



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Facultat de Ciències de l'Educació i Psicologia
Departament de Psicologia

**EFECTOS NEUROCONDUCTUALES
DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A
SULFONATO DE PERFLUOROCTANO
(PFOS) Y SU INTERACCIÓN CON EL
ESTRÉS PRENATAL**

Silvia Fuentes De Frutos

Tesis Doctoral

Tarragona, 2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

A mis abuelos, madre y hermano.

A Frédéric.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

Agradecimientos

Además de haberme aportado toda una serie de conocimientos nuevos, tanto estrictamente científicos como relacionados con el ámbito académico, la realización de la presente tesis me ha permitido conocer a personas que se han convertido en muy importantes para mí. Lo han sido durante el desarrollo de este trabajo y lo van a ser de aquí en adelante.

Para comenzar, quiero agradecer a la Dra. Maria Teresa Colomina y al Dr. José Luis Domingo la posibilidad de haber podido realizar mi trabajo en su grupo de investigación. Gracias a ellos dos, y gracias también a la Dra. Paloma Vicens, por su atención y por todo lo que me han estado enseñando durante este tiempo.

Muchas gracias a la "generación" de becarios y técnicos anterior a la mía, que me acogieron y guiaron en su momento. Además, me han estado proporcionando cariño y comprensión hasta ahora. Me refiero, especialmente, a Ana, Vicky, Marga y Silvia.

Gracias también a todo el departamento de Fisiología en general, donde siempre me he sentido recibida y tratada como una más. En concreto, muchas gracias a Luisa y Montse, cuyos consejos y complicidad me han ayudado siempre a llevar mejor las malas épocas.

Agradecer también a Esperanza, Juan y Amparo toda su ayuda técnica y cariño, además de sus interesantes conversaciones.

Trabajando un poquito más cerca de nuestro "labo", hay toda una serie de personas a las que también me quiero referir. Son compañeros con los que he estado trabajando directamente, día tras día. Muchas gracias a Núria y Martí, quienes me han ayudado siempre que lo he necesitado. Todo mi cariño para Roser, que me sorprende continuamente, para Montse, una persona llena de ternura, y para todos los becarios que han llegado más

tarde que yo. A pesar de que no he tenido tiempo de conocerlos a todos en profundidad, sé que forman un gran grupo. Me refiero a Tania, Meri, Bea, Lolita, Gemma, Marta, José Gregorio y Ana.

Muy especialmente, quiero agradecer la sincera amistad que me ofreció desde el primer momento Esperanza, una de las personas más generosas, atentas y bondadosas que conozco. Otra persona del grupo, Eva, me ha ayudado durante todo este tiempo a sobrellevar las dificultades que he ido encontrando con una sonrisa, quiero agradecerle su amistad y cariño. Respecto a Diana, comentar que haber trabajado, reído y llorado junto a ella es de lo mejor que me pasado en la vida. Gracias a ellas, he podido trabajar con más alegría e ilusión durante estos últimos años, además me han ayudado a comprobar que se puede conocer a grandes personas en un ambiente tan poco agradecido como puede ser, en ocasiones, el entorno laboral.

Por último, quiero dedicarles este trabajo a mis abuelos, madre y hermano, sin ellos no tendría ni raíces ni guía, y a Frédéric, por su infinita paciencia, cariño, y por el respeto que siempre me ha mostrado.

Gracias.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

Índice

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

I. INTRODUCCIÓN

1. El sulfonato de perfluorooctano (PFOS)	9
1.1 Química del PFOS	11
1.2 Emisiones al medioambiente	12
1.3 Vías de exposición humana al PFOS	14
1.3.1 Estudios de exposición ocupacional	15
1.3.2 Estudios de exposición en población general	16
1.4 Toxicocinética del PFOS	17
1.4.1 Estudios de vida media	18
1.5 Estudios de toxicidad en animales.....	18
1.5.1.1 Toxicidad materna y prenatal	19
1.5.1.2 Toxicidad postnatal	23
1.5.2 Estudios en adultos.....	26
1.5.3 Estudios neuroconductuales.....	29
2. El estrés	30
2.1 Fisiología del estrés.....	32
2.1.1 Diferencias individuales en la respuesta al estrés.....	37
2.2 Modelos de estrés en la experimentación animal	39
2.2.1 Estrés por inmovilización	41
2.3 Efectos del estrés sobre el desarrollo	42
2.4 Estrés y función cognitiva	48
2.5 Estrés y tóxicos	51

II. OBJETIVOS

1. Objetivo general	57
2. Objetivos concretos	57
2.1 Fase Experimental I. <i>Efectos maternotóxicos y embriofetales</i>	
2.1.1 Objetivo general.....	57
2.1.2 Objetivos específicos.....	57
2.2 Fase experimental II. <i>Efectos postnatales y a largo plazo</i>	
2.2.1 Objetivo general.....	58
2.2.2 Objetivos específicos.....	58
2.3 Fase Experimental III. <i>Efectos en la edad adulta</i>	
2.3.1 Objetivo general.....	59
2.3.2 Objetivos específicos.....	59

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales generales.....	63
3.1.1 Animales de experimentación	63
3.1.2 Reactivos y agentes químicos	63
3.1.3 Material accesorio	64
3.2 Métodos generales	64
3.2.1 Apareamiento e identificación de los animales	64
3.2.2 Preparación y administración de las disoluciones.....	64
3.3 Procedimiento: Variables evaluadas y recogida de datos	65

IV. RESULTADOS

4.1 Fase experimental I. <i>Efectos maternotóxicos y embriofetales</i>	
Resumen artículo 1	73

Artículo 1 "Interactions in developmental toxicology: Concurrent exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and stress in pregnant mice"

4.2 Fase experimental II. *Efectos postnatales y a largo plazo*

Resúmenes artículos 2 y 3 75

Artículo 2 "Concurrent exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and stress during pregnancy in mice: effects on postnatal development and behavior of the offspring"

Artículo 3 "Influence of maternal restraint stress on long-lasting effects induced by prenatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) in mice"

4.3 Fase experimental III. *Efectos en la edad adulta*

Resumen artículo 4 77

Artículo 4 "Behavioral effects in adult mice exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS)"

V. DISCUSIÓN 81

5.1 Discusión general 97

VI. CONCLUSIONES 101

VII. BIBLIOGRAFÍA 105

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

Abreviaturas más comunes

ACTH: Hormona Corticotropina

COP: Contaminantes Orgánicos Persistentes

CRH: Hormona Liberadora de Corticotropina

DPN: Día Postnatal

Eje HPA: Eje Hipotálamo-Hipofisiario-Adrenal

PFC: Productos Químicos Perfluorados

FOB: Batería de Observación Funcional

DG: Día de Gestación

NOAEL: Nivel sin Efectos Adversos Observados

PFOS: Sulfonato de Perfluorooctano

SNC: Sistema Nervioso Central

TSH: Hormona Estimulante de la Tiroides

T3: Triyodotironina

T4: Tiroxina

WM: Watermaze (laberinto acuático de Morris)

* La nomenclatura utilizada en referencia al sulfonato de perfluorooctano (PFOS) está extraída del *Proyecto de evaluación de la gestión de riesgos: sulfonato de perfluorooctano (UNEP 2007)*.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

I. Introducción

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

1. El Sulfonato de Perfluorooctano (PFOS)

El sulfonato de perfluorooctano (PFOS) es un compuesto orgánico ampliamente utilizado en la industria como agente surfactante por sus propiedades como repelente del agua y de los lípidos y por su estabilidad (UNEP 2006).

La producción de PFOS se inició en el año 1948 (Seacat y cols., 2002). Desde entonces, y hasta el año 2000, este compuesto se estuvo utilizando en cantidades cada vez mayores para generar líquidos inertes con baja tensión superficial (muy extensibles) o superficies sólidas con propiedades específicas (por lo general, antiadherentes) (CESE 2006).

El PFOS es muy resistente a la degradación, y por ello es muy útil en procesos en los que se utilizan altas temperaturas y en procesos en los que se entra en contacto con bases o ácidos fuertes. De hecho, el PFOS ha demostrado ser extremadamente persistente (UNEP 2006). No se hidroliza, fotoliza ni biodegrada en ninguna de las condiciones ambientales sometidas a ensayo en diferentes experimentos (OECD 2002). La única condición conocida por la cual el PFOS se degrada es a través de la incineración a altas temperaturas, en condiciones operativas adecuadas (3M 2003). Es precisamente la persistencia de este compuesto la responsable de su peligrosidad a nivel medioambiental.

El PFOS ha sido desarrollado por empresas como 3M para proporcionar resistencia a la grasa, el aceite, el agua y la suciedad a una serie de materiales como:

- los productos textiles
- alfombras/tapicería
- cuero/indumentaria
- papeles/embalajes
- revestimientos y aditivos para revestimientos

- productos de limpieza de uso industrial/doméstico
- plaguicidas e insecticidas

Se emplea también, en menor volumen, en cromado, fotografía, espumas antiincendio y fluidos hidráulicos para la aviación (UNEP 2006). En el año 2000 se estaban fabricando y comercializando a escala mundial 4.500 toneladas anuales de PFOS en productos como el acondicionador de alfombras y tejidos Scotchgard™ de 3M. De acuerdo con una estimación del Comité Económico y Social Europeo de 2004, el uso total de sustancias relacionadas con los PFOS en la Unión Europea en el año 2000 fue de aproximadamente 500 toneladas (CESE 2006).

Varios estudios ambientales llevados a cabo en la presente década han mostrado que el PFOS es un contaminante global, persistente y bioacumulativo, cuyos niveles pueden llegar a ser ambientalmente preocupantes en un futuro próximo (Giesy y Kannan 2001; Kannan y cols., 2002a; Kannan y cols., 2001; Kannan y cols., 2002b). Asimismo, se ha demostrado la presencia de PFOS en la población y en el medio ambiente, hecho que ha generado preocupación en la comunidad y ha puesto en alerta a las agencias reguladoras (Lau y cols., 2004).

En gran parte debido a la amplia distribución y a la persistencia del PFOS en humanos y en el medio ambiente, la empresa norteamericana 3M, principal productor PFOS mundial, anunció el cese voluntario de la producción de este contaminante en mayo del 2000. El cese de la producción se convirtió en efectivo hacia finales del año 2002 (Ericson y cols., 2007).

La Unión Europea adoptó recientemente restricciones sobre la comercialización y el uso del PFOS. Las medidas se aplican al ácido del PFOS, sus sales y derivados, incluidos los polímeros de PFOS. En concreto, prohíbe la comercialización o utilización como sustancia o componente de preparados en concentraciones iguales o superiores al 0.005% en masa. Además, se prohíben los artículos y productos semiacabados, si la concentración de PFOS es igual o superior al 0.1% en masa. Existen algunas

excepciones, como por ejemplo, algunos usos en procesos de tratamiento de películas fotográficas (UNEP 2006).

A raíz de la retirada del PFOS y sustancias relacionadas, se han reformulado estos productos tomando como base otros compuestos químicos fluorados con propiedades surfactantes similares, pero con un impacto más reducido sobre la salud y el medio ambiente (CESE 2006).

El cese gradual voluntario de la producción de PFOS, por parte del principal productor de los E.E.U.U., ha llevado a una disminución en el uso actual de sustancias relacionadas con el PFOS. Sin embargo, tal y como reveló la Agencia de Protección Ambiental de los E.E.U.U. (EPA), aún existen compañías proveedoras de sustancias relacionadas con el PFOS en el mercado mundial. De estas, seis están ubicadas en Europa, seis en Asia (cuatro de ellas en Japón) y una en Latinoamérica (OECD 2002). Es posible que esta lista no esté actualizada ni sea exhaustiva. Además, el PFOS se sigue utilizando en muchos países (UNEP 2006).

1.1 Química del PFOS

El sulfonato de perfluorooctano puede formarse (por degradación microbiana ambiental o metabolismo en organismos de mayor tamaño) a partir de un grupo más amplio de sustancias, llamadas sustancias relacionadas con el sulfonato de perfluorooctano (UNEP 2006).

Todas estas sustancias forman parte de un gran conjunto de sulfonatos de perfluoroalquilo. La mayoría de sustancias relacionadas con el PFOS son polímeros de elevado peso molecular en los cuales el PFOS es sólo una fracción del polímero y el producto final (UNEP 2005, 2006). Las sustancias relacionadas con los PFOS se fabrican mediante un proceso específico denominado 'fluoración electroquímica' (CESE 2006).

El 14 de julio de 2005, el gobierno de Suecia presentó una propuesta para la inclusión del sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y 96 sustancias relacionadas con este en el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) (UNEP 2006).

Los PFOS son productos en los que todos los átomos de hidrógeno de una cadena de ocho átomos de carbono han sido reemplazados por átomos de flúor y por un grupo SO_3^- para formar una estructura aniónica estable, que, a su vez, puede formar una sal hidrosoluble y cristalina con metales como el litio, el sodio o el potasio, o con otros grupos catiónicos como el NH_4^+ (CESE 2006).

La combinación de propiedades orgánicas (basadas en el carbono, solubles en aceite) e inorgánicas (sal metálica, hidrosoluble) hace que las sustancias relacionadas con los PFOS sean altamente eficaces como agentes activos sobre las superficies (surfactantes) en una gama de aplicaciones especializadas (CESE 2006). Además, resisten la oxidación y son inertes, incombustibles y estables a cualquier otro tipo de descomposición, por lo tanto, una vez liberados al medio ambiente son persistentes. Por otro lado, debido a su solubilidad tanto en aceite como agua, son también bioacumulables (CESE 2006).

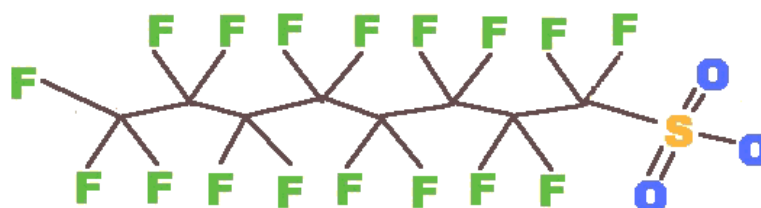


Figura 1: Estructura química del PFOS

1.2 Emisiones al medioambiente

La presencia de PFOS en el medio ambiente es el resultado de su fabricación y uso por parte de los humanos, ya que no es una sustancia que se produzca de forma espontánea (UNEP 2006). Es probable que las emisiones del PFOS y sustancias relacionadas se produzcan a lo largo de todo su ciclo de vida. Estas sustancias pueden liberarse durante su producción, incorporación a un producto comercial, distribución y uso comercial o individual, así como desde vertederos y plantas de tratamiento de aguas residuales tras su utilización (3M 2000). Los procesos de fabricación constituyen una de las principales fuentes de emisiones de PFOS al medio ambiente. Durante estos procesos es posible que se liberen

a la atmósfera sustancias volátiles relacionadas con el PFOS. A través de las aguas residuales también podrían emitirse PFOS y sustancias relacionadas (3M 2000).

La dispersión del PFOS en el medio ambiente se produce a través del transporte en las aguas superficiales o las corrientes oceánicas (Yamashita y cols., 2005), el transporte en el aire (sustancias volátiles relacionadas con el PFOS), la adsorción en partículas (en agua, sedimentos o aire) y a través de organismos vivos (3M 2003). Existen datos que muestran niveles muy elevados de PFOS en diversas partes del hemisferio norte, lejos de la presencia del hombre. La presencia de PFOS en áreas remotas ha sido originada por su transporte a gran distancia en el medio ambiente (UNEP 2006).

Por lo tanto, nos encontramos ante un contaminante global que, sin embargo, muestra un patrón de presencia variable en animales en función del área de procedencia de los mismos, siendo los animales procedentes de zonas más industrializadas (región de los grandes lagos en América del Norte, mar Báltico y mar mediterráneo) los que presentan mayores concentraciones de PFOS (Giesy y Kannan 2001).

Por otra parte, varios estudios realizados en peces han demostrado que el PFOS tiene capacidad de bioconcentración. Además, los datos muestran que los animales en los niveles tróficos más altos tienen mayores concentraciones de PFOS que los animales en los niveles más bajos, lo que indica que se produce biomagnificación. A modo de ejemplo, se han encontrado concentraciones muy elevadas de este contaminante en superdepredadores como el oso polar, la foca, el águila calva o el visón en diversos lugares (UNEP 2006).

Así, nos encontramos ante un contaminante orgánico persistente con capacidad de bioconcentración ampliamente distribuido en el planeta.

1.3 Vías de exposición humana al PFOS

Los mecanismos que conducen a la presencia de PFOS en sangre humana no han sido aún bien caracterizados, pero probablemente tengan que ver con la exposición medioambiental al PFOS o a moléculas precursoras y niveles residuales de PFOS, así como con la exposición a precursores del PFOS en los productos comerciales e industriales. Las fuentes potenciales de exposición humana a PFOS incluirían su producción y el deshecho de productos o artículos que contienen este contaminante, así como el uso o la degradación de algunos productos comerciales y de consumo una vez utilizados, incluyendo los contenedores de comida (3M 2003). Otras fuentes potenciales pueden incluir la exposición a través del aire, aguas superficiales, sedimentos y lodo, aire en espacios cerrados y polvo (Butenhoff y cols., 2006).

Dado que el PFOS se libera al medio ambiente desde las plantas de tratamiento de las aguas residuales, es decir, a través del agua, una de las principales vías de ingreso de PFOS a las cadenas alimenticias locales podría ser a través de los peces (UNEP 2006). Esta hipótesis podría verse corroborada por un estudio realizado en la población sueca, en el que se observaron niveles superiores de PFOS en sangre de mujeres que mantenían un consumo elevado de pescado (27.2 ng/g) (Berglund 2004), en comparación con las mujeres de la población general (17.8 ng/g) (Kärman y cols., 2004).

Varios estudios han revelado la existencia de PFOS en suero y tejidos de personas expuestas y no expuestas laboralmente a este contaminante, en varias especies animales y en aguas superficiales y otros compartimientos medioambientales en diversos países (Ericson y cols., 2007; Giesy y Kannan 2001; Hansen y cols., 2002; So y cols., 2004).

1.3.1 Estudios de exposición ocupacional

Las concentraciones más elevadas de PFOS en humanos se han hallado en personas expuestas laboralmente a dicho compuesto. Los niveles más bajos de PFOS en sangre de trabajadores expuestos laboralmente a este compuesto difieren en gran medida de los niveles hallados en la población general, siendo los primeros mucho más elevados (Alexander y Olsen 2007).

Según los resultados de un estudio que analizó los niveles de PFOS en sangre de 263 trabajadores de la planta de fabricación de PFOS de 3M en Decatur, E.E.U.U., la concentración media de este compuesto fue de 1.32 partes por millón (ppm); los valores oscilaron de 0.06 a 10.6 ppm. Este mismo estudio analizó también las concentraciones de PFOS en sangre de 255 trabajadores de la planta de 3M en Antwerp, Bélgica, las cuales mostraron ser aproximadamente un 50% inferiores a las halladas entre los trabajadores en Decatur (Olsen y cols., 2003a; UNEP 2006).

En general, la investigación indica que la media de concentración de PFOS en sangre de personas que trabajan en la producción de fluoroquímicos depende de la tarea realizada dentro de la planta, las concentraciones se hallan entre 500 y 2000 ng/ml. Sin embargo, los diferentes análisis transversales y longitudinales, llevados a cabo con trabajadores en la producción de sustancias fluoroquímicas, no han revelado cambios en los parámetros hematológicos, lipídicos, hepáticos, tiroideos o urinarios estudiados (Alexander y Olsen 2007).

Un estudio realizado con trabajadores de una planta de PFOS y sustancias relacionadas reveló que no existía una mayor prevalencia de enfermedades hepáticas (incluyendo tumores), cáncer de vejiga, trastornos en el metabolismo tiroideo y lipídico y trastornos en la reproducción entre estos trabajadores. En cambio, sí se observó una mayor incidencia de trastornos en el tracto biliar, cistitis, pólipos benignos en el colon, tumores malignos colorectales, y melanoma maligno (Olsen y cols., 2004a).

1.3.2 Estudios de exposición en población general

Con respecto al grado de impregnación en la población general, una serie de estudios ha mostrado la existencia de concentraciones de PFOS en muestras de sangre de personas no expuestas laboralmente a dicho compuesto (Ericson y cols., 2007). Estas muestras incluyen sangre del cordón umbilical y sangre materna (Inoue y cols., 2004; Midasch y cols., 2007). Se han encontrado también concentraciones de PFOS en leche materna (Kärrman y cols., 2007) y plasma (Guruge y cols., 2005), así como en hígado de cadáveres (Olsen y cols., 2003c).

La gran mayoría de los datos existentes sobre las concentraciones de PFOS en sangre humana provienen de estudios realizados en Estados Unidos y Japón (Butenhoff y cols., 2006). En Estados Unidos, se ha cifrado la concentración media de PFOS en sangre humana en aproximadamente 20-40 ng/ml, las muestras analizadas para llevar a cabo tal estimación fueron recogidas entre participantes del "Nutrition and Health Examination Survey" (NHANES), donantes de la Cruz Roja y niños (Alexander y Olsen 2007).

En un estudio basado en el análisis de muestras de sangre provenientes de 473 donantes de diferentes países (Estados Unidos, Colombia, Brasil, Bélgica, Italia, Polonia, India, Malasia y Corea) se observaron diferencias en los niveles de PFOS y componentes relacionados dependiendo del país de procedencia de las muestras. En concreto, se hallaron concentraciones más elevadas de PFOS en las muestras recogidas en Estados Unidos y Polonia (>30 ng/ml) y concentraciones moderadas en las muestras recogidas en Corea, Bélgica, Malasia, Brasil, Italia y Colombia (3 a 29 ng/ml), las concentraciones más bajas de PFOS en sangre se observaron en la sangre proveniente de la India. Estos datos sugieren la existencia de diferencias en los patrones de exposición humana a este contaminante dependiendo del país de residencia (Kannan y cols., 2004).

En lo referente a las concentraciones de PFOS en sangre en función del sexo, los resultados publicados hasta la fecha son poco congruentes. Por una parte, se ha sugerido que las concentraciones de PFOS son más elevadas en hombres que en mujeres (Harada y cols., 2004). No obstante,

existen otros estudios que muestran que no hay diferencias entre sexos en los niveles del PFOS en sangre (Corsolini y Kannan 2004; Kubwabo y cols., 2004; Olsen y cols., 2004b; Olsen y cols., 2003b).

La falta de diferencias claras entre sexos difiere de la tendencia observada en otros contaminantes lipofílicos, como los PCB (policlorobifenilos). Las concentraciones de PCB suelen ser más elevadas entre los hombres adultos que entre las mujeres en edad adulta (Ericson y cols., 2007). Kannan y otros (2004) sugirieron que este hecho podría deberse a la transferencia de estos contaminantes hacia la descendencia, a través del parto y la lactancia, por parte de la mujer adulta, algo que no ocurriría en el caso de los PFC (Kannan y cols., 2004). Sin embargo, estudios recientes muestran que los PFOS traspasan la barrera de la placenta (Midasch y cols., 2006) y que a través de la lactancia se transfiere una cantidad importante de PFOS al neonato (Kärrman y cols., 2007).

A día de hoy sólo existe un estudio en el que se hayan evaluado los niveles de PFOS en sangre entre la población catalana, en él se describen niveles más bajos de PFOS en sangre que los descritos con anterioridad en otros países (hombres: 8.47 ± 3.90 ng/ml, mujeres: 6.81 ± 2.98 ng/ml). Estos resultados estarían en consonancia con los aportados por otros trabajos realizados con muestras de sangre de europeos, ya que describen niveles más bajos que los observados en Norte América (Ericson y cols., 2007).

1.4 Toxicocinética del PFOS

Estudios toxicocinéticos realizados en animales indican que el PFOS es rápidamente absorbido, distribuido y acumulado en plasma e hígado. Las concentraciones de PFOS en hígado pueden ser varias veces más elevadas que en sangre (Johnson y Ober 1979; Seacat y cols., 2003; Seacat y cols., 2002). De hecho, el hígado parece ser el órgano diana de esta sustancia (Butenhoff y cols., 2006).

A diferencia de otros COP clorados y bromados, el PFOS no se acumula en grasas (Lau y cols., 2004). La razón de este fenómeno es que el PFOS es al mismo tiempo hidrofóbico y lipofóbico. El PFOS se une preferentemente a proteínas en el plasma, como la albúmina (Kerstner-Wood y cols., 2003), y a

las proteínas hepáticas transportadoras de ácidos grasos en el hígado (Luebker y cols., 2002a).

