras.

En el análisis cuantitativo de las potencias relativas de las bandas del EEG, se obtienen durante el periodo de sueño REM, para ratas macho en córtex cerebral e hipocampo respectivamente, las potencias de la banda delta ( $\delta$ ):  $17.4 \pm 9.5\%$  y  $7.2 \pm 0.7\%$  respectivamente; theta ( $\theta$ ):  $33.1 \pm 3.3\%$  y  $26.9 \pm 5.3\%$ ; alfa ( $\alpha$ ):  $34.5 \pm 4\%$  y  $30.6 \pm 2.7\%$ ; y beta ( $\beta$ ):  $25.9 \pm 4.5\%$  y  $35.3 \pm 7\%$ . Respecto a las ratas hembras, las potencias relativas durante el periodo de sueño REM, fueron en córtex cerebral e hipocampo respectivamente, para la banda  $\delta$ :  $11.8 \pm 1.6\%$  y  $8.5 \pm 0.7\%$ ;  $\theta$ :  $33.8 \pm 1.3\%$  y  $30.9 \pm 2.5\%$ ;  $\alpha$ :  $23 \pm 2\%$  y  $32 \pm 3.6\%$ ; y  $\beta$ :  $31.4 \pm 0.4\%$  y  $28.7 \pm 1.5\%$  (Ver Figuras 18 y 19).

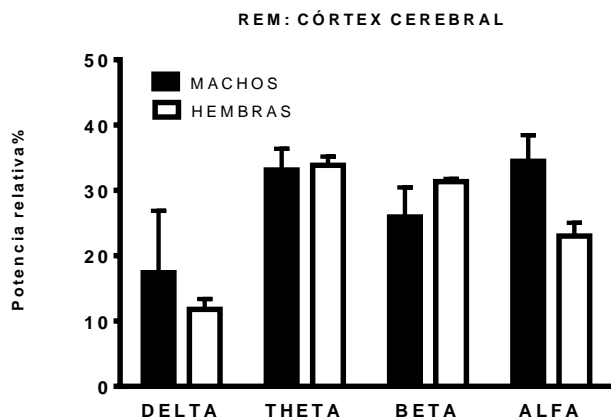


Figura 18. Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en córtex cerebral, durante el periodo de sueño REM. En la Figura se representan la media  $\pm$  SEM de machos y hembras.

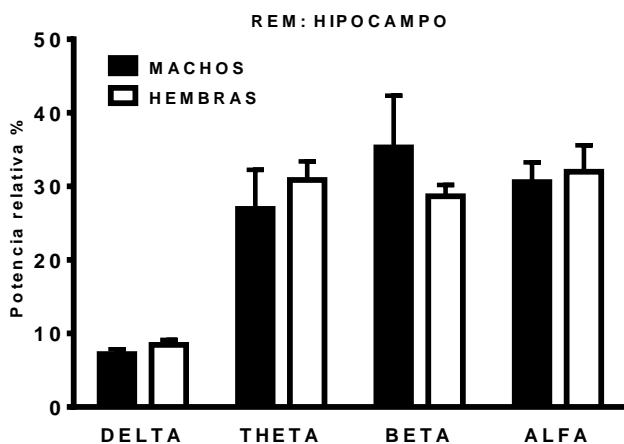
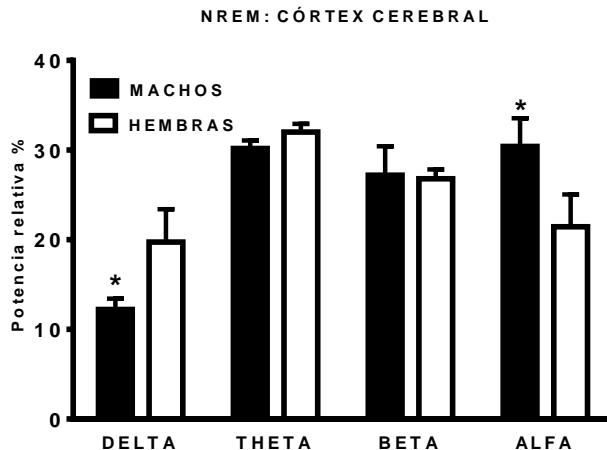


Figura 19. Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas delta (1-3.4Hz), theta (3.5-7.4 Hz), beta (13.5-26 Hz) y alfa (7.5-13.4 Hz) en hipocampo, durante el periodo de sueño REM. En la Figura se representan la media  $\pm$  SEM de machos y hembras.

En el análisis cuantitativo de las potencias relativas de las bandas del EEG, se obtienen durante el periodo de sueño NREM, para ratas macho en córtex cerebral e hipocampo respectivamente, las potencias de la banda delta ( $\delta$ ):  $12.2 \pm 1.2\%$  y  $10 \pm 1\%$  respectivamente; theta ( $\theta$ ):  $30.2 \pm 0.9\%$  y  $25 \pm 4.2\%$ ; alfa ( $\alpha$ ):  $30.4 \pm 3.1\%$  y  $30.4 \pm 2.1\%$ ; y beta ( $\beta$ ):  $27.2 \pm 3.2\%$  y  $34.7 \pm 7.2\%$  Respecto a las ratas hembras, las potencias relativas durante el periodo de sueño NREM, fueron en córtex cerebral e hipocampo respectivamente, para la banda  $\delta$ :  $19.7 \pm 3.7\%$  y  $13.1 \pm 1.5\%$ ;  $\theta$ :  $32 \pm 0.9\%$  y  $26.4 \pm 2.5\%$ ;  $\alpha$ :  $21.4 \pm 3.6\%$  y  $34.9 \pm 3.1\%$ ; y  $\beta$ :  $26.8 \pm 1\%$  y  $25.6 \pm 1.1\%$  (Ver Figuras 20, 20.1 y 21).



**Figura 20.** Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en córtex cerebral, durante el periodo de sueño NREM. En la Figura se representan la media  $\pm$  SEM de machos y hembras. Los resultados con diferencias estadísticamente significativas se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).



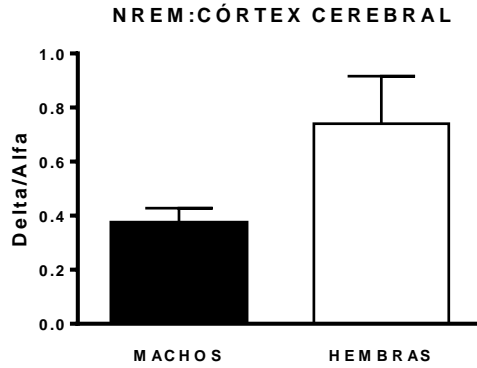


Figura 20.1. Cociente Delta/Alfa durante el sueño NREM en ratas macho y hembra. En la Figura se representan la media  $\pm$  SEM de machos y hembras.

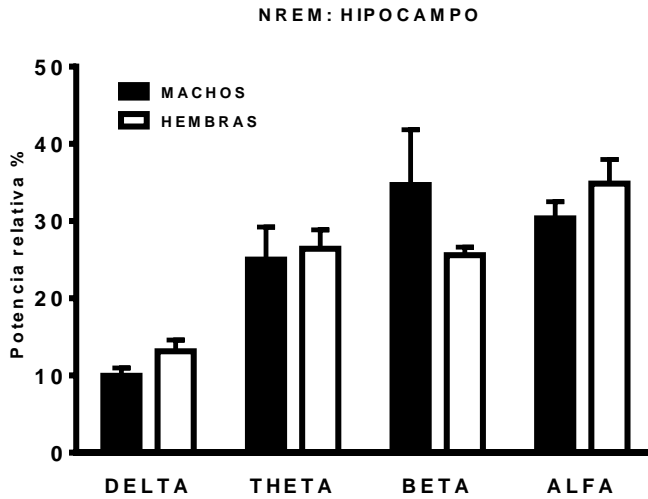


Figura 21. Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en hipocampo, durante el periodo de sueño NREM. En la Figura se representan los valores de la media  $\pm$  SEM de machos y hembras.

#### 4.- Análisis espectral. Resultados en ratas macho expuestas a pesticidas. (Análisis cuantitativo)

En el análisis cuantitativo del EEG, durante el periodo de vigilia en córtex cerebral e hipocampo respectivamente, la Frecuencia Media Dominante (MDF) en machos es de  $9.9 \pm 0.1$  Hz y  $11.8 \pm 0.9$  Hz respectivamente para ratas **control**;  $9.5 \pm 0.3$  Hz y  $12 \pm 0.9$  Hz para expuestas a **END**;  $10.6 \pm 0.9$  Hz y  $11.5 \pm 0.4$  Hz para expuestas a **CYP**;  $9.6 \pm 0.2$  Hz y  $11.4 \pm 0.3$  Hz para expuestas a **CARB**;  $9 \pm 0.3$  Hz y  $10.6 \pm 1.9$  Hz para expuestas a **CPF**.

Durante el periodo de sueño REM en córtex cerebral e hipocampo respectivamente, la Frecuencia Media Dominante (MDF) en machos es de  $10.1 \pm 0.4$  Hz y  $11.8 \pm 0.9$  Hz respectivamente para ratas **control**;  $9.6 \pm 0.2$  Hz y  $12 \pm 0.9$  Hz para expuestas a **END**;  $10.4 \pm 0.8$  Hz y  $11.6 \pm 0.6$  Hz para expuestas a **CYP**;  $10.2 \pm 0.7$  Hz y  $11.8 \pm 0.4$  Hz para expuestas a **CARB**;  $10.2 \pm 0.6$  Hz y  $10.9 \pm 2.1$  Hz para expuestas a **CPF**.

Durante el periodo de sueño NREM en córtex cerebral e hipocampo respectivamente, la Frecuencia Media Dominante (MDF) en machos es de  $9.9 \pm 0.2$  Hz y  $11.7 \pm 1$  Hz respectivamente para ratas **control**;  $9.2 \pm 0.4$  Hz y  $12 \pm 0.8$  Hz para expuestas a **END**;  $10.2 \pm 0.4$  Hz y  $11.4 \pm 0.3$

Hz para expuestas a **CYP**;  $9.3 \pm 0.3$  Hz y  $10.4 \pm 1.4$  Hz para expuestas a **CARB**;  $9.3 \pm 0.1$  Hz y  $10.4 \pm 2.1$  Hz para expuestas a **CPF**.

Con estos resultados vemos que no existen diferencias significativas en los valores de la MDF en córtex cerebral e hipocampo, para ratas control y para expuestas a pesticidas.

