



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

### **EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A LOS CONTAMINANTES AMBIENTALES ORGANOHALOGENADOS SOBRE LA FUNCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA PLASTICIDAD NEURONAL: PAPEL DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL**

## **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**LÓPEZ NIÑO JANINTZITZIC**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA MARÍA DE LA SALUD LEÓN OLEA  
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA "RAMÓN DE LA  
FUENTE MUÑÍZ"**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
DRA. LAURA COLÍN BARENQUE  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO, 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 07 de noviembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **LÓPEZ NIÑO JANINTZITZIC** con número de cuenta **100001433**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A LOS CONTAMINANTES AMBIENTALES ORGANOHALOGENADOS SOBRE LA FUNCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA PLASTICIDAD NEURONAL: PAPEL DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARTHA MARÍA DE LA SALUD LEÓN OLEA**:

Presidente: DRA. LUCÍA ALBA MARTÍNEZ MOTA  
Vocal: DR. MIGUEL ÁNGEL MORALES MENDOZA  
Secretario: DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ  
Suplente: DRA. MARISELA MÉNDEZ ARMENTA  
Suplente: DRA. LAURA COLÍN BARENQUE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 05 de enero de 2017

*María del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



## **Agradecimientos.**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por la beca (No de registro 330466) que me otorgó durante la maestría.

A mi tutora principal, la Dra. Martha León Olea, por su apoyo, supervisión y orientación durante la realización de esta investigación.

A la Dra. Clorinda Arias Álvarez y la Dra. Laura Colín Barenque por formar parte de mi comité tutor, y por guiar y supervisar mi trabajo de investigación durante la maestría.

## **Agradecimientos**

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Neuromorfología Funcional, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz".

Se agradece al Dr. Prasada R. S. Kodavanti, de la Agencia de Protección Ambiental E. U. A., por la donación del tóxico DE-79 que se utilizó en este trabajo de investigación.

A la Dra. Lucía Alba Martínez Mota, del Laboratorio de Farmacología Conductual del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", por todas las facilidades brindadas para la realización y análisis de las pruebas conductuales. Además, por sus orientación y sugerencias en la interpretación de los resultados conductuales obtenidos.

A los integrantes del Laboratorio de Neuromorfología Funcional: Dr. Eduardo Sánchez Islas, Mtro. Samuel Mucio Ramírez, E. M. E. A. C. B. José Mendoza y la médico Mhar Y. Álvarez González, por enseñarme las técnicas utilizadas en este trabajo y por orientarme cuando tenía dudas sobre éstas. De cada uno me llevo un aprendizaje.

Al Dr. René Garduño Gutiérrez del Departamento de Neuromorfología Funcional del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", por su ayuda en la estandarización del western blot para la sinaptofisina y la PSD-95, técnica utilizada en este trabajo de investigación.

Se hace un agradecimiento especial a Dianne León por su ayuda para llevar a cabo las pruebas conductuales, durante su servicio social en el Departamento de Neuromorfología Funcional del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz". Sin su apoyo y compañía el trabajo habría sido mucho más pesado en el cuarto de conducta.

Al técnico Sergio Márquez Baltasar y a la Dra. Graciela Jiménez Rubio del Laboratorio de Farmacología Conductual del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", por enseñarme a evaluar a las ratas en el laberinto de Barnes y a utilizar el software para la evaluación conductual.

*Con amor a Francisco López y Ena Niño, mi raíz y mi fortaleza  
A Itzcoatl López y a Iyari López, la alegría en mi corazón*

## Contenido

Lista de Figuras.....	i
Abreviaturas.....	iii
Resumen .....	1
Abstract.....	3
Introducción.....	5
1. Los éteres difenilos polibromados.....	8
1.1 Generalidades de los éteres difenilos polibromados.....	9
1.2 Los PBDE en el medio ambiente y en los humanos .....	11
1.2.1 El caso de México .....	14
1.3 Los PBDE en el sistema nervioso central .....	16
2. Óxido Nítrico .....	20
2.1 Generalidades del óxido nítrico.....	20
2.2 El óxido nítrico en la formación y refinamiento de los circuitos sinápticos .....	21
2.2.1 El óxido nítrico y la sinaptogénesis.....	22
2.2.2 El óxido nítrico en la plasticidad neuronal .....	23
2.3 El óxido nítrico y los contaminantes ambientales .....	25
3. Ambientes enriquecidos.....	27
3.1 Generalidades de los ambientes enriquecidos.....	27
3.2 Efectos de los ambientes enriquecidos en el cerebro .....	28
3.3 Efecto terapéutico de los ambientes enriquecidos .....	30
4. Planteamiento del problema.....	32
5. Hipótesis.....	32
6. Objetivos .....	33
6.1 Objetivos generales.....	33
6.2 Objetivos específicos .....	33
7. Metodología.....	34
7.1 Sujetos.....	34
7.2 Ambientes enriquecidos.....	35
7.3 Laberinto de Barnes .....	36
7.4 Actividad motora.....	39



7.5 Histoquímica para la NADPH-diaforasa .....	39
7.6 Western Blot .....	40
7.7 Análisis Estadístico .....	42
8. Resultados .....	43
8.1 La exposición perinatal al DE-79 no afecta la memoria espacial. Los ambientes enriquecidos mejoran la ejecución de las ratas control.....	43
8.1.1 La exposición perinatal al DE-79 no afecta la motricidad de las ratas .....	52
8.2 Actividad de la NOS en el hipocampo.....	54
8.2.1 La exposición perinatal a la mezcla DE-79 afecta la producción del óxido nítrico en el área CA1 hipocampal .....	54
8.2.2 La exposición perinatal a la mezcla DE-79 no afecta la actividad de la NOS en el área CA3 hipocampal.....	56
8.3 Expresión de las proteínas sinápticas sinaptofisina y PSD-95 en el hipocampo .....	58
8.3.1 La exposición perinatal al DE-79 no cambia la expresión de las proteínas sinápticas de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo.....	59
9. Discusión .....	64
9.1 Laberinto de Barnes .....	65
9.2 Actividad de la NOS en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo.....	68
9.3 Niveles de sinaptofisina y PSD-95 en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo .....	71
10. Conclusiones .....	74
10. Literatura Citada.....	75

## Lista de Figuras

Figura 1. Los difenilos policlorados (PCB) y los éteres difenilos polibromados (PBDE).....	9
Figura 2. Distribución y destino ambiental de los PBDE. ....	13
Figura 3. El óxido nítrico en la plasticidad sináptica. ....	24
Figura 4. Ambientes Enriquecidos.....	36
Figura 6. Laberinto de Barnes.....	37
Figura 7. Efecto de la exposición perinatal al DE-79 sobre la latencia para encontrar la caja de escape en el laberinto de Barnes. ....	44
Figura 8. Efecto de los ambientes enriquecidos sobre la latencia para encontrar la caja de escape en el laberinto de Barnes. ....	45
Figura 9. Efecto de la exposición perinatal al DE-79 sobre la distancia recorrida para encontrar la caja de escape en el laberinto de Barnes.....	46
Figura 10. Efecto de los ambientes enriquecidos sobre la distancia recorrida para encontrar la caja de escape en el laberinto de Barnes.....	47
Figura 11. Trayectorias recorridas por las ratas en el laberinto de Barnes. ....	48
Figura 12. Efecto de la exposición perinatal al DE-79 sobre el número de errores en la memoria de referencia.....	49
Figura 13. Efecto de los ambientes enriquecidos sobre el número de errores en la memoria de referencia.....	50
Figura 14. Efecto de la exposición perinatal al DE-79 sobre el número de errores en la memoria de trabajo. ....	51
Figura 15. Efecto de los ambientes enriquecidos sobre el número de errores en la memoria de trabajo.....	51
Figura 16. Efecto de la exposición perinatal al DE-79 sobre la motricidad.....	52
Figura 17. Efecto de los ambientes enriquecidos sobre la motricidad. ....	53

<b>Figura 18. Actividad de la NOS en el área CA1 hipocampal.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 19. Actividad de la NOS en el área CA1 hipocampal.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 20. Actividad de la NOS en el área CA3 hipocampal.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 21. Actividad de la NOS en el área CA3 hipocampal.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 22. Niveles de sinaptofisina en el área CA1 hipocampal. ....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 23. Niveles de sinaptofisina en el área CA3 hipocampal. ....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 24. Niveles de PSD-95 en el área CA1 hipocampal.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 25. Niveles de PSD-95 en el área CA3 hipocampal.....</b>	<b>63</b>

## Abreviaturas

<b>BDNF</b>	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
<b>EGF</b>	Factor de Crecimiento Epidérmico
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<b>NGF</b>	Factor de Crecimiento Nervioso
<b>LTP</b>	Potenciación a Largo Plazo
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>NADPH-d</b>	NADPH-diaforasa
<b>NOS</b>	Sintasa del óxido nítrico
<b>NT</b>	Neurotrofina
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>SEM</b>	Error Estándar de la Media
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>PBDE</b>	Éteres Difenilos Polibromados
<b>PCB</b>	Difenilos Policlorados

## Resumen

Los éteres difenilos polibromados (PBDE) son contaminantes ambientales que se utilizan como retardantes de flama. Existen tres mezclas comerciales que se han utilizado en aparatos electrónicos, plásticos y textiles: pentaBDE (DE-71), octaBDE (DE-79) y decaBDE (DE-83). Los PBDE se desprenden fácilmente de los objetos a los que se añaden, por lo que se acumulan en los organismos y su ambiente. La exposición a los PBDE se ha relacionado con afectaciones motoras y cognoscitivas. En roedores, la exposición perinatal a los PBDE causa hiperactividad y se relaciona con deficiencias en tareas de aprendizaje y memoria. En el sistema nervioso central, los PBDE causan daños al neurodesarrollo. Particularmente, en el hipocampo, afectan la morfología neuronal, causan muerte celular y cambios en la expresión de proteínas sinápticas en las áreas CA1 y CA3. Por otra parte, el óxido nítrico se relaciona con procesos de espinogénesis y sinaptogénesis en el desarrollo postnatal temprano, así como con procesos de plasticidad fisiológica y estructural, mecanismos involucrados con el aprendizaje y la memoria. Lo que sugiere que la exposición perinatal a los PBDE podría disminuir su producción y contribuir a las deficiencias cognoscitivas causadas por estos tóxicos. Además, existe evidencia de que la crianza de roedores en ambientes enriquecidos favorece la formación de nuevas espinas dendríticas y sinapsis, así como la mejor ejecución de tareas relacionadas con el aprendizaje y la memoria. Estos efectos son de especial importancia como estrategia terapéutica en enfermedades del neurodesarrollo y neurodegenerativas, así como en enfermedades cerebrovasculares y adicciones. Lo que haría posible que los daños causados por la exposición perinatal a los PBDE, puedan ser revertidos o aminorados por los ambientes enriquecidos. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la exposición perinatal a la mezcla DE-79 sobre la producción del óxido nítrico y la expresión de proteínas sinápticas, como la sinaptofisina y la PSD-95, en el hipocampo; así como el desempeño de las ratas en el laberinto de Barnes. Además, tuvo como objetivo estudiar si la crianza en ambientes enriquecidos tiene un efecto benéfico sobre las ratas perinatalmente expuestas. Los resultados muestran que la exposición perinatal a la mezcla DE-79 facilitó el

aprendizaje de las ratas en el laberinto de Barnes y disminuyó la producción del óxido nítrico en el área CA1 hipocampal. Además, en las ratas expuestas perinatalmente al DE-79 no se pudieron observar cambios propiciados por los ambientes enriquecidos en la conducta de las ratas, en la producción de óxido nítrico y en la expresión de las proteínas sinápticas en el área CA1. Estos resultados sugieren que aunque la producción del óxido nítrico en el área CA1 del hipocampo disminuyó por la exposición perinatal al DE-79, existen mecanismos de compensación que influyen en la ejecución conductual de las ratas expuestas a este tóxico. Estudios posteriores encaminados a dilucidar los mecanismos anatómicos y fisiológicos involucrados en las afectaciones motoras y cognoscitivas causadas por los PBDE contribuirán a la prevención y tratamiento de estas deficiencias.

## Abstract

Polibrominated diphenyl ethers (PBDE) are organic compounds that have been used as flame retardants and are considered to be toxic environmental pollutants. There are three commercial mixtures that have been used for textiles, house furnishings, electronic appliances and building materials: pentabrominated BDE (DE-71), octabrominated BDE (DE-79) and decabrominated BDE (DE-83). PBDEs escape from the polymers that contained them because they are not chemically bound to them. Consequently, PBDEs accumulate in the organisms and the environment. Chronic exposure to PBDEs has been related to behavioral and cognitive disorders. In rodents, perinatal exposure to PBDEs affects spontaneous behavior and habituation to novel environments, cause hyperactivity and deficits in memory tasks performance. In the central nervous system, perinatal PBDE exposure cause neuroendocrine and neurodevelopmental disruption. Particularly, it affects hippocampal cell arrangement, cause cell death and synaptic proteins changes in CA1 and CA3 areas. On the other hand, nitric oxide is a molecule that is related to spinogenesis and synaptogenesis mechanisms during early postnatal development, and to physiological and structural plasticity, which participate in learning and memory mechanisms. This evidence suggests that perinatal exposure to PBDE could affect nitric oxide production and participate in motor and cognitive deficits caused by these pollutants. In addition, there is evidence which indicates that environmental enrichment elicits spinogenesis and synaptogenesis, and improves performance in learning and memory tasks. Therefore, it is possible that environmental enrichment reverses or relieves the effects of perinatal exposure to PBDE. Here, we evaluated the effect of perinatal exposure to DE-79 mixture on nitric oxide production and on synaptic markers expression (synaptophysin and PSD-95) in hippocampus. Also, we evaluated the performance in the Barnes maze, a spatial memory task, after DE-79 exposure; and we studied if there is a beneficial effect of environmental enrichment rearing. Our results show that perinatal exposure to DE-79 mixture did not affect performance in the Barnes maze, but it reduced nitric oxide production in the CA1 field. In addition, our results did not show a beneficial effect of environmental enrichment on rats perinatally exposed to

DE-79 mixture, but they did on control rats. These results suggest that although DE-79 exposure reduces nitric oxide production in the CA1 field, there are compensation mechanisms that improve performance of the DE-79-treated rats in the Barnes maze. Future research on anatomical and physiological consequences following perinatal PBDE exposure will help preventing and treating behavioral and cognitive impairment caused by this environmental pollutants.



## Introducción

En el mundo industrializado se ha hecho uso de diferentes compuestos que, a pesar de ser útiles, en grandes cantidades tienen repercusiones dañinas para los ecosistemas y la salud. Ante la demanda de productos eléctricos, electrodomésticos, autos y polímeros, creció el riesgo de quemaduras de inmuebles y/o personas (Costa y Giordano, 2007). Los difenilos policlorados (PCB, por sus siglas en inglés) surgieron como una alternativa para retardar la ignición de distintos productos, salvar vidas y detener las pérdidas materiales ocasionadas por los incendios de diferentes inmuebles (Dingemans et al., 2011). Sin embargo, los PCB resultaron dañinos para la salud y su uso se discontinuó (Król et al., 2012). A partir de los años 70, los éteres difenilos polibromados (PBDE, por sus siglas en inglés) sustituyeron a los PCB como aditivos retardantes de flama en electrodomésticos, juguetes, teléfonos, textiles y materiales para construcción (Król et al., 2012).

Actualmente, se sabe que los PBDE se desprenden de los objetos a los que se adicionan y que se concentran en sedimentos y organismos de diversos ecosistemas, llegando incluso al ártico (Rocha-Gutierrez et al., 2015). Las repercusiones a la salud por la exposición a los PBDE, se hicieron evidentes gracias a estudios longitudinales con humanos en países industrializados, y con diferentes modelos de exposición en animales de laboratorio (Eriksson et al., 2001; Roze et al., 2009). La acumulación de los PBDE en los humanos desde etapas perinatales está relacionada con deficiencias motoras y cognitivas (Roze et al., 2009). Estudios con roedores, asemejan lo observado en los

humanos y permiten un acercamiento a los mecanismos celulares que se dañan por estos contaminantes ambientales y que subyacen a las deficiencias motoras y cognoscitivas que se han observado. Sin embargo, aún quedan interrogantes por responder.

Diversos trabajos de investigación han demostrado que la exposición perinatal a los PBDE afecta la expresión de proteínas sinápticas tanto en la pre-, como en la postsinapsis (Viberg, 2009). Sin embargo, no se ha establecido una relación directa entre los mecanismos celulares que se dañan y las repercusiones conductuales que éstos tienen. El óxido nítrico es un gas que actúa como un neurotransmisor retrógrado en la sinapsis. Participa en la sinaptogénesis propia del desarrollo postnatal temprano, y con mecanismos celulares relacionados con el aprendizaje y la memoria (Paul y Ekambaram, 2011; Nikonenko et al., 2013). Lo que sugiere que la exposición perinatal a los PBDE podría disminuir su producción, causando los daños en la cognición que se han encontrado en los organismos expuestos a estos compuestos.

Por otra parte, la investigación sobre posibles programas de intervención y/o estrategias terapéuticas que ayuden a mejorar la capacidad motora y cognoscitiva de quienes se han afectado por la exposición a los PBDE, es limitada. Los ambientes enriquecidos son un paradigma conductual que promueve y favorece la estimulación sensorial, cognoscitiva y motora (Nithianantharajah y Hannan, 2006). Estudios con roedores que se criaron en ambientes enriquecidos han establecido que este paradigma conductual provoca cambios anatómicos y funcionales en el cerebro, y que tiene efectos benéficos sobre la motricidad y la cognición de los roedores (Ilin y Richter-Levin, 2009). Además, los ambientes enriquecidos ayudan

a la recuperación de los daños celulares y conductuales presentes en roedores que se expusieron a sustancias como el tolueno, y el etanol (Hannigan et al., 2007; Paez-Martínez et al., 2013; Hannan, 2014). Estas evidencias sugieren que los ambientes enriquecidos podrían revertir o mejorar los daños causados por la exposición a los PBDE.

Este trabajo se realizó con el objetivo de profundizar más sobre el estudio de los efectos dañinos de la exposición perinatal a los PBDE y de establecer una relación entre los PBDE, la producción del óxido nítrico y las repercusiones cognitivas que pudiera tener. Además, también se exploró el papel del ambiente enriquecido como una estrategia terapéutica viable para el tratamiento de los déficits motores y cognitivos causados por los PBDE. Un mejor entendimiento de los mecanismos celulares que participan en las alteraciones causadas por los PBDE, nos ayudará a crear estrategias terapéuticas o programas de intervención más específicos y puntuales.

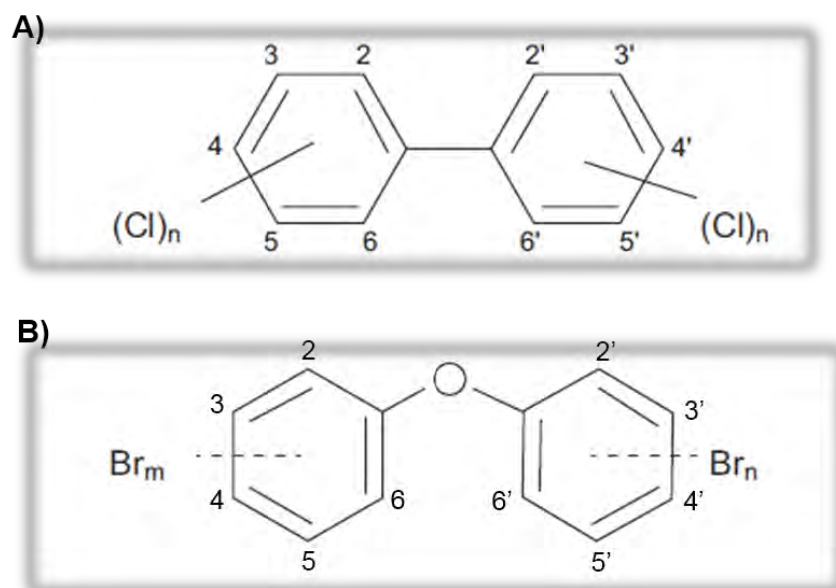
## 1. Los éteres difenilos polibromados

El índice de accidentes y muertes provocados por objetos quemados, así como las pérdidas materiales causadas por el fuego en países industrializados, provocaron la búsqueda de alternativas que ayudaran a prevenir o disminuir estos incidentes (Costa y Giordano, 2007; Dingemans et al., 2011).

Los compuestos halogenados (aquellos que tienen en su estructura átomos de cloro, iodo, fluoro o bromo) surgieron como retardantes de flama útiles para prevenir o retrasar la combustión de diversos objetos, ya que generan radicales libres que reaccionan con el oxígeno del ambiente que los rodea, evitando así la propagación del fuego (Domingo, 2012; Rocha-Gutiérrez et al., 2015). Además, los compuestos organoclorados y los organobromados, tienen alta eficiencia y baja descomposición a temperaturas elevadas, a diferencia de los compuestos fluorados o iodados que se descomponen una vez que la combustión ocurrió (Rocha-Gutiérrez et al., 2015).

Entre los compuestos halogenados más utilizados como retardantes de flama se encontraban los difenilos policlorados (PCB, por sus siglas en inglés) (Dingemans et al., 2011), compuestos orgánicos que se caracterizan por tener unidos a su estructura átomos de cloro (**Fig. 1A**). Sin embargo, los PCB se retiraron del mercado por su gran toxicidad, y se comenzaron a utilizar los éteres difenilos polibromados (PBDE, por sus siglas en inglés) (Król et al., 2012). Actualmente, los PBDE se siguen usando como aditivos para prevenir o retardar la propagación del fuego en diversos objetos, entre los que se encuentran: aparatos

electrodomésticos, textiles, automóviles y materiales de construcción (Birnbaum y Staskal, 2004; Król et al., 2012).



**Figura 1. Los difenilos policlorados (PCB) y los éteres difenilos polibromados (PBDE).** Representación gráfica de la estructura química de **A)** PCB y **B)** PBDE (Modificado de Rocha-Gutiérrez et al., 2015).

### 1.1 Generalidades de los éteres difenilos polibromados

Los éteres difenilos polibromados (PBDE, por sus siglas en inglés), son compuestos orgánicos análogos a los PCB, que se diferencian por tener unidos a su estructura átomos de bromo (**Fig. 1B**). De acuerdo al número y posición de sus átomos bromados, los PBDE se nombran según el sistema de la IUPAC, se clasifican dentro de 10 categorías y existen hasta 209 congéneres (Zhang et al., 2013). Los congéneres que cuentan con menor número de átomos bromados son los tetra, penta y hexa PBDE, mientras que los deca PBDE son los que tienen más átomos de bromo (Rocha-Gutiérrez et al., 2015).

Desde los años 70, los PBDE comenzaron a industrializarse como retardantes de flama, en forma de mezclas que fueron nombradas según la dominancia de los congéneres que contenían (Król et al., 2012). Las mezclas comerciales más comunes se conocen como penta DE 71(50-60% pentaBDE, 25% tetraBDE y 4-8% hexaBDE), octa DE79 (31% octaBDE, 37% heptaBDE y 14% nonaBDE) y deca DE-83 (97% decaBDE y 3% nonaBDE) (Costa y Giordano, 2007). La mezcla comercial pentaBDE se encuentra principalmente en muebles y ropa de cama, mientras que las otras dos mezclas se encuentran en polímeros como plásticos duros, aparatos electrodomésticos y textiles (La Guardia et al., 2006; Król et al., 2012).

Otra característica de los PBDE es que son aditivos que no se unen químicamente a la superficie de los objetos a los que se aplican, debido a que los polímeros carecen de sitios de unión para estos compuestos (Domingo et al., 2012). Por lo tanto, los PBDE se desprenden fácilmente hacia el medio ambiente, ya sea por volatilización o por formación de polvo causada por el uso de los objetos tratados (Birnbaum y Staskal, 2004; Król et al., 2012). Una vez en el ambiente, los PBDE son capaces de bioacumularse debido a que son persistentes, hidrofóbicos y lipofílicos (León-Olea et al., 2012).