Además de acumularse en plasma e hígado, un estudio llevado a cabo con ratas describe concentraciones de PFOS en tejidos como el corazón, los riñones, el bazo, los ovarios y las glándulas suprarrenales. Se observó también una acumulación de PFOS en varias partes del cerebro: córtex, hipocampo, hipotálamo, tronco cerebral y cerebelo, presentando el hipotálamo niveles de PFOS 3 veces superiores a los de las otras estructuras encefálicas (Austin y cols., 2003).

1.4.1 Estudios de vida media

Diversos estudios indican que el PFOS es un compuesto químico pobremente eliminado. Se ha estimado que la vida media para la eliminación del mismo a través de la orina y las heces es de más de 90 días en ratas macho (Johnson y cols., 1984; Johnson y Ober 1979; Seacat y cols., 2003). Su vida media plasmática se estima en 7.5 días en ratas, tras un tratamiento vía oral con este contaminante (Johnson y Ober 1979), y en aproximadamente 100 - 200 días en monos *Cynomolgus*, tanto machos como hembras, después de un tratamiento con una duración de 6 meses (Noker y Gorman 2003; Seacat y cols., 2002).

Análisis realizados con suero de antiguos trabajadores en una planta de producción de PFOS mostraron que este contaminante cuenta con una vida media de aproximadamente 5 años en humanos (Olsen y cols., 2007). Estos datos sugieren que existen grandes diferencias en la cinética de la eliminación del PFOS entre especies (Harada y cols., 2005a).

1.5 Estudios de toxicidad en animales

A pesar de que los efectos tóxicos del PFOS no están aún bien establecidos, existen pruebas de toxicidad en mamíferos a raíz de exposiciones agudas, crónicas y subcrónicas en ratas, exposiciones subcrónicas en monos, y un estudio de dos generaciones en ratas. Hay resultados disponibles de estudios reproductivos y de teratogenicidad en roedores y conejos (UNEP 2006).

1.5.1.1 Toxicidad materna y prenatal

Se han llevado a cabo estudios en rata, ratón y conejo para determinar la toxicidad materna y los efectos teratológicos del PFOS. Los hallazgos de dichos experimentos parecen coincidir entre laboratorios y especies examinadas (Lau y cols., 2004).

Toxicidad materna

Diversos estudios experimentales realizados en roedores muestran que las madres expuestas a dosis elevadas de PFOS (2-10 mg/kg/día en rata y 20 mg/kg/día en ratón) presentaron reducciones significativas en el incremento de peso corporal y una disminución en el consumo de comida durante la gestación (Lau y cols., 2004).

También en roedor, se han observado concentraciones de PFOS en sangre e hígado maternos directamente proporcionales a las dosis de tratamiento utilizadas. Los niveles hallados en hígado materno fueron como mínimo tres veces superiores a los encontrados en sangre (Luebker y cols., 2005b; Thibodeaux y cols., 2003). Además, en ratón, las madres tratadas con las dosis de PFOS más elevadas (10-20 mg/kg/día) presentaron hepatomegalia (Thibodeaux y cols., 2003).

Por otra parte, se ha descrito que el tratamiento con PFOS a dosis de 0.4, 0.8, 1, 1.2, 1.6 y 2 mg/kg/día redujo los niveles de colesterol en sangre de rata gestante. Dentro del mismo estudio, la administración de 2 mg/kg/día de PFOS redujo, además, la concentración de glucosa en sangre (Luebker y cols., 2005b). Los niveles de triglicéridos se vieron también disminuidos en sangre e hígado de ratas tratadas con dosis de 1.6 y 2 mg/kg/día (Luebker y cols., 2005b) y en sangre de ratas tratadas con 10 mg/kg/día (Thibodeaux y cols., 2003), así como en ratones gestantes expuestos a 5 y 20 mg/kg/día (Thibodeaux y cols., 2003). Estos cambios resultaron particularmente evidentes en los grupos tratados con dosis más elevadas. Los datos aquí expuestos sugieren que los PFOS interfieren en el metabolismo de los lípidos.

Se han descrito, además, variaciones en los niveles de determinadas hormonas en suero materno en rata y ratón tras la exposición a PFOS. Los niveles de tiroxina (T4) libre y total y triyodotironina (T3) total en ratas gestantes tratadas con PFOS durante los días de gestación (GD) 2-20 se vieron reducidos en todas las dosis de tratamiento con este compuesto (1, 2, 3, 5 y 10 mg/kg/día), incluso desde la primera semana de tratamiento en algunos grupos (Thibodeaux y cols., 2003). En ratón, las madres tratadas con 20 mg/kg/día presentaron niveles más bajos de T4 total. Los efectos adversos del PFOS sobre las hormonas tiroideas parecen ser menos pronunciados en ratón que en rata (Thibodeaux y cols., 2003). En ningún caso se observó respuesta de retroalimentación por parte de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (Luebker y cols., 2005b; Thibodeaux y cols., 2003).

En un estudio, en el cual se administró PFOS a ratas durante las 6 semanas previas al cruce, el periodo de cruce, la gestación y la lactancia, se observaron niveles de T4 total disminuidos en las madres tratadas con 0.4, 0.8, 1, 1.2, 1.6 y 2 mg/kg/día, a su vez los grupos tratados con dosis superiores o iguales a 1.2 mg/kg/día mostraron también niveles reducidos de T3 total. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de T4 libre ni en los niveles de TSH. La determinación de dichas hormonas se llevó a cabo durante el quinto día de lactancia (Luebker y cols., 2005b).

La falta de respuesta hipofisaria y la disminución de hormonas tiroideas en madres gestantes expuestas a PFOS es un tema complejo que se sigue estudiando. Los cambios hormonales producidos durante la gestación y el aumento del volumen plasmático, que se produce al final de la gestación, así como la posible inducción enzimática producida por los PFOS, junto con el cambio en los niveles de proteínas plasmáticas circulantes, son variables que podrían influir en los resultados obtenidos en relación a la función tiroidea. Por otra parte, un estudio reciente muestra que el PFOS en suero interfiere en la detección de hormonas tiroideas con la mayoría de los métodos utilizados (Chang y cols., 2008; Chang y cols., 2007).

El estudio de seguimiento de dos generaciones en rata, en el que las ratas de la F0 y la F1 fueron tratadas antes del apareamiento, durante la

gestación y la lactancia a dosis de 0, 0,1, 0.4, 1.6 y 3.2 mg/kg/día, que evalúa los efectos del PFOS sobre el apareamiento, fertilidad y desarrollo tras la lactancia, describe áreas de alopecia parcial entre las hembras tratadas con PFOS de la generación 0 ("F 0"). No se observó ningún efecto de este compuesto, entre las hembras de la generación 0, sobre el apareamiento o la fertilidad, los índices valorados incluyeron el estro, el número de embarazos en relación con el número de apareamientos y el número de apareamientos durante la primera semana de cohabitación. Los datos provenientes de las cesáreas, realizadas durante el día de gestación 10, tampoco revelaron diferencias estadísticamente significativas, entre las madres de la generación 0, en la media de cuerpos lúteos por camada, implantaciones, embriones viables o embriones no viables. Sin embargo, sí se observó una disminución en la duración de la gestación y en el número de implantaciones, así como un aumento en el número de madres con crías muertas en el parto o durante los primeros 4 días de la lactancia, entre las madres de la generación 0 expuestas a 3.2 mg/kg/día (Luebker y cols., 2005a). Estos datos sugieren que los efectos del PFOS se producen mayoritariamente en fases tardías de la gestación.

Este mismo estudio estableció el NOAEL (nivel sin efectos adversos observados) para la toxicidad materna en 0.1 mg/kg/día en la generación 0 y ≥ 0.4 mg/kg/día en la generación 1. Respecto a la función reproductora del PFOS, su NOAEL se estimó en ≥ 3.2 mg/kg/día en la generación 0 y en ≥ 0.4 mg/kg/día en la primera generación (Luebker y cols., 2005a).

Toxicidad prenatal

Los hallazgos de los estudios realizados revelan que el PFOS posee efectos sobre el desarrollo que incluyen una reducción del peso fetal, una mayor incidencia en la aparición de paladar hendido, anasarca (edema), retrasos en la osificación (esternón y falanges) y anormalidades cardíacas (defecto ventricular septal y dilatación de la aurícula derecha). Es importante recalcar que la mayoría de estas anormalidades estructurales se ha observado en los animales expuestos a las dosis más elevadas de PFOS dentro de los diferentes estudios (Lau y cols., 2004).

A pesar de que se han descrito abortos en conejos tratados con dosis de 2.5 mg/kg/día de PFOS y superiores (Luebker y cols., 2005a), ningún estudio ha descrito abortos en rata o ratón.

Por otra parte, se han hallado concentraciones de PFOS en hígado de los fetos expuestos a este compuesto (Luebker y cols., 2005b; Thibodeaux y cols., 2003) y en sangre (Luebker y cols., 2005b) directamente proporcionales a la dosis maternas de tratamiento.

Grasty y otros (2003) llevaron a cabo un estudio para determinar los periodos críticos de toxicidad del PFOS durante la gestación, administrando PFOS vía gástrica a ratas gestantes durante periodos de 4 días consecutivos en diferentes momentos temporales a lo largo de la gestación. Se observó mortalidad neonatal tras la exposición a PFOS en todos los periodos de administración, pero la incidencia de muerte neonatal incrementó a medida que el periodo de exposición se acercaba al final de la gestación. La exposición de ratas gestantes a 25 mg/kg/día de PFOS durante los días de gestación 17-20 ó a 50 mg/kg/día de PFOS durante los días de gestación 19 y 20 fue suficiente para inducir la mortalidad del 100% de las crías durante los primeros 4 días de vida (Grasty y cols., 2003).

Por lo tanto, los datos existentes hasta la fecha sugieren que el PFOS provoca más efectos tóxicos durante las fases tardías de la gestación y el periodo perinatal. Las causas que explican esta mayor toxicidad durante este periodo pueden ser múltiples, sin embargo, estas son aún desconocidas.

Al respecto, los resultados del estudio realizado por Grasty y otros (2003) sugieren que los órganos que se desarrollan durante la fase tardía de la gestación podrían verse especialmente afectados por la acción del PFOS en el organismo (Grasty y cols., 2003). Esta última hipótesis sería consistente con la falta de efectos teratológicos de importancia hallada en los diferentes trabajos (Lau y cols., 2004).

1.5.1.2 Toxicidad postnatal

Los estudios basados en los efectos del PFOS sobre el desarrollo postnatal describen efectos similares de este compuesto en animales a pesar de utilizar paradigmas experimentales diferentes (Lau y cols., 2004).

En el estudio llevado a cabo por Lau y otros (2003), el PFOS produjo efectos nocivos dependientes de la dosis en crías de rata y ratón. En rata, todas las crías del estudio nacieron vivas y activas, pero en el transcurso de 30-60 min, todas las crías de las madres tratadas con la dosis más elevada del estudio (10 mg/kg/día) murieron. La mayoría de las crías expuestas a la segunda dosis más alta dentro del estudio (5 mg/kg/día) murieron también, tan sólo unas cuantas llegaron vivas a la pubertad. El periodo de tratamiento en rata gestante se inició el DG 2 y se finalizó el DG 21. Cuando se hizo que las madres del grupo control cuidaran de las crías de las madres tratadas con 5 mg/kg de PFOS (Cross-fostering), no se observó ninguna diferencia en la tasa de supervivencia de las crías, descartando así la hipótesis de que este compuesto hubiese producido comportamientos maternos inadecuados en las madres (Lau y cols., 2003).

En ratón se observó un patrón similar de mortalidad postnatal al de la rata, con la excepción de que las dosis maternas requeridas para producir este efecto fueron más elevadas. La mayoría de las crías expuestas a 15 ó 20 mg/kg de PFOS, durante el periodo de tratamiento DG 1-18, no sobrevivió 24 horas después del nacimiento. La dosis letal 50 (DL50) se estableció en 3mg/kg en rata y en 10 en ratón (Lau y cols., 2003).

Estudios realizados por otros autores, siguiendo protocolos experimentales diferentes, sugieren resultados similares respecto a la viabilidad de las crías de roedores tratados con PFOS a dosis elevadas. Un importante porcentaje de crías expuestas a dosis altas de este compuesto muere días después del parto (Butenhoff y cols., 2002; Chrisitan y cols., 1999; Luebker y cols., 2005a; Luebker y cols., 2005b), los estudios de Cross-fostering no logran reducir la tasa de mortalidad (Case y cols., 2001). Luebker y otros (2005) estimaron el NOAEL para la mortalidad postnatal

en su estudio de seguimiento de dos generaciones en rata, esta se estableció en 1.6 mg/kg/día en la generación 0 y en ≥ 0.4 mg/kg/día en la generación 1 (Luebker y cols., 2005a).

Respecto al peso corporal, se han descrito pesos más bajos en crías de roedor expuestas a PFOS prenatalmente, este efecto persiste, en ocasiones, hasta más allá de la lactancia (Butenhoff y cols., 2002; Chrisitan y cols., 1999; Lau y cols., 2003; Luebker y cols., 2005a). Además, tal y como se ha observado en madres gestantes, se ha detectado un aumento del peso del hígado en crías de rata y ratón expuestas prenatalmente a PFOS, este efecto resulta particularmente evidente en crías de ratón (Lau y cols., 2003). Por otra parte, las concentraciones de PFOS en sangre e hígado más altas se dieron en las crías expuestas a las dosis más elevadas, como ocurre también entre las madres tratadas con este contaminante (Luebker y cols., 2005b).

Existe también acuerdo entre los diferentes estudios respecto al retraso observado en la maduración física en crías de roedor expuestas a PFOS prenatalmente. Se han descrito retrasos en parámetros físicos como la apertura de los ojos (Lau y cols., 2003; Luebker y cols., 2005a) y el desplegamiento del pabellón auditivo (Luebker y cols., 2005a), así como en variables de maduración neuromotora como el reflejo de enderezamiento superficial ("surface righting") y el reflejo de enderezamiento en el aire ("air righting") (Luebker y cols., 2005a). Se entiende como "surface righting" la habilidad que muestra el animal para volver a la posición dorso-ventral después de ser colocado boca para arriba sobre una superficie, mientras que como "air righting" se entiende la capacidad mostrada por el animal para girarse hacia abajo desde una posición supina durante una caída.

Por otra parte, se han mostrado niveles reducidos de hormonas tiroideas en suero de neonatos expuestos a PFOS por vía materna, observándose una disminución en los niveles de tiroxina (T4) total, pero no en los niveles de triyodotironina (T3). Los niveles en la hormona estimulante de la tiroides (TSH), o bien no se vieron afectados, o presentaron un ligero aumento (Lau y cols., 2003; Luebker y cols., 2005b).

Aunque diversos estudios han analizado los niveles hormonales en animales expuestos a PFOS, existen problemas en la detección de los mismos derivados de la técnica. Un estudio reciente ha podido demostrar que los PFOS en suero compiten con la T4 por la unión a proteínas transportadoras plasmáticas e interfieren en la detección de estas hormonas según el método utilizado (Chang y cols., 2007). En este sentido, se ha podido demostrar que los PFOS aumentan el recambio de T4 total, facilitando el paso de esta a T4 libre. Además, también aumentan la excreción de T4. Este hecho explica que los resultados muestren una disminución de T4 total pero no hallen modificaciones en los niveles de TSH, ya que los niveles de T3 y T4 libres, que serían los responsables de inducir una respuesta compensatoria incrementando la concentración de TSH, son prácticamente normales. Por otro lado, en este mismo estudio se demuestra que el eje hipotálamo-hipofisario no se ve afectado por la exposición a PFOS (Chang y cols., 2008). Con todo, la importancia que poseen las hormonas tiroideas sobre el desarrollo del SNC y la posibilidad de que los PFOS provoquen ligeros déficits en los niveles de hormonas tiroideas durante el desarrollo son motivos suficientemente importantes que justifican que se siga estudiando este tema.

Las hormonas tiroideas poseen múltiples funciones fisiológicas. En esencia, estas modulan las vías metabólicas en el organismo a través de cambios en el metabolismo de las proteínas, lípidos, carbohidratos y vitaminas. Además, las hormonas tiroideas poseen efectos sobre la síntesis y degradación de otras muchas hormonas y factores de crecimiento, influyendo indirectamente sobre la señalización endocrina (Smith y cols., 2002). Muchas investigaciones recientes se centran en la actividad de estas hormonas en el sistema nervioso central. Se ha demostrado, en rata, que un déficit de hormonas tiroideas durante el desarrollo fetal afecta la maduración de la glía en el hipocampo, alterando, en consecuencia, la migración celular dentro de esta región del cerebro (Smith y cols., 2002). El desarrollo adecuado del cerebro, en general, y el funcionamiento correcto del sistema colinérgico, en particular, dependen en gran medida de las hormonas tiroideas (Gould y Butcher 1989; Rami y cols., 1989).

No obstante, la patofisiología que subyace bajo la mortalidad neonatal derivada de la exposición a PFOS es aún desconocida. Luebker y otros (2005) concluyen en su estudio de toxicidad reproductiva en dos generaciones, en rata, que esta no se debe a la reducción en los niveles de lípidos, glucosa u hormonas tiroideas (Luebker y cols., 2005b).

En general, los efectos del PFOS sobre el desarrollo postnatal descritos en estos estudios (peso corporal reducido, retraso en la maduración física y neuromotora, aumento en el peso del hígado y reducción en los niveles de las hormonas tiroideas) son consistentes entre sí. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estos efectos han sido observados a dosis que también son tóxicas para las madres. Su importancia, por lo tanto, queda un poco mitigada por el hecho de darse en presencia de déficits en el aumento de peso y consumo de alimento en la madre (Butenhoff y cols., 2006). Por otra parte, la malnutrición maternal no parece ser el único factor responsable de estos efectos nocivos sobre el desarrollo (Lau y cols., 2004).

1.5.2 Estudios en adultos

Varios estudios de dosis repetidas subcrónicas llevados a cabo en primates no humanos y en roedores adultos demuestran que el PFOS tiene efectos adversos. En general, se ha mostrado que el tratamiento con PFOS reduce el peso corporal, aumenta el peso del hígado y reduce los niveles de colesterol y hormonas tiroideas en suero (Butenhoff y cols., 2006; Lau y cols., 2004).

Estudios realizados en primates muestran casos de mortalidad elevada tras la administración de PFOS a dosis altas. En un estudio de 90 días realizado en monos Rhesus, expuestos a sal de potasio de PFOS mediante sonda gástrica, se observó que la exposición a 4.5 mg/kg/día produjo la mortalidad de todos los animales (n=4). No se observó ninguna muerte a dosis de 0.5 ó 1.5 mg/kg/día, sin embargo estos animales presentaron signos de toxicidad gastrointestinal (Goldenthal y cols., 1978). Seacat y otros (2002) demostraron mortalidad entre monos *Cynomolgus* (2 de 6 machos) a dosis más bajas (0.75 mg/kg/día durante 182 días de tratamiento) (Seacat y cols., 2002).

Otros efectos observados en primates adultos, tras la exposición a este contaminante, son la atrofia del timo en hembras y una reducción de lipoproteínas de alta densidad, colesterol, triyodotironina y niveles de bilirrubina total en machos (Covance 2002). Además, en el estudio llevado a cabo por Seacat y otros (2002), se detectaron una disminución del peso corporal, un incremento en el peso del hígado y concentraciones reducidas de colesterol, triyodotironina y estradiol en suero. Cabe resaltar que estos efectos fueron sólo observables en los animales tratados con la dosis más alta dentro del estudio (0.75 mg/kg/día) (Seacat y cols., 2002).

Los efectos del PFOS en estudios realizados en roedores adultos no difieren en gran medida de los hallados en primates no humanos, aunque existe un mayor número de trabajos y variables estudiadas en comparación con los estudios realizados en primates.

En un estudio de 90 días de exposición a PFOS en ratas se alimentó a los animales con dietas con 0, 30, 100, 300, 1000 y 3000 mg/kg/día. Debido a que se trataba de dosis muy elevadas, todas las ratas tratadas con las dosis de 300 mg/kg/día y superiores murieron. A niveles de 100 mg/kg/día murió el 50% de los animales. Todas las ratas que recibieron dietas con 30 mg/kg/día sobrevivieron hasta el final del estudio, pero se observaron pequeños cambios en el peso de órganos y cuerpo (Goldenthal y cols., 1978).

Se han descrito efectos que incluyen niveles reducidos de glucosa en suero y un aumento de la alanina aminotransferasa (ALT) en hembras. Estos animales habían sido previamente tratados con 20 ppm de PFOS en dieta durante 4 semanas. Tras 14 semanas de exposición a 20 ppm de PFOS en la dieta, se observaron los siguientes efectos en machos: niveles reducidos de colesterol, un nivel incrementado de neutrofilos no segmentados y un aumento en los niveles de ALT. Se detectaron un incremento del peso relativo del hígado y un incremento en los niveles de nitrógeno ureico en ambos sexos tras 14 semanas de tratamiento con la misma dosis. Por último, se describieron alteraciones hepáticas, que incluían hipertrofia de los hepatocitos y vacuolización citoplasmática, en los grupos de machos tratados con 5 o 20 ppm y en el grupo de hembras tratado con 20 ppm.

Los niveles de PFOS hallados en estos animales, tanto en suero como en hígado, fueron proporcionales a la dosis administrada. En general, las concentraciones fueron más elevadas en hembras que en machos (Seacat y cols., 2003).

Austin y otros (2003) realizaron un estudio con ratas hembra, a las que se les inyectó 0, 1 ó 10 mg/kg/día de PFOS intraperitonealmente durante 2 semanas. Estos autores describieron acumulaciones de PFOS dependientes de la dosis en varios tejidos corporales, incluyendo el cerebro. La exposición a PFOS redujo el peso corporal y el consumo de comida en el grupo expuesto a la dosis de PFOS más elevada. Además, el tratamiento con PFOS afectó el ciclo del estro, aumentó los niveles de corticosterona en suero e incrementó las concentraciones de norepinefrina en el núcleo paraventricular del hipotálamo, mientras que disminuyó la concentración de leptina en suero. A partir de los resultados obtenidos en el estudio, el autor arguye que la exposición a PFOS puede afectar el sistema neuroendocrino en rata (Austin y cols., 2003).

Se han descrito las siguientes vías como posibles mecanismos de acción del PFOS: la activación de los receptores nucleares (Shipley y cols., 2004), la interferencia en el metabolismo lipídico y la disminución del colesterol en sangre (Haughom y Spydevold 1992; Luebker y cols., 2002a; Luebker y cols., 2002b), el retraso de la maduración de los pulmones y la función pulmonar (Grasty y cols., 2003), la interferencia con las funciones mitocondriales (Berthiaume y Wallace 2002; Starkov y Wallace 2002), la inhibición de los procesos de comunicación intercelulares por alteración de las zonas de unión entre células "gap junctions" (Hu y cols., 2002), las interacciones con las proteínas transportadoras de ácidos grasos (Luebker y cols., 2002a), hepatotoxicidad (proliferación de peroxisomas) (Sohlenius y cols., 1993), alteraciones en los canales de calcio (Harada y cols., 2005b) y alteraciones en los niveles maternos y fetales de las hormonas tiroideas (Lau y cols., 2003; Luebker y cols., 2005b; Thibodeaux y cols., 2003). Sin embargo, hasta la fecha, los mecanismos de toxicidad del PFOS siguen sin ser entendidos (Butenhoff y cols., 2006).

1.5.3 Estudios neuroconductuales

La información referente al desarrollo neuroconductual de las crías expuestas prenatalmente a PFOS es muy limitada. Por otra parte, hasta la fecha, no se han llevado a cabo estudios de neurocomportamiento con adultos expuestos a dosis repetidas subcrónicas de PFOS.

Tan sólo dos estudios han evaluado los efectos de este compuesto sobre la conducta de roedores. En orden cronológico, en el primer de ellos se evaluó el aprendizaje en crías de ratas expuestas a dosis de 0, 1, 2, 3, 5 ó 10 mg/kg/día de PFOS vía sonda gástrica durante los días de gestación 2-21 y en ratones expuestos prenatalmente a PFOS a dosis de 0, 1, 5, 10, 15 y 20 mg/kg/día durante los días de gestación 1-18. Los animales fueron evaluados durante el periodo de lactancia con la prueba del laberinto-T para la evaluación del aprendizaje. No se hallaron diferencias en la ejecución de esta prueba según dosis de tratamiento (Lau y cols., 2003).