En el análisis cuantitativo de las potencias relativas de las bandas del EEG, se obtienen unas potencias durante el periodo de vigilia para ratas macho **control** en córtex cerebral e hipocampo respectivamente de la banda delta ( $\delta$ ):  $12 \pm 0.4\%$  y  $8.7 \pm 0.6\%$  respectivamente; theta ( $\theta$ ):  $32.4 \pm 1.2\%$  y  $26 \pm 4.9\%$ ; alfa ( $\alpha$ ):  $27.3 \pm 1.8\%$  y  $29.6 \pm 2\%$ ; y beta ( $\beta$ ):  $28.3 \pm 2.8\%$  y  $35.7 \pm 7\%$ . Para ratas expuestas a **END** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $15.6 \pm 2.9\%$  y  $9 \pm 0.6\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $32.5 \pm 1\%$  y  $24.3 \pm 4.7\%$ ; banda  $\alpha$ :  $28.3 \pm 4.2\%$  y  $29.6 \pm 2\%$ ; y banda  $\beta$ :  $23.7 \pm 0.8\%$  y  $38.4 \pm 6.1\%$ . Para ratas expuestas a **CYP** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $10.5 \pm 3.1\%$  y  $9.7 \pm 1.1\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $28.4 \pm 3.9\%$  y  $24.3 \pm 1.2\%$ ; banda  $\alpha$ :  $29.1 \pm 5\%$  y  $34.6 \pm 3.5\%$ ; y banda  $\beta$ :  $32 \pm 1.9\%$  y  $31.5 \pm 3.4\%$ . Para ratas expuestas a **CARB** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $14.3 \pm 2.3\%$  y  $9.4 \pm 0.1\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $32.3 \pm 2.7\%$  y  $27.1 \pm 0.5\%$ ;

banda  $\alpha$ :  $26.6 \pm 0.9\%$  y  $34.3 \pm 2.1\%$ ; y banda  $\beta$ :  $29.5 \pm 2.6\%$  y  $29.2 \pm 1.6\%$ . Para ratas expuestas a **CPF** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $19 \pm 2.8\%$  y  $14.2 \pm 7\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $32.7 \pm 0.6\%$  y  $27.8 \pm 4.7\%$ ; banda  $\alpha$ :  $21.6 \pm 1.3\%$  y  $30.5 \pm 10\%$ ; y banda  $\beta$ :  $23.9 \pm 2.4\%$  y  $27.5 \pm 0.9\%$  (Ver Figuras 22 y 23)

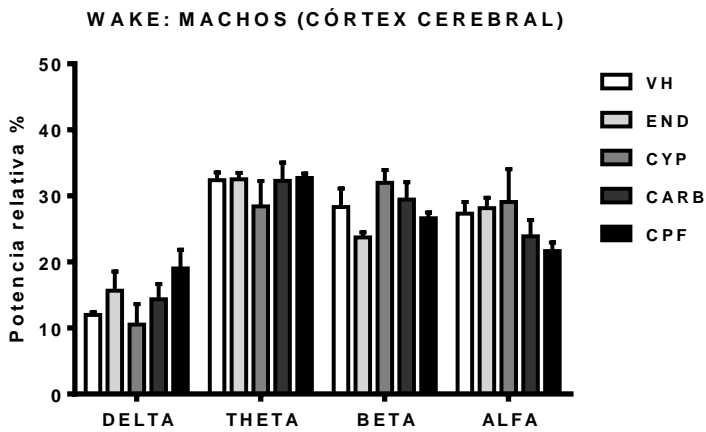


Figura 22. Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en córtex cerebral, durante el periodo de vigilia. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de las bandas de frecuencias en los diferentes grupos de ratas macho estudiados (VH: vehículo; END: endosulfán; CYP: cipermetrín; CARB: carbaril; CPF: clorpirifos).

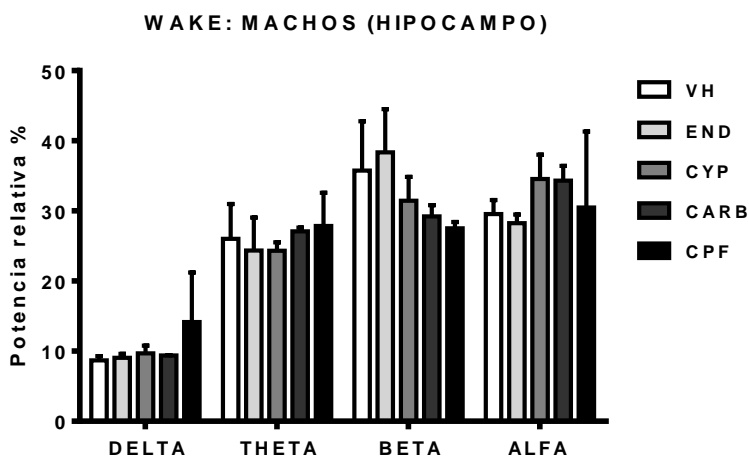


Figura 23: Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas delta (1-3.4Hz), theta (3.5-7.4 Hz), beta (13.5-26 Hz) y alfa (7.5-13.4 Hz) en hipocampo, durante el periodo de vigilia. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de las bandas de frecuencias en los diferentes grupos de ratas macho estudiados (VH: vehiculo; END: endosulfán; CYP: cipermetrin; CARB: carbaril; CPF: clorpirifos).

En el análisis cuantitativo de las potencias relativas de las bandas del EEG, se obtienen unas potencias durante el periodo de sueño REM para ratas macho **control** en córtex cerebral e hipocampo respectivamente de la banda  $\delta$ :  $17.4 \pm 9.5\%$  y  $7.2 \pm 0.7\%$  respectivamente;  $\theta$ :  $33.1 \pm 3.3\%$  y  $26.9 \pm 5.3\%$ ;  $\alpha$ :  $34.5 \pm 4\%$  y  $30.6 \pm 2.7\%$ ; y  $\beta$ :  $25.9 \pm 4.5\%$  y  $35.3 \pm 7\%$ . Para ratas expuestas a **END** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $13.3 \pm 3.3\%$  y  $8.2 \pm 0.5\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $32.8 \pm 2.1\%$  y  $27.2 \pm 7.5\%$ ; banda  $\alpha$ :  $31 \pm 1.5\%$  y  $26.8 \pm 1.8\%$ ; y banda  $\beta$ :  $23 \pm 0.3\%$  y  $37.8 \pm 6.2\%$ . Para ratas expuestas a **CYP** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $8.5 \pm 1.7\%$  y  $8.4 \pm 0.6\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $30.2 \pm 4.2\%$  y  $25.8 \pm 3.8\%$ ; banda  $\alpha$ :  $26.2 \pm 4.7\%$  y  $35 \pm 4.7\%$ ;

y banda  $\beta$ :  $35.2 \pm 1.2\%$  y  $30.9 \pm 1.5\%$ . Para ratas expuestas a **CARB** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $10.7 \pm 1.1\%$  y  $8.6 \pm 1\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $31.3 \pm 3.5\%$  y  $27 \pm 0.3\%$ ; banda  $\alpha$ :  $25.8 \pm 4.5\%$  y  $36.8 \pm 4.1\%$ ; y banda  $\beta$ :  $32.2 \pm 3\%$  y  $27.6 \pm 9\%$ . Para ratas expuestas a **CPF** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $13.8 \pm 3.9\%$  y  $10.9 \pm 3.5\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $29.2 \pm 0.2\%$  y  $28.6 \pm 7.4\%$ ; banda  $\alpha$ :  $27.6 \pm 2.6\%$  y  $30.9 \pm 13\%$ ; y banda  $\beta$ :  $29.4 \pm 1.4\%$  y  $29.6 \pm 2.6\%$  (Ver Figuras 24 y 25).

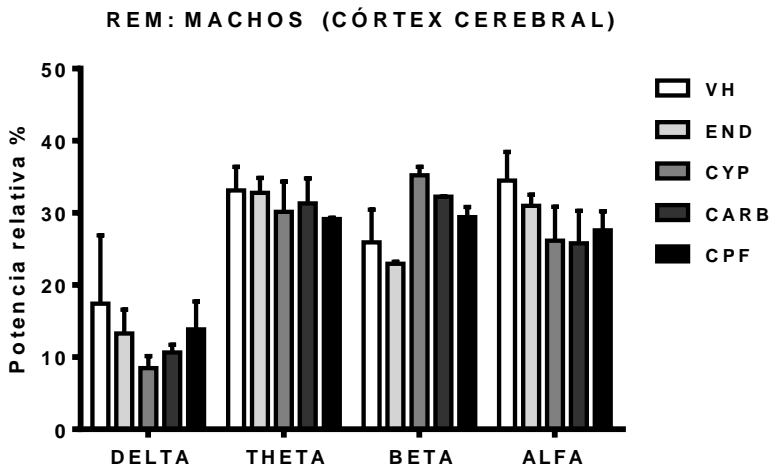


Figura 24. Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en córtex cerebral, durante el periodo de sueño REM. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de las bandas de frecuencias en los diferentes grupos de ratas macho estudiados (VH: vehículo; END: endosulfán; CYP: cipermetrín; CARB: carbaril ; CPF: clorpirifos).

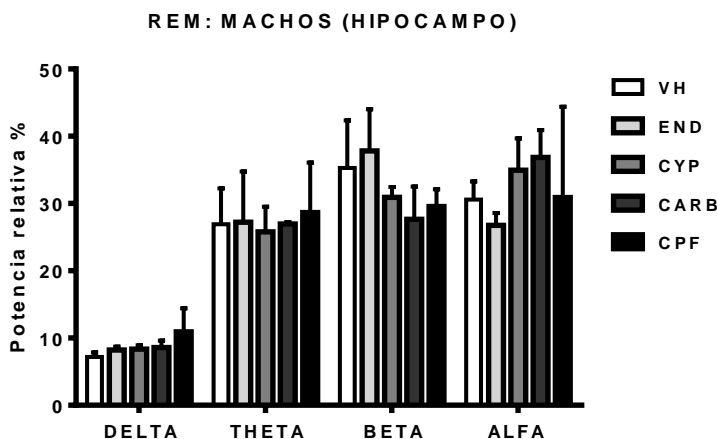
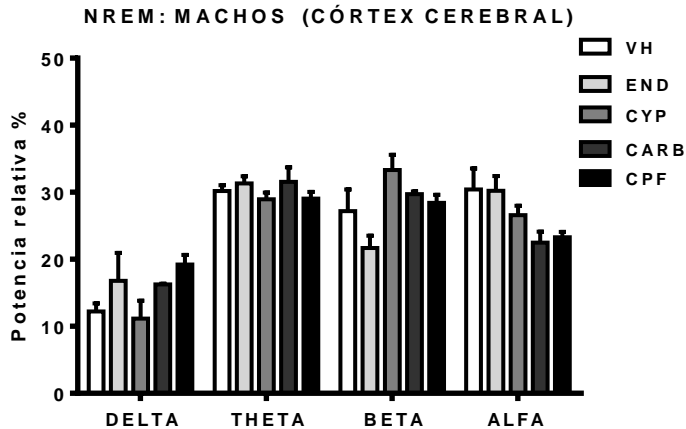


Figura 25. Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en hipocampo, durante el periodo de sueño REM. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de las bandas de frecuencias en los diferentes grupos de ratas macho estudiados (VH: vehículo; END: endosulfán; CYP: cipermetrín; CARB: carbaril; CPF: clorpirifos).