Actualmente, los PBDE se consideran contaminantes ambientales debido a que se depositan en la superficie terrestre, el agua y los organismos, cubriendo así toda la cadena alimenticia (Darnerud et al., 2001; Frederiksen et al., 2009).

## 1.2 Los PBDE en el medio ambiente y en los humanos

Los primeros indicios de que los PBDE se acumulaban en el ambiente se hallaron al analizar peces de Suecia durante los años 80 (Anderson y Blomkvist, 1981). Mientras que en los humanos, se identificaron grandes cantidades de estos compuestos en sangre y en leche materna (Pérez-Maldonado et al., 2009; Bradman et al., 2012; Eskenazi et al., 2013).

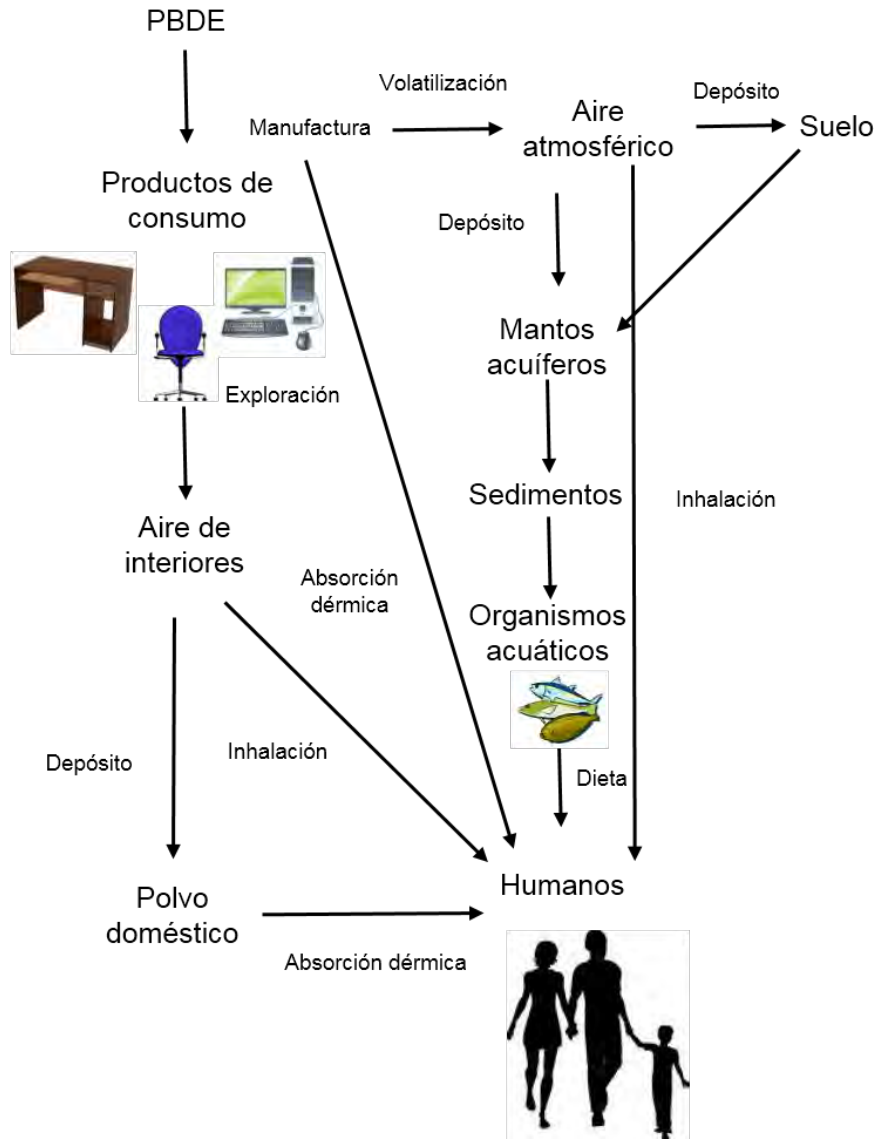
La identificación de diversas cantidades de los PBDE en múltiples organismos y ecosistemas que van desde el ártico hasta el polvo doméstico (Ikonomou et al., 2002), y desde peces hasta humanos (Frederiksen et al., 2009; Bradman et al., 2012), puso en evidencia la capacidad de estos compuestos de bioacumularse y magnificarse.

Existen tres factores importantes que influyen en la acumulación de los PBDE en el medio ambiente: la producción industrial de estos compuestos; su uso y el destino final de los objetos que los contienen (Rocha-Gutiérrez et al., 2015). Una de las fuentes más comunes de contaminación del agua es la infiltración de desechos electrónicos a los mantos acuíferos (Rocha-Gutiérrez et al., 2015). Por otra parte, la acumulación de los PBDE en los sedimentos se da, principalmente, por el uso de aparatos electrónicos, electrodomésticos, muebles y el desgaste de alfombras que se trataron con PBDE de alto peso molecular y baja volatilidad (Rocha-Gutierrez et al., 2015).

El uso y acumulación de los PBDE en el ambiente provocan que el ser humano esté continuamente expuesto a estos compuestos (**Fig. 2**). Las vías de exposición pueden ser tres: inhalación de gases o polvo contaminado (dentro y fuera del hogar), absorción dérmica, por contacto con objetos tratados o polvo, e ingestión

de alimentos contaminado, por ejemplo: pescados ricos en grasa (Frederiksen et al., 2009, Domingo, 2012; Król et al., 2012). Adicionalmente, la acumulación de los PBDE en el tejido adiposo, la sangre y la leche materna constituyen otra vía de exposición a estos compuestos. Durante el periodo perinatal se puede exponer a la descendencia, vía intrauterina o durante la lactancia (Frederiksen et al., 2010; Dingemans et al., 2011; Koenig et al., 2012); afectando, de esta forma, el desarrollo fetal y postnatal.





**Figura 2. Distribución y destino ambiental de los PBDE.** El uso constante de los PBDE provoca su acumulación en el ambiente. El humano está expuesto por tres vías: ingestión, inhalación y absorción dérmica (Modificado de Król et al., 2012).

Debido a la preocupación por el ambiente y la salud, en el 2004, en Europa, se prohibió el uso de las mezclas comerciales penta y octaBDE, mientras que en Estados Unidos, la única comercializadora de estas mezclas dejó de producirlas voluntariamente (La Guardia et al., 2006). A pesar de su prohibición, los PBDE presentes en estas mezclas persisten en el ambiente, pues muchos de los objetos

que fueron tratados con ellas siguen en uso o sus partes se han reciclado para la generación de nuevos objetos (La Guardia et al., 2006; Frederiksen et al., 2009). Por otra parte, la mezcla decaBDE se sigue produciendo en Estados Unidos y se comercializa en todo el mundo (Frederiksen et al., 2009; Chen et al., 2010). Los congéneres decabromados, una vez que son liberados al ambiente, se pueden degradar y dar lugar a congéneres con menor número de átomos, que tienen mayor toxicidad y la capacidad de bioacumularse (La Guardia et al., 2006; Noyes et al., 2011).

### **1.2.1 El caso de México**

A pesar de la preocupación internacional por los efectos de la exposición continua a los PBDE, en México, no se tiene certeza de los niveles a los que está expuesta la población. Hasta ahora, se han realizado pocos estudios sobre los niveles ambientales en el país y su presencia en los pobladores, así como investigaciones acerca de los posibles efectos dañinos de los PBDE sobre las funciones biológicas y cognitivas de los mexicanos (López et al., 2006; Pérez-Maldonado et al., 2009; Orta-García et al., 2011, 2014). Sin embargo, se sabe que Estados Unidos exporta hacia México gran cantidad de objetos que son tratados con los PBDE, entre los que se encuentran: aparatos electrónicos (electrodomésticos, teléfonos celulares, computadoras, televisiones, etc.), ropa y automóviles (Hale et al., 2003). En consecuencia, México y su población están expuestos a estos contaminantes ambientales constantemente.

Un estudio realizado a cinco mujeres habitantes de la ciudad de San Luis Potosí, San Luis Potosí, y a siete mujeres de la zona rural de la Huasteca, San Luis

Potosí, encontró que las mujeres de la zona urbana tenían una concentración de PBDE en sangre de 21.5-37.5 ng/ g<sup>-1</sup> lípido, mientras que las mujeres que habitaban la zona rural tenían una concentración en leche de 0.8-5.4 ng/ g<sup>-1</sup> lípido (López et al., 2006). Así mismo, otro estudio reportó que niños de seis a trece años de edad que habitaban zonas industriales como Ciudad Juárez, Chihuahua, tenían mayores niveles de PBDE en sangre, en comparación con niños de poblaciones rurales en el Estado de México y San Luis Potosí que también presentaron niveles detectables de estos contaminantes (Pérez-Maldonado et al., 2009).

Además, estudios más recientes encontraron que niños de la ciudad de Guadalajara y habitantes de la Ciudad de México también presentaron PBDE en sangre (Orta-García et al., 2011, 2014). En Guadalajara, los niños de zonas agrícolas presentaron los niveles más altos de los PBDE (2000 ng/g lípido) junto con los niños de zonas industriales (995 ng/g lípido) (Orta-García et al., 2014). Mientras que en la ciudad de México los pobladores presentaron rangos que van desde niveles indetectables hasta la presencia de 350 ng/g lípido, con una media de 15.3 ng/g lípido (Orta-García et al., 2014). En conjunto, estos resultados demuestran que los habitantes de México, tanto de zonas rurales como de zonas urbanas, están expuestos a los PBDE.

Por otra parte, en un análisis de aguas residuales en Ciudad Juárez, Chihuahua, se detectó que había niveles altos de los PBDE; específicamente, de los congéneres BDE-47, -99, -100 y -153 que son tetra y penta PBDEs, los más propensos a bioacumularse (Rocha-Gutiérrez y Lee, 2012; Costa et al., 2014). Lo

que sugiere la acumulación de estos contaminantes no sólo en los pobladores, sino también en las aguas y los sedimentos del país.

La bioacumulación de los PBDE en los humanos se ha convertido en un tema de especial importancia. En los últimos años, se ha encontrado que la presencia de los PBDE en la sangre y leche materna va en aumento (Eriksson et al., 2001; revisado en Viberg et al., 2003), con lo que se pone en riesgo el desarrollo fetal y postnatal de la descendencia, y se incrementa el riesgo de sufrir enfermedades del neurodesarrollo en las que se afectan el aprendizaje, el lenguaje y el comportamiento (Roze et al., 2009; Eskenazi et al., 2013).

### **1.3 Los PBDE en el sistema nervioso central**

El uso excesivo de los PBDE y su desprendimiento hacia la biosfera han provocado el contacto constante de los organismos con estos compuestos. Consecuentemente, la exposición a los PBDE se puede dar en cualquier etapa de la vida y de esta forma afectarla.

Los efectos de los PBDE son dependientes de la dosis, la vía de administración y el periodo del desarrollo al momento de la exposición (León-Olea et al., 2012). Hoy en día, se considera que así como los PCB, los PBDE causan disrupción endocrina, neuroendocrina y del neurodesarrollo (Kodavanti y Currás-Collazo, 2010; Herbstman y Mall, 2014; León-Olea et al., 2014). Según las investigaciones acerca de los efectos de la exposición a los PBDE, uno de los periodos más susceptibles a daños es la etapa perinatal (Eriksson et al., 2001; Viberg et al., 2003; Eskenazi et al., 2013). La presencia de sustancias tóxicas durante el desarrollo (fetal y/o postnatal) del sistema nervioso central (SNC), tiene como

consecuencia afectaciones morfológicas y/o funcionales que repercuten en la vida adulta de los organismos (Costa et al., 2014; Herbstman y Mall, 2014). Por lo tanto, la presencia de los PBDE durante periodos perinatales es altamente tóxica para el desarrollo de este sistema.

La exposición perinatal a los PBDE se da principalmente por vía intrauterina debido a que pasan la barrera placentaria, por ingestión de leche materna contaminada, y/o por inhalación del polvo en los hogares (Currás-Collazo, 2010; Frederiksen et al., 2010). En humanos, diversos estudios longitudinales han observado que la exposición perinatal a los PBDE se relaciona con afectaciones en funciones cognoscitivas como la atención, el procesamiento verbal y el razonamiento perceptual (Roze et al., 2009; Eskenazi et al., 2013); y funciones motoras como la motricidad fina (Roze et al., 2009; Herbstman y Mall, 2014).

Por otra parte, en roedores, se demostró que la exposición perinatal a los PBDE afecta funciones motoras; por ejemplo: daña la actividad motora espontánea, causa hiperactividad y disminuye la habituación a ambientes novedosos (Eriksson et al., 2001; Viberg et al., 2003; Rice et al., 2007; Suvorov et al., 2009). En cuanto al funcionamiento cognoscitivo, se observó que la exposición perinatal a los PBDE se relaciona con un bajo desempeño de los roedores en tareas de atención, y aprendizaje y memoria, como el laberinto de Morris cuando son adultos (Eriksson et al., 2001; Viberg et al., 2003; Driscoll et al., 2010; Koenig et al., 2012).

A pesar de la evidencia sobre los daños causados en el neurodesarrollo por la exposición perinatal a los PBDE, el mecanismo de acción de estos compuestos no se conoce por completo. Diversos trabajos de investigación se han llevado a cabo

con el fin de dilucidarlo y se han centrado en los efectos directos que podrían tener los PBDE sobre el desarrollo del SNC.

El desarrollo del SNC comprende fases perinatales; una de ellas es la fase de crecimiento rápido del cerebro (Viberg et al., 2003), que en los humanos, abarca hasta los primeros dos años de vida, mientras que en especies como los roedores es durante las primeras dos semanas postnatales (Herbstman y Mall, 2014). Durante esta fase del desarrollo se llevan a cabo procesos que comprenden el crecimiento de dendritas y axones, así como la espinogénesis y sinaptogénesis que llevarán al establecimiento de los circuitos sinápticos en el cerebro (Yuste y Bonhoeffer, 2004; Yoshihara et al., 2009). La exposición perinatal a los PBDE provoca un desequilibrio en la expresión de proteínas que participan en el establecimiento de conexiones sinápticas en la corteza y el hipocampo. Por ejemplo: la proteína asociada al crecimiento 43 (GAP-43, por sus siglas en inglés) (Viberg, 2008), la sinaptofisina (Viberg, 2009), factores neurotróficos como el BDNF (Viberg, 2009) y proteínas cinasas como la CaMKII (Dingemans et al., 2007; Viberg, 2008).

Por otra parte, la exposición perinatal a los PBDE, también puede causar afectaciones morfológicas y fisiológicas de las neuronas del hipocampo, estructura esencial para llevar a cabo procesos de aprendizaje y memoria. Específicamente, se ha encontrado que la exposición perinatal a los PBDE causa anomalías en la ultraestructura neuronal de las áreas CA1 y CA3; por ejemplo: hinchamiento de organelos como las mitocondrias y el retículo endoplásmico, menor número de vacuolas y condensación anormal de la cromatina (He et al., 2009; Zhang et al., 2013). Adicionalmente, se observó que en el área CA3, el número de neuronas

presentes disminuye considerablemente y su arreglo espacial cambia (Zhang et al., 2013).

Respecto a las afectaciones fisiológicas, se reportó que en tejido hipocampal la exposición perinatal a los PBDE provoca cambios en la plasticidad sináptica asociada al aprendizaje y memoria. Particularmente, se observó una reducción de la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés), incremento en la amplitud de los potenciales excitatorios postsinápticos inducidos por la estimulación eléctrica de alta frecuencia (Lamprecht y LeDoux, 2004), (Dingemans et al., 2007; Xing et al., 2009); junto con una reducción de proteínas postsinápticas como: subunidades de receptores glutamatérgicos y CAMKII (Dingemans et al., 2007; Yan et al., 2012). Además, estudios *in vitro* con células hipocampales, revelaron que algunas vías de señalización involucradas con el aprendizaje y la memoria se afectaban con la exposición a los PBDE. Específicamente, la exposición a diversos congéneres de los PBDE, causó afectaciones en la homeostasis de  $Ca^{2+}$  e incrementó la translocación de proteínas cinasas como la PKC (Kodavanti y Ward, 2005; Coburn et al., 2008).

En su conjunto, estas evidencias demuestran que la exposición perinatal a los PBDE provoca cambios importantes en el desarrollo y funcionamiento del SNC, causando afectaciones importantes a nivel motor y cognoscitivo.

## 2. Óxido Nítrico

### 2.1 Generalidades del óxido nítrico

El óxido nítrico es una molécula de señalización que participa en diversos procesos fisiológicos como el sueño, el dolor, el aprendizaje y la memoria (Garthwaite, 2008). El óxido nítrico se forma por la actividad de la enzima sintasa del óxido nítrico (NOS); existen tres isoformas de esta enzima, dos constitutivas: la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS), y una de tipo inducible (iNOS) (Garthwaite, 2008). Las tres isoformas sintetizan el óxido nítrico a partir de la L-arginina y utilizando como cofactor al NADPH; sin embargo, la iNOS sólo se expresa durante procesos patológicos como la inflamación (Saha y Pahan, 2006; Calebrese et al., 2009).

En el sistema nervioso, el óxido nítrico se forma principalmente por la actividad de la nNOS, específicamente por la nNOS $\alpha$ . En el SNC, la nNOS $\alpha$  se encuentra asociada a los receptores NMDA de la postsinapsis mediante los dominios PDZ de la proteína de densidad postsináptica-95 (PSD-95) (Nikonenko et al., 2008). Cuando los receptores NMDA se abren, permiten el paso de Ca<sup>2+</sup> que se unirá a la calmodulina, resultando en la activación catalítica de la nNOS (Garthwaite, 2008).

Una vez sintetizado, el óxido nítrico es capaz de difundir a través de los lípidos y el espacio extracelular  $\sim 0.8 \mu\text{m}/100 \mu\text{s}$  (Lancaster, 1997; Garthwaite; 2008). La capacidad de difusión del óxido nítrico le permitiría actuar sobre diferentes blancos alrededor de su sitio de síntesis, sin embargo, la localización de sus receptores determinará si su efecto es retrógrado o anterógrado en la sinapsis (Garthwaite, 2008).



Los receptores de óxido nítrico, en el SNC, son los receptores guanilato ciclasa. Estos receptores son heterodímeros formados por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ . Los receptores guanilato ciclasa pueden tener dos isoformas:  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_2\beta_1$ ; y su localización celular en el cerebro es diferenciada (Gibb y Garthwaite; 2001). La isoforma  $\alpha_2\beta_1$  cuenta con un dominio PDZ que le permite unirse a proteínas de andamiaje presentes en las sinapsis, por ejemplo: la PSD95 (Garthwaite, 2016). En el hipocampo, la nNOS se concentra en la postsinapsis, mientras que los receptores del óxido nítrico se localizan en la presinapsis (Burette et al., 2002; Szabadits et al., 2011). Estas evidencias apoyan la hipótesis de que el óxido nítrico es un neurotransmisor retrógrado capaz de comunicar a la presinapsis que en la postsinapsis hubo actividad sináptica.

Las propiedades del óxido nítrico lo convierten en una molécula útil para la regulación y mantenimiento de la actividad sináptica, que le permiten actuar en diferentes procesos del neurodesarrollo y la plasticidad neuronal (Contestabile, 2000; Paul y Ekambaram, 2011).

## **2.2 El óxido nítrico en la formación y refinamiento de los circuitos sinápticos**

El óxido nítrico está presente en el cerebro a lo largo de toda la vida, la nNOS está presente tanto en los cerebros en desarrollo como en los cerebros maduros (Calebrese et al., 2009). El óxido nítrico participa en múltiples mecanismos que involucran la formación, refinamiento y plasticidad de los circuitos sinápticos en el cerebro. Estos mecanismos permitirán que, durante el desarrollo postnatal temprano, se lleve a cabo la formación de circuitos sinápticos bien definidos (Chen et al., 2004; Mize y Lo, 2004) y que, posteriormente, estos circuitos puedan

fortalecerse y/o cambiar para dar lugar a procesos como el aprendizaje y la memoria (Hardingham et al., 2013).

### **2.2.1 El óxido nítrico y la sinaptogénesis**

Durante el desarrollo temprano del sistema nervioso, el óxido nítrico participa en la diferenciación y supervivencia neuronal (Chen et al., 2004; Contestabile, 2000), así como en la espinogénesis y la sinaptogénesis postnatal (Morales-Medina et al., 2007; Nikonenko et al., 2013). En el sistema visual, la producción del óxido nítrico en las primeras semanas postnatales se ha relacionado con la maduración y refinamiento de las fibras de la retina (Mize y Lo, 2004; Chung et al., 2004). Asimismo, en el bulbo olfatorio, la inhibición de la producción del óxido nítrico afecta el correcto establecimiento de sinapsis durante el desarrollo (Chen et al., 2004).

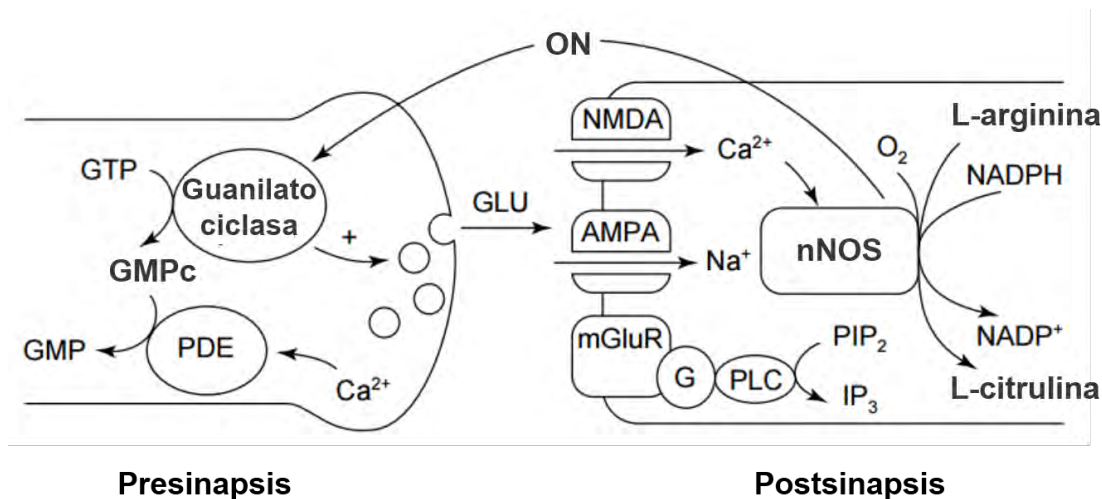
Particularmente, en el hipocampo, la inhibición de la nNOS, en los primeros días postnatales, disminuye la expresión de la proteína sináptica sinapsina I, que podría relacionarse con un menor número de sinapsis establecidas (Sánchez-Islas y León-Olea, 2004). A este respecto, se encontró, en tejido y cultivos hipocámpales de células en desarrollo, que la ausencia del óxido nítrico provoca un decremento en el número de espinas dendríticas y sinapsis (Morales-Medina et al., 2007; Nikonenko et al., 2008; Nikonenko et al., 2013). Estos efectos pudieron hallarse incluso en etapas posteriores del desarrollo, particularmente en el área CA1 (Morales-Medina et al., 2007). Además, cuando se pierde el balance en la producción del óxido nítrico y existe una sobreproducción de esta molécula, el número de espinas dendríticas multiinervadas incrementa (Nikonenko et al., 2008).

Estas evidencias sugieren que el óxido nítrico propicia la diferenciación de las terminales sinápticas y las guía hacia las espinas dendríticas adyacentes para establecer contactos sinápticos (Nikonenko et al., 2008); contribuyendo, de esta forma, a la formación y establecimiento de los circuitos neuronales del cerebro.