El segundo estudio es el trabajo de toxicidad reproductiva en dos generaciones llevado a cabo por Luebker y otros (2005). En él se administró PFOS vía sonda gástrica a ratas a dosis de 0, 0.1, 0.4, 1.6 y 3.2 mg/kg/día. Con el objeto de examinar los efectos del PFOS a nivel de conducta, se realizó una evaluación del aprendizaje, la retención a corto plazo y la memoria, en un paradigma de evitación pasiva en los animales de la generación 1 ("F1"), cuando contaban con 24 días de edad. Aproximadamente 70 días después del parto, los animales fueron evaluados en un laberinto acuático de Morris para observar posibles deficiencias en la coordinación neuromuscular, la habilidad para nadar, el aprendizaje y la memoria espacial. Ninguna de las dos pruebas efectuadas mostró efectos del PFOS (Luebker y cols., 2005a).

Como se ha descrito con anterioridad, diversos estudios muestran que la exposición a PFOS, durante el desarrollo en roedores (Luebker y cols., 2005a) y en la edad adulta en roedores (Lau y cols., 2004) y en primates (Seacat y cols., 2002), reduce los niveles de hormonas tiroideas en sangre. En este sentido, cabe destacar que las hormonas tiroideas poseen

muchas funciones fisiológicas y son esenciales para el desarrollo neurológico, intelectual y del comportamiento. Estas poseen un amplio espectro de efectos sobre el cerebro en desarrollo y median en operaciones importantes dentro del sistema nervioso central a lo largo de la vida.

La aportación insuficiente de yodo durante la gestación y la deficiencia de hormonas tiroideas durante el desarrollo se asocian con alteraciones patológicas como el cretinismo y el retraso mental. En la edad adulta, la disfunción de las tiroides está relacionada con anomalías neurológicas y de comportamiento, incluyendo problemas de memoria. Diferentes modelos animales experimentales sugieren que la mayoría de efectos sobre la cognición provocados por la disfunción de las tiroides resultan en modificaciones del hipocampo. Los niveles deficientes de THS durante el desarrollo alteran la función sináptica en esta estructura, afectando negativamente las tareas de aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo. Estos efectos sobre el aprendizaje, por parte de las hormonas tiroideas, persisten en animales adultos (Rivas y Naranjo 2007).

Como hemos mencionado con anterioridad, se ha sugerido recientemente que los PFOS no afectan al eje hipotálamo-hipofisario-tiroideo, aunque sí parece que los niveles de T4 totales están alterados tras la exposición a este contaminante. Parece también que los niveles de T3 y T4 libres, fracciones activas de esta hormona, son normales o presentan déficits ligeros, tras la exposición a PFOS. Desconocemos aún hasta qué punto pueden ser estos déficits responsables de algunos de los retrasos observados durante el desarrollo de sujetos expuestos a PFOS.

2. El estrés

La palabra estrés deriva del termino griego "stringere", que significa "provocar tensión". A principios del siglo XX, William Osler equiparó el término "estrés" con "trabajo duro" y "tensión", relacionando así el concepto físico de estrés con diversas conductas humanas y respuestas del organismo ante situaciones de demanda excesiva. Continuando con la investigación de los efectos del estrés sobre el organismo, Walter Cannon

(1929) mostró que la respuesta ante el estrés constituye una conducta adaptativa que prepara al organismo para atacar o huir ante una amenaza. Esta respuesta automática se produce de forma refleja, a través de la estimulación del sistema nervioso simpático y la secreción de adrenalina por las glándulas suprarrenales. Sin embargo, el origen del concepto estrés, tal y como se entiende actualmente, fue desarrollado en la década de 1930 por el fisiólogo Hans Selye (1907-1982) (Sandi y cols., 2001).

Selye observó, a través de sus experimentos, que tanto las ratas tratadas como las del grupo control, a las que les había inyectado un concentrado de hormonas, acababan presentando síntomas de enfermedad (Sapolsky 1995). Este autor observó 3 grupos diferentes de signos:

- 1.** Hipertrofia de la corteza de las glándulas suprarrenales.
- 2.** Atrofia de diversos órganos del sistema inmunológico, como el timo, el bazo, o los nódulos linfáticos.
- 3.** Úlceras profundas y sangrantes en el estómago y los intestinos.

Selye tildó estos cambios como “la tríada del estrés”. Este autor llegó a la conclusión de que las ratas presentaban este conjunto de alteraciones debido a su inexperiencia personal en las técnicas experimentales de manejo de animales. Sometió a prueba la hipótesis y observó los mismos signos en ratas expuestas a ambientes demasiado calurosos o demasiado fríos, a toxinas patógenas y a ruidos muy intensos (Sapolsky 1995).

Según Selye, el término “estrés” se refiere a un estado o situación del cuerpo producido por diversos agentes nocivos (que varían en los distintos sujetos y en el mismo individuo según los momentos), manifestado por un conjunto de cambios que dan a conocer la presencia del estrés en el cuerpo (Selye 1936). A este conjunto de cambios lo denominó *Síndrome General de Adaptación*.

Otras definiciones más actuales del concepto son:

- "Definimos estrés como un estado de no armonía, o homeostasis amenazada. La respuesta adaptativa puede ser específica o generalizada y no específica" (Chrousos y Gold 1992).
- "Se puede definir el estrés como una amenaza, real o interpretada, hacia la integridad física y psicológica de una persona que resulta en respuestas fisiológicas y/o de comportamiento. En biomedicina, estrés se refiere a situaciones en las que los niveles de glucocorticoides y catecolaminas se muestran elevados debido a una experiencia" (McEwen 2000).

Sin embargo, estas definiciones, así como la mayoría de definiciones propuestas para definir este concepto, son problemáticas. Resulta difícil consensuar una definición del estrés que englobe todos los elementos relacionados (Levine 2005).

2.1 Fisiología del estrés

A grandes rasgos, la respuesta de estrés ayuda al organismo a la hora de movilizar las reservas energéticas del cuerpo para preparar la conducta de "lucha" o "huida" ("fight" or "fly" en inglés) (Sapolsky y cols., 1990). Además, pueden darse otras respuestas cognitivas y conductuales asociadas (Nieto y cols., 2004).

Las situaciones de estrés producirán un aumento general de la activación fisiológica del organismo. Se pueden distinguir tres ejes de actuación del estrés (Nieto y cols., 2004):

I. Eje neural

Este eje parece activarse de manera inmediata ante la presencia de un estresor, provocando una activación simpática y, en casos excepcionales, parasimpática, así como un incremento en la estimulación del sistema nervioso somático. Sólo en respuesta a una activación inicial excesivamente intensa, al estado precario de alguno de los órganos o a ambas causas, se podría producir un trastorno (p.ej., infarto de miocardio u otra alteración

vascular). Esta estimulación se irá reduciendo de forma lenta (de quince a treinta minutos) si la situación de estrés desaparece.

II. Eje neuroendocrino

Implica la activación de la médula de las glándulas suprarrenales, con la consiguiente secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). La activación de este eje tiene gran importancia para la supervivencia, pues prepara al organismo para una intensa actividad corporal con la que enfrentarse a cualquier amenaza externa, bien haciéndole frente (luchando), bien escapando de ella. Se considera, pues, el eje más directamente relacionado con la puesta en marcha de las conductas de afrontamiento a las demandas del medio, siempre que impliquen alguna actividad. Una activación mantenida de este eje facilitará la aparición de problemas cardiovasculares (infartos de miocardio, angina de pecho, hipertensión, etc.).

III. Eje endocrino

Activación del eje Hipotálamo- Hipofisario- Adrenal (HPA)

Este eje responde a su activación provocando la liberación de las siguientes hormonas:

- Factor u hormona liberadora de corticotropina (CRH), antidiurética o arginina vasopresina (AVP), oxitocina y otros neuropéptidos por parte del hipotálamo.
- Hormona corticotropina (ACTH) liberada desde la hipófisis junto con opiáceos endógenos (endorfinas).
- Glucocorticoides (cortisol y corticosterona), así como mineralcorticoides (aldosterona y deoxicorticosterona), secretados por la corteza adrenal (Lightman 1994).

Las distintas vías involucradas en la información de la situación de estrés convergen en el hipotálamo. Esta estructura cerebral es la encargada de coordinar y modular la rápida respuesta del sistema simpático junto con la

activación del eje HPA, si bien esta última es más lenta, ya que se necesita al menos de varios minutos para que llegue a producirse la liberación de los glucocorticoides, productos finales de la activación del eje HPA (Sandi y cols., 2001).

Inicialmente, en respuesta a los distintos agentes estresantes, se producen señales de activación que convergen en un grupo de neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo. Estas neuronas sintetizan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), cuando estas neuronas son activadas, liberan CRH en la eminencia media, donde hay una serie de capilares que forman un sistema de vasos portales. Junto con la liberación de CRH, también se puede producir la activación de neuronas magnocelulares del hipotálamo y la síntesis de otras hormonas como la vasopresina (AVP) y la oxitocina, estas hormonas son liberadas directamente en el lóbulo posterior de la hipófisis (neurohipófisis). Los vasos portales de la eminencia media ponen en comunicación al hipotálamo con la hipófisis anterior o adenohipófisis. Al llegar a la adenohipófisis, la CRH estimula la secreción de hormona corticotropina (ACTH), así como de β -endorfina, un péptido opiáceo responsable de la analgesia asociada al estrés (Kofman 2002; Teague y cols., 2007).

Además de ejercer estas funciones, la CRH juega un papel importante en la inhibición de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) durante la respuesta de estrés. También inhibe la secreción de la hormona del crecimiento (GH, somatotropina), de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y de la tirotropina (TSH). De este modo, la CRH actuaría suprimiendo la reproducción, el crecimiento y las funciones tiroideas (Tsigos y Chrousos 2002).

Una vez secretada la ACTH a la circulación sanguínea, esta hormona activa la captación de glucosa en el músculo esquelético y, al llegar las glándulas adrenales, estimula la producción y liberación de los *glucocorticoides* a la sangre, en donde la máxima concentración de estas hormonas suele observarse a los 30 minutos de haber comenzado la situación estresante (Sandi y cols., 2001).

Los glucocorticoides

Los glucocorticoides son un tipo de hormonas esteroides que se sintetizan, principalmente en la capa fascicular de la corteza de las glándulas adrenales, a partir del colesterol (White 1994). En humanos, el principal glucocorticoide secretado es el cortisol, mientras que en distintos animales de experimentación (ratón, rata, pollos) lo es la corticosterona (Kofman 2002).

Los glucocorticoides ejercen una gran variedad de efectos, tanto en los tejidos periféricos como en el sistema nervioso central. El mecanismo principal por el que actúan estas hormonas tiene lugar mediante la unión a sus receptores específicos (Mc Master y Ray 2007).

Existen dos tipos de *receptores para los glucocorticoides*.

Tipo I (MR) Es un receptor de alta afinidad que también puede unir mineralcorticoides. Este receptor se encuentra mayoritariamente ocupado en condiciones de actividad basal del eje HPA (De Kloet 1991). Se encuentra localizado, principalmente, en las neuronas piramidales y granulares del hipocampo, el núcleo olfativo, la amígdala, el estriado, el septum y algunos núcleos hipotalámicos (Sandi y cols., 2001).

Tipo II (GR) Une glucocorticoides como el cortisol, la corticosterona o la dexametasona (un glucocorticoide sintético). Sólo se encuentra ocupado en situaciones en las que aumentan mucho los niveles circulantes de glucocorticoides, como ocurre en una situación de estrés o durante los picos de secreción circadianos (Ferguson y Sapolsky 2007). Este receptor se halla ampliamente distribuido por todo el cerebro, si bien existe una densidad de ellos particularmente alta en el hipocampo y el hipotálamo, y una densidad moderada en la corteza frontal, parietal y entorrinal, la amígdala, el estriado, el núcleo accumbens y algunos núcleos del tálamo (Sandi y cols., 2001).

Los receptores MR y GR tienen un papel muy importante en el mecanismo de autorregulación de la liberación, llamado retroalimentación negativa (feedback negativo), que se ejerce principalmente a nivel del hipotálamo. La ocupación de estos en el hipotálamo, hipocampo, amígdala y otras estructuras límbicas provoca la inhibición de la liberación de CRH por parte

del hipotálamo y, por tanto, una disminución en los niveles de ACTH y glucocorticoides (McEwen 1994).

Los glucocorticoides pueden atravesar fácilmente la membrana plasmática de la célula y unirse a sus receptores intracelulares, formando un complejo "Hormona-Receptor" que es capaz de regular la transcripción de determinados genes (Herman y Spencer 1998).

Estos esteroides son necesarios para que nuestro organismo responda de forma eficaz al estrés, pero un exceso de estos de manera mantenida puede ser perjudicial para el individuo (McEwen 1994; Sapolsky 1994a; Stout y Nemeroff 1994).

Los efectos generales de estas hormonas son:

- *Aumento de los niveles de glucosa en sangre.* Para ello los glucocorticoides recurren a la conversión de proteínas en carbohidratos y a la glucogenólisis. Además, con el mismo objetivo, dificultan la glucogénesis y aumentan la lipólisis.
- *Efectos sobre el SNC.* Principalmente en el hipotálamo, el hipocampo, la amígdala, el córtex prefrontal y el tronco del cerebro. En general, podemos afirmar que,
 - Introducen una respuesta periférica en el cerebro.
 - Controlan a largo plazo la excitabilidad de algunos grupos neuronales.
 - Modulan las funciones cognitivas durante el estrés (Joëls 1997).

Las respuestas fisiológicas activadas y los órganos implicados en la respuesta al estrés dependen del tipo de estímulo estresor y de la valoración que hace la persona, así como de la búsqueda de una solución. Si la respuesta de estrés provoca una activación fisiológica excesivamente intensa, repetida o duradera, se produce un agotamiento de los recursos y un desgaste excesivo de los órganos diana, y se propicia la aparición de trastornos psicofisiológicos o psicosomáticos asociados, mediados por la

predisposición o vulnerabilidad de tipo constitucional de la persona (Labrador 1992).

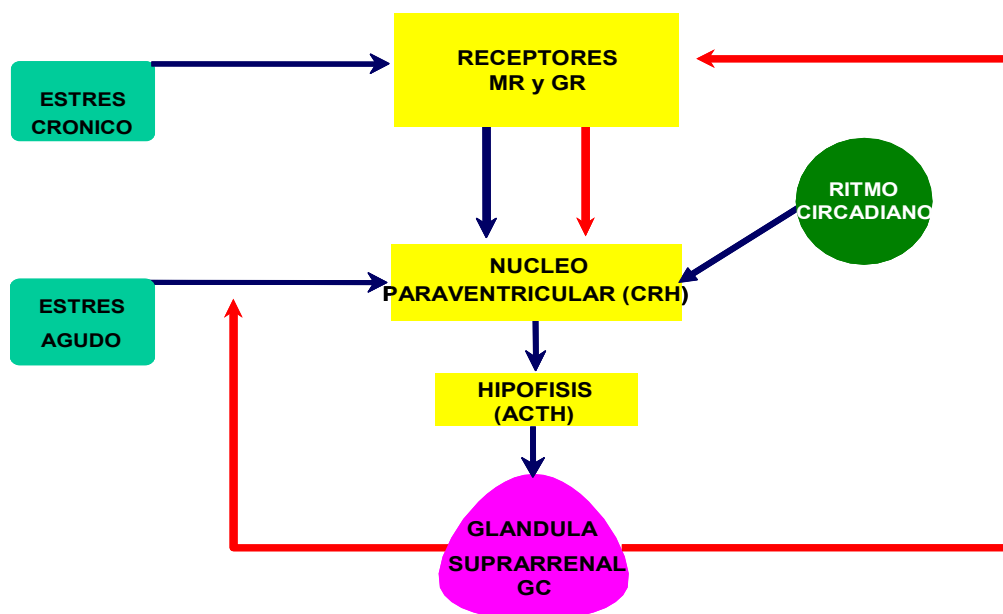


Figura 2: Esquema de liberación de los glucocorticoides

2.1.1 Diferencias individuales en la respuesta al estrés

Los organismos difieren en gran medida en su vulnerabilidad ante el estrés. Tanto los estresores físicos como los psicológicos afectan de manera diferente a los sujetos. Además, la vulnerabilidad de un individuo ante el estrés puede variar considerablemente en distintos momentos de la vida.

Cabe destacar que algunos autores han puesto énfasis en el rol de la genética y otros en las diferentes experiencias perinatales o durante la infancia para explicar el aumento de las diferencias en la respuesta del adulto ante el estrés (Sapolsky 1994b).

La idea de que ciertos factores genéticos pueden determinar la existencia de diferencias en las respuestas fisiológicas y psicológicas al estrés viene avalada por un número importante de investigaciones, realizadas fundamentalmente en animales (Stead y cols., 2006; Steimer y Driscoll 2003). Estudios llevados a cabo en monos de la misma especie arrojan evidencia sobre la importancia de la carga genética en el comportamiento.

Estos animales, a pesar de haber crecido en un entorno de crianza equivalente o idéntico, mostraron considerables diferencias individuales en parámetros como la tasa cardíaca exhibida en respuesta a diversas circunstancias estresantes, su nivel de agresividad y sus tendencias filiativas (Kaplan y cols., 1985).

En humanos, también se ha comprobado que, frente a individuos más resistentes, otros dan muestras de una reducción o sobreactivación en la funcionalidad de diversos sistemas, lo cual conduce a un desajuste en la regulación de las respuestas neuroendocrinas, autonómicas e inmunológicas, que aumenta su vulnerabilidad a padecer diversas enfermedades (Stephoe 1989).

De hecho, los estudios realizados tanto en animales como en humanos apoyan la idea de que el funcionamiento y la capacidad reactiva del eje HPA se encuentra, al menos, bajo influencia genética. Así, por ejemplo, algunas investigaciones han encontrado mayor concordancia en los niveles basales del cortisol entre hermanos gemelos univitelinos que entre hermanos bivitelinos (Kirschbaum y cols., 1992).

Por otra parte, se ha descrito que las diferencias en la vulnerabilidad ante el estrés de los sujetos, observadas en la edad adulta, podrían formarse al inicio de la vida. Estudios realizados en animales sugieren que el cuidado materno, las interacciones entre la madre y la cría y los componentes hormonales de la leche materna podrían contribuir al respecto. Se cree que la estimulación de las crías al inicio de la vida puede reducir los niveles de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de arginina vasopresina (AVP) en el núcleo paraventricular del hipocampo (Anisman y cols., 1998). Además, se ha observado que el manejo ("handling") de los animales recién nacidos resulta en un incremento en el número de receptores GR en el hipocampo y en el córtex frontal (Meaney y cols., 1985; Meaney y cols., 1996).

Sin embargo, los efectos de las primeras experiencias acontecidas en la vida dependen de la carga genética del sujeto. Así, tan sólo se observaron consecuencias adversas derivadas de la falta de cuidado materno en cepas

de ratones vulnerables, pero no en cepas más resistentes (Anisman y cols., 1998).

El género parece influir también considerablemente en la respuesta fisiológica y conductual emitida por los individuos ante situaciones estresantes (Kirschbaum y cols., 1995). Además, se ha descrito que las características de personalidad del individuo (Kobasa 1979), sus estrategias de afrontamiento ante situaciones de estrés (Carver y cols., 1989) y el apoyo social con el que cuenta (Cohen 1988) son también factores que inciden en la susceptibilidad ante el estrés.

Todo ello, en relación con las diversas experiencias vividas, fundamentalmente, en periodos de máxima vulnerabilidad de los sujetos (infancia y adolescencia), así como con el contexto social y cultural en que acontecen estas experiencias (donde variables como estatus social, situación laboral... cobran especial relevancia) se ha propuesto como el conjunto de factores que determina la evaluación cognitiva que un individuo realiza de una situación de amenaza (Sandi y cols., 2001).

Y es que las situaciones de amenaza se perciben y evalúan de diferente manera por los individuos y, a su vez, las respuestas dadas ante tales situaciones presentan notables diferencias (Buendía 1993).

2.2 Modelos de estrés en la experimentación animal

La utilización de modelos animales, para estudiar tanto las respuestas como las consecuencias fisiológicas y conductuales del estrés, permite abordar numerosas cuestiones cuyo planteamiento en humanos sería de difícil o imposible ejecución.

En general, con el desarrollo de modelos animales para emular experimentalmente problemas presentes en humanos, se pretende generar en los animales un síndrome, o conjunto de respuestas, que se asemejen a las que presentan los humanos ante determinadas situaciones (Sandi y cols., 2001).

Los modelos animales permiten el estudio de los mecanismos que subyacen a comportamientos específicos y a su patofisiología. Estos

pueden ayudar a desarrollar y predecir respuestas terapéuticas a agentes farmacológicos (Redei y cols., 2001).

Existen muchos y variados *modelos animales de estrés*. De acuerdo con el criterio de la naturaleza del estresor, podemos distinguir entre (Sandi y cols., 2001):

➤ *Modelos centrados en estresores de tipo físico*

En estos modelos se somete al animal a choques eléctricos, aislamiento, ruido, temperaturas extremas, estrés quirúrgico o a inmovilización. Estos estresores pueden ser aplicados durante periodos que oscilan entre 1-2 min. y 6-8 h. Está bien establecido que estos estresores producen efectos a corto plazo sobre la conducta, fisiología y función inmune. Si el estrés agudo no cesa apropiadamente, este puede conducir a cambios persistentes que son característicos de un estado de estrés crónico (Ottenweller 2000).

➤ *Modelos centrados en estresores de tipo biológico*

Estos estudios manipulan el estado fisiológico del organismo, incluyendo para ello estresores de naturaleza biológica como la privación de alimento, bebida o sueño. Su finalidad no suele ser el estudio del estrés, sino el de la motivación, los ritmos biológicos, el envejecimiento u otro tipo de procesos asociados con ellos (Masoro 2005).

➤ *Modelos centrados en estresores psicológicos*

Se trata de modelos que, a modo de ejemplo, utilizan un ambiente novedoso ("novelty"), se basan en el paradigma del condicionamiento clásico o utilizan situaciones de conflicto para el estudio del estrés (Clement y cols., 2007).

➤ *Modelos centrados en estresores sociales*

En animales, los modos de estrés social se basan tanto en las tendencias innatas de sus conductas, como en los modos de organización característicos de cada especie. Por ejemplo, se utilizan modelos de

agresividad, especialmente ente machos, o de aislamiento (Douglas y cols., 2007; Redei y cols., 2001).

Además, los animales están también sometidos a otros tipos estresores, derivados de la rutina del laboratorio, entre ellos se incluyen el ruido y la vibración, el traslado y las jaulas metabólicas. Los efectos de estos estresores han sido estudiados por diferentes autores (Golub y cols., 2004).

2.2.1 Estrés por inmovilización

El uso de la inmovilización para la investigación de la fisiología, patología y farmacología animal tiene una extensa historia. Ya en 1936 Selye realizó un trabajo sobre la influencia del estrés por inmovilización en el síndrome por él descrito (Pare y Glavin 1986).

El estrés por inmovilización ("restraint") se utiliza para inducir respuestas fisiológicas en el animal a través de la restricción de su movimiento libre. Una de las características de este método es que se considera un modelo mixto de estrés físico moderado y estrés psicológico. Además, su popularidad es atribuible a su relativamente bajo coste económico y a la facilidad para llevarla a cabo (Servatius y cols., 2000).

Se ha descrito que, en ratón, la aplicación del estrés por inmovilización en la madre durante el periodo de peri-implantación produce fallos en la implantación. Cuando este método se aplica durante periodos concretos de la organogénesis, se observa la presencia de paladar hendido, costillas supernumerarias y reabsorciones. En rata, existe la evidencia de fallos en la implantación, pero no de anomalías morfológicas. El estrés por inmovilización la durante última etapa de la gestación altera el comportamiento de sexual de las ratas macho en la edad adulta (Golub y cols., 2004).

Está establecido que esta técnica es muy útil para estudiar los mecanismos centrales y periféricos del SNC en los trastornos relacionados con el estrés (Pare y Glavin 1986). Aunque debemos puntualizar que el efecto del estrés por inmovilización depende del grado de inmovilización del animal o la

duración del procedimiento, existiendo resultados muy variables dependiendo de las variaciones en el método.