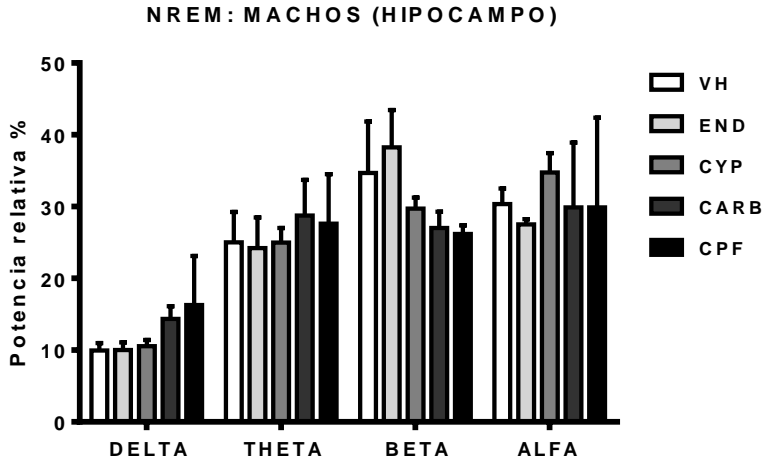
En el análisis cuantitativo de las potencias relativas de las bandas del EEG, se obtienen unas potencias durante el periodo de sueño NREM para ratas macho **control** en córtex cerebral e hipocampo respectivamente de la banda  $\delta$ :  $12.2 \pm 1.2\%$  y  $10 \pm 1\%$  respectivamente;  $\theta$ :  $30.2 \pm 0.9\%$  y  $25 \pm 4.2\%$ ;  $\alpha$ :  $30.4 \pm 3.1\%$  y  $30.4 \pm 2.1\%$ ; y  $\beta$ :  $27.2 \pm 3.2\%$  y  $34.7 \pm 7.2\%$ . Para ratas expuestas a **END** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $16.8 \pm 3.2\%$  y  $10 \pm 1.1\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $31.3 \pm 1\%$  y  $24.2 \pm 4.3\%$ ; banda  $\alpha$ :  $30.2 \pm 2.2\%$  y  $27.5 \pm 0.7\%$ ; y banda  $\beta$ :  $21.7 \pm 1.9\%$  y  $38.3 \pm 5.2\%$ . Para ratas expuestas a **CYP** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $11.1 \pm 2.7\%$  y  $10.6 \pm 0.9\%$

respectivamente; banda  $\theta$ :  $33.3 \pm 2.3\%$  y  $25 \pm 2\%$ ; banda  $\alpha$ :  $26.6 \pm 1.4\%$  y  $34.7 \pm 2.7\%$ ; y banda  $\beta$ :  $33.3 \pm 2.3\%$  y  $29.7 \pm 1.5\%$ . Para ratas expuestas a **CARB** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $16.2 \pm 0.1\%$  y  $14.3 \pm 1.8\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $31.6 \pm 2.2\%$  y  $28.7 \pm 5\%$ ; banda  $\alpha$ :  $22.5 \pm 1.6\%$  y  $29.9 \pm 9\%$ ; y banda  $\beta$ :  $29.7 \pm 0.4\%$  y  $27 \pm 2.3\%$ . Para ratas expuestas a **CPF** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $19.2 \pm 1.4\%$  y  $16.3 \pm 6.8\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $29.1 \pm 1\%$  y  $27.6 \pm 6.9\%$ ; banda  $\alpha$ :  $23.3 \pm 0.8\%$  y  $29.9 \pm 12\%$ ; y banda  $\beta$ :  $28.4 \pm 1.2\%$  y  $26.2 \pm 1.2\%$  (Ver Figuras 26 y 27).



**Figura 26. Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en córtex cerebral, durante el periodo de sueño NREM.** Los valores representan la media  $\pm$  SEM de las bandas de frecuencias en los diferentes grupos de ratas macho estudiados (VH: vehículo; END: endosulfán; CYP: cipermetrín; CARB: carbaril; CPF: clorpirifos).





**Figura 27. Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en hipocampo, durante el periodo de sueño NREM.** Los valores representan la media  $\pm$  SEM de las bandas de frecuencias en los diferentes grupos de ratas macho estudiados (VH: vehículo; END: endosulfán; CYP: cipermetrín; CARB: carbaril, CPF: clorpirifos).

Según estos resultados se calculó el cociente Delta/Alfa para los distintos modelos animales macho estudiados, para los periodos de vigilia, sueño NREM y sueño REM obteniendo resultados estadísticamente significativos en córtex cerebral para ratas macho tratadas con CPF en los periodos WAKE y NREM, lo que indica un aumento de la banda delta y una disminución de la banda alfa en dichos periodos (Ver Figuras 28, 29 y 30).

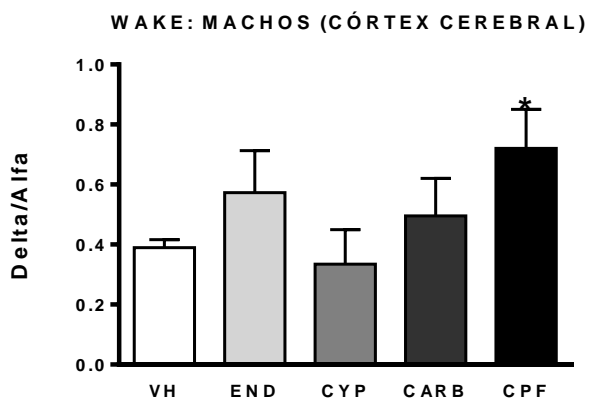


Figura 28. Cociente Delta/Alfa durante la vigilia en ratas macho control y expuestas a pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfán; CYP: cipermetrín; CARB: carbaril; CPF: clorpirifos). La Figura representa la media  $\pm$  SEM. Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

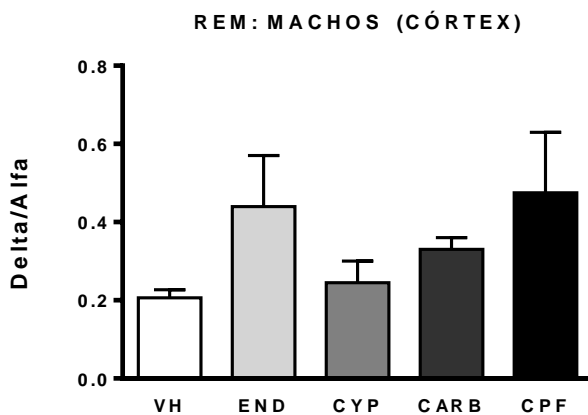


Figura 29. Cociente Delta/Alfa durante el sueño REM en ratas macho control y expuestas a pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfán; CYP: cipermetrín; CARB: carbaril; CPF: clorpirifos). La Figura representa la media  $\pm$  SEM.

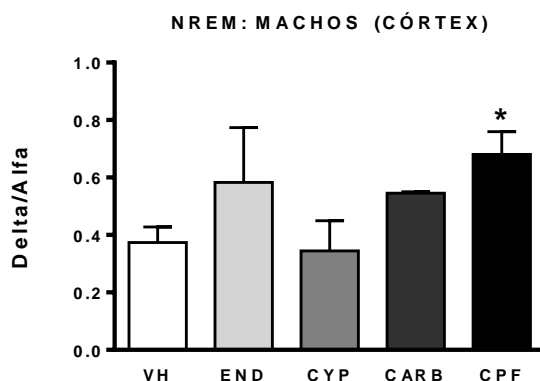


Figura 30. Cociente Delta/Alfa durante el sueño NREM en ratas macho control y expuestas a pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfán; CYP: cipermetrín; CARB: carbaril; CPF: clorpirifos). La Figura representa la media  $\pm$  SEM. Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

## 5.- Análisis espectral. Resultado en ratas hembra expuestas a pesticidas. (Análisis cuantitativo)

En el análisis cuantitativo del EEG, durante el periodo de vigilia en córtex cerebral e hipocampo respectivamente, la Frecuencia Media Dominante (MDF) en hembras es de  $9.1 \pm 0.4$  Hz y  $11.3 \pm 0.2$  Hz respectivamente para ratas **control**;  $10.6 \pm 0.2$  Hz y  $12.6 \pm 0.2$  Hz para expuestas a **END**;  $8.8 \pm 0$  Hz y  $13.2 \pm 0$  Hz para expuestas a **CARB**.

Durante el periodo de sueño REM en córtex cerebral e hipocampo respectivamente, la Frecuencia Media Dominante (MDF) en hembras es de  $9.7 \pm 0.3$  Hz y  $11. \pm 0.5$  Hz respectivamente para ratas **control**;  $10.9 \pm 0.2$

Hz y  $12.6 \pm 0.2$  Hz para expuestas a **END**;  $10.3 \pm 0$  Hz y  $13.1 \pm 0$  Hz para expuestas a **CARB**.

Durante el periodo de sueño NREM en córtex cerebral e hipocampo respectivamente, la Frecuencia Media Dominante (MDF) en hembras es de  $8.8 \pm 0.6$  Hz y  $11 \pm 0.6$  Hz respectivamente para ratas **control**;  $10.3 \pm 0.2$  Hz y  $12 \pm 0.2$  Hz para expuestas a **END**;  $9.5 \pm 0$  Hz y  $13 \pm 0$  Hz para expuestas a **CARB**.