### **2.2.2 El óxido nítrico en la plasticidad neuronal**

El óxido nítrico, también juega un papel importante en la plasticidad fisiológica y estructural que involucra la modificación de los circuitos neuronales por efecto de la actividad sináptica y la experiencia (Paul y Ekambaram, 2011; Hardingham et al., 2013).

Uno de los mecanismos más estudiados de la plasticidad sináptica es la LTP (Lamprecht y LeDoux, 2004). En la LTP, se produce óxido nítrico por la activación de los receptores NMDA (Zorumski y Izomu, 1998; Hardingham et al., 2013). El óxido nítrico, que difunde a la presinapsis, activa a su receptor guanilato ciclasa, se incrementa la liberación de glutamato, que a su vez, activa a los receptores NMDA y propicia el fortalecimiento de ese contacto sináptico (Arancio et al., 2001; Ratnayaka et al., 2012; Hardingham et al., 2013) (**Fig. 3**). Como consecuencia de los cambios en la eficacia sináptica ocurren cambios estructurales como la formación de nuevas espinas dendríticas y sinapsis (Engert y Bonhoeffer, 1999). Los cambios en la eficacia sináptica, así como los cambios estructurales que ésta conlleva se relacionan con fenómenos como el aprendizaje y la memoria (Lamprecht y LeDoux, 2004).



**Figura 3. El óxido nítrico en la plasticidad sináptica.** El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la postsinapsis, por la apertura de los receptores NMDA, provoca la activación catalítica de la nNOS. La nNOS produce óxido nítrico (ON) que difunde a la presinapsis, activando a su receptor guanilato ciclasa y provocando un incremento en la liberación del neurotransmisor glutamato (GLU). Además, en la presinapsis, una fosfodiesterasa (PDE, por sus siglas en inglés) dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  decrementa la concentración de GMPcíclico (GMPc) que incrementa por efecto de la guanilato ciclasa. Abreviaturas: G, proteína G;  $\text{IP}_3$ , inositol trifosfato; mGluR, receptor glutamatérgico metabotrópico;  $\text{PIP}_2$ , fosfatidilinositol diacilglicerol; PLC, fosfolipasa C (Modificado de Hölscher, 1997).

Las alteraciones en la producción del óxido nítrico, no sólo afectan la plasticidad sináptica, sino los procesos de aprendizaje y memoria a los que está relacionada (Paul y Ekambaram, 2011). Ratones knockout en la nNOS muestran deficiencias en su ejecución en paradigmas conductuales como el condicionamiento de miedo contextual, el laberinto de agua de Morris, el laberinto elevado en T y el campo abierto (Weitzdoerfer et al., 2004; Kelley et al., 2009; Tanda et al., 2009).

Particularmente, la inhibición de la nNOS mediante fármacos produce alteraciones en la adquisición y recuperación de la memoria espacial, evaluada mediante laberintos, por ejemplo: el laberinto de agua de Morris (Chapman et al., 1992; Majlessi et al., 2008; Paul y Ekambaram, 2011; Li et al., 2012). La codificación y consolidación de la memoria espacial es dependiente del hipocampo (Hartley et

al., 2014; Leutgeb et al., 2004). En esta estructura se observó un incremento en la expresión de la nNOS en las fases de adquisición y consolidación de la memoria en un paradigma de condicionamiento operante (Rapanelli et al., 2010), así como un incremento en la actividad de la NOS después del entrenamiento en una tarea de memoria espacial (Zhang et al., 1998). Adicionalmente, en otros paradigmas de plasticidad dependiente de experiencia como los ambientes enriquecidos, también se ha observado que en el hipocampo, específicamente en el área CA1, el óxido nítrico es necesario para la remodelación estructural de las neuronas, es decir, para la formación de nuevas espinas dendríticas y sinapsis (Nikonenko et al., 2013).

### **2.3 El óxido nítrico y los contaminantes ambientales**

La participación del óxido nítrico en el desarrollo postnatal temprano, así como en la plasticidad neuronal, lo convierten en una molécula blanco de afectaciones causantes de daños al SNC. En los últimos años, se ha relacionado a la disrupción del balance en la producción del óxido nítrico con alteraciones cognoscitivas, y desórdenes neuropsiquiátricos y del neurodesarrollo como la hiperactividad, el autismo y la esquizofrenia (Akyol et al., 2004; Bernstein et al., 2005; Tande et al., 2009). Diversos factores psicosociales, biológicos y ambientales subyacen a estos desórdenes (Akyol et al., 2004). Interesantemente, la exposición a contaminantes ambientales como los PBDE, se ha asociado con déficits conductuales y cognoscitivos característicos de estos desórdenes neuropsiquiátricos, por ejemplo: déficits en la conducta social, impulsividad, hiperactividad y déficits en la memoria (de Cock et al., 2012; Roze et al., 2009; Viberg et al., 2003; Messer, 2010). Sin

embargo, los mecanismos biológicos que provocan estas conductas y desordenes cognoscitivos aún no se conocen por completo.

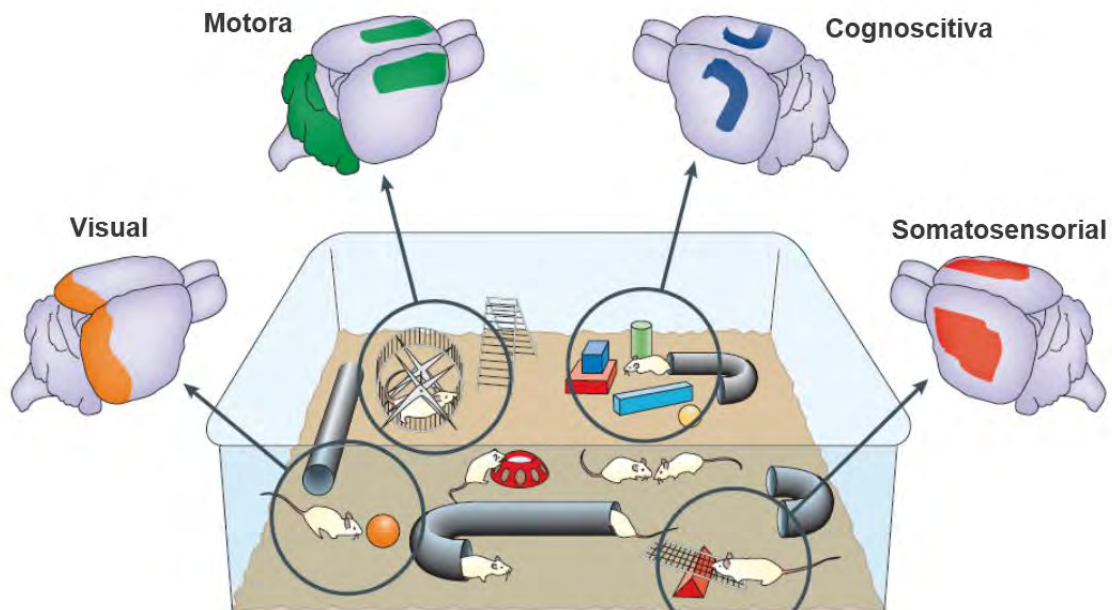
### 3. Ambientes enriquecidos

#### 3.1 Generalidades de los ambientes enriquecidos

Los efectos de la estimulación ambiental y la experiencia sobre el cerebro y el comportamiento cobraron importancia cuando se observó que resultaban benéficos para el refinamiento de los circuitos cerebrales desde el nacimiento hasta la edad adulta (Nithianantharajah y Hannan, 2006; Mora et al., 2007). Inicialmente, en 1947, Donald Hebb reportó que ratas que se habían criado como mascotas mostraban mejorías conductuales en comparación con ratas de la misma camada que se mantuvieron en condiciones de laboratorio (revisado en van Praag et al., 2000). Años más tarde, Rosenzweig et al., introdujeron el uso experimental de los ambientes enriquecidos, demostrando que la modificación de las jaulas de las ratas con juguetes y laberintos provocaba cambios neuroquímicos y anatómicos en el cerebro (Rosenzweig et al., 1962; Rosenzweig y Bennett, 1996).

Actualmente, se considera que los ambientes enriquecidos son un paradigma conductual que propicia la estimulación sensorial, motora y cognoscitiva (Nithianantharajah y Hannan, 2006; Petrosiniet al., 2009) (**Fig. 4**). Para ello, en los laboratorios, se lleva a cabo la modificación de las jaulas: se hacen más grandes, se equipan con juguetes de diferentes colores, tamaños y texturas que son intercambiados constantemente; y se incluye material para hacer nidos, así como ruedas para correr y túneles que estimulan la actividad motora (Olsson y Dahlborn 2002; Petrosiniet al., 2009). Adicionalmente, la conformación espacial dentro de la jaula se va modificando e incluso la ubicación de la comida y el agua cambia con

el fin de estimular la capacidad cognoscitiva como la codificación de información para la formación de mapas espaciales, el reconocimiento de objetos y la detección de novedades (Nithianantharajah y Hannan, 2006).



**Figura 4. Ambientes Enriquecidos.** Representación gráfica de los ambientes enriquecidos y sus componentes. Los ambientes enriquecidos facilitan la estimulación sensorial, provocando la activación de la corteza visual (anaranjada) y la somatosensorial (roja). Además, promueven la actividad motora con ruedas para correr y la exploración del espacio, activando la corteza motora y el cerebelo (verde); e incrementan la estimulación cognoscitiva, a través de la codificación de mapas espaciales, detección de novedades y el reconocimiento de objetos, causando la activación del hipocampo (azul) y otras áreas corticales (Modificado de Nithianantharajah y Hannan, 2006).

### 3.2 Efectos de los ambientes enriquecidos en el cerebro

La exposición a los ambientes enriquecidos produce cambios en la fisiología y la anatomía del SNC. Los primeros reportes de cambios anatómicos se referían a cambios en el peso de los cerebros de los animales expuestos, así como en el grosor de la corteza cerebral y del hipocampo (Rosenzweig et al., 1972; Walsh et



al., 1969). Estudios neuroanatómicos más detallados, con el uso de la impregnación de Golgi, revelaron que las arborizaciones dendríticas de neuronas de la corteza visual aumentaban su longitud, grosor y complejidad, resultando en el engrosamiento de la corteza cerebral (Volkmar y Greenough, 1972; Greenough et al., 1973; Anderson, 2011). Estos cambios se pueden observar en otras cortezas como la motora y la somatosensorial (Kolb, et al., 2003; Landers et al., 2011; Jung y Herms; 2012), y en estructuras como los ganglios basales, el cerebelo y el hipocampo (especialmente en la región CA1) (Moser et al., 1994; Comery et al., 1996; Kozorovitskiy et al., 2005). Asimismo, gracias al análisis con microscopía electrónica se observó que no sólo las espinas dendríticas incrementaban, sino que el número de sinapsis aumentaba por efecto de los ambientes enriquecidos (Turner y Greenough, 1985; Landers et al., 2011).

El incremento en las arborizaciones dendríticas y el número de sinapsis de la corteza y el hipocampo, se observó incluso en primates que se han criado en ambientes enriquecidos, en los que además de estos cambios, también hay una mayor expresión de proteínas sinápticas como la sinaptofisina (Kozorovitskiy et al., 2005). A este respecto, se reportó que los ambientes enriquecidos promueven la expresión de proteínas y factores tróficos que tienen que ver con la espinogénesis, la sinaptogénesis y la señalización sináptica, por ejemplo: la PSD-95, CREB, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) y la neurotrofina-3 (Ickes et al., 2000; Williams et al 2001; Nithianantharajah et al, 2004; Simpson y Kelly, 2011): Así como el incremento de neurotransmisores como la acetilcolina y el glutamato, y sus receptores en la corteza y el hipocampo (Kozorovitskiy et al.,

2005; Simpson y Kelly, 2011), lo que coincide con un incremento de la LTP, después de la exposición a los ambientes enriquecidos (Artola et al., 2006; Eckert et al., 2010).

Finalmente, y como consecuencia de los cambios anatómico-funcionales inducidos por los ambientes enriquecidos, también se observaron efectos favorables sobre la ejecución de tareas conductuales como el campo abierto, el laberinto en cruz elevado y la exploración de un contexto novedoso (Amaral et al., 2008; Ilin y Richter-Levin, 2009). Igualmente, los ambientes enriquecidos mejoran la ejecución de los roedores en tareas relacionadas con el aprendizaje y la memoria, por ejemplo: la memoria espacial, evaluada mediante el laberinto de agua de Morris (Williams et al., 2001; Eckert et al., 2010).

### **3.3 Efecto terapéutico de los ambientes enriquecidos**

Los ambientes enriquecidos se han utilizado como un modelo para estudiar la plasticidad dependiente de experiencia en el SNC. Sin embargo, en los últimos años tomaron especial importancia como estrategia terapéutica en patologías del neurodesarrollo como el autismo, el síndrome de Down, el síndrome del X frágil (Reynolds et al., 2010; Begenisic et al., 2011); y en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la corea de Huntington y la enfermedad de Parkinson (Laviola et al., 2008; Hannan, 2014). Diversos trabajos de investigación con modelos animales de estas enfermedades han mostrado que los ambientes enriquecidos retrasan la aparición de los síntomas que las caracterizan y/o que mejoran los déficits cognoscitivos y conductuales que presentan (Pang et al., 2013; Hannan, 2014). Igualmente, los ambientes enriquecidos tienen efectos

benéficos en desórdenes conductuales como la hiperactividad, la ansiedad y la depresión (Rogers et al., 2016; Halperin y Healy, 2011; Renoir et al., 2013), así como en la recuperación de los daños causados por enfermedades cerebrovasculares y las adicciones (Buchhold et al., 2007; Hannigan et al., 2007; Paez-Martínez et al., 2013; Hannan, 2014).

En humanos, algunas estrategias de los ambientes enriquecidos se han utilizado como intervención temprana para niños nacidos prematuramente o con parálisis cerebral (Palmer et al., 1990; Blauw-Hospers et al., 2007). Estos programas de intervención temprana incluyen: servicios de salud, nutrición, educación, ejercicio físico, integración sensorial y tutorías familiares (Ramey y Ramey, 1998; Raine et al., 2001; Reynolds et al., 2010); y son efectivos para el mejoramiento de las habilidades verbales, visuales, y motoras de los infantes (Ramey y Ramey, 1998; Raine et al., 2001). Además, en el caso de las enfermedades del neurodesarrollo y neurodegenerativas, la intervención con actividades sociales o entrenamiento cognoscitivo, o con ejercicio físico, ayudan a retardar o aminorar la aparición de deficiencias cognoscitivas (Baker et al., 2010; Gates y Valenzuela, 2010; Halperin y Healy, 2011).

#### **4. Planteamiento del problema**

La exposición perinatal a los PBDE se relaciona con déficits conductuales y cognoscitivos, por ejemplo: hiperactividad, déficits de atención y fallas en la consolidación de la memoria. Los efectos directos de los PBDE sobre el SNC no se conocen por completo, lo que impide la generación de estrategias terapéuticas que coadyuven al tratamiento de los déficits presentados por sujetos expuestos a estos compuestos. Por lo tanto, esta tesis tuvo como objetivos: determinar si la exposición perinatal a los contaminantes ambientales PBDE está relacionada con una disminución en la producción del óxido nítrico en el hipocampo y si esta disminución se relaciona con un decremento en la expresión de proteínas sinápticas en el hipocampo, así como con déficits en la memoria espacial.

Por otra parte, el efecto terapéutico de los ambientes enriquecidos en diferentes enfermedades y desórdenes del neurodesarrollo y del sistema nervioso adulto, hace posible su efectividad para revertir o aminorar los efectos dañinos que pudiera tener la exposición perinatal a los PBDE. Por lo que otro objetivo de esta tesis fue estudiar si la crianza de las ratas expuestas perinatalmente a los PBDE en ambientes enriquecidos, tiene beneficios sobre la producción del óxido nítrico, la expresión de las proteínas sinápticas PSD-95 y sinaptofisina; y en la ejecución de las ratas en el laberinto de Barnes, relacionado con la memoria espacial.

#### **5. Hipótesis**

- La exposición perinatal a los PBDE afectará la actividad de la NOS, y los niveles de proteínas sinápticas en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo.

- La exposición perinatal a los PBDE afectará el desempeño de las ratas en el laberinto de Barnes, relacionado con el aprendizaje y memoria espacial dependientes del hipocampo.
- Los ambientes enriquecidos mejorarán o revertirán los efectos dañinos de la exposición perinatal a los PBDE sobre la actividad de la NOS, los niveles de proteínas sinápticas y la ejecución conductual en el laberinto de Barnes.

## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivos generales**

- Estudiar si la exposición perinatal a los PBDE tiene un efecto sobre la expresión de proteínas sinápticas y sobre la actividad de la sintasa del óxido nítrico en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo.
- Estudiar si la exposición perinatal a estos compuestos tiene un efecto sobre el desempeño de los roedores en el laberinto de Barnes.
- Estudiar si el enriquecimiento ambiental revierte o mejora estos efectos.

### **6.2 Objetivos específicos**

- Determinar si existen cambios en la actividad de la NOS en ratas adultas expuestas perinatalmente a los PBDE, mediante la cuantificación de la densidad óptica integrada de la histoquímica para la NADPH-diaforasa.
- Evaluar la memoria espacial de las ratas adultas expuestas perinatalmente a los PBDE mediante el laberinto de Barnes.

- Analizar los niveles de proteínas sinápticas en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, en las ratas adultas expuestas perinatalmente a los PBDE, por medio de western blot con anticuerpos específicos para sinaptofisina y PSD-95.
- Determinar si los ambientes enriquecidos tienen un efecto benéfico sobre el desempeño de los roedores en el laberinto de Barnes, así como en los niveles de proteínas sinápticas en el hipocampo.

## **7. Metodología**

### **7.1 Sujetos**

Para la realización de esta tesis se utilizaron ratas Wistar (250-260 g) procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”.

Las ratas Wistar se aparearon y, una vez en gestación, se expusieron al DE-79, una mezcla de PBDEs octabromados conformada por: heptaBDE, 37%; octaBDE, 31% y nonaBDE, 14% (Costa y Giordano, 2007) (Great Lakes Chemical Corporation, West Lafayette, IN). La exposición al DE-79 se realizó por vía oral (ratas madre) del día 6 gestacional al día 21 postnatal de las crías, mediante la ingesta de frituras de maíz con una dosis de 10.2 mg/Kg/día, disuelto en aceite de maíz (vehículo). Las ratas control consumieron las frituras sólo con el vehículo. Las crías tratadas y control se destetaron en el día postnatal 21 y se agruparon, de acuerdo a tratamiento, en condiciones estándar hasta el día postnatal 28. Al término de este período, las ratas macho se distribuyeron aleatoriamente en una de las siguientes condiciones: tratadas en ambiente no enriquecido (n= 15 por

grupo), tratadas en ambiente enriquecido (n= 15 por grupo), controles en ambiente no enriquecido (n= 15 por grupo) y controles en ambiente enriquecido (n= 15 por grupo), en las que permanecieron durante 8 semanas.

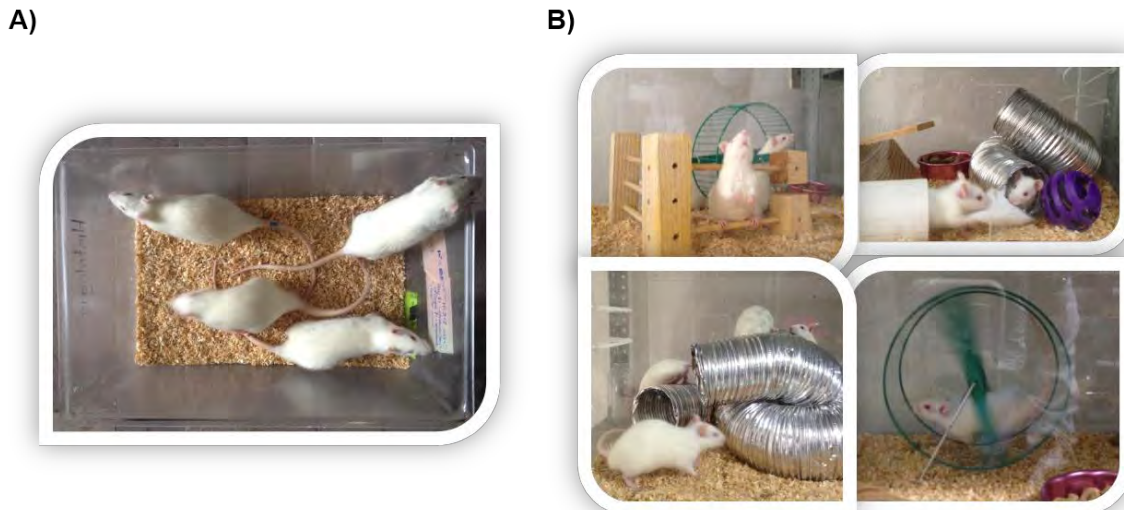
Los 15 animales de cada condición experimental se estudiaron separadamente en 3 grupos de 5 animales cada uno y se obtuvo un total de 15 ratas por grupo experimental. Todas las ratas se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*, en un ciclo de luz-obscuridad 12:12 h y temperatura de  $20 \pm 1$  °C.

## **7.2 Ambientes enriquecidos**

Las ratas macho en ambientes no enriquecidos se mantuvieron en jaulas estándar de laboratorio con las siguientes medidas: 32x47x20 cm (**Fig. 5A**). Por otra parte, las ratas en ambientes enriquecidos se criaron en cajas de acrílico de 100x50x45 cm, que se acondicionaron con una rueda para correr, juguetes de diferentes tamaños y texturas, túneles simulados con tubos flexibles de cartón, aluminio y plástico, así como material para hacer nidos (**Fig. 5B**). Durante las ocho semanas en que las ratas se mantuvieron en estas condiciones, se realizó limpieza general de su caja de alojamiento tres veces por semana. Para los ambientes enriquecidos, además, se intercambiaron los juguetes y los túneles, el número de ruedas para correr (una o dos por caja), y se disponían en diferentes lugares con el fin de crear nuevas conformaciones espaciales cada vez.

Una vez que las ratas cumplieron ocho semanas en la condición control o en los ambientes enriquecidos, comenzó la evaluación de su ejecución en el laberinto de Barnes. Las ratas se mantuvieron en los ambientes enriquecidos hasta el término de la evaluación conductual. Finalmente, previa anestesia, las ratas se sacrificaron

y sus cerebros se procesaron para western blot e histoquímica para la NADPH-diaforasa.



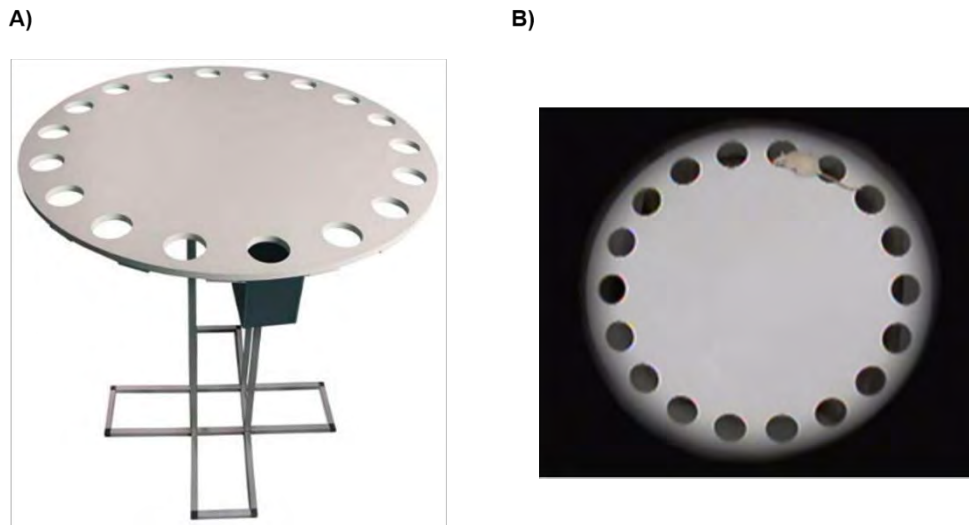
**Figura 5. Condiciones de habitación. A)** Ambiente no enriquecido. Las ratas en condición control se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio. **B)** Ambientes enriquecidos. Cajas de acrílico acondicionadas con juguetes, túneles y ruedas para correr.