2.3 Efectos del estrés sobre el desarrollo

Estudios realizados en humanos demuestran que los acontecimientos adversos y/o los estados de ansiedad durante la gestación se asocian con un peso bajo al nacer (menos de 2.5 kg) y/o una mayor incidencia de partos prematuros (parto antes de la semana 37) (Hedegaard y cols., 1993; Hedegaard y cols., 1996; Mutale y cols., 1991; Steer y cols., 1992; Wadhwa y cols., 1993; Zambrana y cols., 1999). Tanto los partos prematuros como el peso bajo al nacer son factores de riesgo para el desarrollo de alteraciones neurológicas y de comportamiento en el niño (Holst y cols., 1989; Taylor y cols., 1985).

Otros trabajos, llevados a cabo en niños de hasta 15 años de edad, describen un retraso en la locomoción, el habla y el control de esfínteres, además de signos de trastornos emocionales que incluyen: lloro, hiperactividad, umbral bajo para la frustración y comportamiento no sociable (Meijer 1985; Stott 1973; Ward y Stehm 1991).

Por su parte, la investigación en animales de experimentación sugiere que el estrés prenatal afecta al control hormonal y al desarrollo del comportamiento en la descendencia (Kofman 2002). Estudios realizados con roedores y primates no humanos muestran que el estrés prenatal, o la administración de glucocorticoides durante la gestación, provoca efectos estructurales, farmacológicos y de comportamiento en la descendencia. En cambio, existe poca información referente a los efectos a largo plazo del estrés prenatal sobre el comportamiento tras la infancia (Weinstock 1997).

Efectos del estrés prenatal sobre el eje HPA

La activación del eje HPA en respuesta al estrés psicológico durante el embarazo podría jugar un papel importante en la regulación de la respuesta ante el estrés en la descendencia a lo largo de la vida (Weinstock 2001).

En humanos

El estrés y la ansiedad durante el embarazo resultan en una activación del eje HPA materno y un aumento de los niveles de ACTH, β -endorfina y cortisol en plasma, particularmente en casos de estrés crónico (Wadhwa y cols., 1996).

El estrés materno también puede causar un aumento en la liberación de CRH desde la placenta a través de las catecolaminas y glucocorticoides (Petraglia y cols., 1996). Por su parte, la CRH puede causar la liberación de β -endorfina desde la placenta. Se ha descrito que este péptido podría influir sobre la actividad opioide en el feto (Chrousos y cols., 1998) y sobre el desarrollo motor (Weinstock 2005).

Además, los niveles de proteínas de unión de la CRH caen hasta un 60% durante el último mes de la gestación en un embarazo normal, resultando en niveles de CHR circulante más elevados (Weinstock 2001). Se ha encontrado una clara asociación entre la presencia de niveles elevados de hormonas hipotalámicas, pituitarias y de la placenta y la ocurrencia de partos prematuros (Mc Clean y cols., 1995; Wadhwa y cols., 1998).

Por otra parte, diferentes estudios han mostrado una regulación anormal del eje HPA, en trastornos de ansiedad generalizada y depresión (Arborelius y cols., 1999), reflejada por niveles de cortisol más elevados en orina y saliva en personas que cursaban estos trastornos en comparación con individuos sanos (Nemeroff y cols., 1984). Además, algunos sujetos con depresión mostraron una supresión menor y por un periodo más corto de tiempo de los niveles de ACTH, β -endorfina y cortisol en plasma en respuesta a una única dosis de dexametasona que los sujetos control (Heim y cols., 2000).

Aunque aún no se conoce con exactitud el modo en que la activación materna del eje HPA afecta al comportamiento del niño, parece estar claro que la probabilidad de sufrir estados de ansiedad o síntomas de depresión a lo largo de su vida puede verse incrementada por este factor.

En animales

La evidencia que apoya una regulación anormal del eje HPA en el adulto estresado prenatalmente se ha obtenido en roedores y primates no humanos usando diferentes tipos de estrés durante la gestación.

Diversos estudios han descrito niveles basales de cortisol en monos Resus estresados prenatalmente más elevados que en sus controles (Clarke y cols., 1994), lo mismo ocurrió en el caso de la corticosterona en ratas (Fride y cols., 1986; Peters 1982; Ward y cols., 2000). Otros autores han hallado hipertrofia adrenal en ratas estresadas prenatalmente, lo que quizás sea resultado de la sobreestimulación crónica de las glándulas adrenales por parte de la ACTH (Ward y cols., 2000).

Se ha demostrado que tanto la corticosterona como la β -endorfina pueden cruzar la barrera placentaria e influir en el desarrollo del feto. Sin embargo, la ACTH actúa indirectamente, incrementando los niveles de hormonas adrenales circulante en la madre (Weinstock 2005).

Además, un incremento en los niveles de corticosterona y CRH en el cerebro en desarrollo puede alterar el desarrollo sináptico y de la actividad neurotransmisora (Weinstock 2005), y provocar alteraciones estructurales y cambios en la expresión génica en la amígdala y en hipocampo (Yaka y cols., 2007).

No obstante, no todos los estudios describen diferencias en los niveles de corticosterona entre ratas sujetas a estrés prenatalmente y ratas que no lo han estado. La razón de esta aparente incongruencia entre resultados puede deberse al momento del día en el que se ha llevado a cabo la extracción sanguínea, ya que el estrés prenatal ha mostrado causar alteraciones en el ritmo circadiano de la corticosterona (Koehl y cols., 1999), o a si las ratas han sido sometidas a alguna condición estresante que conlleve la activación del eje HPA antes de realizar la extracción de sangre (Weinstock 2001).

Por otra parte, se he sugerido que la respuesta del eje HPA en animales es sexualmente dimórfica (Schneider y cols., 1998; Szuran y cols., 2000).

Existen datos que muestran que los niveles basales de ACTH y corticosterona difieren entre sexos (Takahashi y cols., 1992b). Además, se dan también diferencias en el funcionamiento de dicho eje entre machos y hembras expuestos prenatalmente a estrés, tales diferencias persisten hasta la edad adulta. Las hembras expuestas prenatalmente a estrés mostraron niveles más elevados de ACTH como respuesta al estrés por inmovilización que las hembras no expuestas a estrés. Los machos expuestos a estrés prenatalmente mostraron una recuperación más rápida en los niveles basales de ACTH, tras una situación de estrés, que los animales no expuestos (McCormick y cols., 1995; Weinstock y cols., 1992).

El comportamiento ansiogénico y depresivo, así como las alteraciones en la regulación del eje HPA derivadas del estrés prenatal, se perciben con más facilidad en hembras que en machos. Estos hallazgos apuntarían hacia una mayor sensibilidad de las hembras al estrés prenatal (Zagron y Weinstock 2006).

Efectos sobre la conducta

La mayoría de estudios que valoran los efectos del estrés prenatal sobre la conducta se ha realizado en ratas.

En las diferentes investigaciones, estos animales han sido expuestos a distintos tipos de estresores durante diferentes momentos de la gestación. Como procedimiento para generar estrés se ha recurrido al entrenamiento de la evitación condicionada (Thompson 1957), ruido y a destellos de luz (Fride y Weinstock 1984), privación del sueño, inmersión en agua fría (Velazquez-Moctezuma y cols., 1993), inmovilización (Alonso y cols., 1991; Vallee y cols., 1997), inmovilización con calor y agitación, una o tres veces al día (Ward 1972; Ward y Stehm 1991), choques eléctricos repetidos en la cola (Takahashi y cols., 1992a), o inyecciones salinas (Drago y cols., 1999).

Existen estudios, realizados en rata, que sugieren que el eje HPA es funcional en el feto durante la última etapa de la gestación y que su función se suprime al inicio del periodo postnatal, alcanzando el nivel de

funcionamiento adulto a los 15 días de vida (Sapolsky y Meaney 1986). De hecho, en la mayoría de los estudios que describen cambios en el comportamiento de la descendencia y/o en la actividad del eje HPA, las madres fueron expuestas a estrés durante los días de gestación 15-21, cuando el eje HPA del feto empieza a liberar su propia ACTH y corticosterona (Boudouresque y cols., 1988).

Se ha observado que el estrés prenatal posee efectos, principalmente, sobre el desarrollo motor, el peso corporal y variables del desarrollo físico, el sistema inmune, la función cardiovascular, el desarrollo sexual y el comportamiento (Clark 1998; Weinstock y cols., 1988).

A pesar de que, en función del tipo e intensidad del estresor y del periodo de aplicación durante la gestación, el estrés prenatal parece afectar de manera diversa al desarrollo de la descendencia, la gran mayoría de estudios describe que el estrés prenatal produce alteraciones sobre el desarrollo a varios niveles.

Desarrollo motor y locomoción

Los resultados de los diferentes estudios que evalúan los efectos del estrés prenatal sobre el desarrollo de la locomoción y de la conducta exploratoria parecen ser inconsistentes. Factores como sensibilidades diferentes entre las distintas especies y cepas utilizadas, el método empleado para medir la locomoción, el tipo e intensidad de estrés prenatal y el momento de aplicación del mismo durante la gestación, podrían explicar la diversidad de los resultados observados (Weinstock 1997).

La gran mayoría de los efectos obtenidos, en lo referente a la línea base de actividad, se observan cuando la madre ha sido sometida a estrés durante la tercera semana de gestación. Otros estudios, que aplican el estrés durante etapas anteriores de la gestación, no encuentran diferencias en esta variable (Kofman 2002).

Se ha descrito que el estrés prenatal, aplicado desde el DG 5 hasta el último día de la gestación, retrasa el desarrollo de los reflejos sensorimotors en ratas macho (Drago y cols., 1999) y el desarrollo del

comportamiento espontáneo de alternancia en ratas hembra, tras haberse aplicado de manera aleatoria durante todo el periodo de la gestación (Fride y Weinstock 1989).

Los estudios que aplican estrés prenatal severo tienden a no encontrar diferencias importantes en la línea base de locomoción entre ratas macho estresadas prenatalmente y ratas no estresadas (Henry y cols., 1995; Kisilevsky y Low 1998; Lehmann y cols., 2000; Nishio y cols., 2001; Ward y cols., 2000). Sin embargo, describen un número reducido de levantamientos verticales ("rearings") en los machos estresados (Fujioka y cols., 2001; Ward y cols., 2000).

Respecto a la respuesta hormonal en un ambiente nuevo como es el campo abierto ("openfield"), el aumento en los niveles de corticosterona en crías de madres expuestas a estrés de manera impredecible fue más acentuado que el observado en crías de madres expuestas a estrés de manera predecible (Weinstock y cols., 1988). El estrés prenatal produce alteraciones a largo plazo en la regulación del eje HPA, que no tienen porqué manifestarse en condiciones basales o no estresantes. Así por ejemplo, la ejecución de una tarea estresante para el sujeto, como la exploración del campo abierto, puede revelar déficits, en el sistema de retroalimentación de dicho eje, que conlleven a conductas de ansiedad o miedo. Por otra parte, se sabe que estas alteraciones son más fácilmente apreciables en hembras que en machos.

Aprendizaje

Los desajustes en la función del eje HPA se presuponen ligados a cambios en las tareas de aprendizaje que son dependientes del hipocampo (de Quervain y cols., 1998). Los efectos del estrés prenatal en el aprendizaje espacial se han evaluado principalmente en ratas macho.

A pesar de la existencia de estudios que indican que el estrés prenatal por inmovilización dificulta el aprendizaje de una tarea espacial y disminuye la neurogénesis en el hipocampo y la potenciación a largo plazo (LTP), otros estudios no hallan tales déficits. La razón de esta discrepancia entre resultados puede deberse a la intensidad y a la duración del estrés

materno, a la edad de las ratas cuando realizan las pruebas y al método para evaluar el aprendizaje y la memoria (Yaka y cols., 2007; Zagron y Weinstock 2006).

Estudios realizados tanto en machos como en hembras revelan un efecto diferencial en función del sexo. Se ha descrito que el estrés prenatal retrasa el aprendizaje espacial en el laberinto de agua ("water maze") en machos, pero no en hembras (Lemaire y cols., 2000; Nishio y cols., 2001; Szuran y cols., 2000). Sin embargo, se ha descrito que cuando el estrés prenatal es moderado, este mejora la adquisición, facilita el comportamiento exploratorio y reduce la emocionalidad (Cannizzaro y cols., 2006; Fujioka y cols., 2001).

Este hallazgo estaría en consonancia con la teoría que defiende que el efecto del estrés en el aprendizaje sigue un patrón de "U invertida", es decir que el estrés moderado lo facilitaría, en cambio, en casos de estrés severo, el aprendizaje se vería perjudicado (Arnsten 1999; de Quervain y cols., 1998).

No obstante, debe tenerse también en cuenta la variabilidad existente entre individuos. En concreto, la interacción entre la carga genética y las experiencias vividas (en especial neo y perinatales) parecen determinar la actuación del eje HPA en situaciones de estrés, lo que influiría, de manera indirecta, sobre la capacidad de aprendizaje del individuo.

2.4 Estrés y función cognitiva

Los efectos del estrés sobre la función cognitiva han generado gran interés. Se han efectuado estudios para valorar diferentes aspectos asociados. Los trabajos realizados proporcionan, en ocasiones, resultados controvertidos.

La exposición a niveles de glucocorticoides elevados produce efectos que perjudican la potenciación a largo plazo (long term potentiation, LTP) y/o la potenciación a largo plazo de bajo umbral (primed burst potentiation, PBP) en el hipocampo. Sin embargo, la exposición a niveles moderados de estrés o glucocorticoides puede facilitar la plasticidad en dicha estructura

(McEwen y Sapolsky 1995). Los efectos beneficiosos del incremento moderado de los niveles de glucocorticoides están mediados por los receptores MR (o tipo I), que se hallan ocupados por los niveles basales de glucocorticoides durante el ciclo diurno. Por otra parte, los efectos negativos están controlados por los receptores GR (o tipo II), que sólo están ocupados en situaciones de estrés elevado y niveles altos de glucocorticoides (de Kloet y cols., 1993; McEwen y Sapolsky 1995).

Además, se sabe, desde hace tiempo, que los niveles elevados de glucocorticoides decrecen la excitabilidad en el hipocampo (Joëls y de Kloet 1992) debido a que prolongan el periodo refractario de las neuronas hipocampales (McEwen y Sapolsky 1995).

Por otro lado, existen estudios, llevados a cabo con primates y roedores, que describen degeneración y pérdida neuronal causadas por la exposición prolongada a estrés o a glucocorticoides. Se han observado zonas extensas de daño cerebral en la región CA3 del hipocampo en los animales expuestos a condiciones de estrés severo (McEwen 2005; Watanabe y cols., 1992; Woolley y cols., 1990). Se apuntó hacia el hipercortisolismo como causa del deterioro observado en el hipocampo (Sapolsky y cols., 1990). El hipocampo media la retroalimentación negativa de liberación de cortisol. Por lo tanto, una falta o deficiencia en las neuronas del hipocampo atenuaría esta retroalimentación, resultando en hipercortisolismo (Uno y cols., 1989).

Existe una vía bien definida a través de la cual los glucocorticoides participan en la pérdida neuronal manifestada en la isquemia, excitotoxicidad y posiblemente el envejecimiento, este mecanismo se basa en la inhibición del transporte y la utilización de la glucosa en el cerebro en general y en el hipocampo en particular (Reagan y McEwen 1997). Varios estudios muestran que los glucocorticoides inhiben la captación de glucosa tanto en neuronas del hipocampo como en glía (Horner y cols., 1990; Virgin y cols., 1991). La inhibición del transporte de glucosa causada por los glucocorticoides y la vulnerabilidad energética resultante dificultan la recaptación del glutamato. Una de las consecuencias del incremento de los niveles glutaminérgicos en la sinapsis sería el aumento de los niveles de calcio (Ca^{2+}) intracelular a través

de los receptores NMDA, y posiblemente también a través de los canales de calcio (Ca^{2+}) dependientes del voltaje (Reagan y McEwen 1997). Un incremento excesivo en los niveles de (Ca^{2+}) intracelular puede provocar la sobreactivación de proteasas, lipasas, fosfatos y endonucleasas, que dañarían directamente la estructura de la célula o inducirían la formación de radicales libres que median la muerte celular (Arundine y Tymianski 2003).

Los efectos de la administración aguda de glucocorticoides se aprecian en un periodo de tiempo que abarca desde las pocas horas hasta al día, estos son generalmente reversibles y se evidencian en tareas selectivas o en una situación particular (Lupien y McEwen 1997). Respecto al estrés crónico, se ha descrito, en personas con una actividad exacerbada del eje HPA durante 3 o 4 años, una afectación de la memoria espacial y episódica, funciones cognitivas relacionadas con el hipocampo (McEwen 1999). Los individuos que mostraron un mayor deterioro en estas funciones presentaron un volumen de hipocampo reducido en comparación con los individuos menos afectados (Lupien y McEwen 1997).

Por otra parte, está bien documentado que el estrés prenatal modifica la regulación de la respuesta de retroalimentación del eje HPA en la descendencia (Zagron y Weinstock 2006). En este sentido, se observó que los animales expuestos a estrés materno predecible presentaron niveles más bajos de corticosterona que los animales expuestos a estrés prenatal impredecible en la prueba del campo abierto, prueba que evalúa la conducta del animal en un ambiente novedoso.

Además, se ha descrito que el estrés prenatal posee efectos sobre la conducta de la descendencia en animales, aunque los resultados a este respecto son controvertidos (Kofman 2002). Por lo tanto, las modificaciones en el mecanismo de retroalimentación del eje HPA podrían alterar el desarrollo emocional en la descendencia, lo que podría acarrear efectos sobre la cognición y el comportamiento a largo plazo.

2.5 Estrés y tóxicos

El conocimiento actual que se posee acerca de los efectos de los tóxicos presentes a escala medioambiental y en el ámbito ocupacional proviene de estudios que han evaluado los efectos de los diferentes contaminantes de manera aislada. Estos estudios han sido y son útiles para comprender los mecanismos biológicos a través de los cuales los tóxicos ejercen sus efectos (Cory-Slechta 2005).

Sin embargo, la exposición humana a contaminantes raramente sucede de manera aislada. De hecho, la mayoría de veces estamos expuestos a una mezcla de contaminantes (Simmons 1995). Por otra parte, toda exposición a un contaminante ocurre en un contexto que incluye otros factores de riesgo para la salud humana, como la base genética, la dieta, enfermedades, nivel socioeconómico, el tabaco y el alcohol. Estos factores pueden potenciar el riesgo que comporta la exposición a un contaminante o mitigarlo (Cory-Slechta 2005; Gordon 2003).

El estrés se ha propuesto como un factor que puede interactuar con ciertos tóxicos. En concreto, el estrés prenatal podría potenciar la toxicidad de algunas sustancias químicas, en especial cuando estas son administradas a dosis altas (Colomina y cols., 1995, 1997; Colomina y cols., 1998; Colomina y cols., 1999; Domingo y cols., 2004).

Además, se ha descrito que el estrés puede afectar a la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de drogas o toxinas (Vogel 1987), incrementar o disminuir la interacción toxina-receptor y modificar los efectos tóxicos de drogas particulares (Vogel 1993), influir en el metabolismo y eliminación de ciertos xenobióticos (Pollack y cols., 1991) o aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Barber y cols., 2005).

A modo de ejemplo, la exposición a plomo durante el desarrollo, a través de la madre, puede modular los efectos del estrés materno y, al contrario, el estrés puede modificar los efectos del plomo. Además, los efectos derivados de la interacción entre el plomo y el estrés pueden detectarse, incluso en

ausencia de efectos del plomo y el estrés aisladamente. Por otra parte, los efectos del plomo como factor aislado difieren notablemente de los efectos de la interacción entre el plomo y el estrés (Cory-Slechta y cols., 2004).

Se ha descrito que el estudio de la interacción de ciertos tóxicos con el estrés revela efectos que no se pueden replicar cuando se evalúan las acciones de los tóxicos o del estrés como factores aislados (Cory-Slechta 2005).

Por lo tanto, el sujeto estresado estaría a la vez expuesto a una serie de tóxicos que podrían compartir mecanismos de acción con los procesos de estrés, potenciando o modificando sus efectos. Evaluar los efectos del estrés y tóxicos por separado podría conllevar a la imposibilidad de recopilar información necesaria para entender con claridad las consecuencias del estrés y elaborar el perfil tóxico de ciertas sustancias.

En este sentido, existen evidencias de una reducción en los niveles de hormonas tiroideas en sangre tras el tratamiento con PFOS en primates no humanos adultos (Seacat y cols., 2002), en roedores gestantes (Luebker y cols., 2005b; Thibodeaux y cols., 2003) y en roedores tratados prenatalmente con este tóxico (Lau y cols., 2003; Luebker y cols., 2005b) y de un aumento en los niveles de corticosterona en ratas adultas (Austin y cols., 2003). Está bien establecido que la respuesta ante el estrés incluye un aumento de los niveles de corticosterona y alteraciones en varios parámetros relacionados con las hormonas tiroideas, lo que se conoce con el nombre de "síndrome de T3 baja". Los cambios en la actividad de las hormonas tiroideas producidos por el estrés resultan en una supresión de la función tiroidea y en una inhibición de la conversión de la prohormona T4 a la hormona activa T3. Ambas acciones vienen mediadas por los niveles elevados de cortisol (Visser y Fliers 2000).

Por lo tanto, el estrés y el PFOS podrían compartir mecanismos de acción comunes, lo que podría incrementar el riesgo de interacciones toxicológicas entre estos dos factores. Sin embargo, hasta hoy, ningún estudio había evaluado de forma conjunta la exposición a PFOS y a estrés durante el periodo prenatal.

Teniendo en cuenta que el estrés y los PFOS afectan a dianas comunes, que hoy en día, tanto los adultos de ambos sexos como las mujeres embarazadas podrían estar expuestos al PFOS de manera ocupacional y/o ambiental, y que el estrés forma parte, en mayor o menor grado, de nuestro estilo de vida, es importante el estudio conjunto de ambos factores y sus posibles efectos sobre el desarrollo.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

II. Objetivos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

Si bien los efectos de la exposición a PFOS durante el desarrollo han sido testados en algunos trabajos, mediante la evaluación de la maduración física y neuromotora, así como de ciertos aspectos conductuales en la descendencia, no queda claro que este compuesto tenga efectos sobre el sistema HPA. Actualmente, tampoco existen datos que evalúen una posible interacción entre el estrés prenatal y la toxicidad de este compuesto en la madre gestante o sobre el desarrollo pre y postnatal de las crías. Asimismo, es especialmente escasa la información relativa a los posibles efectos conductuales derivados de estas exposiciones en sujetos adultos.

1. Objetivo general

En este contexto, el objetivo general de la presente tesis es evaluar los efectos del PFOS, del estrés prenatal y de una posible interacción entre ambos factores sobre la toxicidad materna, el desarrollo pre y postnatal y la conducta de la descendencia, además de valorar la conducta en sujetos adultos tras la exposición a PFOS.

2. Objetivos concretos

2.1 Fase Experimental I. Efectos maternotóxicos y embriofetales

2.1.1 Objetivo general

Evaluar los efectos de la administración de PFOS y estrés materno durante la fase de organogénesis y final de la gestación sobre la toxicidad materna y embriofetal y valorar si existen interacciones entre ambos factores.

2.1.2 Objetivos específicos

- 1.** Determinar los efectos materno tóxicos derivados de la exposición a PFOS y estrés por inmovilización durante la gestación (Días de Gestación 6-18).
- 2.** Estudiar las posibles variaciones en los niveles de corticosterona y hormonas tiroideas en madres gestantes expuestas a PFOS y estrés por inmovilización durante la gestación (DG 6-18).

3. Explorar posibles malformaciones y variaciones externas, internas y esqueléticas en fetos expuestos a PFOS y estrés por inmovilización durante la gestación (DG 6-18).

2.2 Fase experimental II. Efectos postnatales y a largo plazo

2.2.1 Objetivo general

Evaluar los efectos postnatales derivados de la exposición a PFOS y estrés por inmovilización durante la fase final de la gestación (DG 12-18) sobre la maduración física y motora y sobre la locomoción, la coordinación motora y el aprendizaje espacial. Valorar si existen interacciones entre ambos factores.