Con estos resultados vemos que existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de la MDF en córtex cerebral e hipocampo, para el grupo expuesto a END en todas los estadios, excepto en el NREM en hipocampo, siendo mayores las del grupo control. (Ver Figuras 31 a 36)

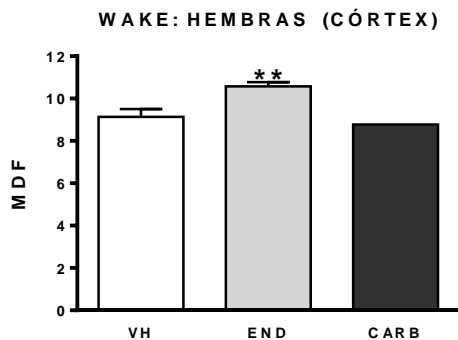
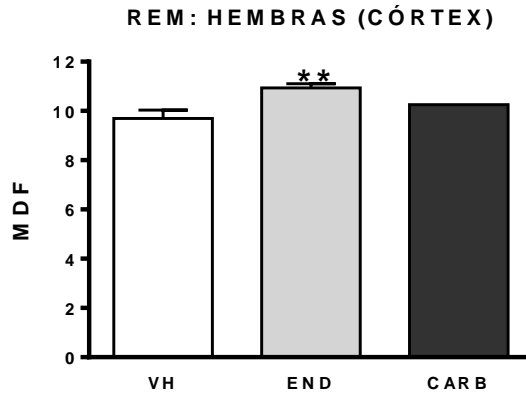
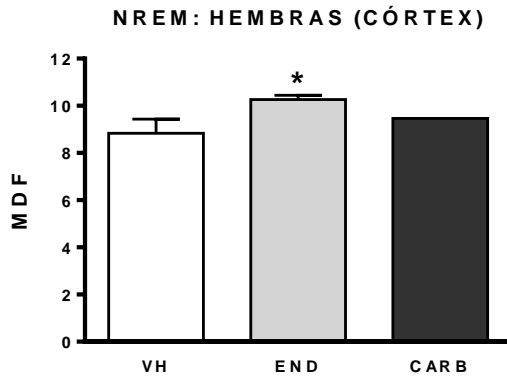


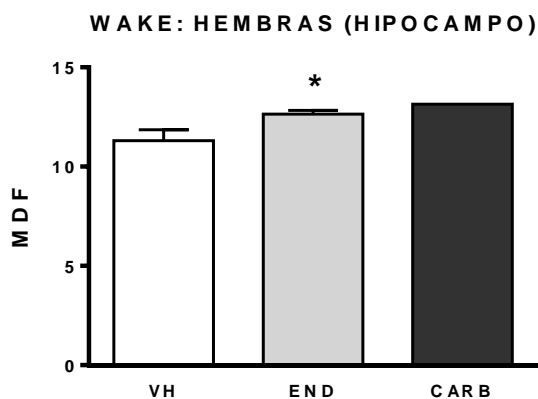
Figura 31. MDF en córtex cerebral de hembras durante el periodo de vigilia en ratas control y expuestas a pesticidas ((VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril). La Figura representa la media  $\pm$  SEM (Hz). Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).



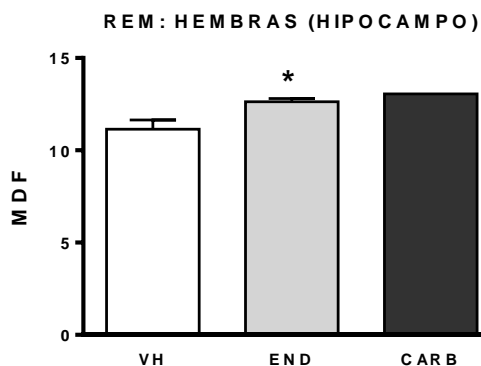
**Figura 32. MDF en córtex cerebral de hembras durante el periodo de sueño REM en ratas control y expuestas a pesticidas ((VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril). La Figura representa la media ± SEM (Hz). Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).**



**Figura 33. MDF en córtex cerebral de hembras durante el periodo de sueño NREM en ratas control y expuestas a pesticidas ((VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril). La Figura representa la media ± SEM (Hz). Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).**



**Figura 34. MDF en hipocampo de hembras durante el periodo de vigilia en ratas control y expuestas a pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril).** La Figura representa la media  $\pm$  SEM (Hz). Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).



**Figura 35. MDF en hipocampo de hembras durante el periodo de sueño REM en ratas control y expuestas a pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril).** La Figura representa la media  $\pm$  SEM (Hz). Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

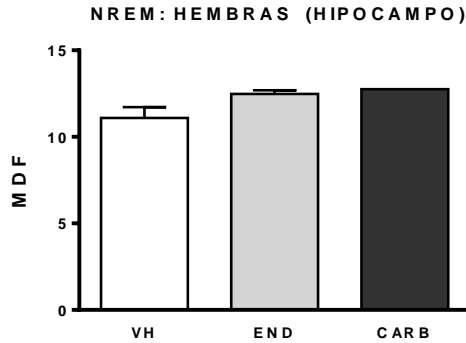
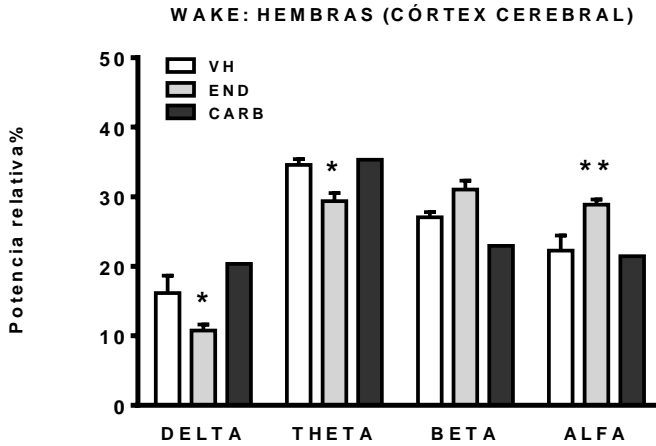
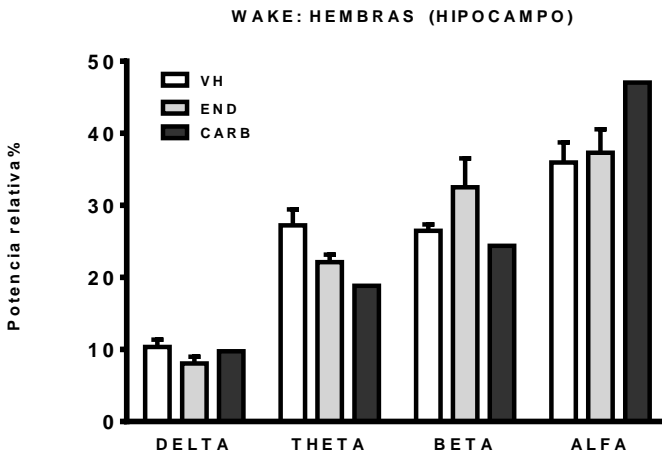


Figura 36. MDF en hipocampo de hembras durante el periodo de sueño NREM en ratas control y expuestas a pesticidas ((VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril). La Figura representa la media  $\pm$  SEM (Hz). Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).

En el análisis cuantitativo de las potencias relativas de las bandas del EEG, se obtienen unas potencias durante el periodo vigilia para ratas hembra **control** en córtex cerebral e hipocampo respectivamente de la banda  $\delta$ :  $16.2 \pm 2.5\%$  y  $10.4 \pm 1\%$  respectivamente;  $\theta$ :  $34.6 \pm 0.8\%$  y  $27.2 \pm 2.2\%$ ;  $\alpha$ :  $22.2 \pm 2.2\%$  y  $35.9 \pm 2.8\%$ ; y  $\beta$ :  $27 \pm 0.7\%$  y  $26.5 \pm 0.8\%$ . Para ratas expuestas a **END** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $10.8 \pm 3.9\%$  y  $8.1 \pm 0.9\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $29.4 \pm 1.1\%$  y  $22.1 \pm 1\%$ ; banda  $\alpha$ :  $28.9 \pm 0.8\%$  y  $37.3 \pm 3.2\%$ ; y banda  $\beta$ :  $31 \pm 1.3\%$  y  $32.5 \pm 4\%$ . Para ratas expuestas a **CARB** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $20.3 \pm 0\%$  y  $9.7 \pm 0\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $35.3 \pm 0\%$  y  $18.8 \pm 0. \%$ ; banda  $\alpha$ :  $21.4 \pm 0\%$  y  $47 \pm 0\%$ ; y banda  $\beta$ :  $22.9 \pm 0\%$  y  $24.4 \pm 0$  (Ver Figuras 37 y 38).



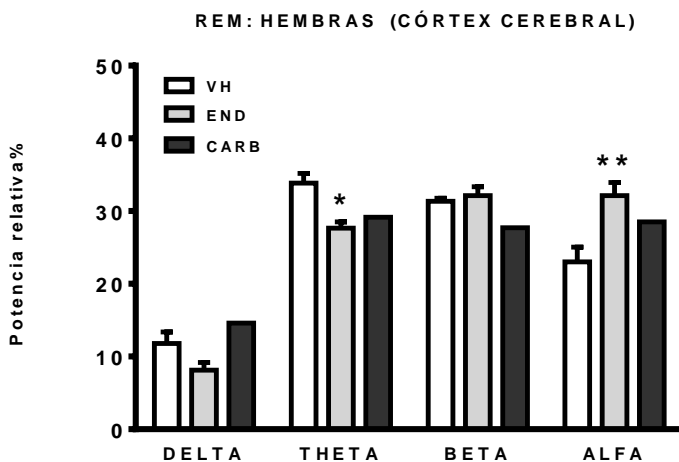
**Figura 37. Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en córtex cerebral, durante el periodo de vigilia.** La Figura representa la media  $\pm$  SEM de las bandas de frecuencias en los diferentes grupos de ratas hembras estudiados (VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril). Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).



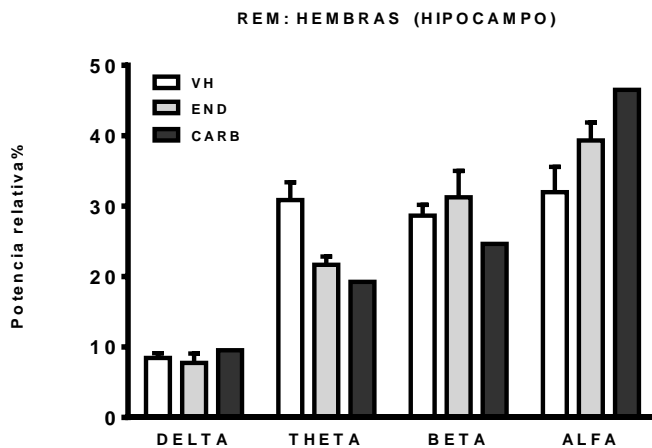
**Figura 38 Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en hipocampo, durante el periodo de vigilia.** La Figura representa la media  $\pm$  SEM de las bandas de frecuencias en los diferentes grupos de ratas hembras estudiados (VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril).



En el análisis cuantitativo de las potencias relativas de las bandas del EEG, se obtienen unas potencias durante el periodo de sueño REM para ratas hembra **control** en córtex cerebral e hipocampo respectivamente de la banda  $\delta$ :  $11.8 \pm 1.6\%$  y  $8.5 \pm 0.7\%$  respectivamente;  $\theta$ :  $33.8 \pm 1.3\%$  y  $30.9 \pm 2.5\%$ ;  $\alpha$ :  $23.2 \pm 2\%$  y  $32 \pm 3.6\%$ ; y  $\beta$ :  $31.4 \pm 0.4\%$  y  $28.7 \pm 1.5\%$ . Para ratas expuestas a **END** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $8.1 \pm 1.1\%$  y  $7.8 \pm 1.3\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $27.6 \pm 0.9\%$  y  $21.7 \pm 1.2\%$ ; banda  $\alpha$ :  $32.1 \pm 1.8\%$  y  $39.3 \pm 2.6\%$ ; y banda  $\beta$ :  $32.1 \pm 1.2\%$  y  $31.3 \pm 3.8\%$ . Para ratas expuestas a **CARB** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $14.6 \pm 0\%$  y  $9.5 \pm 0\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $29.1 \pm 0\%$  y  $19.3 \pm 0. \%$ ; banda  $\alpha$ :  $28.5 \pm 0\%$  y  $46.5 \pm 0\%$ ; y banda  $\beta$ :  $27.7 \pm 0\%$  y  $24.7 \pm 0$  (Ver Figuras 39 y 40).