### 7.3 Laberinto de Barnes

El laberinto de Barnes es una tarea diseñada para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial dependientes de hipocampo. Consiste en una plataforma circular de 120 cm de diámetro con 18 hoyos distribuidos uniformemente a lo largo de su perímetro. Uno de los hoyos es la entrada a una caja que permite a las ratas escapar de la superficie abierta de la plataforma (**Fig. 6**). Alrededor del laberinto y 50 cm sobre la plataforma, en cada una de las paredes del cuarto de conducta, se colocaron referencias espaciales que consistieron en imágenes de figuras geométricas de color negro y con 30 cm de altura (un triángulo, un cuadrado, un círculo y una cruz).



Durante todas las sesiones de entrenamiento y evaluación en el laberinto, las referencias espaciales se mantuvieron en la misma posición. Además, en cada sesión se motivó a las ratas a encontrar la caja de escape con la reproducción de ruido blanco (85 dB) y luz brillante (200 W).



**Figura 6. Laberinto de Barnes. A)** Vista completa del laberinto de Barnes y sus componentes: base, plataforma y caja de escape (color negro). **B)** Vista superior de la plataforma del laberinto de Barnes. La rata busca en los hoyos hasta localizar el que es la entrada a la caja de escape.

La evaluación de la ejecución conductual de las ratas en el laberinto de Barnes se llevó a cabo de forma similar a Barnes (1979) y McLay et al., (1999). Brevemente, las ratas de todas las condiciones experimentales (n= 15 por grupo) se habituaron a la caja de escape durante 4 min. Posteriormente, se les colocó en el centro de la plataforma y se les dirigió manualmente a la caja de escape, en donde permanecieron por otros cuatro minutos. Al término de la habituación, se comenzó con la fase de entrenamiento que tuvo una duración de cuatro días con cuatro ensayos cada uno. Al inicio de cada ensayo las ratas se colocaron en un cilindro

de acrílico al centro del laberinto por treinta segundos. Posteriormente, el cilindro se levantaba y se daba un tiempo máximo de 4 minutos para que las ratas encontraran la caja de escape en donde permanecían dos minutos. Cada ensayo estuvo espaciado por quince minutos.

Tres y doce días después de la fase de entrenamiento (memoria a corto y largo plazo, respectivamente), se reevaluó la conducta de las ratas en el laberinto de Barnes de igual forma que en el entrenamiento. Sin embargo, en esta fase, no se colocó el cilindro de inicio, por lo que las ratas comenzaron la exploración en cuanto se les colocó en el laberinto de Barnes.

Todas las sesiones se grabaron con un sistema computarizado de video para su análisis posterior (OAVIdReg, Video Tracking-OMNIALVA). Las variables cuantificadas fueron:

- Latencia para encontrar la caja de escape: tiempo que les tomó a las ratas localizar y entrar en el hoyo que contenía la caja de escape.
- Distancia recorrida: centímetros que las ratas recorrieron en el laberinto para localizar la caja de escape.
- Errores en la memoria de referencia: número de veces que las ratas visitaron los hoyos que no eran la entrada a la caja de escape.
- Errores en la memoria de trabajo: número de veces que las ratas visitaron un hoyo que ya habían visitado en el mismo ensayo.

#### **7.4 Actividad motora**

Con el fin de descartar efectos inespecíficos sobre la motricidad de las ratas (por ejemplo: actividad locomotora incrementada), causados por la exposición perinatal a la mezcla DE-79 (10.2 mg/kg/día) y que pudieran afectar los resultados en el laberinto de Barnes, se realizó una prueba de motricidad a todas las ratas de las cuatro condiciones experimentales (n=15 por grupo).

Se colocó a cada rata por separado en el centro de un campo abierto automatizado (45x35x45 cm; PanLab) capaz de detectar y cuantificar movimientos mediante sensores infrarrojos localizados en las paredes (a 2.5 y 10.5 cm de la base de la caja) y acoplados a un software (IR LE8811). Durante un lapso de 5 minutos, se dejó que cada una de las ratas se moviera y explorara libremente. Los movimientos que se registraron fueron: movimientos ambulatorios, movimientos estereotipados (todos los movimientos repetitivos, por ejemplo: acicalamientos) y parados en las dos patas posteriores (*rearing*).

#### **7.5 Histoquímica para la NADPH-diaforasa**

La histoquímica para la NADPH-diaforasa es una técnica histológica que aprovecha la actividad de la NOS como diaforasa. La NOS/NADPH-diaforasa reduce químicamente a las sales de tetrazolio, dando como resultado la coloración del tejido. Consecuentemente, esta técnica permite detectar indirectamente la presencia y actividad de esta enzima en diferentes grupos neuronales (Sánchez-Islas y León-Olea, 2001).

Ratas de las cuatro condiciones experimentales (n= 4 por grupo) se fijaron mediante una perfusión transcardial. Se utilizó solución salina al 0.9% (pH= 7.4)

seguida por paraformaldehído al 4% (pH= 7.4) (PFA; Sigma Aldrich, Cat. P-6148). A continuación, los cerebros se extrajeron y se mantuvieron de dos a cuatro horas en PFA, para asegurar su fijación. Una vez fijados, los cerebros se colocaron en sacarosa al 30% (Merck Millipore, Cat. 1.07651.1000) toda la noche, y se realizaron cortes de 40  $\mu$ m para su tinción (n= 72 cortes por grupo).

Finalmente, los cortes de los cerebros controles y experimentales (n= 72 por grupo; 4 ratas por grupo), se permeabilizaron en Tritón X-100 al 0.1% (Sigma Aldrich, Cat. T-9284) en buffer fosfato (PB) durante 5 minutos. La actividad de la NADPH-diaforasa se reveló mediante la incubación de los cortes en PB con 0.1 mg/ml de azul de nitrotetrazolio (Sigma Aldrich, Cat. N-6876) y 1 mg de  $\beta$ -NADPH (Sigma Aldrich, Cat. N-1630) durante 45 minutos a 37 °C. Los cortes control de la técnica se incubaron sólo con la  $\beta$ -NADPH o con el azul de nitrotetrazolio. Por último, los cortes se lavaron en PB, se secaron, aclararon y montaron.

Se obtuvieron imágenes digitalizadas de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo. La densidad óptica integrada de la histoquímica se determinó con el programa Image Pro Plus (Diagnostics Instruments).

## **7.6 Western Blot**

Para la realización de esta técnica, ratas de cada grupo (n= 4-5) se sacrificaron mediante decapitación, se obtuvieron los cerebros y se realizaron cortes coronales que se disectaron para obtener las zonas CA1 y CA3 del hipocampo. Se realizó un concentrado con el tejido de cada zona y se homogenizó en una solución de: EDTA 1 mM (Sigma Aldrich, Cat. E-9884), HEPES 10 mM (Sigma Aldrich, Cat. H-3375), Tris-HCl 10mM (Bio- Rad, Cat. 161-0716), sacarosa 0.25 M (Merck

Millipore, Cat. 1.07651.1000) y una tableta de coctel inhibidor de proteasas (Roche, Cat. 11697498001). El homogenado se centrifugó a 4 °C por 15 minutos a 3000g y el sobrenadante que se obtuvo a 20000 g por 30 minutos. A continuación se determinaron los niveles de proteína del sobrenadante mediante un kit Micro BCA (Thermo Scientific, Cat. 23235). Alicuotas con 15 y 20 µg de proteína total se hirvieron en buffer de carga con Tris-HCl 100 mM (pH 8.5), ditioneitol 4 mM (DTT; Bio- Rad, Cat. 161-0611), azul de bromofenol al 0.001% (Sigma Aldrich, Cat. B-5525), urea 12M (Bio- Rad, Cat. 161-0731) y sacarosa al 24%.

Los 15 o 20 µg de proteína se cargaron a un gel discontinuo de poliacrilamida al 4 y al 10% (Bio- Rad, Cat. 161-0100) y las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio- Rad, Cat. 162-0150). Las membranas se bloquearon con leche en polvo al 0.8% (Bio- Rad, Cat. 170-6404), y se incubaron con los anticuerpos primarios sinaptofisina (1: 3000; Abcam, Cat. ab14692) y PSD-95 (1:1000; Abcam, Cat. ab2723) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las membranas se incubaron con anticuerpos específicos conjugados con peroxidasa (Santa Cruz, anti-ratón (PSD-95) Cat., SC2314; anti-conejo (sinaptofisina) Cat. SC2313) por dos horas a temperatura ambiente. Las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante un kit de quimioluminiscencia (Perkin Elmer Cat. NEL105001EA).

La intensidad de las bandas se cuantificó a través de densitometría, utilizando el programa ImageJ. Los valores de densitometría para la sinaptofisina y la PSD-95 fueron normalizados con los valores obtenidos para la actina (1:8500; Santa Cruz, Cat. SC1616. Secundario anti-cabra, Santa Cruz, Cat., SC2020).

## 7.7 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos en este estudio se analizaron mediante un ANOVA de tres vías para el laberinto de Barnes (factores: tratamiento, ambiente y días de entrenamiento) y la prueba de motricidad (factores: tratamiento, ambiente y movimiento), y un ANOVA de dos vías para la histoquímica y el western blot (factores: tratamiento y ambiente). Se realizó una prueba *post hoc* de Tukey para determinar diferencias significativas con una  $p \leq 0.05$ . Los estadísticos descriptivos se muestran como la media  $\pm$  error estándar (SEM).

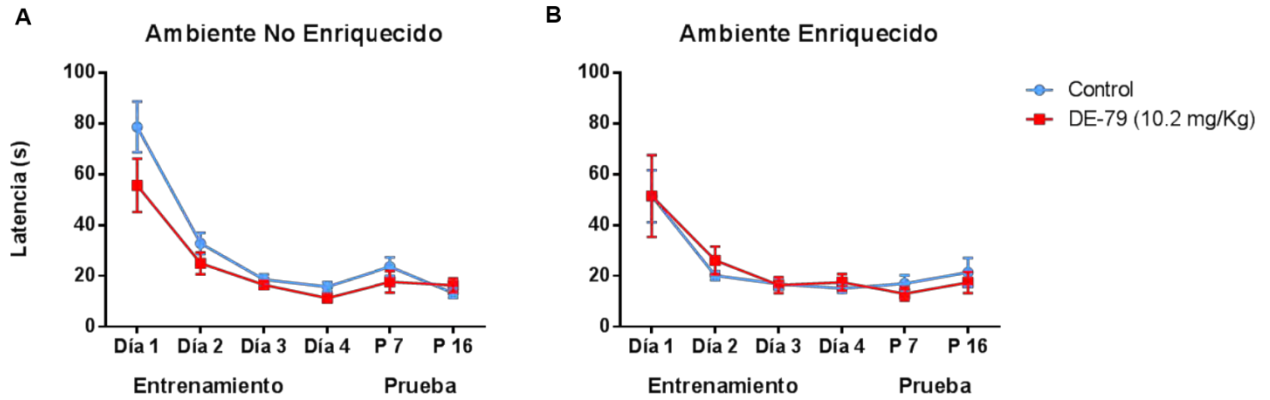
## 8. Resultados

### 8.1 La exposición perinatal al DE-79 no afecta la memoria espacial. Los ambientes enriquecidos mejoran la ejecución de las ratas control

Después de la exposición perinatal a la mezcla DE-79 (10.2 mg/kg/día) y de la crianza de las ratas en ambientes enriquecidos o en condiciones estándar de laboratorio, lo primero que se evaluó fue si la exposición perinatal a la mezcla DE-79 afectó la memoria espacial de las ratas y si los ambientes enriquecidos tuvieron algún efecto sobre ésta. Las variables que se cuantificaron durante el entrenamiento y la evaluación de la memoria a corto y largo plazo fueron: la latencia para encontrar la caja de escape, los errores en la memoria de referencia y los errores en la memoria de trabajo.

#### ➤ Latencia para encontrar la caja de escape

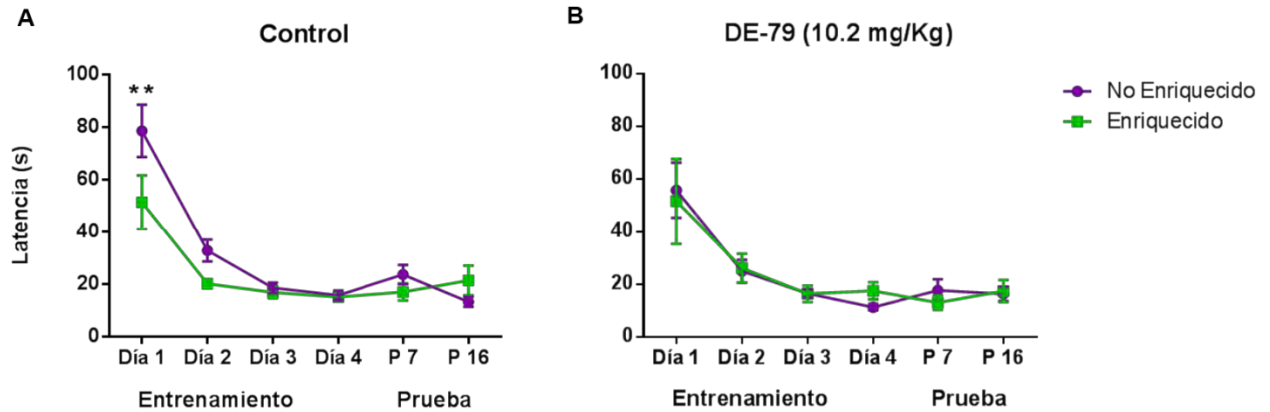
En la latencia para encontrar la caja de escape en el laberinto de Barnes se encontró un efecto estadísticamente significativo del factor días de entrenamiento, sobre la latencia ( $F= 35.279$ ,  $gl= 5$ ,  $p= 0.000$ ); es decir, las ratas de todos los grupos disminuyeron el tiempo que les tomó escapar conforme el entrenamiento avanzó. Las curvas de aprendizaje (diminución de la latencia con el entrenamiento) se pueden observar independientemente del tratamiento perinatal con la mezcla DE-79 (**Fig. 7**).



**Figura 7. Efecto de la exposición perinatal al DE-79 sobre la latencia para encontrar la caja de escape en el laberinto de Barnes.** El DE-79 no afectó la habilidad de las ratas para encontrar la caja de escape. Todas las ratas disminuyeron el tiempo que les tomó escapar de la superficie abierta del laberinto. Se muestran las latencias (s) en los días de entrenamiento (Día 1-4) y en las pruebas de memoria a corto y largo plazo (P7 y P16) de los grupos experimentales divididos por ambiente (A. No Enriquecido; B. Enriquecido). Las barras de error representan SEM; n= 15 por grupo.

El análisis estadístico también reveló diferencias estadísticamente significativas por efecto del factor ambiente enriquecido en las ratas control ( $F= 5.578$ ,  $g/1$ ,  $p= 0.01$ ). El grupo control en ambiente enriquecido fue más rápido el primer día de entrenamiento que el grupo control alojado en ambiente no enriquecido ( $51.45 \pm 10.25$  s vs  $78.68 \pm 10.01$  s;  $p \leq 0.01$ ) (**Fig. 8A**). Por otro lado, en los grupos expuestos perinatalmente al DE-79, se observaron las mismas latencias durante el entrenamiento y las pruebas de memoria a corto y largo plazo, independientemente del ambiente en el que se habían criado (ambiente enriquecido o ambiente estándar (**Fig. 8B**)).



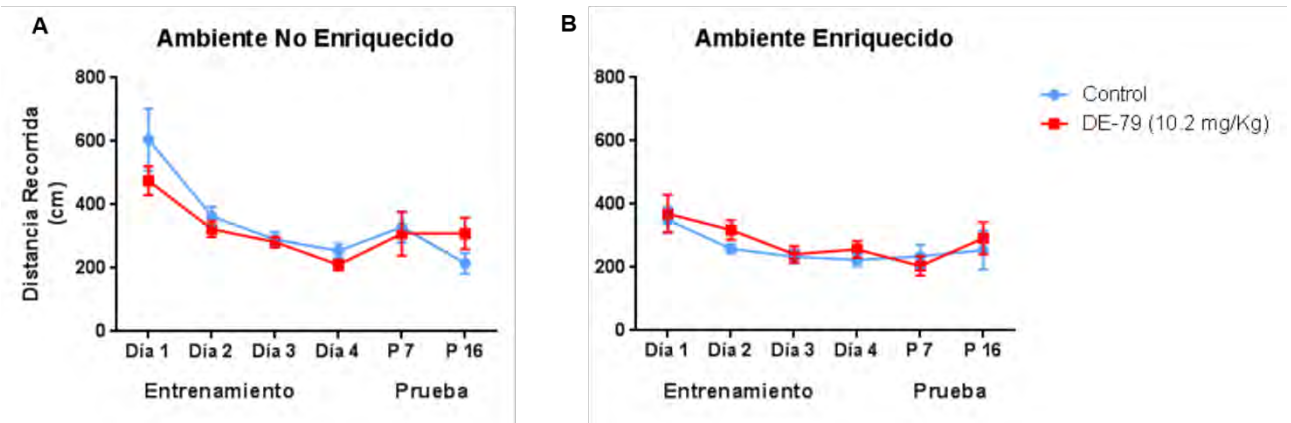


**Figura 8. Efecto de los ambientes enriquecidos sobre la latencia para encontrar la caja de escape en el laberinto de Barnes.** Los ambientes enriquecidos mejoraron la habilidad de las ratas control para encontrar la caja de escape desde el primer día de entrenamiento. Sin embargo, no se pudo observar un efecto sobre las ratas que fueron expuestas perinatalmente al DE-79. Se muestran los valores de las latencias (Entrenamiento, Día 1-4; y pruebas de memoria a corto y largo plazo; P7 y P16) de los grupos experimentales divididos por tratamiento (**A.** Control; **B.** Tratado). Las barras de error representan SEM. n= 15 por grupo; \*\* p ≤0.01

### ➤ Distancia recorrida

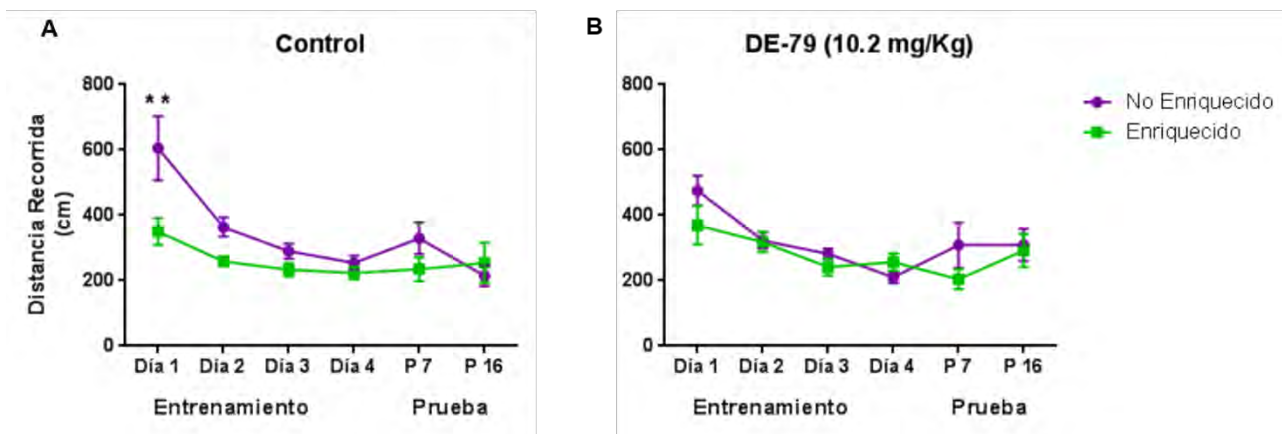
Además del tiempo que tomó a las ratas encontrar la caja de escape, también se cuantificó la distancia que recorrieron en el laberinto de Barnes. Según los resultados, las ratas que se expusieron perinatalmente a la mezcla DE-79 recorrieron una distancia o una trayectoria similar a la que las ratas control recorrieron para encontrar la caja de escape.

En este análisis, todas las ratas que se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, sin importar su tratamiento, recorrieron menos distancia por efecto de los días de entrenamiento ( $F= 13.710$ ,  $g/= 5$ ,  $p= 0.000$ ) (**Fig. 9A**). Mientras que todas las ratas que se criaron en ambientes enriquecidos recorrieron distancias similares todos los días de entrenamiento y en las pruebas de memoria a corto y a largo plazo (**Fig. 9B**).



**Figura 9. Efecto de la exposición perinatal al DE-79 sobre la distancia recorrida para encontrar la caja de escape en el laberinto de Barnes.** Las ratas de todos los grupos experimentales disminuyeron la distancia que recorrieron conforme avanzó el entrenamiento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas por efecto de la mezcla DE-79. Se muestra la distancia recorrida en los días de entrenamiento (Día 1-4) y en las pruebas de memoria a corto y largo plazo (P7 y P16) de los grupos experimentales divididos por ambiente (**A.** No Enriquecido; **B.** Enriquecido). Las barras de error representan SEM; n= 15 por grupo.

Por otra parte, el análisis estadístico demostró que los ambientes enriquecidos tienen un efecto benéfico sobre las ratas control ( $F= 11.11$ ,  $g/ = 1$ ,  $p= 0.001$ ). Las ratas que se criaron en los ambientes enriquecidos recorrieron menor distancia en el laberinto de Barnes en comparación con el grupo control en condiciones estándar de laboratorio. Particularmente, en el día 1 se observan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos controles ( $350.38 \pm 41.14$  cm vs  $605.37 \pm 98.53$  cm;  $p \leq 0.001$ ) (**Fig. 10A**). Respecto a las ratas tratadas con el DE-79, tanto el grupo en condiciones estándar de laboratorio, como el grupo alojado en ambientes enriquecidos, recorrieron distancias similares (**Fig. 10B**).