2.2.2 Objetivos específicos

- 1.** Explorar los efectos de la exposición a PFOS y estrés por inmovilización durante el periodo prenatal sobre determinados parámetros de la maduración física, funcional y neuromotora.
- 2.** Analizar los efectos de la exposición a PFOS y estrés por inmovilización durante el periodo prenatal sobre la locomoción y la exploración en un campo abierto y sobre el equilibrio y la coordinación motora.
- 3.** Valorar posibles alteraciones en los patrones de mielinización derivadas de la exposición a PFOS y estrés por inmovilización durante el periodo prenatal.
- 4.** Observar los efectos a largo plazo provocados por la exposición a PFOS y estrés por inmovilización durante el periodo prenatal sobre la locomoción y la exploración en un campo abierto y sobre el aprendizaje y la memoria espacial en un laberinto de agua.
- 5.** Valorar posibles alteraciones a largo plazo en los niveles de corticosterona derivadas de la exposición a PFOS y estrés por inmovilización durante el periodo prenatal.

2.3 Fase Experimental III. Efectos en la edad adulta

2.3.1 Objetivo general

Evaluar los efectos conductuales derivados de la administración de PFOS por vía oral a dosis de 0, 3 ó 6 mg/kg/día durante un mes en el sujeto adulto.

2.3.2 Objetivos específicos

- 1.** Valorar los efectos de la exposición a PFOS en la edad adulta sobre la actividad y excitabilidad del sistema nervioso central, los efectos neuromusculares y autónomos y la reactividad sensorimotora a partir de una batería de observación funcional.
- 2.** Explorar los efectos de la exposición a PFOS en la edad adulta sobre la locomoción y la exploración en un campo abierto y sobre el aprendizaje y la memoria espacial en un laberinto de agua.
- 3.** Valorar posibles alteraciones en los niveles de corticosterona derivadas de la exposición a PFOS durante la edad adulta.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

III. Materiales y métodos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

Para conseguir los objetivos propuestos se han utilizado los materiales y la metodología que se describe a continuación.

3.1 Materiales generales

3.1.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones albinos, cepa CD1 (Criffa, Barcelona, España), con un peso promedio de 28-32 g. Los animales fueron acomodados en el estabulario en jaulas de plástico, bajo unas condiciones constantes de temperatura (22 ± 2 C), de humedad relativa ($50 \pm 10\%$) y un ciclo luz-oscuridad de 12 horas diarias (luz 08:00-20:00). En todo momento los animales recibieron comida (dieta standard Panlab para roedores, Barcelona, España) y agua ad libitum.

Los procedimientos relativos a la utilización de los animals y al protocolo de experimentación fueron aprobados por el Comité Ético de Cuidado y Uso animal de la Universidad Rovira i Virgili.

3.1.2 Reactivos y agentes químicos

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- Sulfonato de perfluorooctano (PFOS, sal de potasio), Fluka Chemical (Suiza).
- Tween 20, Bio-Rad (USA).
- Tribromoetanol al 2%, Sigma-Aldrich (Alemania).
- Paraformaldehído al 4%, Química clínica aplicada (España).

3.1.3 Material accesorio

- Jaulas de inmovilización

Con el fin de inmovilizar a los animales, se utilizaron pequeñas jaulas en forma de tubo cilíndrico fabricadas con alambre de acero inoxidable. Las utilizadas en fase de organogénesis (días 7-10 de gestación) tienen unas dimensiones de 10 x 3 cm, mientras que las utilizadas en la fase final de gestación (días 15-18) son de 10 x 4 cm.



Figura 3: Inmovilización de los animales (Restraint).

3.2 Métodos generales

3.2.1 Apareamiento e identificación de los animales

Tras un periodo de aclimatación de 7 días, se aparearon hembras con machos (2:1) hasta evidenciar la presencia de tapón vaginal. El día en el cual se detectó el tapón vaginal fue asignado como día 0 de gestación (GD 0). Las hembras supuestamente positivas se separaron del resto y fueron distribuidas de forma aleatoria entre los distintos grupos de tratamiento.

3.2.2 Preparación y administración de las disoluciones

Preparación del tratamiento El Tween 20 fue disuelto al 0.5% en un volumen de agua destilada calculado según el número de ratones previsto a tratar. La cantidad de PFOS disuelta en Tween 20 al 0.5% dependió de las dosis administradas en cada experimento. Las disoluciones se prepararon semanalmente. El volumen que recibió cada ratón fue de 0.30 ml por cada 30 g de peso. La elección de las dosis de tratamiento se basó en las dosis utilizadas en estudios previos (Lau y cols., 2003). La administración del

tratamiento se realizó por intubación mediante sonda gástrica rígida acoplada a una jeringa desechable de insulina de 1 ml. Tanto las dosis administradas como el periodo de administración quedan detallados en cada uno de los trabajos.



Figura 4: Administración del tratamiento mediante sonda gástrica (Gavage).

Preparación del anestésico El tribromoetanol fue disuelto al 2% en un volumen de agua destilada calculado según el número de ratones que se tuvieran que anestésiar. El volumen que recibió cada ratón fue de 0.30 ml por cada 30 g de peso. Se inyectó el anestésico intraperitonealmente mediante jeringas desechables de insulina de 1 ml.

Se disolvió el paraformaldehído al 4% en un volumen de tampón fosfato (PBS) calculado según el número de ratones a perfundir.

3.3 Procedimiento: Variables evaluadas y recogida de datos

Todos los protocolos utilizados para llevar a cabo las diferentes valoraciones están explicados detalladamente en los diversos trabajos realizados, adjuntos en el apartado de *Resultados*.

En todos los casos se llevó a cabo un seguimiento del estado físico de los animales, para valorar posibles anomalías, se incluyó el registro del peso. Cuando se valoró la toxicidad materna y el desarrollo postnatal, este seguimiento fue diario.

a) Toxicidad materna y embrio/fetal

Con el objeto de evaluar la toxicidad materna durante toda la gestación, se motorizó diariamente:

- Ingesta de comida y bebida durante los días 0-18 de gestación (g/madre)
- Número de muertes
- Número de abortos
- Duración de la gestación
- Día en el que se produce el parto

Cuando se realizaron las cesáreas, con el objetivo de evaluar la toxicidad materna, se extrajo el útero grávido y se registraron los parámetros que se detallan en el primer trabajo, además se valoraron los niveles maternos de hormonas tiroideas y corticosterona.

Para contabilizar las malformaciones externas de los fetos vivos, se destinaron aproximadamente la mitad de los fetos disponibles al *estudio visceral* y la otra mitad al *examen esquelético*.

b) Toxicidad del desarrollo postnatal

Siempre que fue posible, y, de forma aleatoria, se mantuvieron con la madre a 4 hembras y 4 machos de cada camada. El desarrollo físico y funcional durante el periodo postnatal se controló a través del registro de diversos parámetros del desarrollo físico, de la aplicación una serie de pruebas para valorar la función sensitiva, la maduración neuromotora y la conducta y a través de la determinación de los niveles de corticosterona en suero. Además, se llevaron a cabo pruebas neurohistológicas para completar la evaluación del desarrollo.

c) Toxicidad en adultos

Los efectos tóxicos en adultos se evaluaron en machos a partir de una batería de observación funcional (FOB), destinada a detectar la actividad y excitabilidad del sistema nervioso central, los efectos neuromusculares y autónomos y la reactividad sensorimotora. También se realizaron las siguientes pruebas de conducta: prueba del campo abierto (Open-field),

laberinto de agua (Water-maze) y Rotarod. Además, se llevó a cabo el análisis de los niveles de corticosterona en suero.

Valoración de la conducta

Prueba del campo abierto (Open-field)

La actividad general motora y la conducta exploratoria se evaluaron mediante un test de campo abierto. La prueba se realizó en una caja cuadrada de madera 1 x 1 rodeada por una pared de color oscuro de 47 cm. Se trazó un cuadrado en el centro del aparato para delimitar el área central. Durante la prueba, los ratones se movieron libremente durante un tiempo determinado (15 – 30 min.).

La trayectoria y el movimiento de los animales fueron registrados por una cámara (Sony CCD-IRIS) situada por encima del cuadrado. Se utilizó la ayuda de un programa informático Etho-Vision (Noldus Information Technologies, Wageningen, Holanda) para medir la distancia total recorrida y el número de levantamientos verticales (rearings) en el centro y la periferia del aparato.



Figura 5: Exploración de un ambiente novedoso en una campo abierto (Open-field).

Prueba del laberinto de agua (Water-maze)

Se valoró el aprendizaje espacial y la memoria en una versión de plataforma oculta del laberinto de agua. El laberinto de agua o Water-maze fue diseñado por R.G. Morris para evaluar la memoria espacial en ratas (Morris, 1984). En nuestro trabajo, el laberinto consiste en un depósito circular (1 m de diámetro y 60 cm de altura) dividido en cuatro cuadrantes. Se situó una plataforma de escape en el centro del cuadrante objetivo. Se colocaron pistas extra-laberinto alrededor de la piscina, para proporcionar una configuración espacial de la tarea.

Al inicio de cada intento, el ratón fue introducido en la piscina, mirando hacia la pared, desde una de las 4 posiciones de salida. Las posiciones de salida fueron cambiadas diariamente de manera pseudoaleatoria. La duración máxima de cada intento fue de 60 segundos. Los animales que no lograron alcanzar la plataforma durante los 60 s fueron situados por el experimentador encima de la misma y permanecieron allí durante 30 s. Tras el periodo entre intentos (30 s), el ratón fue situado en la siguiente posición de salida. Los animales realizaron 4 intentos durante 5 días consecutivos (adquisición).

Al finalizar el último día de adquisición, 4 horas después de la última sesión de entrenamiento, se valoró la retención de la tarea mediante una prueba de retención (probe), la cual consiste en dejar nadar al animal libremente durante 60 s, sin que plataforma esté en la piscina. La actuación del animal fue registrada por una cámara de vídeo situada por encima de la piscina, los datos se analizaron con el programa informático Etho-Vision.

Se analizaron la distancia recorrida y el tiempo que tardaron los animales en encontrar la plataforma de escape (latencia) durante las sesiones de entrenamiento, así como la velocidad de nado, el tiempo total y el porcentaje de tiempo que pasó cada animal en el cuadrante objetivo durante el intento de prueba. Con el objeto de analizar los datos provenientes de la fase de entrenamiento o adquisición, se realizó la media de los diferentes intentos por día y por animal.



Figura 6: Los ratones fueron entrenados para encontrar una plataforma sumergida en una posición fija en una piscina (Water-maze).

Prueba de coordinación motora (Rotarod)

Se evaluaron la coordinación motora y el equilibrio con un rodillo giratorio (UGO Basile Accelerating Rotarod). La prueba del rotarod se realizó colocando al animal sobre un rodillo giratorio y anotando cada vez que el animal no era capaz de mantener el equilibrio. También se registró las veces que el animal daba la vuelta entera sobre sí mismo ("flips") y el tiempo transcurrido desde el inicio de la prueba hasta la primera caída. Se repitió el mismo procedimiento 3 veces (2 sesiones de entrenamiento y una sesión de prueba). Durante las dos primeras sesiones, se realizó la prueba a una velocidad constante de 16 rpm, se incrementó la velocidad a 24 rpm en la sesión de prueba. En cada sesión, se colocó al animal sobre el rodillo durante 120 segundos. Cada vez que el ratón se caía, era colocado de nuevo sobre el rodillo.



Figura 7: Coordinación motora en un rodillo giratorio (Rotarod).

Análisis hormonales

Los animales destinados al estudio hormonal fueron anestesiados con tribromoetanol. Antes del sacrificio, se procedió a la extracción sanguínea desde la vena cava, se recogió la sangre con tubos con EDTA (BD Vacutainer, Inglaterra). Las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 minutos y fueron guardadas a -20° C para los análisis posteriores de corticosterona y de hormonas tiroideas (T3 y T4 totales y libres) en suero.

Determinación de hormonas tiroideas

Los niveles de hormonas tiroideas en suero fueron determinados por duplicado con el kit BLK para ELISA (Biolink 2000, Barcelona, España), según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Determinación de corticosterona

Las concentraciones de corticosterona fueron medidas por duplicado usando un kit para RIA (ICN Biomedical Inc., CostaMesa, CA, USA), según las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue 25–1000 ng/ml.

IV. Resultados

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

4. 1 Fase Experimental I

Efectos maternotóxicos y embriofetales

En el presente trabajo se evaluaron los efectos de la administración conjunta de sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y estrés materno por inmovilización sobre la madre y el desarrollo embriofetal en ratón.

Durante los DG 6-18, se administró 0, 1.5, 3 ó 6 mg/kg/día de PFOS vía oral a 4 grupos de hembras que mostraron presencia de tapón vaginal. Se añadieron al estudio 4 grupos de hembras con tapón vaginal que recibieron las mismas dosis de PFOS, a la vez, estos grupos fueron expuestos a estrés por inmovilización 30 minutos, 3 veces al día. Además, se incluyó también un grupo control.

El DG 18 se realizó una cesárea a las madres y se pesó y examinó a los fetos con el objeto de detectar malformaciones internas, externas y variaciones. Justo antes de sacrificar a las madres, se les extrajo sangre y se prepararon las muestras de suero para realizar los posteriores análisis de hormonas tiroideas (T3 y T4 totales y libres) y corticosterona.

Los resultados del presente estudio muestran que tanto el PFOS como el estrés por inmovilización produjeron efectos maternotóxicos. En lo referente a la toxicidad fetal, el PFOS incrementó la tasa de mortalidad prenatal y el estrés por inmovilización redujo el peso corporal e incrementó la mortalidad prenatal en fetos expuestos simultáneamente a 1.5 mg/kg/día de PFOS y estrés por inmovilización. Los efectos adversos del PFOS sobre la madre y el desarrollo embriofetal, aquí citados, se observaron a dosis más bajas que las descritas con anterioridad en la bibliografía.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

4. 2 Fase experimental II

Efectos postnatales y a largo plazo

En el presente estudio se evaluaron los efectos derivados de la administración materna conjunta de sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y estrés por inmovilización sobre el desarrollo postnatal y el comportamiento en ratón.

Se dividieron, de manera aleatoria, 34 hembras con tapón vaginal en dos grupos y se les administró vía oral 0 y 6 mg/kg/día durante los DG 12-18. La mitad de animales de cada grupo fue sujeta, a la vez, a estrés por inmovilización durante 30 minutos, 3 veces al día, el mismo periodo de días.

Se dejó que las madres parieran y amamantasen a sus crías. En el momento del nacimiento, se registró la duración de la gestación, el peso materno, el número de crías vivas y muertas y el peso y sexo de cada cría. Se mantuvieron 4 machos y 4 hembras de cada camada. Con estos animales, se llevaron a cabo una serie de observaciones y pruebas con el objeto de evaluar el desarrollo físico y funcional y la maduración neuromotora. Cuando los animales contaron con 3 meses, se evaluó su actividad general y comportamiento exploratorio en un test de campo abierto, aprendizaje y memoria espacial en un laberinto acuático de Morris y coordinación motora en la prueba del rotarod. Tras finalizar las pruebas de comportamiento, se extrajo sangre a los animales y se prepararon las muestras de suero para realizar los posteriores análisis de corticosterona.

Ni el estrés por inmovilización ni la administración de PFOS modificaron significativamente el consumo materno de agua y comida. Las crías de las madres expuestas a 6 mg/kg/día de PFOS mostraron un peso corporal reducido durante los días postnatales 4 y 8. Además, la exposición prenatal a PFOS retrasó el desarrollo físico y la maduración neuromotora. Los presentes resultados indican que la exposición simultánea a PFOS y estrés por inmovilización durante la gestación produce efectos opuestos sobre el desarrollo de la descendencia. Estos efectos consisten en una

tendencia hacia un retraso general en la maduración, por parte del PFOS, y un patrón de maduración general acelerada, por parte del estrés prenatal. En lo referente al comportamiento de la descendencia a los 3 meses de edad, se observó que el grupo expuesto prenatalmente a PFOS y estrés por inmovilización presentó una movilidad reducida en la prueba del campo abierto. Además, en el laberinto acuático de Morris, se detectó una interacción entre el factor sexo y el estrés prenatal por inmovilización; las hembras expuestas a estrés y PFOS mostraron un retraso en el aprendizaje de la tarea. Por otra parte, se observó un efecto general del estrés por inmovilización sobre la retención de la tarea, fueron los animales expuestos a estrés los que presentaron una mejor retención. Los resultados mostraron que los grupos de machos expuestos a estrés prenatal presentaron una coordinación motora más pobre en la prueba del rotarod. Por último, los niveles de corticosterona fueron más bajos en las hembras expuestas a estrés prenatal. Los resultados del presente trabajo sugieren la presencia de efectos interactivos entre ambos factores en el comportamiento de la descendencia a los 3 meses de edad.

4. 3 Fase Experimental III

Efectos en la edad adulta

En el presente estudio se evaluaron los efectos derivados de la administración de PFOS durante 1 mes sobre el comportamiento de ratones macho de 3 meses de edad.

Se dividieron 34 ratones adultos en tres grupos. Los animales fueron tratados con 0, 3 y 6 mg/kg/día de PFOS vía oral durante 4 semanas consecutivas.

Tras el periodo de tratamiento, los animales fueron evaluados con una batería de observación funcional (FOB), con el objetivo de detectar disfunciones en el sistema nervioso central, autonómico o periférico, con la prueba del campo abierto, para explorar la actividad general y el comportamiento exploratorio, con la prueba del laberinto acuático de Morris, con el objeto de detectar anomalías en el aprendizaje y la memoria espacial y con la prueba de rotarod, destinada a explorar la coordinación motora. Por último, se extrajo sangre de los animales y se prepararon las muestras de suero para realizar los posteriores análisis de corticosterona.

En lo referente a los resultados, no se observaron diferencias en la batería de observación funcional. En términos generales, la actividad observada en la prueba del campo abierto fue similar en todos los grupos, sin embargo se observó una reducción en el tiempo transcurrido en el centro del aparato, por parte del grupo tratado con 3 mg/kg/día de PFOS y una disminución en la conducta exploratoria en el grupo expuesto a 6 mg/kg/día de PFOS. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas durante la fase de adquisición de la tarea en el laberinto acuático de Morris, aunque sí se detectó un efecto perjudicial del PFOS sobre la retención de la tarea. Finalmente, no se observaron diferencias en los niveles de corticosterona en suero. Los resultados del presente estudio indican que el efecto más remarcable, producido tras la administración de PFOS a ratones adultos, fue el deterioro en la retención de una tarea espacial.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

V. Discusión

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

El sulfonato de perfluorooctano (PFOS) es un compuesto orgánico ampliamente utilizado en la industria como agente surfactante. Varios estudios ambientales han mostrado que el PFOS es un contaminante persistente y bioacumulativo, cuyos niveles en la población y en el medio ambiente a nivel global son en la actualidad un riesgo potencial. Sin embargo, existen pocos datos toxicológicos en general y neurotoxicológicos, en particular, que permitan realizar estimaciones de riesgo para la población. Los efectos tóxicos del PFOS no están aún bien caracterizados. Se considera que este compuesto es un posible disruptor endocrino, con efectos sobre los niveles de hormonas tiroideas y glucocorticoides. Algunos trabajos experimentales han mostrado que la administración de PFOS produce efectos maternotóxicos y sobre el desarrollo, pero los datos existentes sobre las posibles repercusiones a largo plazo de estas exposiciones, así como de los efectos sobre los sujetos adultos expuestos, son prácticamente inexistentes.

Siguiendo con la línea de trabajo del Laboratori de Toxicologia i Salut Mediambiental (URV), y debido a los posibles efectos del PFOS sobre el sistema endocrino, nuestro interés se centró en estudiar las posibles interacciones de este tóxico con el estrés maternal y sus efectos sobre el desarrollo, a corto y a largo plazo, centrándonos principalmente en el estudio de los efectos conductuales como reflejo del funcionamiento del SNC y las modificaciones sobre los niveles de glucocorticoides. Además, nos interesó explorar los posibles efectos conductuales, derivados de la exposición a esta sustancia, en sujetos adultos.

Efectos maternotóxicos del PFOS y el estrés por inmovilización

En nuestros estudios de exposición materna a PFOS y estrés por inmovilización, no observamos cambios sobre el peso corporal, la ingesta o la conducta derivados del tratamiento con PFOS. Sin embargo, constatamos un incremento en el peso del hígado en las madres expuestas a este contaminante durante los DG 6-18, el estrés por inmovilización tendió a enmascarar este efecto. Además, se observó una disminución en el peso corporal, la ingesta y el peso del hígado en las madres expuestas a estrés por inmovilización durante este mismo periodo.

Por otra parte, las madres expuestas a estrés por inmovilización, durante los DG 12-18, permanecieron más tiempo con sus crías, efecto que podría ser beneficioso para las mismas. A diferencia con nuestro primer estudio, en este trabajo no observamos diferencias significativas entre grupos debidas al estrés por inmovilización, en lo que concierne a la ingesta o al peso materno. Tampoco se observó ningún efecto materno derivado del tratamiento con PFOS o a la interacción entre ambos factores en las variables analizadas.

Trabajos previos referentes a los efectos del estrés materno por inmovilización, en madres y en crías, muestran diferencias importantes en función de la intensidad y de la duración del estrés, así como del periodo de la gestación en el que se aplique (Kofman 2002). En este sentido, en nuestro primer trabajo el estrés materno se administró durante un periodo más prolongado de tiempo (DG 6-18).

Nuestros resultados mostraron que la exposición a estrés por inmovilización durante los días de gestación 6-18 produjo efectos adversos sobre el peso corporal materno durante la gestación. El estrés materno por inmovilización redujo el aumento del peso durante el periodo de tratamiento, el peso en el DG18, el peso corporal corregido y el cambio en el peso corporal. A la vez, se observó también que el estrés por inmovilización condujo a un efecto general sobre la ingesta, hecho que podría ser responsable, en parte, del efecto observado sobre el peso corporal en las madres estresadas.

Varios estudios han constatado que el estrés provoca una reducción en el peso corporal (Albina y cols., 2002; Colomina y cols., 1997; Kinsley y Svare 1986) y la ingesta (Albina y cols., 2005; Colomina y cols., 1999) durante la gestación. Sin embargo, los efectos del estrés materno dependen en gran medida del procedimiento seguido para generar estrés y del periodo de aplicación dentro de la gestación. Los resultados de estudios previos realizados en nuestro laboratorio muestran que el estrés prenatal aplicado durante el periodo de organogénesis y gestación tardía es más propicio a provocar cambios en el peso corporal materno (Albina y cols., 2002; Colomina y cols., 1997) que su aplicación aguda o durante fases iniciales de la gestación (Albina y cols., 1997; Colomina y cols., 1997). Además, la exposición a hidrocortisona a dosis de 5 mg/kg durante los días de gestación

6-18 provocó también reducciones en el peso corporal materno (Torrente y cols., 2000).

Por otro lado, los resultados de nuestro trabajo muestran que el tratamiento con PFOS, durante los DG 6-18, incrementó el peso del hígado materno de manera dependiente de la dosis (0, 1.5, 3 o 6 mg/kg/día). Este efecto sobre el hígado fue la única consecuencia observada en la madre, tras la administración de PFOS. Son varios los estudios que previamente habían descrito la toxicidad de este compuesto sobre el hígado en ratas y ratones gestantes (Thibodeaux y cols., 2003) y en ratones, ratas y monos adultos (Seacat y cols., 2003; Seacat y cols., 2002; Sohlenius y cols., 1993). Seacat y otros demostraron en su estudio que el PFOS se acumula en el hígado y provoca hipertrofia hepatocelular (Seacat y cols., 2003). De hecho, el hígado parece ser el órgano diana de esta sustancia (Butenhoff y cols., 2006).

A diferencia con el efecto producido por el PFOS sobre el peso del hígado, el estrés por inmovilización aplicado durante los DG 6-18 redujo el mismo en las madres. Tal efecto se observó también tras la exposición diaria a 6 horas de estrés materno por inmovilización durante los días de gestación 6-15 (Tyl y cols., 1994). Se describió un efecto similar en un estudio que administró 2 horas diarias de estrés materno durante todo el periodo de gestación (Albina y cols., 2002). No obstante, no existen muchos resultados referentes al efecto del estrés materno sobre el peso del hígado, y estos no apuntan siempre hacia la existencia de diferencias en este parámetro, como consecuencia del estrés, en madres gestantes (Colomina y cols., 1998).

Además, sería plausible que la reducción en el peso del hígado observada en este estudio estuviese ligada a la reducción en el peso corporal, ya que no se observaron diferencias significativas en el peso relativo del hígado entre los controles estresados y no estresados. Las madres tratadas con PFOS y estrés tampoco mostraron diferencias respecto al peso relativo del hígado en comparación con los controles estresados o con los controles no estresados.