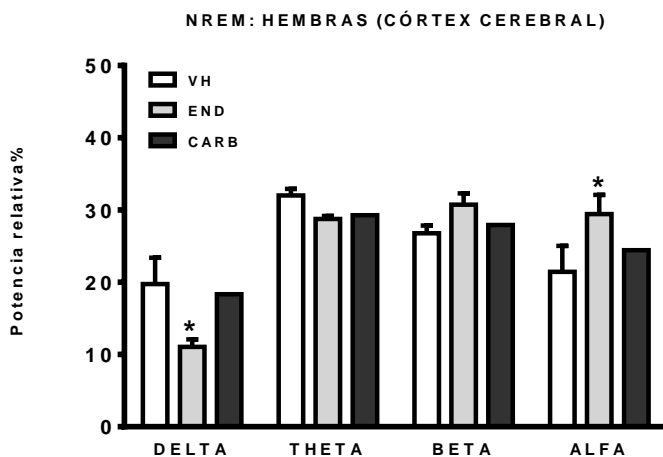
**Figura 39.** Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en córtex cerebral, durante el periodo de sueño REM. La Figura representa la media  $\pm$  SEM de las bandas de frecuencias en los diferentes grupos de ratas hembras estudiados (VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril). Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).



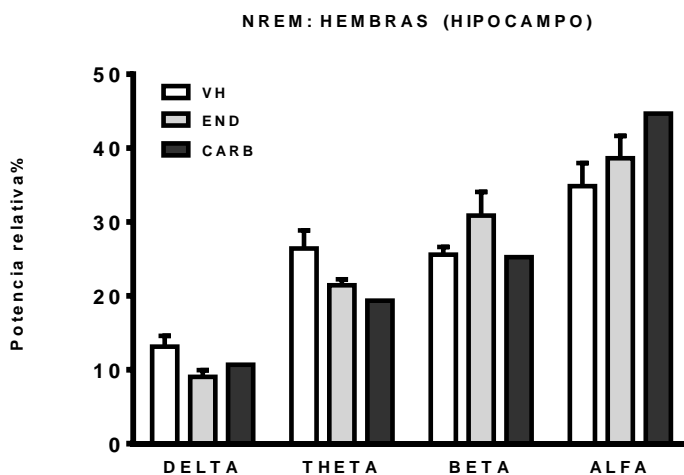
**Figura 40.** Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en hipocampo, durante el periodo de sueño REM. La Figura representa la media  $\pm$  SEM de las bandas de frecuencias en los diferentes grupos de ratas hembras estudiados (VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril).

En el análisis cuantitativo de las potencias relativas de las bandas del EEG, se obtienen unas potencias durante el periodo de sueño NREM para ratas hembra **control** en córtex cerebral e hipocampo respectivamente de la banda  $\delta$ :  $19.7 \pm 3.7\%$  y  $13.1 \pm 1.8\%$  respectivamente;  $\theta$ :  $32 \pm 0.9\%$  y  $26.4 \pm 2.5\%$ ;  $\alpha$ :  $21.4 \pm 3.6\%$  y  $34.9 \pm 3.1\%$ ; y  $\beta$ :  $26.8 \pm 1\%$  y  $25.6 \pm 1.1\%$ . Para ratas expuestas a **END** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $11.1 \pm 1.1\%$  y  $9.5 \pm 0.9\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $25.8 \pm 0.4\%$  y  $21.4 \pm 0.4\%$ ; banda  $\alpha$ :  $29.4 \pm 2.7\%$  y  $38.6 \pm 3\%$ ; y banda  $\beta$ :  $30.7 \pm 1.6\%$  y  $30.9 \pm 3.2\%$ . Para ratas expuestas a **CARB** los resultados son para la banda  $\delta$ :  $18.3 \pm 0\%$  y  $10.7 \pm 0\%$  respectivamente; banda  $\theta$ :  $29.3 \pm 0\%$  y  $19.4 \pm 0. \%$ ; banda  $\alpha$ :  $24.5 \pm 0\%$  y  $44.7 \pm 0\%$ ; y banda  $\beta$ :  $27.9 \pm 0\%$  y  $25.3 \pm 0$  (Ver Figuras 41 y 42).

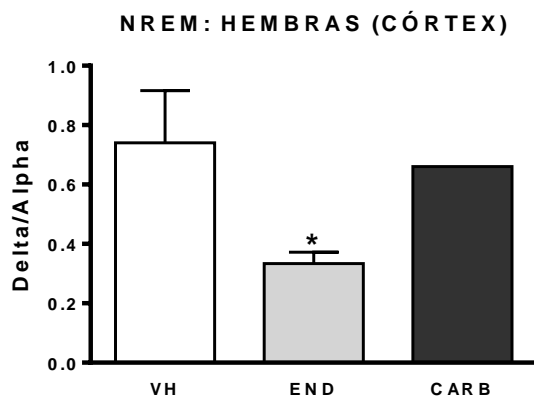
Según estos resultados se calculó el cociente Delta/Alfa para los distintos modelos animales macho estudiados, para los periodos de vigilia, sueño NREM y sueño REM obteniendo resultados estadísticamente significativos en córtex cerebral para ratas hembras tratadas con END en los periodos de sueño NREM, lo que indica un aumento de la banda alfa y una disminución de la banda delta en dichos periodos (Ver figuras 43).



**Figura 41.** Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en córtex cerebral, durante el periodo de sueño NREM. La Figura representa la media  $\pm$  SEM de las bandas de frecuencias en los diferentes grupos de ratas hembras estudiados (VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril). Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01).



**Figura 42.** Espectro de potencia relativa (PR) de las bandas Delta (1-3.4Hz), Theta (3.5-7.4 Hz), Beta (13.5-26 Hz) y Alfa (7.5-13.4 Hz) en hipocampo, durante el periodo de sueño NREM. La Figura representa la media  $\pm$  SEM de las bandas de frecuencias en los diferentes grupos de ratas hembras estudiados (VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril).



**Figura 43. Cociente Delta/Alfa durante el sueño NREM en ratas hembra control y expuestas pesticidas (VH: vehículo; END: endosulfán; CARB: carbaril).** La Figura representa la media  $\pm$  SEM. Los resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control se muestran con asteriscos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ).



## **V.- DISCUSIÓN**

## **V.- DISCUSIÓN**

Se sabe que la exposición durante el desarrollo a los pesticidas contribuye a aumentar la prevalencia de trastornos del desarrollo neurológico en los niños, como el déficit de atención con hiperactividad (TDAH) y trastornos del espectro autista (TEA), todos ellos con importantes alteraciones durante el sueño. Sin embargo, los mecanismos implicados en estas alteraciones siguen siendo poco claros.

Las alteraciones en los patrones del sueño se inician desde el periodo neonatal y generalmente son difíciles de identificar, siendo el sueño un marcador muy valioso del estado de salud del niño.

El cerebro en desarrollo es especialmente susceptible a la exposición a neurotóxicos. Los contaminantes ambientales y alimentarios pueden llegar al cerebro del feto afectando el desarrollo del mismo y conduciendo a disfunciones cognitivas y motrices que pueden ser duraderas o incluso permanentes. (Guillette et al, 1998; Boujard et al, 2011; Grandjean y Landrigan, 2014).

Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de esta tesis es la caracterización del sueño en los modelos animales



expuestos a pesticidas, se ha analizado electroencefalográficamente la actividad cerebral durante el sueño de ratas machos y hembras control y expuestas a pesticidas, de cuatro familias químicas (organofosforados (clorpirifos-CPF), carbamatos (carbaril-CARB), organoclorados (endosulfan-END) y piretroides (cipermetrín-CYP)), evidenciando en la exposición a **END**, una mayor proporción de sueño total tanto en machos como en hembras, con un mayor número de transiciones entre las fase de sueño REM y la vigilia, en machos, lo que indicaría una peor calidad de sueño REM. En hembras expuestas a END, existe una tendencia a un mayor número de despertares durante el sueño y un mayor número de siestas durante el periodo de actividad, con un mayor número de transiciones entre fases sobre todo de fase NREM a vigilia, lo que podría indicar una peor calidad del sueño NREM.

En ratas, puesto que son animales nocturnos, el ciclo sueño-vigilia corresponde con la fase de sueño durante el día (fase de luz) y la vigilia durante la noche (fase de oscuridad), momento en el cual las ratas están más activas. La exposición a algunos pesticidas altera el ciclo del sueño de las ratas. Las ratas macho expuestas a END presentan mayor número de movimientos ambulatorios y verticales que las ratas control durante la fase de luz,

sugiriendo que estas ratas pueden tener alterado el ciclo del sueño. El aumento de ansiedad podría contribuir al aumento de actividad en la fase de sueño y ser responsable de posibles alteraciones del sueño. El END actúa sobre el receptor GABA. El GABA juega un papel importante en la regulación de la síntesis de melatonina (Buijs et al, 2003; Vieira et al, 2005).

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

La exposición a CPF o CYP también aumenta la actividad durante la fase de sueño, pero no induce ansiedad. Otros autores han descrito que la exposición a CPF altera el ritmo circadiano de la temperatura corporal incluso a bajas dosis y el de actividad motora a dosis más elevadas en ratas macho (Gordon y Padnos, 2002). Al igual que el END, la exposición durante el desarrollo a CPF o CYP debe de estar alterando el sueño. Sin embargo ningún pesticida altera el ritmo de actividad en las hembras. Por

tanto existen también diferencias de sexo en el efecto de los diferentes pesticidas sobre los ritmos circadianos de actividad, siendo los machos más sensibles.

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

Actualmente, algunas investigaciones, entre ellas las citadas por Cirelli y Tononi en el 2008, explican que el sueño afecta a todo el organismo, teniendo su efecto más importante en el cerebro (Cirelli et al, 2008). De hecho existe un consenso general de que el sueño está estrictamente relacionado con la memoria el aprendizaje y la plasticidad neuronal (Tononi et al, 2014; Hernandez et al, 2011).