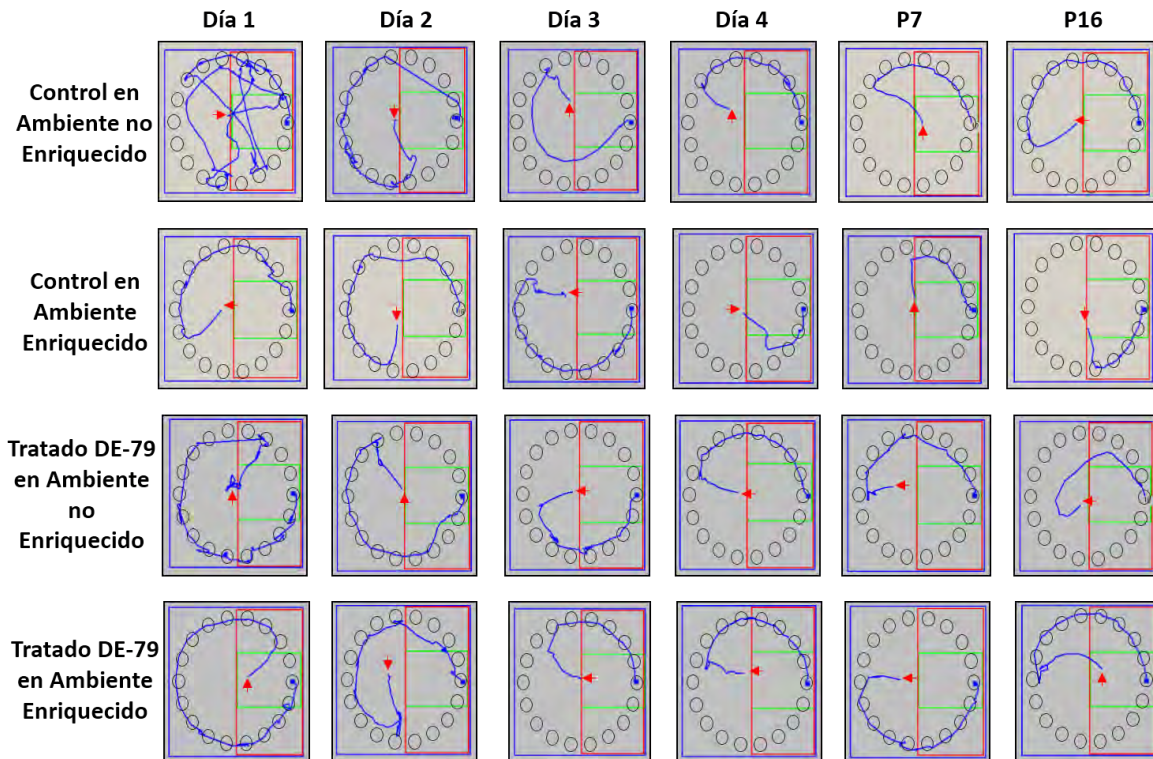


**Figura 10. Efecto de los ambientes enriquecidos sobre la distancia recorrida para encontrar la caja de escape en el laberinto de Barnes.** Los ambientes enriquecidos tuvieron un efecto benéfico sobre el grupo control en ambientes enriquecidos, pues recorrió menor distancia en comparación con el grupo control en ambientes no enriquecidos. El grupo tratado en ambientes enriquecidos no mostró ninguna diferencia respecto a su par en ambientes no enriquecidos. Se muestra la distancia recorrida (Entrenamiento, Día 1-4; y pruebas de memoria a corto y a largo plazo; P7 y P16) de los grupos experimentales divididos por tratamiento (**A. Control**; **B. Tratado**). Las barras de error representan SEM. n= 15 por grupo; \*\* p ≤0.01

Adicionalmente, con el objetivo de determinar si existían diferencias en la estrategia de búsqueda que las ratas utilizaron para encontrar la caja de escape en el laberinto de Barnes, se realizó el análisis cualitativo de las trayectorias recorridas por las ratas de los diferentes grupos experimentales (**Fig. 11**). De acuerdo a los diagramas obtenidos, se pueden observar diferencias entre la ejecución del grupo control en ambientes no enriquecidos durante el día 1 de entrenamiento y los otros grupos. Las ratas control alojadas en condiciones estándar, tuvieron una búsqueda menos asertiva y más aleatoria, en comparación con los otros tres grupos. Sin embargo, conforme el entrenamiento avanzó su estrategia de búsqueda mejoró y se mantuvo en las pruebas de memoria a corto y a largo plazo.

Respecto a los otros tres grupos (control en ambiente enriquecido, y los tratados en ambiente enriquecido y no enriquecido) la estrategia de búsqueda fue similar a

lo largo del entrenamiento y en las pruebas de memoria a corto y a largo plazo. Su estrategia de búsqueda se caracterizó por ser ordenada, visitando cada hoyo o algunos hoyos del laberinto en una sola dirección, hasta encontrar el hoyo que conducía a la caja de escape (**Fig. 11**).

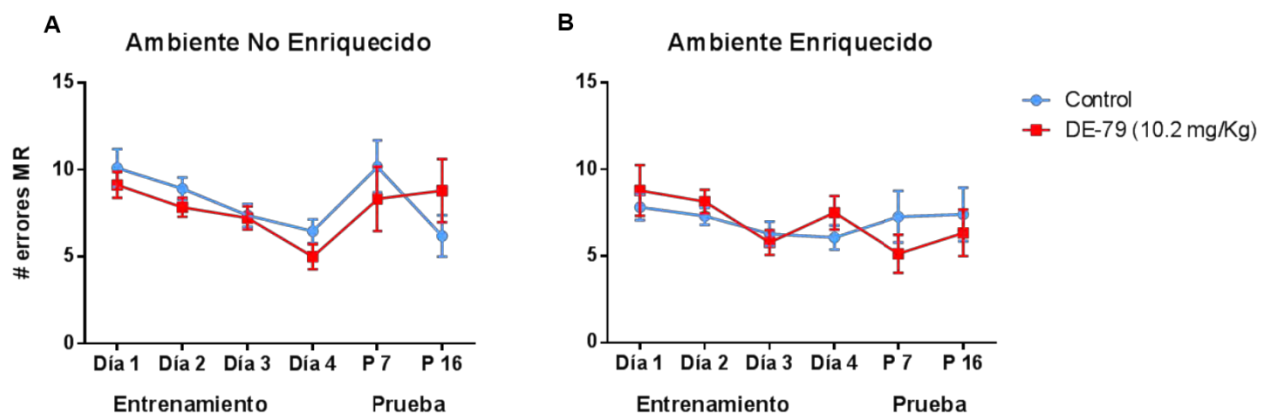


**Figura 11. Trayectorias recorridas por las ratas en el laberinto de Barnes.** Representación gráfica de las trayectorias que las ratas de todos los grupos experimentales recorrieron durante el entrenamiento (Día 1-4) y las pruebas de memoria a corto y largo plazo (P7 y P16). En el día 1, se puede observar que el grupo control en ambientes no enriquecidos muestra una trayectoria menos organizada que los otros grupos experimentales. Sin embargo, la estrategia de búsqueda de este grupo se asemeja a la de los demás conforme sigue el entrenamiento. Las ratas tratadas perinatalmente con la mezcla DE-79 muestran desde el principio una trayectoria similar a las del grupo control en ambientes enriquecidos. ➔ Inicio de la trayectoria.

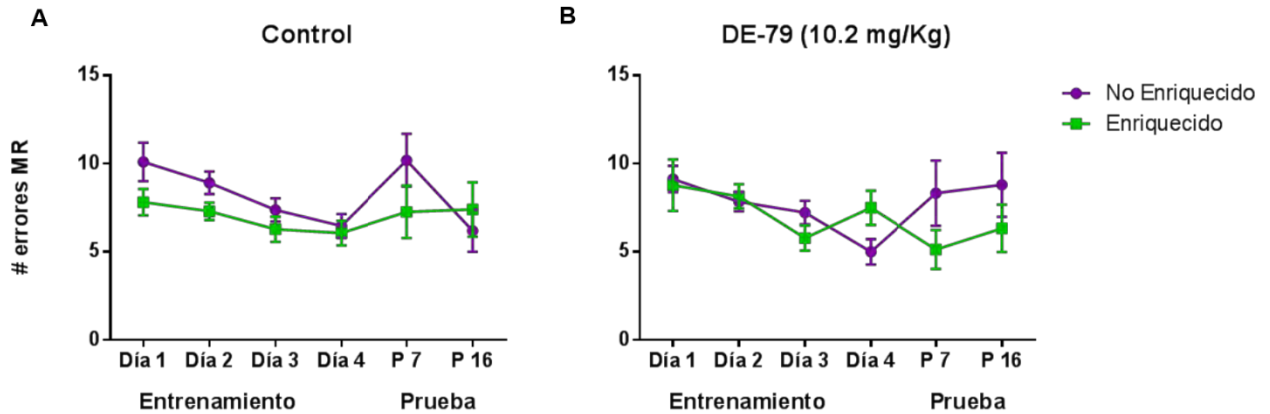
### ➤ Errores en la memoria de referencia

En cuanto a los errores en la memoria de referencia se observó que hubo un efecto estadísticamente significativo del factor días de entrenamiento sobre el

número de errores cometidos por las ratas de todos los grupos experimentales ( $F=3.283$ ,  $g=5$ ,  $p=0.007$ ). Es decir, todas las ratas, sin importar su condición experimental, disminuyeron el número de errores de referencia cometidos al buscar la caja de escape. Además, se observó que las ratas cometieron un número de errores similar en cada día de entrenamiento y en las pruebas de memoria a corto y a largo plazo, independientemente de la exposición perinatal al DE-79 (**Fig. 12**) y de la crianza en los ambientes enriquecidos (**Fig. 13**).



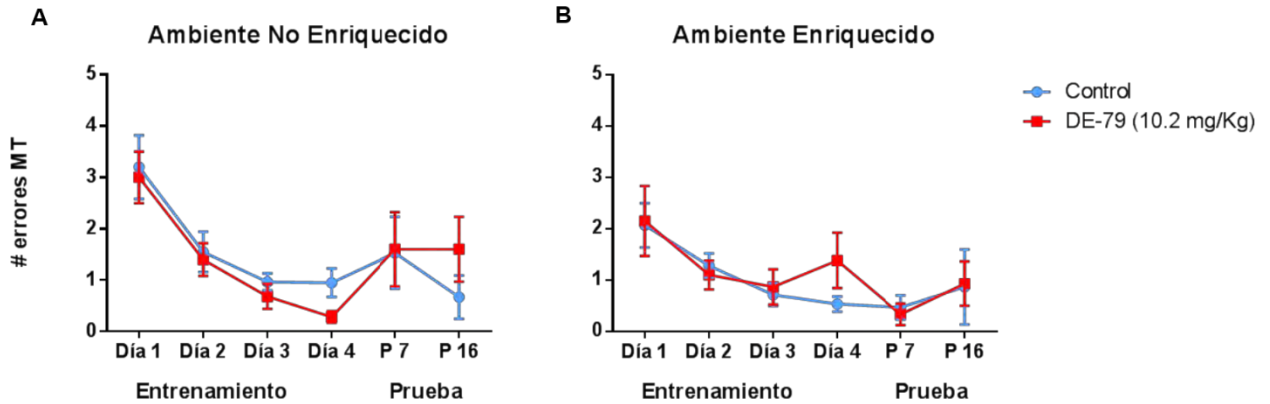
**Figura 12. Efecto de la exposición perinatal al DE-79 sobre el número de errores en la memoria de referencia.** El DE-79 no afectó el número de errores cometidos por las ratas en el laberinto de Barnes. Todas las ratas fueron más asertivas al paso de los días de entrenamiento. Se muestra el número de errores de referencia cometidos por las ratas en los días de entrenamiento (Día 1-4) y en las pruebas de memoria a corto y largo plazo (P7 y P16) de los grupos experimentales divididos por ambiente (**A.** No Enriquecido; **B.** Enriquecido). Las barras de error representan SEM;  $n=15$  por grupo.



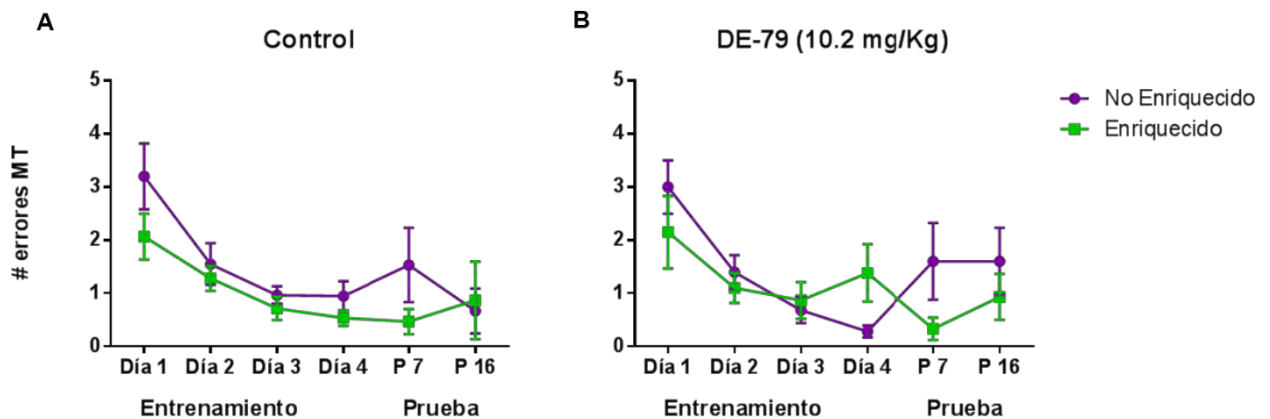
**Figura 13. Efecto de los ambientes enriquecidos sobre el número de errores en la memoria de referencia.** Los ambientes enriquecidos no tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el número de errores cometidos por las ratas control (A) o tratadas (B). Se muestra el número de errores en la memoria de referencia de los grupos experimentales en los días de entrenamiento (Día 1-4) y las pruebas de memoria a corto y largo plazo (P7 y P16). Las barras de error representan SEM; n= 15 por grupo.

#### ➤ Errores en la memoria de trabajo

Igual que con las otras variables (latencia, distancia recorrida y errores en la memoria de referencia), en los errores en la memoria de trabajo se observó un efecto positivo del factor días de entrenamiento sobre el número de errores que las ratas cometieron ( $F= 9.643$ ,  $g/= 5$ ,  $p= 0.000$ ). Además, como con los errores en la memoria de referencia, las ratas cometieron un número de errores similar en cada día de entrenamiento y en las pruebas de memoria a corto y a largo plazo, independientemente de la exposición perinatal al DE-79 (Fig. 14) y de la crianza en los ambientes enriquecidos (Fig. 15).



**Figura 14. Efecto de la exposición perinatal al DE-79 sobre el número de errores en la memoria de trabajo.** El DE-79 no afectó el número de errores cometidos por las ratas en el laberinto de Barnes. Todas las ratas fueron más asertivas al paso de los días de entrenamiento. Se muestra el número de errores en la memoria de trabajo cometidos por las ratas en los días de entrenamiento (Día 1-4) y en las pruebas de memoria a corto y largo plazo (P7 y P16) de los grupos experimentales divididos por ambiente (A. No Enriquecido; B. Enriquecido). Las barras de error representan SEM; n= 15 por grupo.



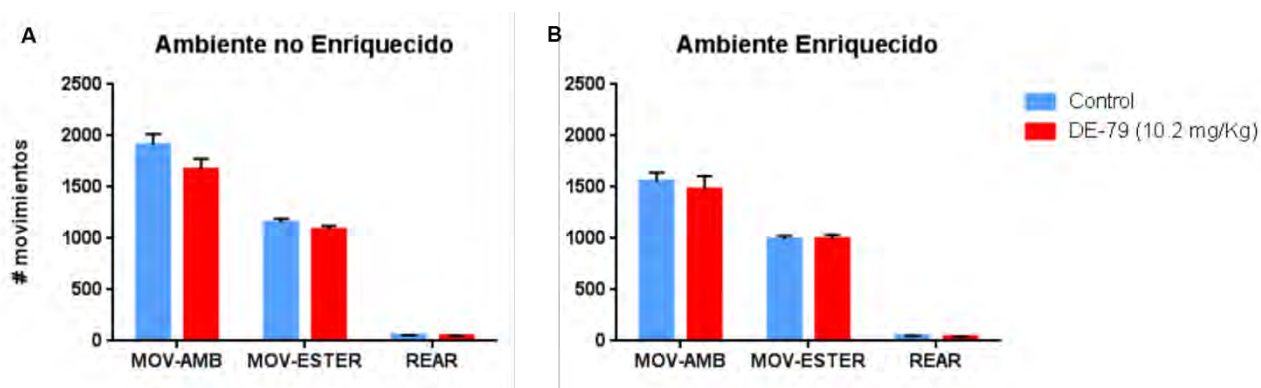
**Figura 15. Efecto de los ambientes enriquecidos sobre el número de errores en la memoria de trabajo.** Los ambientes enriquecidos no tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el número de errores cometidos por las ratas control (A) o tratadas con el DE-79 (B). Se muestra el número de errores en la memoria de trabajo cometidos por las ratas en los días de entrenamiento (Día 1-4) y en las pruebas de memoria a corto y largo plazo (P7 y P16). Las barras de error representan SEM; n= 15 por grupo.

En todas las variables que se midieron, se encontró que los animales mejoraron su ejecución en el laberinto de Barnes conforme avanzó el entrenamiento, independientemente de su condición experimental. En conjunto, estos resultados

sugieren que la exposición perinatal a la mezcla DE-79 con una dosis de 10.2 mg/kg/día no afecta negativamente el aprendizaje y la memoria espacial de las ratas en el laberinto de Barnes. Además, a diferencia de lo que ocurre con las ratas control, en las ratas expuestas al DE-79 no es posible observar un efecto positivo de los ambientes enriquecidos sobre su ejecución en el laberinto de Barnes.

### 8.1.1 La exposición perinatal al DE-79 no afecta la motricidad de las ratas

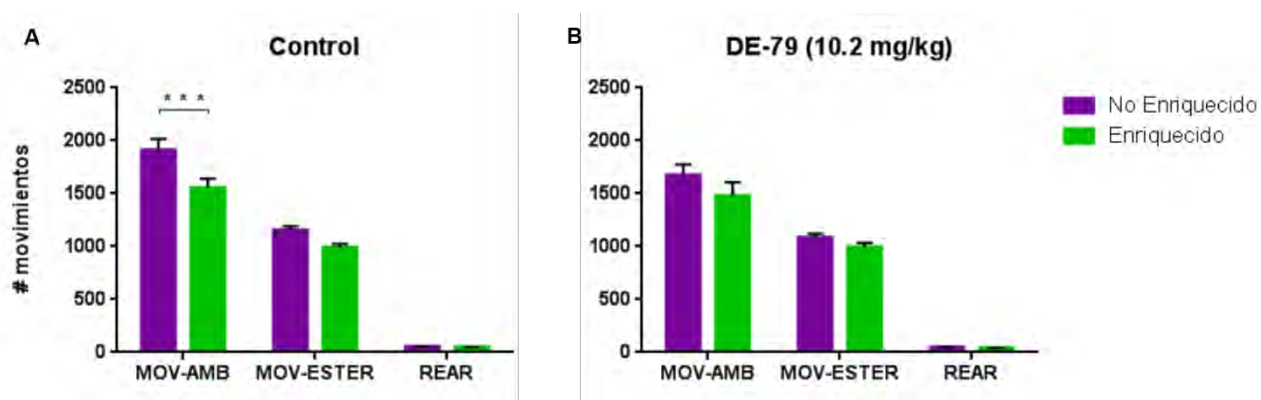
Según los resultados obtenidos en la prueba de motricidad, las ratas expuestas al DE-79 mostraron valores similares a las ratas control en los tres tipos de actividad que se registró: movimientos ambulatorios, movimientos estereotipados y *rearing* (Fig. 16).



**Figura 16. Efecto de la exposición perinatal al DE-79 sobre la motricidad.** Número de movimientos que las ratas realizaron en un lapso de 5 min. La exposición perinatal al DE-79 no afectó la motricidad de las ratas, realizaron el mismo número de movimientos que las ratas control. Se muestran los grupos experimentales divididos por ambiente (A. No Enriquecido; B. Enriquecido). Abreviaturas: MOV-AMB, movimientos ambulatorios; MOV-ESTER, movimientos estereotipados; REAR, rearing. Las barras de error representan SEM; n= 15 por grupo.



Por otra parte, se observó que el número de movimientos ambulatorios en las ratas control disminuyó por efecto de los ambientes enriquecidos en comparación con las ratas control en ambientes no enriquecidos ( $1554.87 \pm 84.73$  vs  $1910.73 \pm 107.3$ ;  $p \leq 0.001$ ) (**Fig. 17A**). Mientras que las ratas tratadas, alojadas en ambiente estándar o en ambiente enriquecido, mostraron valores semejantes. El ambiente enriquecido no generó cambios estadísticamente significativos en ninguno de los tres movimientos que se registraron (**Fig. 17B**).



**Figura 17. Efecto de los ambientes enriquecidos sobre la motricidad.** Número de movimientos que las ratas realizaron en un lapso de 5 min. El número de movimientos ambulatorios que realizaron las ratas control en ambientes enriquecidos fue menor que el de las ratas control en ambientes no enriquecidos. Los ambientes enriquecidos no tuvieron ningún efecto sobre la motricidad de las ratas tratadas. Se muestran los grupos experimentales divididos por tratamiento (**A. Control**; **B. Tratado**). Las barras de error representan SEM.  $n = 15$  por grupo; \*\*\*  $p \leq 0.001$

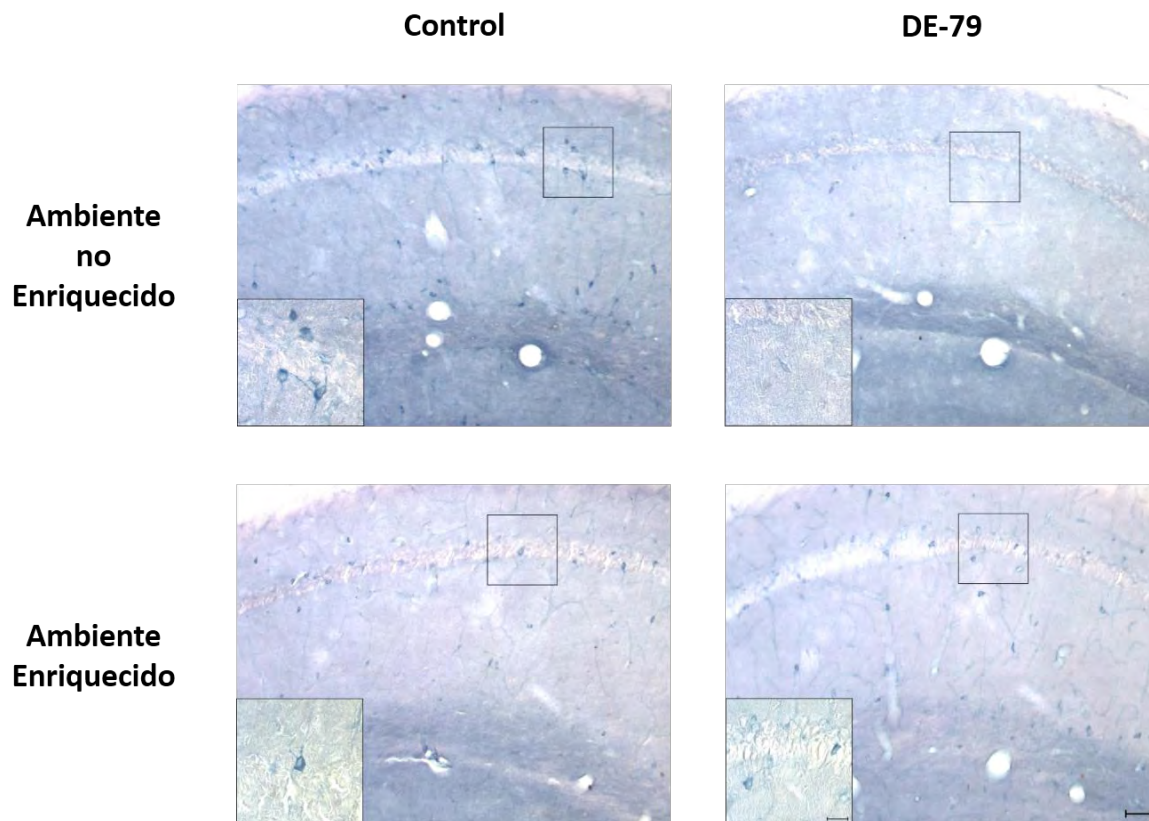
Estos resultados nos sugieren que la exposición perinatal al DE-79 no afectó la motricidad de las ratas. Por lo tanto, todos los resultados que se obtuvieron en el laberinto de Barnes, sí son dependientes del aprendizaje y la memoria espacial de las ratas tratadas con este tóxico.

## 8.2 Actividad de la NOS en el hipocampo

En este trabajo, se cuantificó la densidad óptica integrada (DOI) de la histoquímica enzimática en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo de cada grupo experimental. A mayor densidad óptica obtenida, mayor actividad de la NOS.