Nuestros datos revelaron que las madres estresadas recogieron y juntaron a sus crías, tras ser separadas por el experimentador, en menos tiempo que

las madres no estresadas. Se ha descrito que el estrés durante la gestación puede alterar el comportamiento materno, lo que, a su vez, podría producir cambios en el comportamiento de la descendencia (Smith y cols., 2004).

Los resultados del presente trabajo están en consonancia con los presentados en el estudio de Maestriperi y otros (1991), donde se muestra que las madres estresadas pasan más tiempo con las crías (Maestriperi y cols., 1991). No obstante, otros estudios apuntan hacia un comportamiento materno inadecuado en madres expuestas a estrés durante la gestación (Pardon y cols., 2000). Las diferencias en el procedimiento utilizado para generar estrés en las madres podrían ser las responsables de la variabilidad de resultados observada en su comportamiento con la descendencia.

Existen evidencias de que el cuidado materno al inicio de la vida modifica permanentemente la actividad del eje HPA, así como el desarrollo cognitivo y emocional en la descendencia (Fish y cols., 2004; Lai y cols., 2006). El cuidado materno parece mejorar la eficacia en la regulación de la retroalimentación negativa del eje HPA. Se ha observado que el cuidado de las crías puede reducir los niveles de CRH mRNA en el núcleo paraventricular del hipotálamo y de CRH y arginina vasopresina (AVP) en la eminencia media. Además, la manipulación ("handling") de los animales recién nacidos resulta en un incremento en el número de receptores GR en el hipocampo y en la expresión génica de GR (Levine 2000). Por lo tanto, la mejora en la regulación del eje HPA, debida al cuidado materno, podría ayudar a aminorar los efectos perjudiciales producidos del estrés prenatal durante el desarrollo.

Con relación a la función hormonal, determinada en ratones gestantes expuestos a 0, 1.5, 3 ó 6 mg/kg/día de PFOS y a estrés por inmovilización durante los DG 6-18, nuestros datos no revelaron cambios estadísticamente significativos en la función tiroidea durante el final de la gestación.

Sin embargo, sí se observó que los niveles de la T3 total tendieron a disminuir y los niveles de la T4 total a aumentar en los sujetos expuestos a PFOS. En la circulación sanguínea, la T4 se metaboliza a T3. Nuestros resultados podrían estar indicando que la conversión de T4 a T3, la forma

biológicamente activa, se vio alterada o enlentecida por los efectos del PFOS. Como ya se ha comentado, no se dieron diferencias significativas entre grupos en los niveles de hormonas tiroideas, sin embargo, resultaría interesante evaluar los niveles de estas hormonas, tras la exposición a PFOS, en un número más elevado de madres gestantes.

Existen estudios previos que constatan efectos del PFOS sobre estas hormonas. Se ha descrito que el PFOS tiende a disminuir los niveles de hormonas tiroideas en mamíferos adultos (Lau y cols., 2003; Seacat y cols., 2002; Thibodeaux y cols., 2003).

Por otra parte, cabe destacar el hecho de que Thibodeaux y otros (2003) hallaran cambios en los niveles de hormonas tiroideas en el día de gestación 6, pero no en el periodo final de la gestación. Este hallazgo podría estar indicando que los cambios hormonales acontecidos durante la gestación enmascaran los efectos del tratamiento sobre las hormonas tiroideas (Thibodeaux y cols., 2003).

Debido a que las hormonas tiroideas ejercen un papel importante en el desarrollo, se requiere más investigación para elucidar cambios sutiles que podrían producirse en dicho sistema como consecuencia de la exposición a PFOS.

Ni el PFOS a 0, 1.5, 3 ó 6 mg/kg/día ni el estrés por inmovilización (DG 6-18) modificaron los niveles diurnos de corticosterona en la madre. Este hecho podría deberse a una respuesta atenuada del eje hipotalámico-pituitario-adrenal ante el estrés durante el periodo final de la gestación. Johnstone y otros (2000) describieron respuestas reducidas en los niveles de adrenocorticotropina (ACTH) y corticotropina como respuesta al estrés por inmovilización durante la gestación (Johnstone y cols., 2000).

Efectos del PFOS y el estrés por inmovilización sobre el desarrollo

Los efectos más destacables sobre el desarrollo, producidos como consecuencia de la exposición materna a PFOS y estrés por inmovilización, fueron el aumento de la mortalidad prenatal en fetos expuestos a PFOS durante los DG 6-18, el retraso en la maduración física y neuromotora de

las crías expuestas a PFOS durante los DG 12-18 y, en contraste, la aceleración de la maduración por parte del estrés materno por inmovilización aplicado durante el mismo periodo de la gestación.

En lo referente a la toxicidad fetal, se observó un aumento de la mortalidad prenatal en el grupo expuesto a 6 mg/kg/día durante el periodo de organogénesis y final de la gestación (DG 6-18). Además, los datos revelaron que la mortalidad prenatal en el grupo expuesto simultáneamente a 1.5 mg/kg/día de PFOS y a estrés fue más elevada que en el grupo expuesto a 1.5 mg/kg/día de PFOS no estresado.

Lau y otros (2003) describieron en su estudio una tasa elevada de mortalidad postnatal en ratones expuestos a 10 mg/kg/día o a dosis superiores desde el día de gestación 1 al 17 (Lau y cols., 2003). Del mismo modo, Luebker y otros (2005) hallaron en su estudio una tasa elevada de mortalidad postnatal en ratas expuestas a dosis superiores a 0.8 mg/kg/día (Luebker y cols., 2005b). Sin embargo, hasta a la fecha, ningún estudio había descrito un incremento en la tasa de mortalidad prenatal en roedores expuestos a PFOS.

Los resultados del presente estudio no revelan diferencias en la duración de la gestación o en la viabilidad de crías expuestas prenatalmente a 0 ó 6 mg/kg/día de PFOS y a estrés prenatal durante el periodo final de la gestación (DG 12-18). Estos resultados difieren de los observados en estudios que utilizan un periodo de exposición al PFOS más prolongado. En este sentido, Lau y otros (2003) describieron una tasa elevada de mortalidad postnatal en ratones expuestos a dosis equivalentes a 10 mg/kg/día o superiores durante los DG 1-17 (Lau y cols., 2003). Más recientemente, Luebker y otros (2005) constataron efectos adversos del PFOS sobre el desarrollo en ratas, estos incluían una duración reducida de la gestación (a 3.2 mg/kg/día) y una reducción de la viabilidad y del incremento del peso corporal a dosis de 1.6 mg/kg/día y superiores (Luebker y cols., 2005a).

En dicho experimento, tanto los machos como las hembras fueron tratados con PFOS antes y durante el periodo de cruce, además, las hembras recibieron tratamiento a lo largo de la gestación y el periodo de lactancia.

Por lo tanto, la exposición más prolongada a este compuesto durante la gestación podría influir sobre la concentración de PFOS en los fetos, provocando una tasa de mortalidad más elevada que la observada en este estudio.

En un segundo experimento se pudo constatar que el peso corporal de las crías expuestas a PFOS a 6 mg/kg/día (DG 12-18) fue inferior al observado en el grupo control desde el día postnatal (DPN) 4 al DPN 8, esta diferencia desapareció el DPN 12. Las crías expuestas a estrés prenatal mostraron un aumento de peso en el DPN 21.

Debido a que el PFOS se acumula en el organismo y se ha descrito como vía de excreción la leche materna (Kärrman y cols., 2007; So y cols., 2006), la posible explicación de por qué se observan diferencias de peso el día 4, pero no el día 0, podría estar relacionada con la exposición a PFOS a través de la leche materna. Otras posibles hipótesis, como que se trate de un efecto prenatal retardado que se hace evidente el día 4, parecen menos plausibles, pero no se pueden descartar.

En lo referente al estrés, el estrés prenatal por inmovilización, aplicado desde el DG 12 al 18, provocó un aumento en el peso corporal de las crías el DPN 21, lo que podría estar relacionado, o bien con una maduración acelerada y una buena habilidad para alimentarse autónomamente, o bien con cambios en la homeostasis energética provocados por el estrés prenatal aplicado durante las últimas fases de la gestación, tal y como se ha demostrado recientemente (Mueller y Bale 2006).

Se ha descrito que el estrés durante la gestación aumenta el riesgo de padecer alteraciones en el peso corporal en el momento del nacimiento (Wadhwa y cols., 1993). Más allá, hay estudios que revelan una conexión entre el peso anormal al nacer y una predisposición futura a desarrollar sobrepeso u obesidad (Ong 2007).

Una vez más, existen datos que revelan efectos diferenciales del estrés materno en la descendencia dependiendo de la intensidad y del momento temporal dentro de la gestación en el cual se administra. Así, se ha mostrado que la administración de estrés durante la etapa media y final de

la gestación produce un aumento del peso corporal que persiste a largo plazo, sin embargo, el aumento del peso observado en la descendencia expuesta a estrés prenatal durante la etapa final de la gestación desaparece poco después del nacimiento (Mueller y Bale 2006).

Sorprendentemente, el estrés prenatal por inmovilización pudo enmascarar los efectos del PFOS observados sobre el peso corporal durante los días postnatales 4 y 8, ya que el grupo expuesto a PFOS y estrés prenatal no se vio afectado por la disminución de peso corporal durante este paréntesis de tiempo.

La exposición a 6 mg/kg/día de PFOS durante los días de gestación 12-18 provocó retrasos en la apertura ocular y en el deplegamiento del pabellón auditivo (efecto enmascarado por la inmovilización materna), pero no mostró efectos sobre la maduración sexual. Esta misma relación de efectos del PFOS sobre el desarrollo físico había sido descrita con anterioridad en artículos previos (Lau y cols., 2003; Luebker y cols., 2005a).

Respecto a la maduración neuromotora de ratones expuestos prenatalmente a 0 ó 6 mg/kg/día de PFOS y a estrés por inmovilización durante los días de gestación 12-18, el grupo expuesto a PFOS presentó una habilidad reducida en la prueba de enderezamiento superficial ("surface righting") en comparación con el grupo control estresado. Luebker y otros (2005) describieron en su estudio que las ratas expuestas a 1.6 mg/kg/día de PFOS mostraron un retraso en el desarrollo de tal capacidad (Luebker y cols., 2005a).

En nuestro estudio, el PFOS también dificultó el desarrollo de otras habilidades neuromotoras como el reflejo de resistencia al estiramiento y la habilidad para escalar una rejilla inclinada, así como la fuerza en las extremidades superiores. Se trata de datos que, en su conjunto, parecen indicar que la exposición prenatal a PFOS retrasa la maduración neuromotora.

En cambio, el estrés por inmovilización, aplicado en la madre desde el día de gestación 12 al 18, parece acelerar la maduración de ciertos parámetros físicos y neuromotores. En nuestro estudio, el estrés materno por

inmovilización provocó una erupción de los incisivos más temprana y una rápida maduración sexual en los machos. Sin embargo, Meek y otros (2000) describieron retrasos en la erupción de los incisivos en crías expuestas a estrés prenatal durante la última semana de gestación. En dicho estudio, el procedimiento seguido para generar estrés en las madres consistió en la exposición a diferentes tipos de estresores (calor, ruido y manipulación) (Meek y cols., 2000). Este paradigma de estrés variable produce una respuesta ante el estrés más elevada que la derivada del procedimiento de estrés aplicado en este estudio.

Nuestros resultados muestran que el estrés materno también favoreció el desarrollo de ciertas habilidades como el enderezamiento superficial "surface righting" y enmascaró o redujo los efectos adversos producidos por este contaminante sobre el reflejo de resistencia al estiramiento y la habilidad de escalar.

Estos resultados concuerdan con aquellos hallados en estudios que utilizan periodos de estrés por inmovilización cortos durante el periodo final de la gestación (Fujioka y cols., 2001; Ward y Wainwright 1989), en los que se describen efectos positivos del estrés sobre el desarrollo.

No conocemos los mecanismos por los cuales el estrés ha favorecido, en nuestro estudio, la maduración física y neuromotora de la descendencia, además de aminorar, hasta llegar a enmascarar, los efectos negativos del PFOS sobre la misma. El hecho de que las madres estresadas hayan mostrado un cuidado materno más favorable podría haber contribuido a la aceleración en la maduración observada. Otros efectos hormonales en las crías, como consecuencia de la exposición a estrés prenatal, podrían haber contribuido a propiciar la maduración. A modo de ejemplo, se ha hallado que la expresión de CHR y vasopresina arginina (AVP) se ve alterada en animales expuestos a estrés prenatal.

No obstante, el patrón de efectos sobre el desarrollo derivados de la exposición a estrés durante la gestación depende, en gran medida, del procedimiento y de los días de exposición durante la gestación (Colomina y cols., 1997; Colomina y cols., 2001; Fujioka y cols., 2001; Golub y cols.,

2004). En definitiva, ya sea a través de la mejoría producida sobre la conducta materna, o por otros mecanismos no evaluados en este trabajo, los efectos del estrés parecen haber acelerado la aparición de determinados parámetros de la maduración física y neuromotora o haber enmascarado los efectos perjudiciales que el tratamiento con PFOS parece haber ejercido sobre los mismos.

Nuestros resultados no mostraron interacciones adversas entre la administración de PFOS (0 ó 6 mg/kg/día) y la exposición a estrés materno por inmovilización durante los DG 12-18 sobre el desarrollo físico o neuromotor. El estrés materno puede potenciar la toxicidad de algunos compuestos químicos sobre el desarrollo cuando estos se administran a dosis claramente perjudiciales para la madre (Domingo et al., 2004), pero estos efectos dependerán de la intensidad y duración del estrés así como de las características del propio tóxico.

Efectos conductuales a largo plazo de la exposición prenatal a PFOS y estrés

A pesar de que la interacción entre el PFOS (0 y 6 mg/kg/día) y el estrés materno por inmovilización durante los DG 12-18 no produjo efectos adversos sobre la maduración física o el desarrollo neuromotor, esta causó efectos negativos sobre la conducta de la descendencia en la edad adulta.

A los tres meses de edad, el grupo expuesto simultáneamente a PFOS y estrés prenatal recorrió menos distancia en la prueba de campo abierto ("open-field") en comparación con el grupo tratado con PFOS sin estrés y el grupo control sin estrés.

La prueba de campo abierto tiene como objeto valorar la conducta de exploración en un ambiente novedoso. Además, puede medir también la ansiedad o el miedo a los espacios abiertos. Se considera que una actividad baja en el centro del aparato está relacionada con un nivel alto de ansiedad del animal (Bouwknicht y cols., 2007). Por otra parte, las condiciones ansiogénicas parecen conllevar una disminución en el número de levantamiento verticales (Orito y cols., 2007).

En este sentido, los resultados de nuestro estudio apuntarían hacia un nivel de ansiedad más elevado en los animales expuestos a PFOS y estrés por inmovilización prenatalmente. A pesar de que no se alcanzó el nivel de significación estadística, los resultados indicaron una clara tendencia hacia una interacción entre ambos factores ($p=0.051$). Tal interacción podría ser responsable de la baja actividad horizontal observada en la descendencia expuesta prenatalmente a PFOS y estrés prenatal.

Son pocos los estudios que, a fecha de hoy, han evaluado los efectos de la exposición prenatal a PFOS sobre la conducta de la descendencia. Ninguno de ellos describe efectos por parte de este contaminante sobre el comportamiento (Lau y cols., 2003; Luebker y cols., 2005a). La especie animal utilizada, el periodo y dosis de tratamiento, la conducta evaluada, y/o el tipo de test utilizado podrían explicar la aparente discrepancia entre resultados.

Tampoco se había evaluado, hasta la fecha, la existencia de interacciones tóxicas entre la administración de PFOS y de estrés durante el desarrollo. Quedaría por averiguar si los efectos interactivos entre ambos factores, observados en la prueba del campo abierto, tienden a reproducirse en otro tipo de prueba conductual que valore la conducta de ansiedad en ratón.

Por otra parte, en lo referente al estrés, el grupo control expuesto a estrés prenatal recorrió una mayor distancia en el centro del aparato, en comparación con el resto de los grupos y realizó más levantamientos verticales, en comparación con los grupos PFOS sin estrés y grupo control sin estrés. A pesar de que la interacción entre la administración de PFOS y estrés prenatal parece haber provocado una disminución en la distancia recorrida, el estrés prenatal como factor aislado incrementó la tasa de actividad horizontal y vertical de los animales. En este sentido, los animales expuestos a estrés prenatal habrían mostrado niveles de ansiedad reducidos.

Son varios los estudios que indican que el estrés prenatal posee efectos sobre la locomoción y el comportamiento exploratorio (Kofman 2002). Diversos trabajos han descrito un incremento en el número de levantamientos verticales ("rearings") en ratas macho expuestas a estrés

materno durante el periodo final de la gestación (Fonseca y cols., 2002; Kofman 2002). Sin embargo, existen trabajos que no describen diferencias en la línea base de locomoción en animales expuestos a estrés prenatal severo (Lehmann y cols., 2000; Nishio y cols., 2001). La variabilidad de la cepa, el método utilizado para medir la locomoción y el tipo de estrés prenatal pueden conducir a resultados inconsistentes respecto a la actividad motora de las crías expuestas a estrés materno (Kofman 2002). Además, el hecho de que, en nuestro trabajo, las descendencia de las madres expuestas a estrés hayan recibido un cuidado materno más adecuado, tal y como se ha venido comentando, puede haber colaborado a la reducción en los niveles de ansiedad ante un nuevo entorno.

Los resultados en la prueba de la rueda giratoria (rotarod test) indicaron un efecto dependiente del sexo del estrés materno en la ejecución de esta tarea. Ambos grupos de machos expuestos a estrés presentaron una peor ejecución durante el primer día de la prueba en comparación con los animales expuestos a PFOS. Además, se observaron fallos en la coordinación, durante la tercera sesión, en los machos expuestos prenatalmente a estrés en comparación con las hembras.

A pesar de que el estrés parece haber propiciado la maduración en nuestro trabajo, la exposición materna a estrés no parece mejorar la coordinación motora a largo plazo. Este hecho podría sugerir que la precocidad en la maduración física y neuromotora no implica forzosamente una mejora funcional.

Debido a que la coordinación motora no suele evaluarse en los estudios de estrés prenatal, no existen datos con los que poder comparar nuestros resultados. Se ha demostrado recientemente que el estrés prenatal altera la proporción entre células granulares-y células de -Purkinje en el cerebelo de la rata (Ulupinar y Yucel 2005; Ulupinar y cols., 2006). Sin embargo, con los resultados observados en nuestro trabajo, no podemos establecer si los cambios observados al nivel de coordinación motora pueden estar relacionados con tal alteración celular o con modificaciones en otros sistemas neuronales.

Por último, en nuestro trabajo evaluamos también el aprendizaje espacial y la memoria con una versión de plataforma oculta del laberinto de agua de Morris en animales de 3 meses de edad expuestos prenatalmente a PFOS (0 y 6 mg/kg/día) y estrés prenatal (DG 12-18).

Aunque todos los animales aprendieron la tarea en el transcurso de los días, se observó una interacción entre el sexo y el estrés por inmovilización. Las hembras expuestas prenatalmente a PFOS a 6 mg/kg/día y a estrés por inmovilización mostraron una peor tasa de aprendizaje en comparación con las hembras control expuestas y no expuestas prenatalmente a estrés. En este sentido, la ejecución de las hembras expuestas, de manera prenatal, a PFOS y estrés por inmovilización se vio afectada por ambos factores. Así, se mostró que, en comparación con los machos, las hembras expuestas a PFOS y estrés por inmovilización prenatal fueron más sensibles a los efectos del tratamiento.

Se evaluó la retención de la tarea dos veces tras el periodo de adquisición. Cuatro horas después de la fase de entrenamiento, detectamos un efecto general del estrés por inmovilización, tanto en machos como en hembras, los grupos expuestos a estrés (expuestos y no expuestos a PFOS) recordaron mejor la tarea. Sin embargo, esta diferencia tan sólo alcanzó el nivel de significación en el caso de los machos.

A pesar de que el estrés prenatal por inmovilización no modificó significativamente la adquisición de la tarea en el laberinto de agua, este parece haber mejorado su retención, especialmente entre machos. Catalani y otros (2000) demostraron que la administración de corticosterona a las madres durante la lactancia mejoró la ejecución de la tarea en una prueba de memoria espacial en machos de tres meses (Catalani y cols., 2000).

Catorce días después de la fase de adquisición, no se observaron diferencias significativas entre grupos, todos los animales recordaban aún la tarea.

En nuestro estudio, no observamos efectos significativos producidos por el PFOS sobre el aprendizaje y la memoria espacial. Estos resultados concuerdan con los resultados de un trabajo, en el que se evaluó la administración prenatal de PFOS sobre el aprendizaje de crías de 22-23 días

en el laberinto-T (Lau y cols., 2003), y con los resultados del trabajo llevado a cabo por Luebker y otros (2005), en el que se evaluaron los efectos del PFOS sobre el aprendizaje, la retención a corto plazo y la memoria en un paradigma de evitación pasiva, a los 24 días de edad, y la coordinación neuromuscular, la habilidad para nadar, el aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris a los 70 días (Luebker y cols., 2005a). En ninguna prueba se observaron efectos derivados de la exposición prenatal a este contaminante (Lau y cols., 2003; Luebker y cols., 2005a).

La ontogénesis del comportamiento correlaciona con el desarrollo de las estructuras del sistema nervioso. Depende también de las condiciones medioambientales durante la primera época de la vida.

Se han descrito niveles de corticosterona elevados en la descendencia de ratas expuestas a diferentes tipos de estrés materno, a pesar de que los resultados son bastante controvertidos (Kay y cols., 1998; Peters 1982; Takahashi y cols., 1992a; Ward y cols., 2000; Weinstock 2001).

En nuestro estudio, los niveles de corticosterona presentaron un patrón diferente en machos y hembras, las hembras del grupo expuesto a estrés prenatal sin PFOS mostraron niveles de corticosterona más reducidos que las hembras del grupo control. En cambio, no se observaron diferencias entre los grupos de machos. Por otra parte, se observaron diferencias entre sexos en los niveles de corticosterona. Tanto las hembras del grupo control como del grupo PFOS con estrés presentaron niveles de corticosterona más elevados que los machos de los mismos grupos. Los resultados de estudios previos indican una respuesta sexualmente dimórfica por parte del eje hipotalámico pituitario adrenal (HPA) ante el estrés prenatal (Kofman 2002). Además, está bien documentado que el estrés prenatal modifica la regulación de la respuesta de retroalimentación del eje HPA. Tal alteración se percibe más fácilmente en hembras que en machos (Zagron y Weinstock 2006). También la duración, la intensidad del estrés y los cuidados maternos postnatales influirán en los efectos que el estrés prenatal pueda ejercer en la regulación de la respuesta de retroalimentación del eje HPA.

Efectos del PFOS en adultos

La administración de PFOS a sujetos adultos mostró, como efectos más destacables, la alteración del comportamiento en el campo abierto y el deterioro de la memoria en el laberinto acuático.

La administración de PFOS (0, 3 ó 6 mg/kg/día) a ratones macho adultos, durante 4 semanas consecutivas, no causó diferencias significativas en el peso corporal durante el periodo de tratamiento. No obstante, un estudio previo realizado en rata halló una reducción dependiente de la dosis en el incremento del peso corporal, tras 4 semanas de tratamiento, con dosis similares a las estudiadas en nuestro trabajo (Seacat y cols., 2003). Tal diferencia entre estudios podría deberse a diferencias en la sensibilidad hacia el PFOS entre rata y ratón, diferencias que también existen durante la fase del desarrollo.

Los resultados del presente trabajo sugerirían que el ratón en desarrollo es más sensible a los efectos del PFOS sobre el peso corporal que en la edad adulta.

La batería de observación funcional (FOB) utilizada en nuestro trabajo consistió en 31 puntos diseñados para evaluar comportamiento anormal, lo que podría indicar disfunciones en el sistema nervioso central, autonómico o periférico.

El único efecto observado en dicha prueba fue una reducción en la resistencia ofrecida por los animales expuestos a 3 mg/kg/día al ser extraídos de sus jaulas. Esta única anormalidad no sería determinante para asumir efectos adversos del PFOS a este nivel.

Además, no se observaron efectos en la prueba del rotarod (rueda giratoria), lo que indicaría que el PFOS no posee efectos sobre la coordinación motora y el equilibrio en el ratón adulto.