Según la teoría de los procesos duales, existen dos tipos principales de memoria: la procedimental (o no declarativa) independiente del hipocampo, que se consolida en el sueño REM y la declarativa, dependiente

del hipocampo, que se consolida en los estadios profundos del sueño NREM (Berrozpe, 2012). Sin embargo esta teoría es considerada demasiado simple y junto con otras evidencias se ha dado paso a la Hipótesis secuencial o doble escalón. Según esta hipótesis los procesos de consolidación implican tanto al sueño NREM como al REM, independientemente del tipo de memoria. Lo que lleva a la consolidación de la memoria es la repetición de los ciclos de sueño NREM seguido por sueño REM. Por lo tanto, el sueño NREM favorecería una consolidación del sistema de memoria y el sueño REM permitiría un adecuado procesamiento local de dicha consolidación a nivel sináptico (Gorgoni et al, 2013; Ferini-Strambi et al, 2013).

Durante el sueño NREM, el cerebro está en un periodo de anabolismo, sintetizando nuevas moléculas para restaurar lo consumido durante la vigilia. El gasto energético originado durante la vigilia, debería recuperarse en el estado de reposo, cuando el organismo presenta menor nivel de consumo de oxígeno, menor la frecuencia cardiaca y tono muscular bajo (variaciones fisiológicas que se dan sólo durante el estado NREM). En base a esto, algunas investigaciones han afirmado que el sueño NREM tiene un papel importante en la recuperación física y neurológica (Berrozpe. 2012).

Basándonos en esta hipótesis y pese a que no existe un déficit de sueño total ni una alteración en las proporciones de sueño REM-NREM en ratas de ambos sexos expuestas a END, sí que se ha registrado un mayor número de transiciones a vigilia en ambos grupos.

En machos (END) debido al mayor número de transiciones de sueño REM a vigilia, existiría una peor calidad de sueño REM y por lo tanto, según la teoría anterior, podría estar alterada la consolidación de la memoria.

En hembras (END) debido al mayor número de despertares y al aumento de transiciones de sueño NREM a vigilia, podrían estar alterados tanto el proceso de memorización como el de restauración física y neurológica, empeorando indirectamente su somnolencia, lo que explicaría el aumento del número de siestas durante su periodo de actividad.

Actualmente, no solo el análisis cualitativo de la actividad electroencefalográfica ha aportado información sobre la actividad bioeléctrica cerebral. En las últimas décadas, el análisis cuantitativo del EEG (qEEG) ha realizado contribuciones importantes en el campo de la investigación. En el qEEG cada derivación

electroencefalográfica representa una mezcla de frecuencias las cuales pueden ser separadas mediante el procedimiento matemático conocido como el análisis de Fourier, mediante el cual, la señal EEG de cada derivación se transforma del dominio de tiempo al dominio de frecuencias, y en lugar de tener oscilaciones de voltaje en función del tiempo, se obtienen valores de potencia en función de la frecuencia, los cuales surgen al elevar al cuadrado los valores de amplitud de cada una de las ondas en que se ha descompuesto la actividad correspondiente a cada derivación.

Entre las medidas espectrales más usadas en las investigaciones clínicas está la potencia absoluta (PA) y la potencia relativa (PR). La PA es el área representada bajo la curva del espectro, mientras que la PR representa el porcentaje de actividad en una banda respecto a la totalidad de las bandas estudiadas. Una de las limitaciones de la PA es que varía con la edad, lo que hace difícil decidir los parámetros anormales para los sujetos en estudio.

Dado que la electrogénesis neuronal está influenciada por numerosos factores, incluyendo la presencia de tóxicos circulantes, el análisis del qEEG ha tomado un gran

interés en investigación de diversas patologías, mostrando alteraciones en las PR de las distintas bandas.

Algunos estudios como los de Clarke y su grupo, describieron en personas con TDAH tantas alteraciones en el espectro de frecuencias del EEG como de distintos subtipos del mismo. En unos pacientes encontraron un aumento de la PR de las bandas lentas ( $\delta$  y  $\theta$ ) y una disminución de las rápidas ( $\alpha$  y  $\beta$ ). El aumento de la actividad lenta generalizada y la disminución de la actividad rápida, se ha considerado indicativo de un retraso en la maduración cerebral. Sin embargo, existen otros subtipos donde los resultados son distintos, registrándose un aumento de la PR theta y del cociente theta/beta, una disminución de la PR delta y beta y actividad alfa en niveles normales, todo ello indicativo de estados de hipoalertamiento cortical. Sin embargo, en un 15-20% de niños con TDAH del llamado tipo mixto encontraron un aumento significativo de la actividad rápida (alfa), indicativo de una mayor propensión a los berrinches y labilidad emocional que podría indicar un estado de hiperalertamiento cortical. En otro grupo de pacientes los resultados del EEG estuvieron dentro de la normalidad (Clarke, et al, 1998).

Otros estudios refuerzan el supuesto que los pacientes con TDAH pueden tener una disminución en el nivel de activación cortical, lo que a su vez apoya la hipótesis de la presencia de un retraso de maduración de sus sistemas neuronales, sobre todo de áreas frontales (Mann et al, 1992; Hermens et al, 2005) Todo esto se debe al hecho de que ante una tarea cognitiva demandante (en comparación con el reposo) se esperaría un aumento de las frecuencias rápidas, tal como ocurre en los niños sin este trastorno y no un aumento de las frecuencias lentas (delta) como se obtienen en estos estudios.

De igual forma, en niños con TEA, se ha descrito una gran variedad de combinaciones espectrales. Existen estudios que demuestran irregularidades y anomalías en sus patrones de actividad cerebral, entre las que destacan una reducción de ondas alfa (Chan et al, 2007), un exceso de ondas theta y delta (Cantor et al, 1986; Chan et al, 2007; Cornew et al, 2012), y un ligero exceso de ondas beta, con cociente theta/beta por encima de los límites de la normalidad dado que el exceso de theta es más pronunciado que el de beta (Chan y Leung, 2102; Coben et al, 2008b). Además se encuentran patrones atípicos de simetría-asimetría (Burnette et al, 2011), especialmente para las ondas alfa y en áreas frontales (Luschekina et al, 2012), que pueden hallarse desde edades muy tempranas



y servir como predictores de este trastorno (Gabard et al, 2013). Por otra parte, las personas con TEA pueden presentar un exceso de coherencia generalizada (Cantor et al, 1986) junto con patrones de coherencia reducida entre áreas cerebrales especializadas. Esta aparente contradicción se ha interpretado como un patrón de funcionamiento cerebral en el que se combinan una hipoconectividad distal junto con una hiperconectividad local, especialmente en el lóbulo frontal (Rippon et al, 2007). Estas anomalías podrían tener un impacto negativo en el funcionamiento social y cognitivo (Coben y Myers, 2008b)

Las alteraciones de la actividad delta se han relacionado con una desconexión entre la sustancia blanca y la sustancia gris, y también con alteraciones talámicas. La elevada actividad delta en los niños con TEA puede ser un indicador general de disfunción neurológica, más que una alteración específica de los pacientes con TEA. Otros autores describen que durante el estado de reposo en niños que padecen TEA, existe una potencia excesiva de las frecuencias delta y beta en el hemisferio izquierdo (Wang et al., 2013).

Todo lo descrito anteriormente nos lleva a pensar que nos encontramos ante un “cajón de sastre” de posibles combinaciones, por lo que es importante seguir realizando

estudios neurofisiológicos de la función cerebral (EEG), para poder avanzar en la etiología de este tipo de patologías.

En base a los resultados referidos por investigaciones previas, en nuestro estudio analizamos cuantitativamente la actividad cerebral de los diferentes modelos animales, evidenciando en hembras expuestas a END un aumento de la Frecuencia Media Dominante (MDF) en córtex cerebral e hipocampo, tanto en vigilia como en las distintas fases de sueño; así como un aumento de la PR de la banda alfa y una disminución de las bandas delta y theta en córtex cerebral, con un cociente Delta/Alfa disminuido en la fase del sueño NREM. Este aumento generalizado de las frecuencias rápidas, parece estar en relación con una situación de hiperalertamiento cortical, que clínicamente estaría relacionado con los berrinches y la labilidad emocional.

En ratas macho, expuestas a CPF, se obtuvo un aumento del cociente Delta/Alfa, en córtex cerebral tanto en vigilia como en sueño NREM, lo que indicaría un aumento de la banda delta y una disminución de la banda alfa.

## **VI.- CONCLUSIONES**

## VI.- CONCLUSIONES

- Las ratas de ambos sexos no expuestas a pesticidas (controles) duermen por igual, siendo mayor la proporción de tiempo de sueño durante su periodo de descanso (diurno).
- En las ratas control de ambos sexos se registra un mayor porcentaje de sueño NREM, sin existir diferencias entre sexos en la proporción de sueño REM y NREM, diurno y nocturno.
- Durante el sueño NREM la potencia relativa en córtex cerebral de la banda alfa es mayor y la de la banda delta menor, en ratas control macho que en hembras.
- **Las ratas macho expuestas a endosulfán** presentan un mayor tiempo total de sueño que las ratas control. Se observa una tendencia a un mayor número de transiciones entre las fases REM-WAKE, lo que implicaría que aunque duermen más, el sueño REM es de peor calidad, lo que puede relacionarse con problemas de aprendizaje y de memoria.
- **Las ratas hembra expuestas a endosulfán** también tiene una mayor tendencia a presentar un tiempo total de sueño aumentado. Sin embargo, también existe un mayor número de despertares durante su periodo de

sueño y un mayor número de siestas durante su periodo de actividad. Se observa también una tendencia al aumento respecto al grupo control, del número de transiciones de las distintas fase del sueño REM y NREM a la fase de despierto (WAKE).

Es decir, que aunque existe más tiempo de sueño total, como en las ratas macho expuestas a endosulfán, éste es de peor calidad con aumento del número de despertares. Estos despertares se producen tanto en sueño REM, que contribuiría a una alteración en el aprendizaje y en la memoria, como en sueño NREM, lo que se traduciría en una alteración de los procesos de restauración física y neurológica, y un aumento de su somnolencia, lo que explicaría el aumento del número de siestas durante su periodo de actividad.

En las ratas hembra expuestas a endosulfán existe un aumento de la frecuencia media dominante en córtex cerebral e hipocampo, tanto en vigilia como en sueño (REM y NREM) respecto al grupo control. En córtex cerebral aumenta la banda alfa y disminuyen las bandas theta y delta, en todas las fases estudiadas. El cociente Delta/Alfa está disminuido en fase NREM con respecto a las ratas control. Este cociente podría ser un biomarcador de exposición a endosulfán en hembras.

El aumento de la frecuencia media dominante junto con el aumento de la potencia relativa de la banda alfa tanto en vigilia como en sueño, estaría indicando un estado de hiperalertamiento cerebral, similar al descrito en algunos pacientes con TDAH y por tanto un peor descanso durante el sueño.