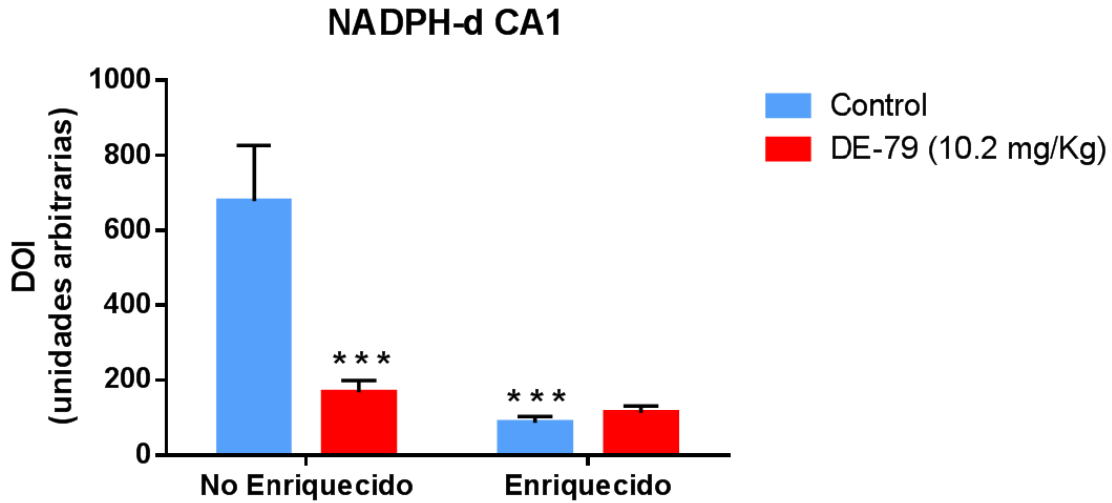
### 8.2.1 La exposición perinatal a la mezcla DE-79 afecta la producción del óxido nítrico en el área CA1 hipocampal

En el área CA1 del hipocampo se observaron cambios en la intensidad de la tinción por la actividad enzimática de la NOS/NADPH-d en los diferentes grupos experimentales (Fig. 18).



**Figura 18. Actividad de la NOS en el área CA1 hipocampal.** Se muestran fotomicrografías representativas de los diferentes grupos experimentales con la técnica de la histoquímica enzimática para la NOS/NADPH-d en el área CA1 (Barra de escala= 50  $\mu$ m). Los recuadros se magnificaron para una mejor observación de la tinción (Barra de escala= 20  $\mu$ m). El grupo control en ambiente no enriquecido muestra mayor actividad de la NOS que los otros tres grupos experimentales.

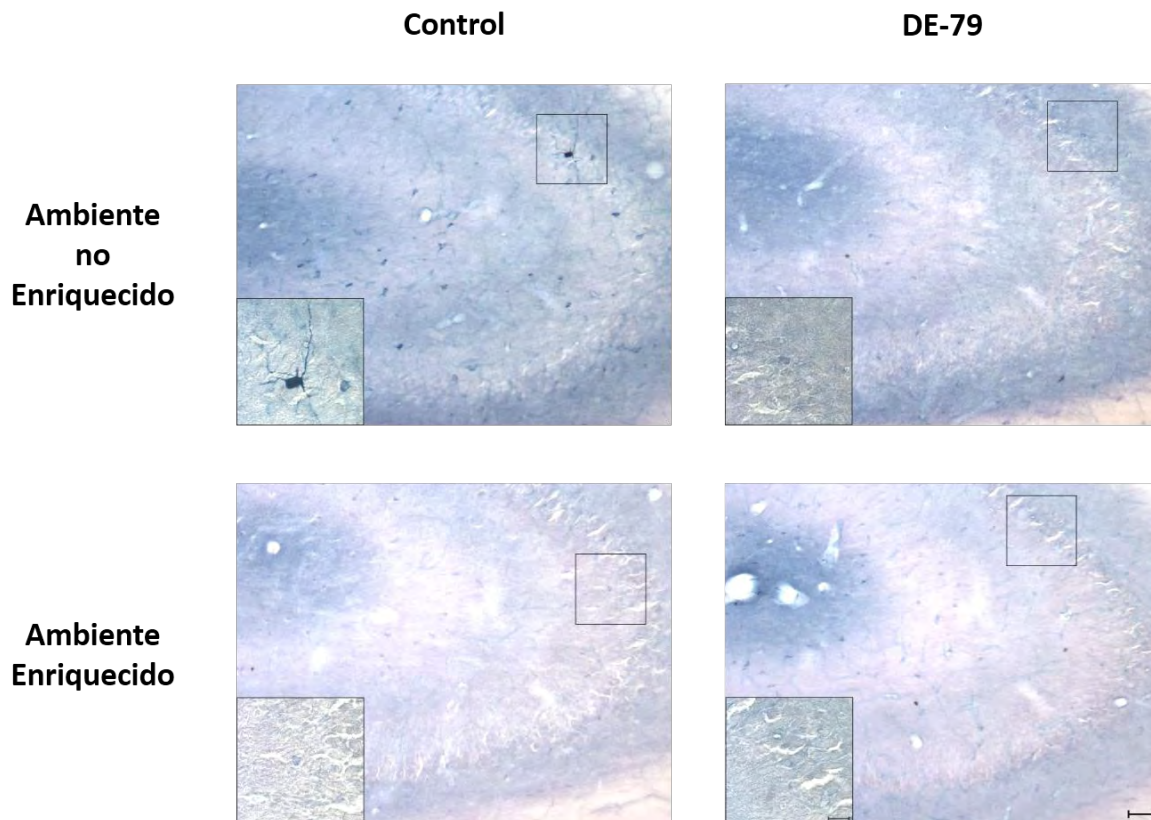
El análisis cuantitativo de la densidad óptica integrada en esta área del hipocampo, reveló diferencias estadísticamente significativas en la actividad de la NOS por efecto de la exposición perinatal al DE-79 ( $F= 9.982$ ,  $g/= 1$ ,  $p= 0.002$ ) (**Fig. 19**). El grupo de ratas expuestas perinatalmente a la mezcla DE-79 mostró una disminución significativa de la actividad de las NOS en comparación con las ratas control en ambiente no enriquecido ( $166.76\pm 31.63$  vs  $678.78\pm 148.36$ ;  $p\leq 0.001$ ). Además, la crianza de las ratas en ambiente enriquecido produce un efecto diferencial entre el grupo de las ratas control y el que fue expuesto al DE-79 ( $F= 17.656$ ,  $g/= 1$ ,  $p=0.000$ ). Las ratas control que habitaron los ambientes enriquecidos presentaron una disminución estadísticamente significativa de la actividad la NOS en comparación con las ratas control en ambiente no enriquecido ( $86.66\pm 16.63$  vs  $678.78\pm 148.36$ ;  $p\leq 0.001$ ), mientras que en el grupo expuesto al DE-79 no se observaron cambios en la actividad de la NOS por efecto del ambiente enriquecido. Lo que sugiere que el efecto de los ambientes enriquecidos sobre la actividad de la NOS, cambia por la exposición perinatal a la mezcla DE-79.



**Figura 19. Actividad de la NOS en el área CA1 hipocampal.** Se muestran los cambios en la densidad óptica integrada (unidades arbitrarias) de los grupos experimentales. Existe una disminución estadísticamente significativa en la actividad de la NOS causada por la exposición perinatal al DE-79. Además, en el grupo control, la actividad de la NOS disminuye por efecto de los ambientes enriquecidos, mientras que en el grupo tratado no se observan cambios. Las barras de error representan SEM. n= 72 cortes por grupo; \*\*\*  $p \leq 0.001$

### 8.2.2 La exposición perinatal a la mezcla DE-79 no afecta la actividad de la NOS en el área CA3 hipocampal

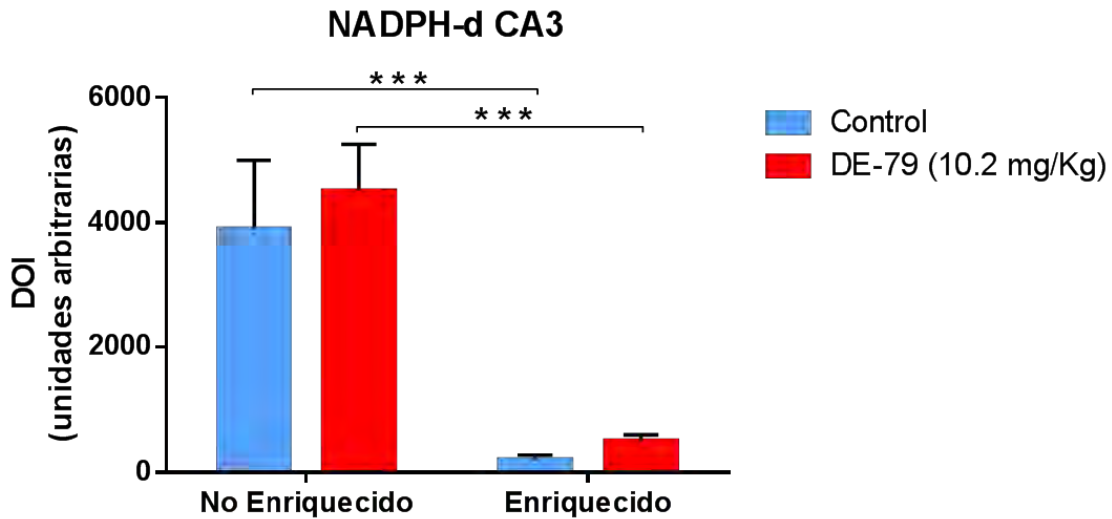
En cuanto al área CA3 del hipocampo, también se observaron cambios en la intensidad de la tinción que los diferentes grupos experimentales presentaron (**Fig. 20**).



**Figura 20. Actividad de la NOS en el área CA3 hipocampal.** Se muestran fotomicrografías representativas de los diferentes grupos experimentales con la técnica de la histoquímica enzimática para la NOS/NADPH-d en el área CA3 (Barra de escala= 50  $\mu$ m). Los recuadros se magnificaron para una mejor observación de la tinción (Barra de escala= 20  $\mu$ m). Los grupos en ambiente no enriquecido muestran mayor actividad de la NOS que los que se mantuvieron en ambiente enriquecido. Barra de escala= 25  $\mu$ m.

Con el análisis cuantitativo de la densidad óptica integrada de la tinción, se observó que la actividad de la NOS en el grupo tratado y criado en ambientes no enriquecidos es similar a la que se encontró en el grupo control alojado en ambientes no enriquecidos (**Fig. 21**). Además se observó que el efecto de los ambientes enriquecidos fue el mismo en ambos grupos. Es decir, tanto en el grupo control ( $194.03 \pm 76.50$  vs  $3897.94 \pm 1098.3$ ;  $p \leq 0.001$ ), como en el grupo tratado perinatalmente con la mezcla DE-79 ( $495.14 \pm 101.8$  vs  $4501.73 \pm 751.24$ ;  $p \leq 0.001$ ), se observó que la actividad de la NOS disminuyó significativamente por

efecto de los ambientes enriquecidos ( $F= 33.27$ ,  $gl= 1$ ,  $p= 0.0001$ ), en comparación con su par en ambientes no enriquecidos (**Fig. 21**).



**Figura 21. Actividad de la NOS en el área CA3 hipocampal.** Se muestran los cambios en la densidad óptica integrada (unidades arbitrarias) de los grupos experimentales. Existe una disminución estadísticamente significativa en la actividad de la NOS causada por los ambientes enriquecidos, tanto en las ratas control como en las ratas tratadas. Las barras de error representan SEM;  $n= 72$  cortes por grupo; \*\*\*  $p \leq 0.001$

Estos resultados sugieren que la exposición perinatal a la mezcla DE-79 repercute en la actividad de la NOS y en el efecto que los ambientes enriquecidos tienen sobre la actividad de esta enzima en el área CA1 del hipocampo.

### 8.3 Expresión de las proteínas sinápticas sinaptofisina y PSD-95 en el hipocampo

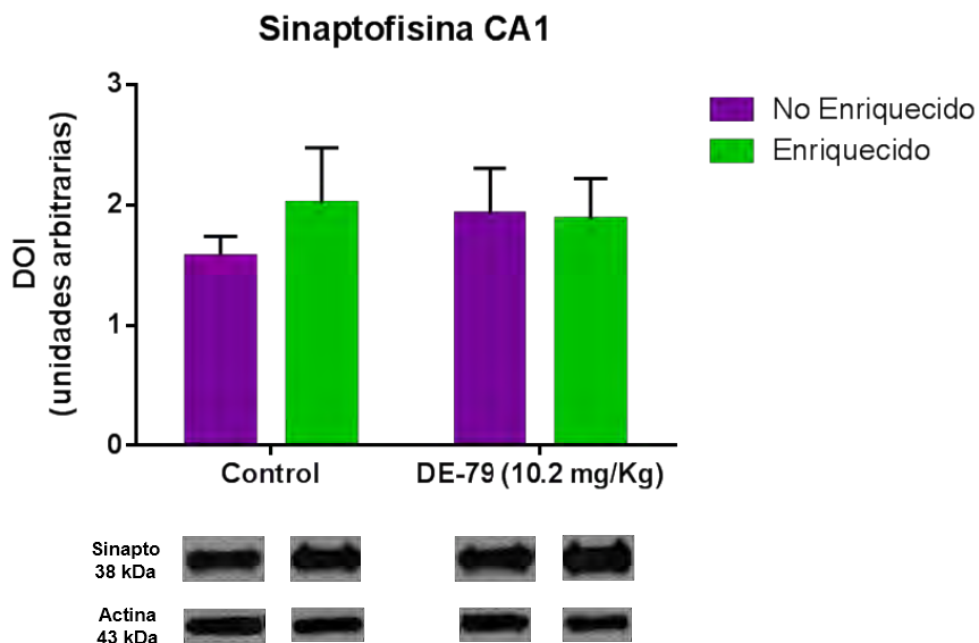
En este trabajo se analizó si los cambios causados en la producción del óxido nítrico por efecto de la exposición perinatal al DE-79 y la crianza en los ambientes enriquecidos, estaban relacionados con cambios en la expresión de la proteína

presináptica sinaptofisina y la proteína postsináptica PSD-95. Con ese objetivo, se realizó un western blot que permitió la detección de las proteínas a través de bandas inmunoreactivas que fueron analizadas con densitometría. Cambios significativos en la expresión de estas proteínas, podrían indicarnos indirectamente cambios en las sinapsis presentes en el hipocampo.

### **8.3.1 La exposición perinatal al DE-79 no cambia la expresión de las proteínas sinápticas de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo.**

#### **➤ Expresión de sinaptofisina en CA1 y CA3**

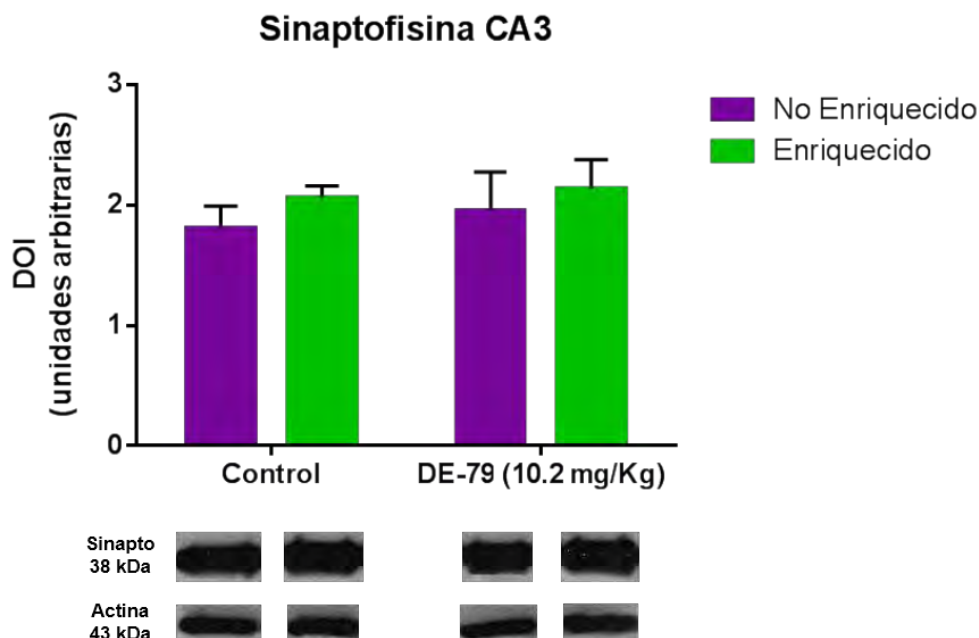
La sinaptofisina es una proteína de la presinapsis involucrada en el establecimiento de sinapsis y procesos de plasticidad neuronal (Kozorovitskiy et al., 2005; Viberg, 2009). De acuerdo con los resultados obtenidos, los niveles de esta proteína en el área CA1 de las ratas expuestas perinatalmente al DE-79 son similares a los que se encontraron en la misma área de las ratas control (**FIG. 22**). Además, en esta misma zona, la observación de las bandas del western blot indica un incremento de la sinaptofisina en el grupo control criado en los ambientes enriquecidos en comparación con el grupo control en condiciones estándar de laboratorio. Sin embargo, este incremento en la expresión de la sinaptofisina no es estadísticamente significativo. De forma contraria, el grupo tratado que fue criado en ambientes enriquecidos mostró los mismos niveles de proteína que su par en ambiente no enriquecido.



**Figura 22. Niveles de sinaptofisina en el área CA1 hipocampal.** Se muestran los cambios en la densidad óptica integrada (unidades arbitrarias) de los niveles de sinaptofisina normalizados con los valores obtenidos para la actina en cada caso. En las ratas control, el ambiente enriquecido induce un incremento de la proteína en el área CA1, aunque no es estadísticamente significativo. El DE-79 no afecta la expresión de la sinaptofisina, y en este grupo el ambiente enriquecido no induce cambios en la expresión de la proteína. Las barras de error representan SEM; n= 5 por grupo

Por otra parte, en el área CA3 del hipocampo los niveles de sinaptofisina que se observaron en el grupo control y en el grupo tratado en ambientes no enriquecidos fueron parecidos. Además, se observó que los niveles de la sinaptofisina muestran una tendencia a incrementar en los grupos expuestos a los ambientes enriquecidos (control y DE-79 (10.2 mg/kg)) (**Fig. 23**).

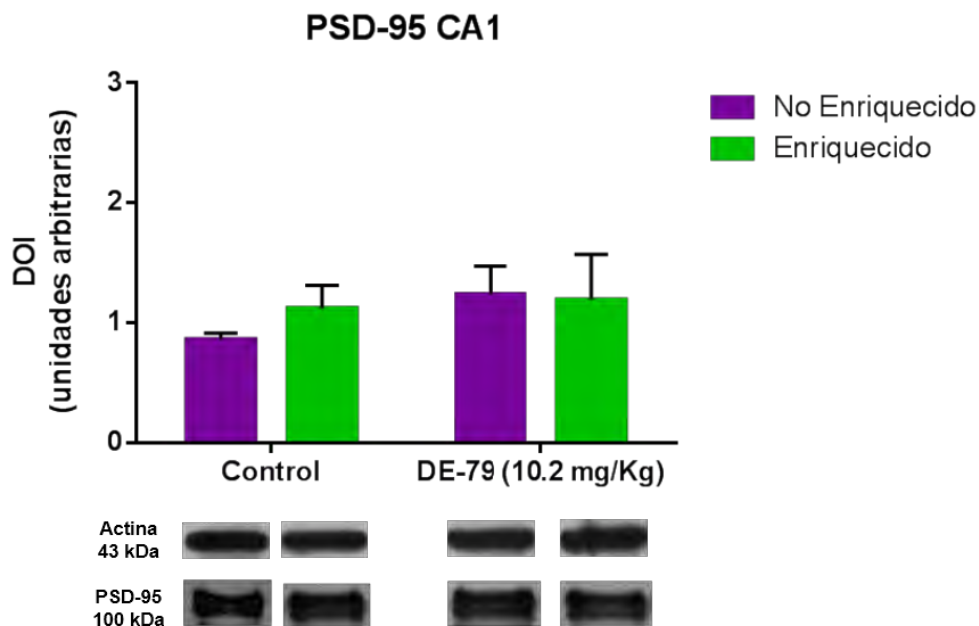




**Figura 23. Niveles de sinaptofisina en el área CA3 hipocampal.** Se muestran los cambios en la densidad óptica integrada (unidades arbitrarias) de los niveles de sinaptofisina normalizados con los valores obtenidos para la actina en cada caso. En el área CA3, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de la proteína por efecto del DE-79. Se observó que la expresión de sinaptofisina, en los grupos en ambientes enriquecidos, incrementó. Sin embargo, este cambio no fue estadísticamente significativo. Las barras de error representan SEM; n= 5 por grupo.

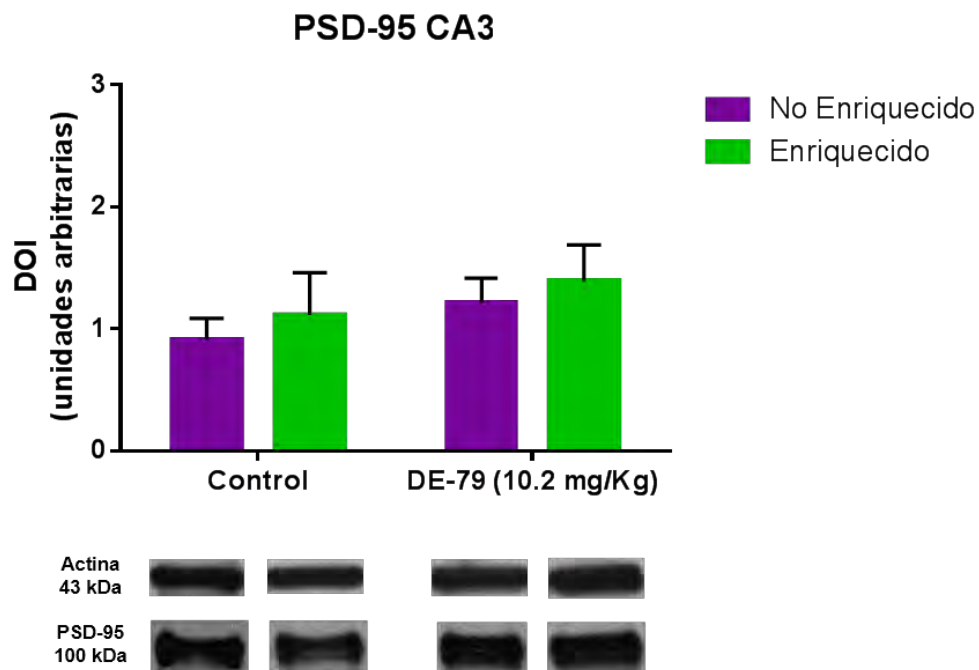
### ➤ Expresión de PSD-95 en CA1 y CA3

La PSD-95 es una proteína de andamiaje ubicada en la postsinapsis que se involucra en el establecimiento de sinapsis durante el desarrollo, y en la plasticidad estructural de las neuronas en la etapa adulta (Nikonenko et al., 2008). En el área CA1 del hipocampo, se observó que en las ratas control los niveles de la PSD-95 incrementaron por efecto de los ambientes enriquecidos. Sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo (**Fig. 24**). En el caso de las ratas tratadas perinatalmente con el DE-79, se observaron los mismos niveles de proteína, independientemente del ambiente en el que se criaron (**Fig. 24**).



**Figura 24. Niveles de PSD-95 en el área CA1 hipocampal.** Se muestran los cambios en la densidad óptica integrada (unidades arbitrarias) de los niveles de PSD-95 normalizados con los valores obtenidos para la actina en cada caso. En el área CA3, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas por efecto de la exposición perinatal al DE-79, ni por los ambientes enriquecidos. Sin embargo, el único grupo que muestra un incremento en la PSD-95 por efecto de los ambientes enriquecidos es el grupo control. Las barras de error representan SEM. n= 5 por grupo

Finalmente, en el área CA3 hipocampal, la exposición perinatal al DE-79 no causó cambios en los niveles de la PSD-95 (**Fig. 25**). Además, se observó que en los grupos criados en ambientes enriquecidos hubo un incremento de esta proteína, aunque el cambio no fue estadísticamente significativo (**Fig. 25**).