Respecto a la actividad observada en el test de campo abierto, nuestros datos muestran algunos efectos limitados en el tiempo por parte del contaminante aquí estudiado.

Se considera que un aumento en el tiempo transcurrido en el centro del aparato es signo de ansiólisis (Prut y Belzung 2003). Por otra parte, respecto a la conducta exploratoria, las condiciones ansiogénicas parecen conllevar una disminución en el número de levantamiento verticales (Orito y cols., 2007).

Los resultados del presente estudio reflejarían niveles elevados de ansiedad como resultado del tratamiento con PFOS. Los animales expuestos a 3 mg/kg/día transcurrieron menos tiempo en el centro del aparato, mientras que los animales expuestos a 6 mg/kg/día realizaron un número menor de levantamientos verticales. Es importante recalcar que estas diferencias tan sólo se observaron durante ciertas fracciones de tiempo, no durante toda la prueba.

Los efectos más remarcables producidos tras la administración de PFOS (0, 3 ó 6 mg/kg/día) a ratones adultos se observaron en una tarea clásica para valorar el aprendizaje y la memoria espacial, el laberinto de agua de Morris.

A pesar de que durante la fase de adquisición no se observaron diferencias entre grupos, sí que se dieron diferencias en la retención de la tarea. El grupo expuesto a 3 mg/kg/día de PFOS recordó peor la tarea, lo que indicaría un déficit en la memoria espacial en estos animales.

Curiosamente, los animales expuestos a 6 mg/kg/día de PFOS recorrieron una mayor distancia en el mismo cuadrante, hecho que podría deberse a la velocidad de nado de los animales de este grupo.

Se ha descrito que la reducción de la velocidad de nado es un indicador de reconocimiento de la localización de la plataforma en ratas (Hollup y cols., 2001). Los resultados del presente trabajo sugieren un deterioro en la retención en ratones expuestos a PFOS. En cambio, no se pudo establecer que este efecto sea lineal dependiente de la dosis.

En cualquier caso, este efecto sobre el aprendizaje debería ser valorado más detalladamente, aumentando el número de animales a evaluar e incrementado la dificultad de la prueba, con el objeto de poner en evidencia la existencia los posibles déficits aquí descritos.

Los resultados de nuestro estudio no mostraron efectos del PFOS (a 0, 3 ó 6 mg/kg/día) en los niveles de corticosterona, determinados en suero de ratón adulto tras 4 semanas de tratamiento. Este dato no estaría en consonancia con los resultados de un estudio previo, en el cual se inyectó intraperitonealmente 10 mg PFOS/kg de peso corporal a ratas hembras adultas durante 2 semanas. Estos animales mostraron niveles de corticosterona elevados (Austin y cols., 2003).

El tiempo transcurrido desde la exposición a PFOS hasta el momento de extracción sanguínea, así como las diferencias en la cepa del animal, el sexo, la dosis, la ruta y el periodo de administración podrían ser responsables de las diferencias en los resultados observadas entre ambos estudios.

5.1 Discusión general

A pesar de que los resultados del presente estudio muestran efectos maternotóxicos tanto del PFOS como del estrés por inmovilización (DG 6-18), no se observaron interacciones tóxicas entre estos dos factores en el ratón gestante.

Por otra parte, la administración de PFOS a 6 mg/kg/día durante los días de gestación 6-18 produjo mortalidad prenatal. Los efectos maternotóxicos y sobre el desarrollo de este compuesto presentados en nuestro trabajo se observaron a dosis más bajas que las utilizadas en otros estudios en ratones (Thibodeaux y cols., 2003).

A pesar de la ausencia de efectos embriofetales derivados de la exposición a estrés por inmovilización, el aumento en la mortalidad prenatal observado en el grupo estresado expuesto a 1.5 mg/kg/día de PFOS, sugiere la necesidad de llevar a cabo más estudios que evalúen posibles interacciones tóxicas entre el PFOS y el estrés durante el desarrollo embriofetal.

Por otra parte, la exposición prenatal a PFOS (6 mg/kg/día), durante los días de gestación 12-18, produjo retrasos ligeros en el desarrollo de ciertos parámetros físicos y en la maduración neuromotora de la descendencia. El estrés prenatal por inmovilización aplicado entre los DG 12-18 tendió a

enmascarar tales retrasos. La interacción entre estos dos factores no causó efectos negativos sobre el desarrollo físico o neuromotor, pero provocó alteraciones sobre la conducta de la descendencia en la edad adulta.

Se detectó una disminución en la movilidad del grupo expuesto simultáneamente a PFOS y estrés prenatal por inmovilización, mientras que los ratones expuestos prenatalmente a estrés presentaron una actividad exploratoria incrementada y una coordinación motora pobre más evidente en machos.

En conclusión, los datos del presente estudio muestran cambios funcionales duraderos sobre el desarrollo, como resultado de la exposición prenatal a PFOS, estrés y a su interacción, que requieren más investigación.

En cuanto a los efectos derivados de la exposición a PFOS en adultos, punto que, hasta la fecha, había recibido una atención limitada, uno de los efectos más relevantes fue la alteración de la memoria espacial. Este efecto no había sido descrito con anterioridad, y abre un nuevo campo de estudio en relación a este compuesto.

VI. Conclusiones

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

- 1.** La exposición a PFOS y a estrés por inmovilización durante la fase de organogénesis y final de la gestación produce efectos maternotóxicos en ratones gestantes. No existen efectos de potenciación entre estos dos factores.
- 2.** La exposición prenatal a 6 mg/kg/día de PFOS durante el periodo de organogénesis y final de la gestación produce mortalidad prenatal.
- 3.** La exposición a estrés prenatal por inmovilización durante el periodo de organogénesis y final de la gestación disminuyó el peso corporal de los fetos e incrementó la mortalidad prenatal en fetos expuestos a dosis iguales a 1.5 mg/kg/día de PFOS.
- 4.** La exposición prenatal a 6 mg/kg/día de PFOS durante el periodo final de la gestación provocó retrasos ligeros en la maduración física y neuromotora, estos efectos quedaron enmascarados por la exposición prenatal a estrés por inmovilización durante el mismo periodo.
- 5.** La exposición simultánea a 6 mg/kg/día de PFOS y estrés prenatal por inmovilización durante el final de la gestación produjo una reducción en la movilidad en la prueba del campo abierto a los tres meses.
- 6.** Se observó una interacción entre la exposición a estrés prenatal por inmovilización durante el periodo final de la gestación y el sexo a los tres meses. Las hembras expuestas a estrés y a PFOS mostraron un retraso en el aprendizaje de la tarea en el laberinto de agua.
- 7.** La exposición prenatal a estrés por inmovilización durante el periodo final de la gestación provocó una mejor retención de la tarea en el laberinto de agua y una disminución en los niveles de corticosterona a los tres meses.
- 8.** La administración de 3 mg/kg/día de PFOS a ratones adultos provocó una reducción en la distancia recorrida en el centro del campo abierto, mientras que su administración a 6 mg/kg/día redujo la actividad vertical.
- 9.** La administración de PFOS a 3 mg/kg/día de PFOS a ratones adultos provocó efectos adversos sobre el recuerdo de la tarea en el laberinto de agua.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

VII. Bibliografía

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A SULFONATO DE PERFLUOROCTANO (PFOS)
Y SU INTERACCIÓN CON EL ESTRÉS PRENATAL
Silvia Fuentes de Frutos
ISBN:978-84-691-9745-5/DL: T-1260-2008

3M (2000). Sulfonated Perfluorochemicals in the Environment: Sources, Dispersion, Fate and Effects. *3 M Company*.

3M (2003). Environmental and Health Assessment of Perfluorooctane Sulfonic Acid and its Salts. *3 M Company*.

Albina, M. L., Belles, M., Linares, V., Sanchez, D. J., y Domingo, J. L. (2005). Restraint stress does not enhance the uranium-induced developmental and behavioral effects in the offspring of uranium-exposed male rats. *Toxicology* **215**, 69-79.

Albina, M. L., Colomina, M. T., Sanchez, D. J., y Domingo, J. L. (1997). Effects of maternal stress on concurrent prenatal exposure to ethanol and methylmercury. I Embryo/fetal toxicity. *Res. Commun. Alcohol Subst. Abuse* **18**, 57-70.

Albina, M. L., Colomina, M. T., Sanchez, D. J., Torrente, M., y Domingo, J. L. (2002). Interactions of caffeine and restraint stress during pregnancy in mice. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**, 779-85.

Alexander, B. H., y Olsen, G. W. (2007). Bladder cancer in perfluorooctanesulfonyl fluoride manufacturing workers. *Ann Epidemiol* **17**, 471-8.

Alonso, S. J., Arevalo, R., Afonso, D., y Rodriguez, M. (1991). Effects of maternal stress during pregnancy on forced swimming test behavior of the offspring. *Physiol Behav* **50**, 511-7.

Anisman, H., Zaharia, M. D., Meaney, M. J., y Merali, Z. (1998). Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int J Dev Neurosci* **16**, 149-64.

Arborelius, L., Owens, M. J., Plotsky, P. M., y Nemeroff, C. B. (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* **160**, 1-12.

Arnsten, A. F. (1999). Development of the cerebral cortex: XIV. Stress impairs prefrontal cortical function. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **38**, 220-2.

Arundine, M., y Tymianski, M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* **34**, 325-37.

Austin, M. E., Kasturi, B. S., Barber, M., Kannan, K., MohanKumar, P. S., y MohanKumar, S. M. (2003). Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats. *Environ Health Perspect* **111**, 1485-9.

Barber, D. S., Ehrich, M. F., y Jortner, B. S. (2005). The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure. *J Toxicol Environ Health A* **68**, 99-111.

Berglund, M. (2004). Personal communication. *Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet*.

Berthiaume, J., y Wallace, K. B. (2002). Perfluorooctanoate, perfluorooctanesulfonate, and N-ethyl perfluorooctanesulfonamido ethanol; peroxisome proliferation and mitochondrial biogenesis. *Toxicol Lett* **129**, 23-32.

Boudouresque, F., Guillaume, V., Grino, M., Strbak, V., Chautard, T., Conte-Devolx, B., y Oliver, C. (1988). Maturation of the pituitary-adrenal function in rat fetuses. *Neuroendocrinology* **48**, 417-22.

Bouwknicht, J. A., Spiga, F., Staub, D. R., Hale, M. W., Shekhar, A., y Lowry, C. A. (2007). Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull* **72**, 32-43.

Buendía, J. (1993). Estrés y depresión. *Ed. J. Buendía. Ediciones Pirámide. Madrid.*

Butenhoff, J. L., Olsen, G. W., y Pfahles-Hutchens, A. (2006). The applicability of biomonitoring data for perfluorooctanesulfonate to the environmental public health continuum. *Environ Health Perspect* **114**, 1776-82.

Butenhoff, J. L., York, R. G., Seacat, A. M., y Luebker, D. J. (2002). Perfluorooctanesulfonate-induced perinatal mortality in rat pups is associated with a step dose-response. *Toxicologist* **66**, 25.

Cannizzaro, C., Plescia, F., Martire, M., Gagliano, M., Cannizzaro, G., Mantia, G., y Cannizzaro, E. (2006). Single, intense prenatal stress decreases emotionality and enhances learning performance in the adolescent rat offspring: interaction with a brief, daily maternal separation. *Behav Brain Res* **169**, 128-36.

Carver, C. S., Scheier, M. F., y Weintraub, J. K. (1989). Assessing coping strategies: a theoretically based approach. *J Pers Soc Psychol* **56**, 267-83.

Case, M. T., York, R. G., y Christian, M. S. (2001). Rat and rabbit oral developmental toxicology studies with two perfluorinated compounds. *Int J Toxicol* **20**, 101-9.

Catalani, A., Casolini, P., Scaccianoce, S., Patacchioli, F. R., Spinozzi, P., y Angelucci, L. (2000). Maternal corticosterone during lactation permanently affects brain corticosteroid receptors, stress response and behaviour in rat progeny. *Neuroscience* **100**, 319-25.

CESE (2006). Dictamen del Comité Ético y Social Europeo sobre la Propuesta de Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a las restricciones, a la comercialización y el uso de sulfonatos de perfluorooctano. *Comité Ético y Social Europeo.*

Clark, P. M. (1998). Programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the fetal origins of adult disease hypothesis. *Eur J Pediatr* **157 Suppl 1**, S7-10.

Clarke, A. S., Wittwer, D. J., Abbott, D. H., y Schneider, M. L. (1994). Long-term effects of prenatal stress on HPA axis activity in juvenile rhesus monkeys. *Dev Psychobiol* **27**, 257-69.

Clement, Y., Joubert, C., Kopp, C., Lopicard, E. M., Venault, P., Misslin, R., Cadot, M., y Chapouthier, G. (2007). Anxiety in mice: a principal component analysis study. *Neural Plast* **2007**, 35457.

Cohen, S. (1988). Psychosocial models of the role of social support in the etiology of physical disease. *Health Psychol* **7**, 269-97.

Colomina, M. T., Albina, M. L., Domingo, J. L., y Corbella, J. (1995). Effects of maternal stress on methylmercury-induced developmental toxicity in mice. *Physiol Behav* **58**, 979-83.

Colomina, M. T., Albina, M. L., Domingo, J. L., y Corbella, J. (1997). Influence of maternal stress on the effects of prenatal exposure to methylmercury and arsenic on postnatal development and behavior in mice: a preliminary evaluation. *Physiol Behav* **61**, 455-9.

Colomina, M. T., Albina, M. L., Sanchez, D. J., y Domingo, J. L. (2001). Interactions in developmental toxicology: combined action of restraint stress, caffeine, and aspirin in pregnant mice. *Teratology* **63**, 144-51.

Colomina, M. T., Esparza, J. L., Corbella, J., y Domingo, J. L. (1998). The effect of maternal restraint on developmental toxicity of aluminum in mice. *Neurotoxicol Teratol* **20**, 651-6.

Colomina, M. T., Sanchez, D. J., Esparza, J. L., y Domingo, J. L. (1999). Prenatal effects of caffeine and restraint stress in mice. *Proc Soc Exp Biol Med* **220**, 106-11.

Corsolini, S., y Kannan, K. (2004). Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in several organisms including humans from Italy. *Organohalog Compd* **66**, 4079-85.

Cory-Slechta, D. A. (2005). Studying toxicants as single chemicals: does this strategy adequately identify neurotoxic risk? *Neurotoxicology* **26**, 491-510.

Cory-Slechta, D. A., Virgolini, M. B., Thiruchelvam, M., Weston, D. D., y Bauter, M. R. (2004). Maternal stress modulates the effects of developmental lead exposure. *Environ Health Perspect* **112**, 717-30.

Covance, Laboratories. (2002). Final report: 104-week dietary chronic toxicity and carcinogenicity study with perfluorooctane sulfonic acid potassium salt (PFOS; T-6295) in rats. *Study No. 6239-183. Madison, Wisconsin*

Chang, S. C., Thibodeaux, J. R., Eastvold, M. L., Ehresman, D. J., Bjork, J. A., Froehlich, J. W., Lau, C., Singh, R. J., Wallace, K. B., y Butenhoff, J. L. (2008). Thyroid hormone status and pituitary function in adult rats given oral doses of perfluorooctanesulfonate (PFOS). *Toxicology* **243**, 330-9.

Chang, S. C., Thibodeaux, J. R., Eastvold, M. L., Ehresman, D. J., Bjork, J. A., Froehlich, J. W., Lau, C. S., Singh, R. J., Wallace, K. B., y Butenhoff, J. L. (2007). Negative bias from analog methods used in the analysis of free thyroxine in rat serum containing perfluorooctanesulfonate (PFOS). *Toxicology* **234**, 21-33.

Chrisitan, M. S., Hoberman, A. M., y York, R. G. (1999). Combined oral (gavage) fertility, developmental and perinata/postnatal reproduction toxicity study of PFOS in rats. *Argus Research Laboratories, Inc., Horsham, PA. US EPA docket 8EHQ-0200-00374. Environmental Protection Agency.*

Chrousos, G. P., y Gold, P. V. (1992). The concepts of stress systems disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* **267**, 1244-1252.

Chrousos, G. P., Torpy, D. J., y Gold, P. W. (1998). Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med* **129**, 229-40.

De Kloet, E. R. (1991). Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Fron Neuroendocrinol* **12**, 96-164.

de Kloet, E. R., Oitzl, M. S., y Joels, M. (1993). Functional implications of brain corticosteroid receptor diversity. *Cell Mol Neurobiol* **13**, 433-55.

de Quervain, D. J., Roozendaal, B., y McGaugh, J. L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* **394**, 787-90.

Domingo, J. L., Domingo, A., y Colomina, M. T. (2004). Influence of maternal stress on metal-induced pre- and postnatal effects in mammals: a review. *Biol Trace Elem Res* **98**, 193-208.

Douglas, A. J., Meddle, S. L., Kroemer, S., Muesch, W., Bosch, O. J., y Neumann, I. D. (2007). Social stress induces hypothalamo-pituitary-adrenal axis responses in lactating rats bred for high trait anxiety. *Eur J Neurosci* **25**, 1599-603.

Drago, F., Di Leo, F., y Giardina, L. (1999). Prenatal stress induces body weight deficit and behavioural alterations in rats: the effect of diazepam. *Eur Neuropsychopharmacol* **9**, 239-45.

Ericson, I., Gomez, M., Nadal, M., van Bavel, B., Lindstrom, G., y Domingo, J. L. (2007). Perfluorinated chemicals in blood of residents in Catalonia (Spain) in relation to age and gender: a pilot study. *Environ Int* **33**, 616-23.

Ferguson, D., y Sapolsky, R. (2007). Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. *J Neurosci* **27**, 8046-52.

Fish, E. W., Shahrokh, D., Bagot, R., Caldji, C., Bredy, T., Szyf, M., y Meaney, M. J. (2004). Epigenetic Programming of Stress Responses through Variations in Maternal Care. *Ann N Y Acad Sci* **1036**, 167-80.

Fonseca, E. S., Massoco, C. O., y Palermo-Neto, J. (2002). Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. *Physiol Behav* **77**, 205-15.

Fride, E., Dan, Y., Feldon, J., Halevy, G., y Weinstock, M. (1986). Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. *Physiol Behav* **37**, 681-7.

Fride, E., y Weinstock, M. (1984). The effects of prenatal exposure to predictable or unpredictable stress on early development in the rat. *Dev Psychobiol* **17**, 651-60.

Fride, E., y Weinstock, M. (1989). Alterations in behavioral and striatal dopamine asymmetries induced by prenatal stress. *Pharmacol Biochem Behav* **32**, 425-30.

Fujioka, T., Fujioka, A., Tan, N., Chowdhury, G. M., Mouri, H., Sakata, Y., y Nakamura, S. (2001). Mild prenatal stress enhances learning performance in the non-adopted rat offspring. *Neuroscience* **103**, 301-7.

Giesy, J. P., y Kannan, K. (2001). Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ Sci Technol* **35**, 1339-42.

Goldenthal, E. I., Jessup, D. C., Geil, R. C., y Mehring, J. S. (1978). Ninety-day subacute Rhesus monkey toxicity study. *Study No. 137-092, International Research and Development Corporation, Mattawan, MI. FYI-0500-1378.*

Golub, M. S., Campbell, M. A., Kaufman, F. L., Iyer, P., Li, L. H., Donald, J. M., y Morgan, J. E. (2004). Effects of restraint stress in gestation: implications for rodent developmental toxicology studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **71**, 26-36.

Gordon, C. J. (2003). Role of environmental stress in the physiological response to chemical toxicants. *Environ Res* **92**, 1-7.

Gould, E., y Butcher, L. L. (1989). Developing cholinergic basal forebrain neurons are sensitive to thyroid hormone. *J Neurosci* **9**, 3347-58.

Grasty, R. C., Wolf, D. C., Grey, B. E., Lau, C. S., y Rogers, J. M. (2003). Prenatal window of susceptibility to perfluorooctane sulfonate-induced neonatal mortality in the Sprague-Dawley rat. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **68**, 465-71.

Guruge, K. S., Taniyasu, S., Yamashita, N., Wijeratna, S., Mohotti, K. M., Seneviratne, H. R., Kannan, K., Yamanaka, N., y Miyazaki, S. (2005). Perfluorinated organic compounds in human blood serum and seminal plasma: a study of urban and rural tea worker populations in Sri Lanka. *J Environ Monit* **7**, 371-7.

Hansen, K. J., Johnson, H. O., Eldridge, J. S., Butenhoff, J. L., y Dick, L. A. (2002). Quantitative characterization of trace levels of PFOS and PFOA in the Tennessee River. *Environ Sci Technol* **36**, 1681-5.

Harada, K., Inoue, K., Morikawa, A., Yoshinaga, T., Saito, N., y Koizumi, A. (2005a). Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion. *Environ Res* **99**, 253-61.

Harada, K., Saito, N., Inoue, K., Yoshinaga, T., Watanabe, T., Sasaki, S., Kamiyama, S., y Koizumi, A. (2004). The influence of time, sex and geographic factors on levels of perfluorooctane sulfonate and

perfluorooctanoate in human serum over the last 25 years. *J Occup Health* **46**, 141-7.

Harada, K., Xu, F., Ono, K., Iijima, T., y Koizumi, A. (2005b). Effects of PFOS and PFOA on L-type Ca²⁺ currents in guinea-pig ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 487-94.

Haugom, B., y Spydevold, O. (1992). The mechanism underlying the hypolipemic effect of perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctane sulphonic acid (PFOSA) and clofibric acid. *Biochim Biophys Acta* **1128**, 65-72.

Hedegaard, M., Henriksen, T. B., Sabroe, S., y Secher, N. J. (1993). Psychological distress in pregnancy and preterm delivery. *BMJ* **307(6898)** 234-9.

Hedegaard, M., Henriksen, T. B., Secher, N. J., Hatch, M. C., y Sabroe, S. (1996). Do stressful life events affect duration of gestation and risk of preterm delivery? *Epidemiology* **7**, 339-45.

Heim, C., Newport, D. J., Heit, S., Graham, Y. P., Wilcox, M., Bonsall, R., Miller, A. H., y Nemeroff, C. B. (2000). Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood. *JAMA* **284 (5)**, 592-7.

Henry, C., Guegant, G., Cador, M., Arnauld, E., Arsaut, J., Le Moal, M., y Demotes-Mainard, J. (1995). Prenatal stress in rats facilitates amphetamine-induced sensitization and induces long-lasting changes in dopamine receptors in the nucleus accumbens. *Brain Res* **685**, 179-86.

Herman, J. P., y Spencer, R. (1998). Regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene transcription and protein expression in vivo. *J Neurosci* **18**, 7462-7473.

Holst, K., Andersen, E., Philip, J., y Henningsen, I. (1989). Antenatal and perinatal conditions correlated to handicap among 4-year-old children. *Am J Perinatol* **6**, 258-67.

Hollup, S. A., Kjelstrup, K. G., Hoff, J., Moser, M. B., y Moser, E. I. (2001). Impaired recognition of the goal location during spatial navigation in rats with hippocampal lesions. *J Neurosci* **21**, 4505-13.

Horner, H. C., Packan, D. R., y Sapolsky, R. M. (1990). Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology* **52**, 57-64.

Hu, W., Jones, P. D., Upham, B. L., Trosko, J. E., Lau, C., y Giesy, J. P. (2002). Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated compounds in rat liver and dolphin kidney epithelial cell lines in vitro and Sprague-Dawley rats in vivo. *Toxicol Sci* **68**, 429-36.

Inoue, K., Okada, F., Ito, R., Kato, S., Sasaki, S., Nakajima, S., Uno, A., Saijo, Y., Sata, F., Yoshimura, Y., Kishi, R., y Nakazawa, H. (2004). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ Health Perspect* **112**, 1204-7.

Joëls, M. (1997). Steroid hormones and excitatory in the mammalian brain. *Frontiers in Neuroendocrinology* **18**, 2-24.

Joëls, M., y de Kloet, E. R. (1992). Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends Neurosci* **15**, 25-30.

Johnson, J. D., Gibson, S. J., y Ober, R. E. (1984). Cholestyramine-enhanced fecal elimination of carbon-14 in rats after administration of ammonium [14C] perfluorooctanoate or potassium [14C]perfluorooctanesulfonate. *Fundam Appl Toxicol* **4**, 972-6.