- **En ratas macho expuestas a clorpirifos**, aumenta en córtex cerebral, durante la vigilia y sueño NREM el cociente Delta/Alfa respecto al grupo control, debido a una disminución de la banda alfa y un aumento de la banda delta, pudiendo reflejar un retraso en la maduración cerebral y fenómenos de hipoalertamiento, ya descritos frecuentemente en pacientes con TEA. Este cociente podría ser útil como biomarcador de exposición a clorpirifos en machos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Anand M, Mehrotra S, Gopal K, Sur RN, Chandra SV. (1985). Role of neurotransmitters in endosulfan-induced aggressive behaviour in normal and lesioned rats. *Toxicol Lett* 24(1):79-84.

Ayala-Guerrero, Mexicano G, Huicochea-Arredondo S. (2014). Sleep characteristics in patients with autism spectrum disorders. *Journal of Neurological Disorders y Stroke*, 2(3), 1-6.

Barry RJ, Clarke AR, Johnstone SJ. (2003). A review of electrophysiology in attention-deficit/hyperactivity disorder: Qualitative and quantitative electroencephalography. *Clin Neurophysiol*, 114:171-183.

Berger (1929). Über das elektroencephalogramm des Menschen. *Arch Psychiatr Nervenkr* 87:527-70.

Berrozpe M. (2012). El debate científico sobre la realidad del sueño infantil. Apéndice I: La función del Sueño. <http://www.suenoinfantil.net>.

Betancourt AM, Carr RL. (2004). The effect of chlorpyrifos-oxon on brain cholinesterase, muscarinic receptor binding, and neurotrophin levels in rats following early postnatal exposure. *Toxicol Sci* 77(1):63-71.

Bjørling -Poulsen M, Andersen HR, and Grandjean P. (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe, *Environ Health* 7, 50.

Bossi R, Vinggaard AM, Taxvig C, Boberg J, Bonefeld-Jorgensen EC. (2013). Levels of pesticides and their metabolites in Wistar rat amniotic fluids and maternal urine upon gestational exposure. *Int J Environ Res Public Health* 10(6):2271-81.

Braquenier JB, Quertemont E, Tirelli E, Plumier JC. (2010). Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. *Neurotoxicol Teratol* 32(2):234-9.

Buijs RM, van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A. (2003). The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol* 177(1):17-26.

Burnette CP, Henderson HA, Inge AP, Zahka NE, Schwart CB, Mundy PC. (2011). Anterior EEG asymmetry and the modifier model of autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 41, 1113-1124.

Cajal R (1908). Las teorías sobre el ensueño. *Revista de Medicina y Cirugía de la Facultad de Medicina de Madrid*. Vol II, 87-89.



Calabeiro T, Caride A, Romero A, Lafuente A. (2008). Effects of in utero and lactational exposure to endosulfan in prefrontal cortex of male rats. *Toxicol Lett* 176(1):58-67.

Calhoun DA, Harding SM. Sleep and hypertension. *Chest*. (2010) Aug; 138(2):439-44.

Campbell CG. (1998). Chlorpyrifos interferes with cell development in rat brain region. *Brain Res Bull*, 43:179-189.

Cantor DS, Thatcher RW, Hrybyk M, Kaye H. (1986). Computerized EEG analyses of autistic children. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 16,169-187.

Cañadas F, Cardona D, Dávila E, Sánchez-Santed F. (2005). Long-term neurotoxicity of chlorpyrifos: spatial learning impairment on repeated acquisition in a water maze. *Toxicol Sci* 85(2):944-51.

Cañadas F (2004). Efectos tóxicos a largo plazo de la exposición aguda a compuestos organofosforados. Alteraciones en las tareas de aprendizaje espacial. Editorial Universidad Almería. 1ª. Edición. Capítulos II-III.

Carr RL, Chambers HW, Guarisco JA, Richardson JR, Tang J, Chambers JE. (2001). Effects of repeated oral

postnatal exposure to chlorpyrifos on open-field behavior in juvenile rats. *Toxicol Sci* 59(2):260-7.

Castañeda-Cabrero C, Lorenzo-Sanz G, Caro-Martínez E. (2003). Alteraciones electroencefalográficas en niños con trastorno por déficit de atención con hiperactividad. *Rev Neurol*.37 (10): 904-908.

Chan AS, Leung WW. (2006). Differentiating autistic children with quantitative encephalography: A 3-month longitudinal study. *Journal of Child Neurology*, 21,391-399.

Chan AS, Sze SL, Cheung M. (2007). Quantitative electroencephalographic profiles for children with autistic spectrum disorder. *Neuropsychology*, 21, 74-81.

Chen XP, Chen WF, Wang DW. (2014). Prenatal organophosphates exposure alternates the cleavage plane orientation of apical neural progenitor in developing neocortex. *PLoS One* 9(4):e95343.

Cirelli C, Tononi G. Is sleep essential?. *PLoS Bio* 6(8):e216. doi:10.1371/journal. Pbio.0060216.

Clarke AR, Barry RJ, Mccarthy R, Selikowitz M. (1998). EEG analysis in attention-deficit/hyperactivity disorder: a comparative study of two subtypes. *Psychiatry Research*, 81, 19-29.

Clarke AR, Barry RJ, Mccarthy R, Selikowitz M, Brown C. (2002). EEG evidence fo a new conceptualization of attention-defict hyperactivity disorder. *Clin Neurophysiol*, 113:1036-1044.

Coalova I. (2013). Pesticide mixtures genotoxicity: More than the sum of its parts? *Acta toxicología Argentina*.

Coben R, Myers TE. (2008b). Connectivity theory of autism: Use of connectivity measures in assessing and treating autistic disorders. *Journal of Neurotherapy*, 12, 161-179.

Cornew L, Roberts TP, Blaskey L, Edgar JC. (2012). Resting-state oscillatory activity in autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 42, 1884-94.

Dam K, Seidler FJ, Slotkin TA. (2000). Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in thedevelopment of coordination skills and locomotor activity. *Brain Res Dev Brain* 121(2):179-87.

Datta S, Hobson JA. (2000). The rata as an experimental model for sleep neurophysiology. *Behavioral Neuroscience* 114 (6), 1239-1244.

Deidda G, Bozarth IF, Cancedda L. (2014). Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopment disorders: investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives. *Front Cell Neurosci* 8:119.

Delpuech JM, Bussod S, Amar A. (2015). The sublethal effects of endosulfan on the circadian rhythms and locomotor activity of two sympatric parasitoid species. *Chemosphere* 132:200-5.

Denker K. (1997). Susceptibility in utero and upon neonatal exposure. *18(3)*, 719-26.

Dési I, Gönczi L, Simon G, Farkas I, Kneffel Z. (1974). Neurotoxicologic studies of two carbamate pesticides in subacute animal experiments. *Toxicol Appl Pharmacol* 27(3):465-76.

Ecobichon DJ. (2001). Pesticide use in developing countries. *Toxicology*; 160 (1-3):27-33.

Eriksson. (1997). Developmental neurotoxicity of environmental agents in the neonate. *Neurotoxicology*, 18(3): 719-726.

Ferini- Strambi L, Galbiati A and Marelli S. (2013). Sleep microstructure and memory function. *Neurol.* 4:159. Doi: 10.3389/fneur.2013.00159.

Franco-Pérez J, Ballesteros P, Custodio V, Paz C. Neurotransmisores y regulación del ciclo sueño-vigilia. (2012) *Rev Inv Clin*,64(2):182-192.

Gabard-Durnam L, Tierney AL, Vogel-Farley V, Tager-Flusberg H, Nelson CA. (2013). Alpha asymmetry in infants at risk for autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental disorders.* Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10803-013-1926-4>.

Gallopín T. (2000). Identifications of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature*, 404, 992-5.

Gil-Nagel A, Parra J, Iriarte J, Kanner AM. Manual de Electroencefalografía. Bases neurofisiológicas de al electroencefalografía y magnetoencefalografía. Madrid: Mc Graw-Hill-Interamericana, España, 2002.

Gómez-Chavarrín M, et al. (2013). Development neurotoxicity by environmental chemical substances. *Arch Neurocién (Mex)* , 18 (3), 154-160.

Gordon CJ, Padnos BK. (2002). Dietary exposure to chlorpyrifos alters core temperature in the rat. *Toxicology* 177(2-3):215-26.

Gorgoni et al (2013). Is Sleep Essential for Neural Plasticity in Humans, and How Does It Affect Motor and Cognitive Recovery. *Neural Plast.* 2013: 103949. Published online 2013 Jun 11. doi: 10.1155/2013/103949.

Grandjean P, Landrigan PJ. Neurobehavioral Effects of Developmental Toxicity. *Lancet Neurol* 2014;13:330-8.

Gregory AM, Agnew-Blais JC, Matthews T, Moffitt TE, Arseneault L. (2016). ADHD and Sleep Quality: Longitudinal Analyses From Childhood to Early Adulthood in a Twin Cohort. *J Clin Child Adolesc Psychol*:1-11.

Gribkoff VK, Pieschl RL, Dudek FE. (2003). GABA receptor-mediated inhibition of neuronal activity in rat SCN in vitro: pharmacology and influence of circadian phase. *J Neurophysiol* 90(3): 1438-48.

Haadeed AJ, S. S. (1989). Maternal cocaine use during pregnancy: effect on the newborn infant. *Pediatrics* , 84 (2), 205-10.

Heise GA, Hudson JD. (1985a). Effects of pesticides and drugs on working memory in rats: continuous delayed

response. *Pharmacol Biochem Behav* 23(4):591-8.

Heise GA, Hudson JD. (1985b). Effects of pesticides and drugs on working memory in rats: continuous non-match. *Pharmacol Biochem Behav* 23(4):599-605.

Hermens DF, Soel EXC, Clarke SD, Kohn Mr, Gordon E, Williams LM. Resting EEG theta activity predicts cognitive performance in attention-deficit-hyperactivity disorder. *Pediatr Neurol* 2005;32:248-256.

Hernandez PJ, Abel T (2011). A molecular basis for interections between sleep and memory. *Sleep Med Clin*. 2011 March 1; 6(1):71-84.Doi:10.1016/j.jsmc.2010.12.004.

Hundley RJ, Shui A, Malow BA. (2016). Relationship Between Subtypes of Restricted and Repetitive Behaviors and Sleep Disturbance in Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord*.

Jiménez VL, Quilodrán PJ, Miranda OJP, Rodríguez BH. (2008). Efecto de dosis única intraperitoneal de cipermetrina en la corteza cerebral somatosensorial de ratones CF-1. *Int. J. Morphol* 26(1):19-26.

Johri A, e. a. (2006). Effect of prenatal exposure of deltamethrin on the ontogeny of xenobiotic metabolizing cytochrome P450s in the brain and liver of offs-prings.