**Figura 25. Niveles de PSD-95 en el área CA3 hipocampal.** Se muestran los cambios en la densidad óptica integrada (unidades arbitrarias) de los niveles de PSD-95 normalizados con los valores obtenidos para la actina en cada caso. En el área CA3 no se detectaron cambios causados por la exposición perinatal al DE-79. En los grupos expuestos a los ambientes enriquecidos, la PSD-95 incrementa. Sin embargo, los cambios observados no son estadísticamente significativos. Las barras de error representan SEM. n= 5 por grupo

En conjunto estos resultados nos sugieren que en condiciones estándar de laboratorio, la exposición perinatal a la mezcla DE-79 no produce cambios significativos en los niveles de las proteínas sinápticas: sinaptofisina y PSD-95. Sin embargo, en el área CA1 de estas ratas se observó que los niveles de las proteínas sinaptofisina y PSD-95 son similares tanto en condiciones estándar de laboratorio, como en ambientes enriquecidos; lo que sugiere que la exposición perinatal al DE-79 interfiere con los cambios promovidos por los ambientes enriquecidos en esta área hipocampal.

## 9. Discusión

La exposición perinatal a diversos congéneres de los PBDE provoca su acumulación en tejido sanguíneo, tejido adiposo, leche materna y en el cerebro (Koenig et al., 2012; León-Olea et al., 2012). La acumulación de los PBDE en el cerebro tiene como consecuencia la alteración de la morfología neuronal y de diversos procesos de plasticidad sináptica relacionados con el aprendizaje y la memoria (Xing et al., 2009; Zhang et al., 2013).

En este trabajo se probó si la exposición perinatal (durante la gestación y la lactancia) a una de las mezclas comerciales más utilizadas de PBDE, el DE-79, a una dosis de 10.2 mg/kg/día, provocaba deficiencias en el aprendizaje y la memoria espacial de las crías probadas a los 3 meses de edad en el laberinto de Barnes, así como cambios en la actividad de la NOS y los niveles de proteínas sinápticas en CA1 y CA3 del hipocampo. Esta dosis se eligió de acuerdo a datos de nuestro laboratorio que indican que la administración perinatal de 10.2 mg/kg/día afecta el SNC, específicamente el sistema neuroendocrino de las crías (León-Olea et al., 2012; Álvarez-González et al., 2016). Además, 10.2 mg/kg/día de DE-79 equivalen molarmente a una dosis de 6 mg/kg del PCB Aroclor 1254 (Kodavanti et al., 2010), con el que nuestro grupo de investigación también ha encontrado afectaciones sobre el SNC (León-Olea et al., 2012), y que nos permite comparar los efectos dañinos de los PCB y los PBDE que están estructuralmente relacionados.

## 9.1 Laberinto de Barnes

Los resultados muestran que las ratas control estimuladas con los ambientes enriquecidos, fueron más eficientes en la ejecución del laberinto de Barnes comparadas con las ratas control en condiciones estándar. Todas las ratas expuestas al DE-79 mostraron latencias y distancias recorridas similares a las de las ratas control en ambientes enriquecidos. Es decir, independientemente del ambiente en el que se les alojó, la ejecución de las ratas expuestas al tóxico fue tan eficiente como la que mostraron las ratas control estimuladas con los ambientes enriquecidos. Además, se observó que todas las ratas en ambiente enriquecido disminuyeron el tiempo en el que encontraron la caja de escape. La distancia que recorrieron fue similar entre los días de entrenamiento y las pruebas de memoria a corto y a largo plazo, lo que indica que con los ensayos se incrementó la velocidad de búsqueda de las ratas, sin afectar el número de errores que cometieron.

Para descartar que estos resultados se debieran a un incremento en la actividad locomotora de las ratas, se realizó una prueba de motricidad. Se observó, que la exposición perinatal a la mezcla DE-79 no causó cambios en la locomoción de las ratas. Por lo tanto, lo que se encontró con la prueba en el laberinto de Barnes es dependiente del aprendizaje y la memoria espacial de las ratas.

A este respecto, estudios anteriores reportaron que la exposición perinatal crónica (durante la gestación y la lactancia) a los PBDE causa tanto deficiencias como mejorías en la ejecución de los roedores en diferentes tareas conductuales (Llansola et al; 2009; Ta et al., 2011; Koenig et al., 2012). En el laberinto de agua de Morris, se encontró que el BDE-47 (tetraPBDE) afectó la velocidad de nado de

los ratones expuestos; sin embargo, estos ratones recorrieron menor distancia que los ratones control para encontrar la plataforma de escape (Ta et al., 2011). Koenig et al., (2012) demostraron que la exposición perinatal al congénere BDE-47 causó deficiencias en la latencia y la distancia recorrida de los ratones en el laberinto de Barnes, el primer día de la prueba conductual. Adicionalmente, Llansola et al., (2009) reportaron que las ratas expuestas prenatalmente al PBDE-99 (pentaPBDE) fueron mejores en el aprendizaje de una tarea de memoria de trabajo espacial (laberinto en Y) dependiente de cerebelo, en comparación con las ratas que no se expusieron al tóxico. En humanos, también se reportaron discrepancias en los efectos de estos compuestos. La exposición perinatal a los PBDE afecta la motricidad fina y la atención de las personas; asimismo, mejoran la coordinación motora, la percepción visual y el comportamiento (menor agresividad y reactividad emocional) (Roze et al., 2009).

Por otra parte, los estudios que también encontraron deficiencias significativas causadas por la exposición perinatal a los PBDE, realizaron exposiciones agudas a los congéneres, principalmente una sola exposición en el día postnatal diez (Eriksson et al., 2001; Viberg et al., 2003; Gee y Moser, 2008; Zhang et al., 2013) o durante treinta días en ratas adultas (Yan et al., 2012). Además, estos trabajos utilizaron un solo congénere de los PBDE y no una mezcla comercial de ellos como se realizó en este trabajo.

El tratamiento agudo y con un solo congénere de los PBDE, no representa adecuadamente la exposición a la que los humanos se enfrentan en la vida cotidiana. Los congéneres individuales y en mezclas comerciales, tienen diferentes cinéticas y tasas de eliminación que propician una distribución y

acumulación diferenciada de los PBDE en los tejidos, y repercusiones conductuales variadas (Ta et al., 2011; Roze et al., 2009; Suvorov et al., 2009; Gee y Moser, 2008). Lo que sugiere que la exposición crónica y perinatal al DE-79 no causa los mismos efectos que una sola exposición a dosis altas de PBDE en los primeros días postnatales o en etapas tardías del desarrollo. La exposición crónica a los PBDE, desde la gestación hasta el destete, podría desencadenar mecanismos de compensación o de sobreactivación del SNC que aminoraran los efectos causados por estos contaminantes ambientales, provocando que las ratas tengan una ejecución eficiente en una prueba de aprendizaje y memoria espacial como el laberinto de Barnes.

Finalmente, este trabajo también tuvo como objetivo analizar si la crianza en ambientes enriquecidos tenía un efecto positivo sobre la ejecución conductual de las ratas tratadas con la mezcla DE-79. Los resultados muestran que las ratas control se beneficiaron de los ambientes enriquecidos. En estas ratas, la latencia y la distancia recorrida fue menor en el primer día de entrenamiento en el laberinto de Barnes, en comparación con las ratas control en condiciones estándar. Lo que coincide con estudios anteriores que indican que los ambientes enriquecidos mejoran la ejecución de los roedores en diferentes tareas conductuales relacionadas con el aprendizaje y la memoria (Ilin y Richter-Levin, 2009). En cuanto a las ratas tratadas con el DE-79 que se criaron en ambiente enriquecido, no se observaron cambios en la ejecución en el laberinto de Barnes, por efecto de los ambientes enriquecidos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la ejecución de todas las ratas expuestas al DE-79 en el laberinto de Barnes, fue similar a la de las ratas control en ambientes enriquecidos. Según nuestro

conocimiento, hasta ahora no existen otros trabajos de investigación que analicen el efecto terapéutico de los ambientes enriquecidos sobre la actividad de las ratas expuestas a los PBDE. Estudios posteriores sobre este tema ayudarán a dilucidar qué repercusiones tienen los ambientes enriquecidos sobre el aprendizaje y la memoria de los roedores expuestos perinatalmente a los PBDE.

## **9.2 Actividad de la NOS en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo**

De acuerdo con los resultados obtenidos, la exposición perinatal al DE-79 afecta la producción del óxido nítrico en el hipocampo. Las ratas expuestas perinatalmente al DE-79 tuvieron una disminución estadísticamente significativa en la actividad de la NOS sólo en el área CA1, en comparación con las ratas control. Aunque la exposición al DE-79 se realizó durante la gestación y la lactancia de las ratas, los cambios en la producción del óxido nítrico se observaron en la etapa adulta de los animales (3 meses de edad), lo que sugiere que el efecto de la mezcla DE-79 sobre la actividad de la NOS en el área CA1 es a largo plazo.

Interesantemente, la disminución de la actividad de la NOS en CA1 no interfirió con el aprendizaje y la memoria espacial de las ratas en el laberinto de Barnes. Tanto en el área CA1 como en el área CA3 hipocampal existen células de lugar que intervienen en la codificación, consolidación y recuperación de la memoria espacial (Leutgeb, et al., 2004; 2005). Sin embargo, la codificación y representación de la información espacial en estas dos zonas es diferente. Según estudios realizados con roedores, la actividad neuronal en el área CA3 es diferencial de acuerdo al contexto en el que se encuentran los animales, mientras que en el área CA1 la actividad de los ensambles neuronales se superpone si los



contextos se asemejan (Leutgeb, et al., 2004; 2005). Además, el área CA1 y CA3 responden de acuerdo a las referencias espaciales locales o distales del contexto, siendo el área CA3 más sensible a los cambios que se presentan en ellas (Lee et al., 2004). Estas diferencias funcionales entre el área CA1 y CA3 podrían contribuir con los resultados obtenidos en la ejecución del laberinto de Barnes, ya que el área CA3 no se afectó por la exposición al DE-79.

En cuanto al óxido nítrico, Llansola et al (2007, 2009), demostraron *in vivo e in vitro* que la actividad de la vía de señalización glutamato- óxido nítrico-cGMP en el cerebelo se incrementó por la exposición prenatal a PBDE. Sin embargo, encontraron que sólo los niveles de la guanilato ciclasa y de la calcio calmodulina incrementaron, mientras que los niveles de la nNOS no cambiaron (Llansola et al., 2007). Además, en otro trabajo se determinó que la actividad incrementada de esta vía por la exposición prenatal al PBDE 99 (pentaPBDE) ayudó a mejorar el aprendizaje del laberinto en Y, una tarea relacionada con la memoria de trabajo espacial (Llansola et al., 2009). La mezcla DE-79 podría incrementar del mismo modo a la vía de señalización glutamato- óxido nítrico-cGMP en el hipocampo, compensando el decremento en la actividad de la NOS y contribuyendo a que el desempeño de las ratas tratadas con el DE-79, en el laberinto de Barnes, no se afectara.

Por otra parte, el óxido nítrico está relacionado con cambios anatómicos y funcionales causados por la crianza en los ambientes enriquecidos (Nikonenko et al., 2013; Lores-Arnaiz et al., 2006). En este trabajo se observó que en las ratas control la actividad de la NOS disminuyó tanto en el área CA1 como en el área CA3, por efecto de los ambientes enriquecidos. Según estudios realizados con

ratas jóvenes y ratas viejas, el efecto de la exposición corta (17 días) al enriquecimiento ambiental sobre la actividad de la NOS cambió dependiendo de la edad (Lores-Arnaiz et al., 2007). En las ratas jóvenes la actividad de la NOS se incrementó, y en las ratas adultas la actividad de la NOS no cambió (Lores-Arnaiz et al., 2007). Lo que sugiere que la modulación de la actividad de la NOS por los ambientes enriquecidos depende de la ventana temporal en que se estudie y de la duración de la crianza en los ambientes enriquecidos. En este trabajo, la exposición a los ambientes enriquecidos fue de 8 semanas; por lo que a lo largo de este período la modulación de la actividad de la NOS pudo cambiar. Para detectar si la actividad de la NOS incrementó después de la exposición a los ambientes enriquecidos y de la exposición perinatal a los PBDE, es necesario realizar el análisis en diferentes ventanas temporales.

Por último, en las ratas expuestas perinatalmente al DE-79, la actividad de la NOS disminuyó en el área CA3 por efecto de los ambientes enriquecidos. Sin embargo, en el área CA1 la actividad de la NOS no cambió significativamente a pesar de que disminuyó con la exposición perinatal al DE-79. Estos resultados nos sugieren que los ambientes enriquecidos tienen un efecto diferencial sobre la actividad de la NOS en el hipocampo de las ratas expuestas al DE-79. A este respecto, trabajos de investigación con ratas viejas, mostraron que la crianza en ambientes enriquecidos previene el deterioro cognoscitivo propio del envejecimiento y se relaciona con una producción incrementada del óxido nítrico (Lores-Arnaiz et al., 2006). Sin embargo, en ratas que sufrieron un evento isquémico, los ambientes enriquecidos no promueven el incremento en los niveles de expresión de la NOS, sino que lo previenen (Yu et al., 2013). Estos hallazgos indican que el efecto de

los ambientes enriquecidos sobre la NOS cambia, no sólo por la edad de las ratas, sino por el estado en el que se encuentre el SNC. En este caso, los ambientes enriquecidos podrían prevenir la disminución de la NOS en el área CA1, que ya se había afectado por la exposición perinatal al DE-79; o podrían compensar este efecto, a través de otras vías de señalización.

### **9.3 Niveles de sinaptofisina y PSD-95 en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo**

La inhibición del óxido nítrico en etapas tempranas del desarrollo está relacionada con una disminución en el número de espinas dendríticas y sinapsis, así como con una disminución en la expresión de proteínas sinápticas como la sinapsina I (Sánchez-Islas y León-Olea, 2004; Morales-Medina et al., 2007). En este trabajo, se analizó si la exposición perinatal al DE-79 provocaba cambios en la actividad de la NOS en las áreas CA1 y CA3 hipocampales, y si esto podía repercutir en la expresión de proteínas sinápticas como la sinaptofisina y la PSD-95. Además, también se analizó si los ambientes enriquecidos incrementaban los niveles de estas proteínas en las ratas control y en las ratas tratadas.

Según los resultados obtenidos con el análisis a través del western blot, no se encontraron cambios estadísticamente significativos en ninguna de las condiciones experimentales. La exposición perinatal al DE-79 no afectó los niveles de la sinaptofisina ni los de la PSD-95, en ninguna de las dos zonas. Sin embargo, se observaron tendencias que indican incrementos propiciados por los ambientes enriquecidos tanto en el área CA1, como en el área CA3 de las ratas control. Interesantemente, las ratas tratadas mostraron las mismas tendencias sólo en el

área CA3, mientras que en el área CA1 los niveles de ambas proteínas sinápticas se mantuvieron iguales a los de las ratas tratadas en ambientes no enriquecidos.

La inhibición de la NOS en ratones criados en ambientes enriquecidos, impide la formación de nuevas espinas dendríticas y sinapsis del hipocampo, específicamente en el área CA1 (Nikonenko et al., 2013). En este trabajo se encontró que la exposición perinatal a la mezcla DE-79 disminuyó la actividad de la NOS en el área CA1 hipocampal. Esta disminución en la actividad de la NOS, podría prevenir la formación de nuevas espinas dendríticas y sinapsis en las ratas tratadas criadas en ambientes enriquecidos, lo que podría relacionarse con que no se hayan encontrado cambios en la expresión de la sinaptofisina y la PSD-95 en el área CA1.

El análisis de los niveles de proteínas sinápticas es un indicador indirecto de cómo se encuentran las sinapsis en el SNC. Sin embargo, no descarta la presencia de anomalías en la estructura de las dendritas y las espinas, que también se han relacionado con deficiencias cognitivas y patologías del neurodesarrollo (Fiala et al., 2002; Levenga y Willemsen, 2012). Estudios encaminados a establecer la relación entre la exposición perinatal a la mezcla DE-79, la producción del óxido nítrico y la formación de espinas dendríticas y sinapsis, ayudarán a dilucidar los mecanismos por los cuales los PBDE afectan procesos cognitivos como la atención, el aprendizaje y la memoria.

Este trabajo se realizó como un primer acercamiento al análisis del papel que juega el óxido nítrico en las afectaciones cognitivas y celulares provocadas por la exposición perinatal a los PBDE, con la finalidad de tener un mejor entendimiento de los mecanismos celulares involucrados y de crear estrategias

terapéuticas, como los ambientes enriquecidos, que ayuden al mejoramiento o reversión de los daños cognoscitivos causados por estos contaminantes ambientales.

## 10. Conclusiones

El estudio de los PBDE como sustancias tóxicas para el neurodesarrollo y sus repercusiones sobre el desarrollo motor y los procesos cognoscitivos como el aprendizaje y la memoria, ha cobrado importancia en los últimos años. Sin embargo, todavía no se establece una relación directa entre los mecanismos celulares dañados por los PBDE y sus repercusiones en el comportamiento y la cognición. De acuerdo con los resultados que se obtuvieron en este trabajo: la exposición perinatal a la mezcla DE-79 facilita la habilidad de las ratas para aprender una tarea relacionada con la memoria espacial (laberinto de Barnes); y disminuye la actividad de la NOS en el área CA1 del hipocampo. Sin embargo, la disminución de la actividad de la NOS en CA1 no influyó en los niveles de PSD-95 y sinaptofisina en esta misma zona.

Son necesarios nuevos estudios que den seguimiento al protocolo presentado en este trabajo para contribuir al conocimiento de los mecanismos anatómicos y fisiológicos afectados por la exposición perinatal a los PBDE. De esta forma se contribuirá a la creación de estrategias terapéuticas que ayuden a aminorar o a revertir los daños en la conducta y la cognición causados por estos contaminantes ambientales.

## 10. Literatura Citada

Álvarez-González, M. Y., Sánchez-Islas, E., Mucio-Ramírez, S., de Gortari, P., Amaya, M. I., León-Olea, M. (2016) Efecto de la exposición perinatal al DE-79 sobre el sistema vasopresinérgico en ratas adultas. LIX Congreso Nacional Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A. C. Campeche, Campeche

Akyol, O., Zoroglu, S. S., Armutcu, F., Sahin, S. and Gurel, A. (2004) Nitric oxide as a physiopatological factor in neuropsychiatric disorders. *In Vivo* 18, 377-390

Amaral, O. B., Vargas, R. S., Hansel, G., Izquierdo, I. and Souza, D. O. (2008) Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiology and Behavior* 93, 388-394

Anderson, B. J. (2011) Plasticity of gray matter volume: the cellular and synaptic plasticity that underlies volumetric change. *Developmental Psychobiology* 53, 456-465

Anderson, Ö. and Blomkvist, G. (1981) Polybrominated aromatic pollutants found in fish in Sweden. *Chemosphere* 10, 1051-1060

Arancio, O., Antonova, I., Gambaryan, S., Lohmann, S. M., Wood, J. S., Lawrence, D. S. and Hawkins, R. D. (2001) Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting potentiation. *The Journal of Neuroscience* 21, 143-149

Artola, A., von Frijtag, J. C., Fermont, P. C., Gispen, W. H., Schrama, Kamal, A. and Spruijt, B. M. (2006) Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environment enrichment. *European Journal of Neuroscience* 23, 261-272

Baker, L. D., Frank, L. L., Foster-Schubert, K., Green, P. S., Wilkinson, C. W., McTiernan, A., Plymate, S. R., Fishel, M. A., Watson, G. S., Cholerton, B. A., Duncan, G. E., Mehta, P. D. and Craft, S. (2010) Effects of aerobic exercise on mild cognitive impairment. A controlled trial. *Archives of Neurology* 67, 71-79

Barnes, C.A. (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 93, 74-104

Begenisic, T., Spolidoro, M., Braschi, C., Baroncelli, L., Milanese, M., Pietra, G., Fabbri, M. E., Bonanno, G., Cioni, G., Maffei, L. and Sale, A. (2011) Environmental enrichment decreases GABAergic inhibition and improves cognitive abilities, synaptic plasticity, and visual functions in a mouse model of Down syndrome. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 5, 1-9

Bernstein, H. G. Bogerts, B. and Keilhoff, G. (2005) The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. *Schizophrenia Research* 78, 69-86

Birnbaum, L. S. and Staskal, D. F. (2004) Brominated flame retardants: cause for concern? *Environmental Health Perspectives* 112, 9-17

Blauw-Hospers, C. H., de Graaf-Peters, V. B., Dirks, T., Bos, A. F. and Hadders-Algra, M. (2007) Does early intervention in infants at high risk for a developmental motor disorder improve motor and cognitive development? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31, 1201-1212

Bradman, A., Castorina, R., Sjödin, A., Fenster, L., Jones, R. S., Harley, K. G., Crevier, J., Holland, N. T. and Eskenazi, B. (2012) Factors associated with serum polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels among school-age children in the CHAMACOS cohort. *Environmental Science and Technology* 46, 7373-7381

Buchhold, B., Mogoanta, L., Suofu, Y., Hamm, A., Walker, L., Kessler, Ch., Popa-Wagner, A. (2007) Environmental enrichment improves functional and neuropathological indices following stroke in young and aged rats. *Restorative Neurology and Neuroscience* 25, 467-484

Burette, A., Zabel, U., Weinberg, R. J., Schmidt, H. H. W. and Valtschanoff, J. G. (2002) Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 22, 8961-8970

Calabrese, V., Cornelius, C., Rizzarelli, E., Owen, J. B., Dinkova-Kostova, A. T. and Butterfield, D. A. (2009) Nitric oxide in cell survival : a janus molecule. *Antioxidants and Redox Signaling* 11, 2717-2739

Chen, J., Liufu, C., Sun, W., Sun. X. and Chen, D. (2010) Assessment of the neurotoxic mechanisms of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in primary culture neonatal rat hippocampal neurons includes alterations in second messenger signaling and oxidative stress. *Toxicology Letters* 192, 431-439

Chen, J., Tu, Y., Moon, C., Matarazzo, V., Palmer, A. M. and Ronnett, G. V. (2004) The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance. *Developmental Biology* 269, 165-182

Chapman, P. F., Atkins, C. M., Allen, M. T., Haley, J. E. and Steinmetz, J. E. (1992) Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Learning and Memory* 3, 567-570

Chung, Y. H., Joo, K. M., Lee, Y. J., Shin, D. H. and Cha, C. I. (2004) Postnatal development and age-related changes in the distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the visual system of rats. *Neuroscience Letters* 360, 1-4



Coburn, C. G., Currás-Collazo, M. C. and Kodavanti, P. R. S. (2008) *In vitro* effects of environmentally relevant polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners on calcium buffering mechanisms in rat brain. *Neurochemical Research* 33, 355-364

Comery, T. A., Stamoudis, C. X., Irwin, S. A. and Greenough, W. T. (1996) Increased density of multiple-head dendritic spines on medium-sized spiny neurons of the striatum in rats reared in a complex environment. *Neurobiology of Learning and Memory* 66, 93-96

Contestabile, A. (2000) Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Research reviews* 32, 476-509

Costa, L. G., de Laat, R., Tagliaferri, S. and Pellacani, C. (2014) A mechanistic view of polybrominated diphenyl ether (PBDE) developmental neurotoxicity. *Toxicology Letters* 230, 282-294

Costa, L. G. and Giordano, G. (2007) Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardant. *NeuroToxicology* 28, 1047-1067

Darnerud, P. O. and Risberg, S. (2006) Tissue localization of tetra- and bromodiphenyl ether congeners (BDE-47, -85, -99) in perinatal and adult C57BL mice. *Chemosphere* 62, 485-493

de Cock, M., Maas, Y. G. H. and van de Bor, M. (2012) Does perinatal exposure to endocrine disruptors induce autism spectrum and attention deficit hyperactivity disorders? Review. *Acta Pædiatrica* 101, 811-818