Toxicol Appl Pharmacol , 214 (3), 279-89.

Karalliedde L, S. N. (1989). Organophosphorus insecticide poisoning. Br J Anaesth , 736-750.

Khayat D, G. B. (1994). Fotomustine in the treatment of brain primary tumors and metastases. Cancer Invest , 12: 414-420.

Kunz D, Mahlberg R. A two-part, double-blind, placebo-controlled trial of exogenous melatonin in REM sleep behaviour disorder. J Sleep Res. 2010 Dec; 19(4):591-6.

Lafuente A, Pereiro N. (2013). Neurotoxic effects induced by endosulfan exposure during pregnancy and lactation in female and male rat striatum. Toxicology 311(1-2):35-40.

Landrigan PJ (2001). Pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs): An analysis of the evidence that they impair children´s neurobehavioral development. Molecular Genetics and Metabolism 73(1), 11-17.

Lee I, Eriksson P, Fredriksson A, Buratovic S, Viberg H. (2015b). Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and neuroprotein studies on endosulfan and cypermethrin. Toxicology 335:1-10.

Lemaire G, Mnif W, Mauvais P, Balaguer P, Rahmani R. (2006). Activation of alpha- and beta-estrogen receptors



by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life Sci* 79(12):1160-9.

Loomis AL, H. H. (1937). Cerebral state during sleep, as studied by human brainpotentials. *Journal of experimental psychology* , 21, 127-144.

Lushchekina EA, Podreznava ED, Lushchekin VS, Strelets VB. (2012). A comparative EEG study in normal and autistic children. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 42, 236-243.

Mann CA, Lubar JF, Zimmerman AW, Miller CA, Muenchen RA. Quantitative analysis of EEG in boys with attention-deficit-hyperactivity disorder: controlled study with clinical implications. *Pediatric Neurol* 1992;8:30-36.

Maurya SK, Mishra J, Abbas S, Bandyopadhyay S. (2016). Cypermethrin Stimulates GSK3 $\beta$ -Dependent A $\beta$  and p-tau Proteins and Cognitive Loss in Young Rats: Reduced HB-EGF Signaling and Downstream Neuroinflammation as Critical Regulators. *Mol Neurobiol* 53:968-982.

McDaniel KL, Padilla S, Marshall RS, Phillips PM, Podhorniak L, Qian Y, Moser VC. (2007). Comparison of acute neurobehavioral and cholinesterase inhibitory effects of N-methylcarbamates in rat. *Toxicol Sci*

98(2):552-60.

McGinty D, S. R. (2000). The sleep-wake switch: a neuronal alarm clock. *Nature Medicine* , 6:510.

Menéndez F (2009). *Higiene Industrial*. 9º Edición; Pág 469. Edit Lex-Nova S.A.

Mourek J, Z. P. (2010). Formative Processes of CNS Maturation- The Genesis of Neuropsychiatric Disorders and the Strategy of Optimal Development. *Act Nerv Super Rediviva* , 52 (3):, 556-63.

Murias M, Webb SJ, Greenson J, Dawson G. Resting state cortical connectivity reflected in EEG coherence in individuals with autism. *Biol Psychiatry* 2007; 62: 270-3.

Nasuti C, Gabbianelli R, Falcioni ML, Di Stefano A, Sozio P, Cantalamessa F. (2007). Dopaminergic system modulation, behavioral changes, and oxidative stress after neonatal administration of pyrethroids. *Toxicology* 229(3):194-205.

Niedermeyer E, Lopes Da Silva F. *Electroencephalography. Basic principles, clinical applications and related fields*. Fourth Edition. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 1999.

Omurtag GZ, Tozan A, Sehirli AO, Sener G. (2008).

Melatonin protects against endosulfan-induced oxidative tissue damage in rats. *J Pineal Res* 44(4):432-8.

Ortega García, JA, et al. (2005). Neurotóxicos medioambientales (I). Pesticidas: efectos adversos en el sistema nervioso fetal y posnatal. *Acta Pediatr Esp.* , 63: 140-149.

Ostrea EM, Reyes A, Villanueva-Uy E, Pacifico R, Benitez B, Ramos E, Bernardo RC, Bielawski DM, Delaney-Black V, Chiodo L et al. (2012). Fetal exposure to propoxur and abnormal child neurodevelopment at 2 years of age. *Neurotoxicology* 33(4):669-75.

Palau-Baduell M, Valls-Santasusana A, Salvadó-Salvadó B, Clofent-Torrentó M. (2013). Aportación del electroencefalograma en el autismo. *Rev Neurol*,56 (Supl. 1):S35-S43.

Parra J, Lopes da Silva FH. Manual de Electroencefalografía. Bases neurofisiológicas de la electroencefalografía y magnetoencefalografía. Pág 1-17.

Pasanen M. (1999). The expression and regulation of drug metabolism in human placenta. *Adv Drug Deliv Rev* 1999;38:81-97.

Pelé F, M. G. (2013). Occupational solvent exposure during pregnancy and child behaviour at age 2. *Occup Environ Med* , 70 (2); 114-9.

Peyron C, T. D. (2004). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci*, 24, 5336-45.

Philbert MA, Billingsley ML, Reuhl KR. (2000). Mechanisms of injury in the central nervous system. *Toxicol Pathol* 28(1):43-53.

Pinto FT, Golomberg DA. 1999. Neuroactive steroids alter the circadian system of the Syrian hamster in a phase-dependent manner. *Life Sci* 65(23):2497-504.

Rastogi D, Narayan R, Saxena DK, Chowdhuri DK. (2014). Endosulfan induced cell death in Sertoli-germ cells of male Wistar rat follows intrinsic mode of cell death. *Chemosphere* 94:104-15.

Rauh Virginia A. (2006). Impact of Prenatal Chlordane Exposure on Neurodevelopment in the First 3 Years of Life Among Inner-City Children. *Pediatrics* , 118.

Roberts AL. (2013). Perinatal air pollutant exposures and autism spectrum disorder in the children of Nurses' Health Study II participants. *Environmental Health Perspectives*.

Roennenberg T. (2003). Lifebetweencloks: daily temporal patterns of human chronotypes. *J. BiolRhythms* , 18: 80-90.

Saeedi Saravi SS, Dehpour AR. (2015). Potential role of organochlorine pesticides in the pathogenesis of neurodevelopmental, neurodegenerative, and neurobehavioral disorders: A review. *Life Sci*.

Sachana M, Flaskos J, Alexaki E, Hargreaves AJ. (2003). Inhibition of neurite outgrowth in N2a cells by leptophos and carbaryl: effects on neurofilament heavy chain, GAP-43 and HSP-70. *Toxicol In Vitro* 17(1):115-20.

Sachana M, Flaskos J, Nikolaidis E, Hargreaves A, Alexaki-Tzivanidou E. (2001). Inhibition of rat platelet 5-hydroxytryptamine uptake by chlorpyrifos and carbaryl. *Pharmacol Toxicol* 89(4):195-200.

Santoni G, Cantalamessa F, Spreghini E, Sagretti O, Staffolani M, Piccoli M. (1999). Alterations of T cell distribution and functions in prenatally cypermethrin-exposed rats: possible involvement of catecholamines. *Toxicology* 138(3):175-87.

Saper CB. (2001). The sleepswitch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends in Neurosciences* , 24, 726-31.

Shelton JF. (2014). Neurodevelopmental Disorders and Prenatal Residential Proximity to Agricultural Pesticides: The CHARGE Study. *Environmental Health Perspectives* .

Shirakawa T, Honma S, Honma K. (2001). Multiple oscillators in the suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol Int* 18(3): 371-87.

Silva MH, Gammon D. (200). An assessment of the developmental, reproductive, and neurotoxicity of endosulfan. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 86(1):1-28.

Singh AK, Tiwari MN, Prakash O, Singh MP. (2012). A current review of cypermethrin-induced neurotoxicity and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* 10(1):64-71.

Slotkin TA, Tate CA, Ryde IT, Levin ED, Seidler FJ. (2006). Organophosphate insecticides target the serotonergic system in developing rat brain regions: disparate effects of diazinon and parathion at doses spanning the threshold for cholinesterase inhibition. *Environ Health Perspect.* 114(10):1542-6.

Smalley HE, O'Hara PJ, Bridges CH, Radeleff RD. (1969). The effects of chronic carbaryl administration on the

neuromuscular system of swine. *Toxicol Appl Pharmacol* 14(3):409-19.

Subimal Datta, JA. (2000). The rata as an experimental model for sleep neurophysiology. *Behavioral Neuroscience.* , 114 (6), 1239-1244.

Tafari J. (1987). Organophosphate poisoning. *Ann Emerg Med* , 16: 193-202.

Taira, M., Takase, M. y Sasaki, H. (1998). Sleep disorder in children with autism. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 52, 182-183.

Takase, M., Taira, M., y Sasaki, H. (1998). Sleep-wake rhythm of autistic children. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 52(2), 181-182.

Tononi G, Cirelli C. (2014). Sleep and the Price of plasticity: from synaptic and celular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron*. 2014 Jan 8;81(1):12-34. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.025.

Torres MP, et al. (2011) Cell cycle-dependent phosphorylation and ubiquitination of a G protein alpha subunit. *J Biol Chem* 286(23):20208-16.

Vaara J, Kyröläinen H, Koivu M, Tulppo M, Finni T. The effects of 60-h sleep deprivation on cardiovascular

regulation and body temperature. *Eur J Appl Physiol*. 2009 Feb; 105(3):439-44.

Vélez-Galarraga R, Guillén-Grima F, Crespo-Eguílaz N, Sánchez-Carpintero R. (2016). Prevalence of sleep disorders and their relationship with core symptoms of inattention and hyperactivity in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur J Paediatr Neurol*.

Vieira R, Míguez JM, Aldegunde M. (2005). GABA modulates day-night variation in melatonin levels in the cerebral ganglia of the damselfly *Ischnura graellsii* and the grasshopper *Oedipoda caerulescens*. *Neurosci Lett* 376(2):111-5.

Vivaldi EA. (1994). Measures of location and dispersion of Sleep State Distributions Within the Circular Frame of 12:12 light: Dark Schedule in the rat. *17*, 208-19.

Whyatt RM, et al. (2004). Prenatal Insecticide Exposures and Birth Weight and Length among an Urban Minority Cohort. *Environmental Health Perspectives* , 112 (10), 1125-32.

Worthing CR, Walker SB.(1987). *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 8th ed., Thornton Heath, British Crop Protection Council, pp. 36-37.



Wynchank DS, Bijlenga D, Lamers F, Bron TI, Winthorst WH, Vogel SW, Penninx BW, Beekman AT, Kooij JS. (2016). ADHD, circadian rhythms and seasonality. *J Psychiatr Res* 81:87-94.