Dingemans, M. M. L., Ramakers, G. M. J., Gardoni, F., van Kleef, R. G. D. M., Bergman, A., Di Luca, M., van den Berg, M., Westerink, R. H. S. and Vijverberg, H. P. M. (2007) Neonatal exposure to brominated flame retardant BDE-47 reduces long-term potentiation and postsynaptic protein levels in mouse hippocampus. *Environmental Health Perspectives* 115, 865-870

Dingemans, M. M. L., van den Berg, M. and Westerink, R. H. S. (2011) Neurotoxicity of brominated flame retardants: (in)direct effects of parents and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers on the (developing) nervous system. *Environmental Health Perspectives* 119, 900-907

Domingo, J. L. (2012) Polybrominated diphenyl ethers in food and human dietary exposure: a review of the recent scientific literature. *Food and Chemical Toxicology* 50, 238-249

Driscoll, L. L., Gibson, A. M. and Hieb, A. (2009) Chronic postnatal DE-71 exposure: effects on learning, attention and thyroxine levels. *Neurotoxicology and Teratology* 31, 76-84

Eckert, M. J., Bilkey, D. K., and Abraham, W. C. (2010) Altered plasticity in hippocampal CA1, but not dentate gyrus, following long-term environmental enrichment. *Journal of Neurophysiology* 103, 3320-3329

Engert, F. and Bonhoeffer, T. (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66-70

Eriksson, P., Jakobsson, E. and Fredriksson, A. (2001) Brominated flame retardants: a novel class of developmental neurotoxicants in our environment? *Environmental Health Perspectives* 109, 903-908

Eskenazi, B., Chevrier, J., Rauch, S. A., Kogut, K., Harley, K. G., Johnson, C., Trujillo, C., Sjödin, A. and Bradman, A. (2013) *In utero* and childhood polybrominated diphenyl ether (PBDE) exposures and neurodevelopment in the CHAMACOS study, *Environmental Health Perspectives* 121, 257-262

Frederiksen, M., Vorkamp, K., Mathiesen, L., Mose, T. and Knudsen, L. E. (2010) Placental transfer of the polybrominated diphenyl ethers BDE-47, BDE-99 and BDE-209 in a human placenta perfusion system: an experimental study. *Environmental Health* 9, 1-10

Fiala, J. C., Feinberg, M., Popov, V. and Harris, K. M. (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *The Journal of Neuroscience* 18, 8900–8911

Frederiksen, M., Vorkamp, K., Thomsen, M., and Knudsen, L. E. (2009) Human internal and external exposure to PBDEs- A review of levels and sources. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212, 109-134

García, A., Yáñez, L. and Díaz-Barriga, F. (2009) Exposure assessment of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in mexican children. *Chemosphere* 75, 1215-1220

Garthwaite, J., (2008) Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *European Journal of Neuroscience* 27, 2783-2802

Garthwaite, J., (2016) From synaptically localized to volume transmission by nitric oxide. *The Journal of Physiology* 594.1, 9-18

Gee, J. R. and Moser, V. C. (2008) Acute postnatal exposure to brominated diphenylether 47 delays neuromotor ontogeny and alters motor activity in mice. *Neurotoxicology and Teratology* 30, 79-87

Gates, N. and Valenzuela, M. (2010) Cognitive exercise and its role in cognitive function in older adults. *Current Psychiatry Reports* 12, 20-27

Gibb, B. J., and Garthwaite, J. (2001) Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain. *European Journal of Neuroscience* 13, 539-544

Greenough, W. T. and Volkmar, F. R. (1973) Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Experimental Neurology* 40, 491- 504

Hale, R. C., Alaei, M., Manchester-Neesvig, J. B., Stapleton, H. M. and Ikononou, M.G. (2003) Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the North American environment. *Environment International* 29, 771-779

Halperin, J. M. and Healy, D. M. (2011) The influences of environmental enrichment, cognitive enhancement, and physical exercise on brain development: can we alter the developmental trajectory of ADHD? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35, 621-634

Hannan, A. J. (2014) Review: environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 14, 13-25

Hannigan, J. H., O'Leary-Moore, S. K. and Berman, R. F. (2007) Postnatal environmental or experiential amelioration of neurobehavioral effects of perinatal alcohol exposure in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31, 202-211

Hardingham, N., Dachtler, J. and Fox, K. (2013) The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7, 1-19

Hartley, T., Lever, C., Burgess, N. and O'Keefe, J. (2014) Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 369, 20120510. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0510>

He, P., Wang, A., Xia, T., Gao, P., Niu, Q., Guo, L. and Chen, X. (2009) Mechanisms underlying the developmental neurotoxic effect of PBDE-47 and the enhanced toxicity associated with its combination with PCB153 rats in rats. *NeuroToxicology* 30, 1088-1095

Herbstman, J. B. and Mall, J. K. (2014) Developmental exposure to polybrominated diphenyl ethers and neurodevelopment. *Current Environmental Health Reports* 1, 101-112

Hölscher, C. (1997) Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences* 20, 298-303

Ickes, B. R., Pham, T. M., Sanders, L.A., Albeck, D. S., Mohammed, A. H. and Granholm, A-C. (2000) Long- term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Experimental Neurology* 164, 45-52

Ikonomou, M. G., Rayne, S. and Addison, R. F. (2002) Exponential increases of the brominated flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, in the canadian artic from 1981-2000. *Environmental Science and Technology* 36, 1886-1892

Ilin, Y. and Richter-Levin, G. (2009) Enriched environment experience overcomes learning deficits and depressive-like behavior induced by juvenile stress. *PLoS ONE* 4, e4329. doi:10.1371/journal.pone.0004329

Jung, C. K. E. and Herms, J. (2012) Structural dynamics of dendritic spines are influenced by and environmental enrichment: an in vivo imaging study. *Cerebral Cortex* doi:10.1093/cercor/bhs317

Kelley, J. B., Balda, M. A., Anderson, K. L. and Ytzhak, Y. (2009) Impairments in fear conditioning in mice lacking the nNOS gene. *Learning and Memory* 16, 371-378

Kodavanti, P. R. S., Coburn, C. G., Moser, V. C., MacPhail, R. C., Fenton, S. E., Stoker., T. E., Rayner, J. L., Kannan, K. and Birnbaum, L. S. (2010) Developmental exposure to a commercial PBDE mixture, DE-71: neurobehavioral, hormonal, and reproductive effects. *Toxicological Sciences* 116, 297-312

Kodavanti, P. R. S. and Currás-Collazo, M. C. (2010) Neuroendocrine actions of organohalogenes: thyroid hormones, arginine vasopressin, and neuroplasticity. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31, 479-496

Kodavanti, P. R. S. and Ward, T. R. (2005) Differential effects of commercial polybrominated diphenyl ether and polychlorinated biphenyl mixtures in intracellular signaling in rat brain *in vitro*. *Toxicological Sciences* 85, 952-962

Koenig, C. M., Lango, J., Pessah, I. N. and Berman, R. F. (2012) Maternal transfer of BDE-47 to offspring and neurobehavioral development in C57BL6/J mice. *Neurotoxicology and Teratology* 34, 571-580

Kolb, B., Gorny, G., Söderpalm, A. H. V. and Robinson, T. E. (2003) Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens. *Synapse* 48, 149-153

Kozorovitskiy, Y., Gross, C. G., Kopil, K., Battaglia, L., McBreen, M., Stranahan, A. M. and Gould, E. (2005) Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain. *PNAS* 102, 17478- 17482

Król, S., Zavięgala, B. and Namięsnik, J. (2012) PBDEs in environmental samples: Sampling and analysis. *Talanta* 93, 1-17

La Guardia, M. J., Hale, R. C. and Harvey, E. (2006) Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa-, and deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environmental Science and Technology* 40, 6247-6254

Lamprecht, R. and LeDoux, J. (2004) Structural plasticity and memory. *Nature Reviews* 5, 45-54

Lancaster, J. R. Jr. (1997) A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide* 1, 18-30

Landers, M. S., Knott, G. W., Lipp, H. P., Poletaeva, I., and Welker, E. (2011) Synapse formation in adult barrel cortex following naturalistic environmental enrichment. *Neuroscience* 199, 143-152

Laviola, G., Hannan, A. J., Macri, S., Solinas, M. and Jaber, M. (2008) Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiology of Disease* 31, 159-168

Lee, I., Yoganarasimha, D., Rao, G. and Knierim, J. J. (2004) Comparison of population coherence of place cells in hippocampal subfields CA1 y CA3. *Nature* 430, 456-459

León-Olea, M., Martyniuk, C. J., Orlando, E. F., Ottinger, M. A., Rosenfeld, C. S., Wolstenholme, J. T. and Trudeau, V. L. (2014) Current concepts in neuroendocrine disruption. *General and Comparative Endocrinology* 203, 158-173

León-Olea, M., Sánchez-Islas, E., Mucio-Ramírez, S., Miller-Pérez, C. y Garduño-Gutiérrez, R. (2012) Contaminantes ambientales neurotóxicos cercanos a nuestra vida diaria. *Salud Mental* 35, 395-403

Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Barnes, C. A., Moser, E. I., McNaughton, B. L. and Moser, M. B. (2005) Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles. *Sciences* 309, 619-623

Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Treves, A., Moser, M. B. and Moser, E. I. (2004) Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1. *Scienceexpress*; 10.1126/science.1100265

Levenga, J. and Willemsen, R. (2012) Perturbation of dendritic protrusions in intellectual disability. *Progress in Brain Research* 197, 153-168

Li, C., Wang, S., Cai, Z., Liu, W., Xu, S. and Xiao, P. (2012) Effects of intrahippocampal L-NAME treatment on the behavioral long-term potentiation in dentate gyrus. *Neuroscience Letters* 528, 201-204

Llansola, M., Erceg, S., Monfort, P., Montoliu, C. and Felipo, V. (2007) Prenatal exposure to polybrominated diphenylether 99 enhances the function of the glutamate- nitric oxide- cGMP pathway in brain *in vivo* and in culture neurons. *European Journal of Neuroscience* 25, 373-379

Llansola, M., Hernández-Viadel, M., Erceg, S., Montoliu, C. and Felipo, V. (2009) Increasing the function of glutamate-nitric oxide- cyclic guanosine monophosphate pathway increases the ability to learn a Y-maze task. *Journal of Neuroscience Research* 87, 2351-2355

López, D., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Yáñez, L., Ramírez, R., Díaz-Barriga, F. and Bergman, A. (2006) Estudio preliminar sobre los niveles de exposición a PBDEs en sangre y leche materna en México. *Acta Toxicológica Argentina* 14, 52-54

Lores-Arnaiz, S. Bustamante, J., Arismendi, M., Vilas, S., Paglia, N., Basso, N., Capani, F., Coirini, H., López Costa, J. J. and Lores-Arnaiz, M. R. (2006) Extensive enriched environments protect old rats from the aging dependent impairment of spatial cognition, synaptic plasticity and nitric oxide production. *Behavioural Brain Research* 169, 294-302

Lores-Arnaiz, S. Bustamante, J., Czernizyniec, A., Galeano, P., González Gervasoni, M., Rodil Martínez, A., Plagia, N., Cores, V. and Lores-Arnaiz, M. R. (2007) Exposure to enriched environments increases brain nitric oxide synthase and improves cognitive performance in prepubertal but not in young rats. *Behavioural Brain Research* 184, 117-123

Majlessi, N., Choopani, S., Bozorgmehr, T. and Azizi, Z. (2008) Involvement of hippocampal nitric oxide in spatial learning in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory* 90, 413-419

McLay, R. N., Freeman, S. M., Harlan, R. E., Kastin, A. J. and Zadina, J. E. (1999) Tests used to assess the cognitive abilities of aged rats: their relation to each other and to hippocampal morphology and neurotrophin expression. *Gerontology* 45, 143-155

Messer, A. (2010) Mini-review: polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants as potential autism risk factors. *Physiology and Behavior* 100, 245-249

Mize, R. R. and Lo, F. S. (2000) Nitric oxide, impulse activity, and neurotrophins in visual system development. *Brain Research* 886, 15-32

Mora, F., Segovia, G. and del Arco, A. (2007) Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Research Reviews* 55, 78-88

Morales-Medina, J. C., Mejorada, A., Romero-Curiel, A. and Flores, G. (2007) Alterations in dendritic morphology of hippocampal neurons in adult rats after neonatal administration of N-Omega-Nitro-L-Arginine. *Synapse* 61, 785-789

Moser, M. B., Trommald, M. and Andersen, P. (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggest the formation of new synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12673-12675

Nikonenko, I., Boda, B., Steen, S., Knott, G., Welker, E. and Muller, D. (2008) PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinervated spine formation through nitric oxide signaling. *The Journal of Cell Biology* 183, 1115-1127

Nikonenko, I., Nikonenko, A., Mendez, P., Michurina, T. V., Enikolopov, G. and Muller, D. (2013) Nitric oxide mediates local activity-dependent excitatory synapse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E4142-E4151

Nithianantharajah, J. and Hannan, A. J. (2006) Enriched environments, experienced-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 7, 697-709

Nithianantharajah, J., Levis H. and Murphy, M., (2004) Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiology of Learning and Memory* 81, 200-210

Noyes, P. D., Hinton, D. E. and Stapleton, H. M. (2011) Accumulation and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in juvenile fathead minnows (*Pimephales Promelas*) induces thyroid disruption and liver alterations. *Toxicological Sciences* 122, 265-274

Olsson, A. S. and Dahlborn, K. (2002) Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". *Laboratory Animals* 36, 243-270

Orta-García, S. T., León-Moreno, L. C., González-Vega, C., Dominguez-Cortinas, G., Espinosa-Reyes, G. and Pérez-Maldonado, I. N. (2012) Assessment of the levels of polybrominated diphenyl ethers in blood samples from Guadalajara, Jalisco, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 89, 925-929

Orta-García, S. T., Pérez-Vázquez, F., González-Vega, C., Varela-Silva, J. A., Hernández-González, L. and Pérez-Maldonado, I. (2014) Concentrations of persistent organic pollutants (POPs) in human blood samples from Mexico City, Mexico. *Science of the Total Environment* 472, 496-501

Paez-Martínez, N., Flores-Serrano, Z., Ortiz-López, L. and Ramírez-Rodríguez, G. (2013) Environmental enrichment increases doublecortin-associated new neurons

and decreases neuronal death without modifying anxiety-like behavior in mice chronically exposed to toluene. *Behavioural Brain Research* 256, 432-440

Palmer, F. B., Shapiro, B. K., Allen, M. C., Mosher, B. S., Bilker, S. A., Harryman, S. E., Meinert, C. L. and Capute, A. J. (1990) Infants stimulation curriculum for infants with cerebral palsy: effects on infant temperament, parent-infant interaction, and home environment. *Pediatrics* 85, 411-415

Pang, T. Y. C. and Hannan, A. J. (2013) Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. *Neuropharmacology* 64, 515-528

Paul, V. and Ekambaram, P. (2011) Involvement of nitric oxide in learning and memory processes. *Indian Journal of Medical Research* 133, 471-478

Pérez-Maldonado, I. N., Ramírez-Jiménez, M. del R., Martínez-Arévalo, L. P., López-Guzmán, O. D., Athanasiadou, M., Bergman, A., Yarto-Ramírez, M., Gavilán-

Rapanelli, M., Frick, L. R. and Zanutto, B. S. (2010) Modulation of endothelial and neuronal nitric oxide synthases during learning of an operant conditioning task. *Journal of Neurochemistry* 113, 725-734

Petrosini, L., De Bartolo, P., Foti, F., Gelfo, F., Cutuli, D., Giuseppa Leggio, M. and Mandolesi, L. (2009) On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. *Brain Research Reviews* 61, 221-239

Raine, A., Venables, P. H., Dalais, C., Mellinger, K., Reynolds, C. and Mednick, S. A. (2001) Early educational and health enrichment at age 3-5 years is associated with increased autonomic and central nervous system arousal and orienting at age 11 years: evidence from the Mauritius Child Health Project 38, 254-266

Ramey, C. T. and Ramey, S. L. (1998) Prevention of intellectual disabilities: early interventions to improve cognitive development. *Preventive Medicine* 27, 224-232

Ratnayaka, A., Marra, V., Bush, D., Burden, J. J., Branco, T. and Staras, K., (2012) Recruitment of resting vesicles into recycling pools supports NMDA receptor-dependent synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons. *The Journal of Physiology* 590.7 1585-1597

Renoir, T., Pang, T. Y. and Hannan, A. J. (2013) Effects of environmental manipulations in genetically targeted animal models of affective disorders. *Neurobiology of Disease* 57, 12-27

Reynolds, S., Lane, S. J. and Richards, L. (2010) Using animal models of enriched environments to inform research on sensory integration intervention for the rehabilitation of neurodevelopmental disorders. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 2, 120-132



Rice, D. C., Reeve, E. A., Herlihy, A., Zoeller, R. T., Thompson, W. D. and Markowski, V. P. (2007) Developmental delays and locomotor activity in the C57BL6/J mouse following neonatal exposure to the fully-brominated PBDE, decabromodiphenyl ether. *Neurotoxicology and Teratology* 29, 511-520

Rocha-Gutiérrez, B. and Lee, W. Y. (2012) Determination and comparison of polybrominated and diphenyl ethers in primary, secondary, and tertiary wastewater treatment plants. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 92, 1518-1531

Rocha-Gutiérrez, B. A., Peralta.Pérez, M. del R. y Zavala-Díaz de la Serna, F. J. (2015) Revisión global de los contaminantes emergentes PBDE y el caso particular de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 31, 311-320

Rogers, J., Vo, U., Buret, L. S. Pang, T. Y., Meiklejohn, H., Zeleznikow-Johnston, A., Churilov, L., van den Buuse, M., Hannan, A. J. and Renoir, T. (2016) Dissociating the therapeutic effects of environmental enrichment and exercise in a mouse model of anxiety with cognitive impairment. *Translational Psychiatry* 6, 1-12

Rosenzweig, M. and Bennett, E. L. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behavioural Brain Research*. 78, 57-65

Rosenzweig, M. R., Krech, D., Bennett, E. L. and Diamond, M. C. (1962) Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 55, 429-437

Rosenzweig, M. R., Krech, D., Bennett, E. L. and Diamond, M. C. (1972) Brain changes in response to experience. *Readings from Scientific American* 226, 117-124

Roze, E., Meijer, L., Bakker, A., Van Braeckel, K. N. J. A., Sauer, P. J. J. and Bos, A. F. (2009) Prenatal exposure to organohalogenes, including brominated flame retardants, influence motor, cognitive, and behavioral performance at school age. *Environmental Health Perspectives* 117, 1953-1958

Saha, R. N. and Pahan, K. (2006) Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxidants and Redox Signaling* 5, 929-947

Sánchez-Islas, E. and León-Olea, M. (2001) Histochemical and immunohistochemical localization of neuronal nitric oxide synthase in the olfactory epithelium of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Nitric Oxide* 5, 302-316

Sánchez-Islas, E. and León-Olea, M. (2004) Nitric oxide synthase inhibition during synaptic maturation decreases synapsin I immunoreactivity in rat brain. *Nitric Oxide* 10, 141-149

Simpson, J. and Kelly, J. P. (2011) The impact of environmental enrichment in laboratory rats. Behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural Brain Research* 222, 246-264

Suvorov, A., Girard, S., Lachapelle, S., Abdelouahab, N., Sebire, G. and Takser, L. (2009) Perinatal exposure to low-dose BDE-47, an emergent environmental contaminant, cause hyperactivity in rat offspring. *Neonatology* 95, 203-209

Szabadits, E., Cserép, C., Ludányi, A., Katona, I., Gracia-Llanes, J., Freund, T. F. and Nyíri, G. (2007) Hippocampal gabaergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. *The Journal of Neuroscience* 27, 8101-8111

Ta, T. A., Koenig, C. M., Golub, M. S., Pessah, I. N., Qi, L., Aronov, P. A. and Berman, R. F. (2011) Bioaccumulation and behavioral effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in perinatally exposed mice. *Neurotoxicology and teratology* 33, 393-404

Tanda, K., Nishi, A., Matsuo, N., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Sugimoto, T., Toyama, K., Takao, K. and Miyakawa, T. (2009) Abnormal social behavior, hyperactivity, impaired remote spatial memory, and increased D1-mediated dopaminergic signaling in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *Molecular Brain* 2, doi: 10.1186/1756-6606-2-19

Turner, A. M. and Greenough, W. T. (1985) Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain Research* 329, 195-203

van Praag, H., Kempermann, G. and Cage, F. H. (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews* 1, 191-198

Viberg, H., Fredriksson, A. and Eriksson, P. (2003) Neonatal exposure to polybrominated diphenyl ether (PBDE 153) disrupts spontaneous behavior, impairs learning and memory, and decreases hippocampal cholinergic receptors in adult mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 192, 95-106

Viberg, H., Mundy, W. and Eriksson, P. (2008) Neonatal exposure to decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) results in changes in BDNF, CaMKII and GAP-43, biochemical substrates of neuronal survival, growth, and synaptogenesis. *NeuroToxicology* 29, 152-159

Viberg, H. (2009) Neonatal ontogeny and neurotoxic effect of decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) on levels of synaptophysin and tau. *International Journal of Developmental Neuroscience* 27, 423-429

Volkmar, F. R. and Greenough, W. T. (1972) Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science* 176, 1445-1447

Walsh, R. N., Budtz-Olsen, O. E., Penny, J. E. and Cummins, R. A. (1969) The effects of environmental complexity on the histology of the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology* 137, 361-366

Williams, B. M., Luo, Y., Ward, C., Redd, K., Gibson, R., Kuczaj, S. A. and McCoy, J. G. (2001) Environmental enrichment: effects on spatial memory hippocampal CREB immunoreactivity. *Physiology and Behavior* 73, 649-658

Wetzdoerfer, R., Hoeger, H., Engidawork, E., Engelmann, M., Singewald, N., Lubec, G. and Lubec, B. (2004) Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance. *Nitric Oxide* 10, 130-140

Xing, T., Chen, L., Tao, Y., Wang, M., Chen, J. and Ruan, D. Y. Effects of decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) exposure at different developmental periods on synaptic plasticity in the dentate gyrus of adult rats *in vivo*. *Toxicological Sciences* 110, 401-410

Yan, T., Xiang, L., Xuejun, J., Chengzhi, C., Youbin, Q., Xuelan, Y., Yang, L., Changyan, P. and Hui, C. (2012) Spatial learning and memory deficit of low level polybrominated diphenyl ethers-47 in male adult rat is modulated by intracellular glutamate receptors. *The Journal of Toxicological Sciences* 37, 223-233

Yoshihara, Y., De Roo, M. and Muller, D. (2009) Dendritic spine formation and stabilization. *Current Opinion in Neurobiology* 19, 146- 153

Yu, K., Wu, Y., Hu, Y., Zhang, Q., Xie, H., Liu, G., Chen, Y., Guo, Z. and Jia, J. (2013) Neuroprotective effects of prior exposure to enriched environment on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats: the possible molecular mechanism. *Brain Research* 1538, 93-103

Yuste, R. and Bonhoeffer, T. (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 24-34

Zhang, S., Chen, J. and Wang, S. (1998) Spatial learning and memory induce up-regulation of nitric oxide-producing neurons in rat brain. *Brain Research* 801, 101-106

Zhang, H. Li, X., Nie, J. and Niu, Q. (2013) Lactation exposure to BDE-153 damages learning and memory, disrupts spontaneous behavior and induces hippocampus neuron death in adult rats. *Brain Research* 1517, 44-56

Zorumski, C. F. and Izumi, Y. (1998) Modulation of LTP induction by NMDA receptor activation and nitric oxide release. *Progress in Brain Research* 118, 173-182