Johnson, J. D., y Ober, R. E. (1979). Absorption of FC-95-¹⁴C in rats after a single oral dose. *Project No. 8900310200. Riker Laboratories, Inc., St. Paul, MN. U.S. EPA docket AR226-0007. Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency.*

Johnstone, H. A., Wigger, A., Douglas, A. J., Neumann, I. D., Landgraf, R., Seckl, J. R., y Russell, J. A. (2000). Attenuation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: changes in feedforward and feedback mechanisms. *J Neuroendocrinol* **12**, 811-22.

Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Fillmann, G., Kumar, K. S., Loganathan, B. G., Mohd, M. A., Olivero, J., Van Wouwe, N., Yang, J. H., y Aldoust, K. M. (2004). Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. *Environ Sci Technol* **38**, 4489-95.

Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Oehme, G., Focardi, S., y Giesy, J. P. (2002a). Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in marine mammals, fishes, and birds from coasts of the Baltic and the Mediterranean Seas. *Environ Sci Technol* **36**, 3210-6.

Kannan, K., Franson, J. C., Bowerman, W. W., Hansen, K. J., Jones, P. D., y Giesy, J. P. (2001). Perfluorooctane sulfonate in fish-eating water birds including bald eagles and albatrosses. *Environ Sci Technol* **35**, 3065-70.

Kannan, K., Newsted, J., Halbrook, R. S., y Giesy, J. P. (2002b). Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in mink and river otters from the United States. *Environ Sci Technol* **36**, 2566-71.

Kaplan, J. R., Manuck, S. B., Clarkson, T. B., y Prichard, R. W. (1985). Advances in Behavioral Medicine. *Katkin, E.S. y Manuck, S.B. (Eds). Greenwich CT: JAI*

Kärroman, A., Ericson, I., van Bavel, B., Darnerud, P. O., Aune, M., Glynn, A., Lignell, S., y Lindstrom, G. (2007). Exposure of perfluorinated

chemicals through lactation: levels of matched human milk and serum and a temporal trend, 1996-2004, in Sweden. *Environ Health Perspect* **115**, 226-30.

Kärrman, A., Van Bavel, B., Hardell, L., Järnberg, U., y Lindström, G. (2004). Perfluoroalkylated compounds in whole blood and plasma from the Swedish population. *Report to Swedish EPA, HÄMI 2150213, dnr 721-4007-02 Mm.*

Kay, G., Tarcic, N., Poltyrev, T., y Weinstock, M. (1998). Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiol Behav* **63**, 397-402.

Kerstner-Wood, C., Coward, L., y Gorman, G. (2003). Protein Binding of perfluorbutane sulfonate, perfluorohexanesulfonate, perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate to plasma (human, rat, monkey), and various human-derived plasma protein fractions. *Southern Research Corporation, Study 9921.7. Unpublished report. Available on USEPA Administrative Record AR-226.*

Kinsley, C., y Svare, B. (1986). Prenatal stress effects: are they mediated by reductions in maternal food and water intake and body weight gain? *Physiol Behav* **37**, 191-3.

Kirschbaum, C., Klauer, T., Filipp, S. H., y Hellhammer, D. H. (1995). Sex-specific effects of social support on cortisol and subjective responses to acute psychological stress. *Psychosom Med* **57**, 23-31.

Kirschbaum, C., Wust, S., Faig, H. G., y Hellhammer, D. H. (1992). Heritability of cortisol responses to human corticotropin-releasing hormone, ergometry, and psychological stress in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **75**, 1526-30.

Kisilevsky, B. S., y Low, J. A. (1998). Human fetal behavior: 100 years of study. *Develop Rev* **18**, 1-29.

Kobasa, S. C. (1979). Stressful life events, personality, and health: an inquiry into hardiness. *J Pers Soc Psychol* **37**, 1-11.

Koehl, M., Darnaudery, M., Dulluc, J., Van Reeth, O., Le Moal, M., y Maccari, S. (1999). Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J Neurobiol* **40**, 302-15.

Kofman, O. (2002). The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev* **26**, 457-70.

Kubwabo, C., Vais, N., y Benoit, F. M. (2004). A pilot study on the determination of perfluorooctanesulfonate and other perfluorinated compounds in blood of Canadians. *J Environ Monit* **6**, 540-5.

Labrador, F. (1992). El Estrés. Nuevas Técnicas para su control. *Ed. Temas de Hoy. Madrid*.

Lai, M. C., Holmes, G. L., Lee, K. H., Yang, S. N., Wang, C. A., Wu, C. L., Tiao, M. M., Hsieh, C. S., Lee, C. H., y Huang, L. T. (2006). Effect of neonatal isolation on outcome following neonatal seizures in rats-the role of corticosterone. *Epilepsy Res* **68**, 123-36.

Lau, C., Butenhoff, J. L., y Rogers, J. M. (2004). The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives. *Toxicol Appl Pharmacol* **198**, 231-41.

Lau, C., Thibodeaux, J. R., Hanson, R. G., Rogers, J. M., Grey, B. E., Stanton, M. E., Butenhoff, J. L., y Stevenson, L. A. (2003). Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: postnatal evaluation. *Toxicol Sci* **74**, 382-92.

Lehmann, J., Stohr, T., y Feldon, J. (2000). Long-term effects of prenatal stress experiences and postnatal maternal separation on emotionality and attentional processes. *Behav Brain Res* **107**, 133-44.

Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., y Abrous, D. N. (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11032-7.

Levine, S. (2000). Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol* **405**, 149-60.

Levine, S. (2005). Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* **30**, 939-46.

Lightman, S. L. (1994). How does the hypothalamus respond to stress? *The Neuroscience* **6**, 215-219.

Luebker, D. J., Case, M. T., York, R. G., Moore, J. A., Hansen, K. J., y Butenhoff, J. L. (2005a). Two-generation reproduction and cross-foster studies of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats. *Toxicology* **215**, 126-48.

Luebker, D. J., Hansen, K. J., Bass, N. M., Butenhoff, J. L., y Seacat, A. M. (2002a). Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein. *Toxicology* **176**, 175-85.

Luebker, D. J., York, R. G., Hansen, K. J., Moore, J. A., y Butenhoff, J. L. (2005b). Neonatal mortality from in utero exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) in Sprague-Dawley rats: dose-response, and biochemical and pharmacokinetic parameters. *Toxicology* **215**, 149-69.

Luebker, D. J., York, R. G., Seacat, A. M., y Butenhoff, J. L. (2002b). Perfluorooctanesulfonate-induced perinatal mortality in rat pups is not a result of reduced serum lipids. *Toxicol Sci* **66(S-1)**, 26.

Lupien, S. J., y McEwen, B. S. (1997). The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Brain Res Rev* **24**, 1-27.

Maestriperi, D., Badiani, A., y Puglisi-Allegra, S. (1991). Prepartal chronic stress increases anxiety and decreases aggression in lactating female mice. *Behav Neurosci* **105**, 663-8.

Masoro, E. J. (2005). Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev* **126**, 913-22.

Mc Clean, M., Bisitis, A., Davies, J., Woods, R., Lowry, P., y Smith, R. (1995). A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med* **1**, 460-63.

Mc Master, A., y Ray, D. W. (2007). Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects. *Exp Physiol* **92(2)**, 299-309.

McCormick, C. M., Smythe, J. W., Sharma, S., y Meaney, M. J. (1995). Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res* **84**, 55-61.

McEwen, B. S. (1994). Endocrine effects on the brain and their relationship to behavior. *Basic Neurochemistry. Eds GS Siegel, BW Agranoff, R Wayne, PB Molinoff. Raven Press. New York.*

McEwen, B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* **22**, 105-22.

McEwen, B. S. (2000). Stress, definition and concepts of. *Encyclopedia of Stress. Academic Press. Fink, G. (Ed), San Diego*

McEwen, B. S. (2005). Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism* **54**, 20-3.

McEwen, B. S., y Sapolsky, R. M. (1995). Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* **5**, 205-16.

Meaney, M. J., Aitken, D. H., Bodnoff, S. R., Iny, L. J., Tatarewicz, J. E., y Sapolsky, R. M. (1985). Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behav Neurosci* **99**, 765-70.

Meaney, M. J., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., LaPlante, P., Caldji, C., Sharma, S., Seckl, J. R., y Plotsky, P. M. (1996). Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci* **18**, 49-72.

Meek, L. R., Burda, K. M., y Paster, E. (2000). Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning. *Physiol Behav* **71**, 543-9.

Meijer, A. (1985). Child psychiatric sequelae of maternal war stress. *Acta Psychiatr Scand* **72**, 505-11.

Midasch, O., Drexler, H., Hart, N., Beckmann, M. W., y Angerer, J. (2007). Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health* **80**, 643-8.

Midasch, O., Schettgen, T., y Angerer, J. (2006). Pilot study on the perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate exposure of the German general population. *Int J Hyg Environ Health* **209**, 489-96.

Mueller, B. R., y Bale, T. L. (2006). Impact of prenatal stress on long term body weight is dependent on timing and maternal sensitivity. *Physiol Behav* **88**, 605-14.

Mutale, T., Creed, F., Maresh, M., y Hunt, L. (1991). Life events and low birthweight-analysis by infants preterm and small for gestational age. *Br J Obstet Gynaecol* **98**, 166-72.

Nemeroff, C. B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C. D., Loosen, P. T., y Vale, W. (1984). Elevated

concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* **226**, 1342-4.

Nieto, J., Abad, M. A., Esteban, A., y Tejerna, M. (2004). Psicología para Ciencias de la Salud. Estudio del comportamiento humano ante la enfermedad. *Mc Graw Hill Interamericana. España.*

Nishio, H., Kasuga, S., Ushijima, M., y Harada, Y. (2001). Prenatal stress and postnatal development of neonatal rats-sex-dependent effects on emotional behavior and learning ability of neonatal rats. *Int J Dev Neurosci* **19**, 37-45.

Noker, P. E., y Gorman, G. S. (2003). A pharmacokinetic study of potassium perfluorooctanesulfonate in the cynomolgus monkey. *Southern Research Institute, Birmingham. AL. U.S. EPA docket AR226-1356. Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency.*

OECD (2002). Co-operation on Existing Chemicals-Hazard Assessment of Perfluorooctane Sulfonate and its Salts, Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. *Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos*

Olsen, G. W., Burlew, M. M., Marshall, J. C., Burris, J. M., y Mandel, J. H. (2004a). Analysis of episodes of care in a perfluorooctanesulfonyl fluoride production facility. *J Occup Environ Med* **46**, 837-46.

Olsen, G. W., Burris, J. M., Burlew, M. M., y Mandel, J. H. (2003a). Epidemiologic assessment of worker serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations. *J Occup Environ Med* **45**, 260-70.

Olsen, G. W., Burris, J. M., Ehresman, D. J., Froehlich, J. W., Seacat, A. M., Butenhoff, J. L., y Zobel, L. R. (2007). Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and

perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect* **115**, 1298-305.

Olsen, G. W., Church, T. R., Larson, E. B., van Belle, G., Lundberg, J. K., Hansen, K. J., Burris, J. M., Mandel, J. H., y Zobel, L. R. (2004b). Serum concentrations of perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in an elderly population from Seattle, Washington. *Chemosphere* **54**, 1599-611.

Olsen, G. W., Church, T. R., Miller, J. P., Burris, J. M., Hansen, K. J., Lundberg, J. K., Armitage, J. B., Herron, R. M., Medhdizadehkashi, Z., Nobiletti, J. B., O'Neill, E. M., Mandel, J. H., y Zobel, L. R. (2003b). Perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in the serum of American Red Cross adult blood donors. *Environ Health Perspect* **111**, 1892-901.

Olsen, G. W., Hansen, K. J., Stevenson, L. A., Burris, J. M., y Mandel, J. H. (2003c). Human donor liver and serum concentrations of perfluorooctanesulfonate and other perfluorochemicals. *Environ Sci Technol* **37**, 888-91.

Ong, K. K. (2007). Catch-up growth in small for gestational age babies: good or bad? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **14**, 30-4.

Orito, K., Gotanda, N., Murakami, M., Ikeda, T., Egashira, N., Mishima, K., y Fujiwara, M. (2007). Prenatal exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) promotes anxiogenic behavior in rats. *Tohoku J Exp Med* **212**, 151-7.

Ottenweller, J. E. (2000). Animal Models (Nonprimate) for Human Stress. *Encyclopedia of Stress*. Academic Press. Fink, G. (Ed), San Diego.

Pardon, M., Gerardin, P., Joubert, C., Perez-Diaz, F., y Cohen-Salmon, C. (2000). Influence of prepartum chronic ultramild stress on maternal pup care behavior in mice. *Biol Psychiatry* **47**, 858-63.

Pare, W. P., y Glavin, G. B. (1986). Restraint stress in biomedical research: a review. *Neurosci Biobehav Rev* **10**, 339-70.

Peters, D. A. (1982). Prenatal stress: effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone levels. *Pharmacol Biochem Behav* **17**, 721-5.

Petraglia, F., Florio, P., Nappi, C., y Genazzani, A. (1996). Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocr Rev* **17**, 156-86.

Pollack, G. M., Browne, J. L., Marton, J., y Haberer, L. J. (1991). Chronic stress impairs oxidative metabolism and hepatic excretion of model xenobiotic substrates in the rat. *Drug Metab Dispos* **19**, 130-4.

Prut, L., y Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* **463**, 3-33.

Rami, A., Rabie, A., y Clos, J. (1989). The time course of hippocampal cholinergic innervation in the developing hypothyroid rat. A combined histochemical and biochemical study of acetylcholinesterase activity. *Int J Dev Neurosci* **7**, 301-8.

Reagan, L. P., y McEwen, B. S. (1997). Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J Chem Neuroanat* **13**, 149-67.

Redei, E. E., Ahmadiyeh, N., Baum, A. E., Sasso, D. A., Slone, J. L., Solberg, L. C., Will, C. C., y Volenec, A. (2001). Novel animal models of affective disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry* **6**, 43-67.

Rivas, M., y Naranjo, J. R. (2007). Thyroid hormones, learning and memory. *Genes Brain Behav* **6 Suppl 1**, 40-4.

Sandi, C., Venero, C., y Cordero, M. I. (2001). Estrés, memoria y trastornos asociados. *Ariel Neurociencia. Barcelona*.

Sapolsky, R. M. (1994a). Glicocorticoides, stress and exacerbation of excitotoxic neuron death. *Seminars in the Neurosciences* **6**, 323-331.

Sapolsky, R. M. (1994b). Individual differences and the stress response. *Seminars in Neurosciences* **6**, 261-269.

Sapolsky, R. M. (1995). ¿Por qué las zebras no tienen úlceras?: la guía del estrés. *Alianza Editorial. Madrid*.

Sapolsky, R. M., y Meaney, M. J. (1986). Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res* **396**, 64-76.

Sapolsky, R. M., Uno, H., Rebert, C. S., y Finch, C. E. (1990). Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci* **10**, 2897-902.

Schneider, M. L., Clarke, A. S., Kraemer, G. W., Roughton, E. C., Lubach, G. R., Rimm-Kaufman, S., Schmidt, D., y Ebert, M. (1998). Prenatal stress alters brain biogenic amine levels in primates. *Dev Psychopathol* **10**, 427-40.

Seacat, A. M., Thomford, P. J., Hansen, K. J., Clemen, L. A., Eldridge, S. R., Elcombe, C. R., y Butenhoff, J. L. (2003). Sub-chronic dietary toxicity of potassium perfluorooctanesulfonate in rats. *Toxicology* **183**, 117-31.

Seacat, A. M., Thomford, P. J., Hansen, K. J., Olsen, G. W., Case, M. T., y Butenhoff, J. L. (2002). Subchronic toxicity studies on perfluorooctanesulfonate potassium salt in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* **68**, 249-64.

Servatius, R. J., Salameh, G., Coyle, K. M., y Paré, W. P. (2000). Restraint Stress. *Encyclopedia of stress. Academic Press. Fink, G. (Ed), San Diego*.

Seyle, H. (1936). The alarm reaction. *Can Med Assoc J* **34:706**.

Shiple, J. M., Hurst, C. H., Tanaka, S. S., DeRoos, F. L., Butenhoff, J. L., Seacat, A. M., y Waxman, D. J. (2004). trans-activation of PPARalpha and induction of PPARalpha target genes by perfluorooctane-based chemicals. *Toxicol Sci* **80**, 151-60.

Simmons, J. E. (1995). Chemical mixtures: challenge for toxicology and risk assessment. *Toxicology* **105**, 111-9.

Smith, J. W., Evans, A. T., Costall, B., y Smythe, J. W. (2002). Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci Biobehav Rev* **26**, 45-60.

Smith, J. W., Seckl, J. R., Evans, A. T., Costall, B., y Smythe, J. W. (2004). Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. *Psychoneuroendocrinology* **29**, 227-44.

So, M. K., Taniyasu, S., Yamashita, N., Giesy, J. P., Zheng, J., Fang, Z., Im, S. H., y Lam, P. K. (2004). Perfluorinated compounds in coastal waters of Hong Kong, South China, and Korea. *Environ Sci Technol* **38**, 4056-63.

So, M. K., Yamashita, N., Taniyasu, S., Jiang, Q., Giesy, J. P., Chen, K., y Lam, P. K. (2006). Health risks in infants associated with exposure to perfluorinated compounds in human breast milk from Zhoushan, China. *Environ Sci Technol* **40**, 2924-9.

Sohlenius, A. K., Eriksson, A. M., Hogstrom, C., Kimland, M., y DePierre, J. W. (1993). Perfluorooctane sulfonic acid is a potent inducer of peroxisomal fatty acid beta-oxidation and other activities known to be affected by peroxisome proliferators in mouse liver. *Pharmacol Toxicol* **72**, 90-3.

Starkov, A. A., y Wallace, K. B. (2002). Structural determinants of fluorochemical-induced mitochondrial dysfunction. *Toxicol Sci* **66**, 244-52.

Stead, J. D., Clinton, S., Neal, C., Schneider, J., Jama, A., Miller, S., Vazquez, D. M., Watson, S. J., y Akil, H. (2006). Selective breeding for

divergence in novelty-seeking traits: heritability and enrichment in spontaneous anxiety-related behaviors. *Behav Genet* **36**, 697-712.

Steer, R. A., Scholl, T. O., Hediger, M. L., y Fischer, R. L. (1992). Self-reported depression and negative pregnancy outcomes. *J Clin Epidemiol* **45**, 1093-9.

Steimer, T., y Driscoll, P. (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress* **6**, 87-100.

Steptoe, A. (1989). The significance of personal control in health and disease. *Stress Personal Control and Health*. Steptoe, A. y Appels, A. Chichester, John Wiley (Eds). Inglaterra.

Stott, D. H. (1973). Follow-up study from birth of the effects of prenatal stresses. *Dev Med Child Neurol* **15**, 770-87.

Stout, S. C., y Nemeroff, C. B. (1994). Stress and psychiatric disorders. *Seminars in the Neurosciences* **6**, 271-280.

Szuran, T. F., Pliska, V., Pokorny, J., y Welzl, H. (2000). Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiol Behav* **71**, 353-62.

Takahashi, L. K., Haglin, C., y Kalin, N. H. (1992a). Prenatal stress potentiates stress-induced behavior and reduces the propensity to play in juvenile rats. *Physiol Behav* **51**, 319-23.

Takahashi, L. K., Turner, J. G., y Kalin, N. H. (1992b). Prenatal stress alters brain catecholaminergic activity and potentiates stress-induced behavior in adult rats. *Brain Res* **574**, 131-7.

Taylor, D. J., Howie, P. W., Davidson, J., Davidson, D., y Drillien, C. M. (1985). Do pregnancy complications contribute to neurodevelopmental disability? *Lancet* **30**, 713-16.

Teague, C. R., Dhabhar, F. S., Barton, R. H., Beckwith-Hall, B., Powell, J., Cobain, M., Singer, B., McEwen, B. S., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., y Holmes, E. (2007). Metabonomic studies on the physiological effects of acute and chronic psychological stress in Sprague-Dawley rats. *J Proteome Res* **6**, 2080-93.

Thibodeaux, J. R., Hanson, R. G., Rogers, J. M., Grey, B. E., Barbee, B. D., Richards, J. H., Butenhoff, J. L., Stevenson, L. A., y Lau, C. (2003). Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. I: maternal and prenatal evaluations. *Toxicol Sci* **74**, 369-81.

Thompson, W. R. (1957). Influence of prenatal maternal anxiety on emotionality in young rats. *Science* **125**, 698-9.

Torrente, M., Albina, M. L., Colomina, M. T., Corbella, J. L., y Domingo, J. L. (2000). Interactions in developmental toxicology: effects of combined administration of manganese and hydrocortisone. *Trace Elem. Electrolytes* **17**, 173-79.

Tsigos, C., y Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* **53**, 865-71.

Tyl, R. W., Ballantyne, B., Fisher, L. C., Fait, D. L., Savine, T. A., Pritts, I. M., y Dodd, D. E. (1994). Evaluation of exposure to water aerosol or air by nose-only or whole-body inhalation procedures for CD-1 mice in developmental toxicity studies. *Fundam Appl Toxicol* **23**, 251-60.

Ulupinar, E., y Yucel, F. (2005). Prenatal stress reduces interneuronal connectivity in the rat cerebellar granular layer. *Neurotoxicol Teratol* **27**, 475-84.

Ulupinar, E., Yucel, F., y Ortug, G. (2006). The effects of prenatal stress on the Purkinje cell neurogenesis. *Neurotoxicol Teratol* **28**, 86-94.

UNEP (2005). Propuesta sobre el sulfonato de perfluorooctano. *Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente*.

UNEP (2006). Informe del Comité de Examen de los Contaminantes Orgánicos Persistentes sobre la labor realizada en su segunda reunión. Perfil de riesgos del sulfonato de perfluorooctano. *Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente*

UNEP (2007). Proyecto de evaluación de la gestión de riesgos: sulfonato de perfluorooctano. *Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente*.

Uno, H., Tarara, R., Else, J. G., Suleman, M. A., y Sapolsky, R. M. (1989). Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. *J Neurosci* **9**, 1705-11.

Vallee, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal, M., Simon, H., y Maccari, S. (1997). Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci* **17**, 2626-36.

Velazquez-Moctezuma, J., Dominguez Salazar, E., y Cruz Rueda, M. L. (1993). The effect of prenatal stress on adult sexual behavior in rats depends on the nature of the stressor. *Physiol Behav* **53**, 443-8.

Virgin, C. E., Jr., Ha, T. P., Packan, D. R., Tombaugh, G. C., Yang, S. H., Horner, H. C., y Sapolsky, R. M. (1991). Glucocorticoids inhibit glucose transport and glutamate uptake in hippocampal astrocytes: implications for glucocorticoid neurotoxicity. *J Neurochem* **57**, 1422-8.

Visser, T. J., y Fliers, E. (2000). Thyroid hormones. *Encyclopedia of stress. Encyclopedia of Stress. Academic Press. Fink, G. (Ed), San Diego*.

Vogel, H. M. (1987). Stress-the neglected variable in experimental pharmacology and toxicology. *TIPS* **8**, 35-38.

Vogel, H. M. (1993). The effect of stress on toxicological investigations. *Human and Experimental Toxicology* **12**, 265-271.

Wadhwa, P. D., Dunkel-Schetter, C., Chicz-DeMet, A., Porto, M., y Sandman, C. A. (1996). Prenatal psychosocial factors and the neuroendocrine axis in human pregnancy. *Psychosom Med* **58**, 432-46.

Wadhwa, P. D., Porto, M., Garite, T. J., Chicz-DeMet, A., y Sandman, C. A. (1998). Maternal corticotropin-releasing hormone levels in the early third trimester predict length of gestation in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **179**, 1079-85.

Wadhwa, P. D., Sandman, C. A., Porto, M., Dunkel-Schetter, C., y Garite, T. J. (1993). The association between prenatal stress and infant birth weight and gestational age at birth: a prospective investigation. *Am J Obstet Gynecol* **169**, 858-65.

Ward, G. R., y Wainwright, P. E. (1989). Prenatal ethanol and stress in mice: 1. Pup behavioral development and maternal physiology. *Physiol Behav* **45**, 533-40.

Ward, H. E., Johnson, E. A., Salm, A. K., y Birkle, D. L. (2000). Effects of prenatal stress on defensive withdrawal behavior and corticotropin releasing factor systems in rat brain. *Physiol Behav* **70**, 359-66.

Ward, I. L. (1972). Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science* **175**, 82-4.

Ward, I. L., y Stehm, K. E. (1991). Prenatal stress feminizes juvenile play patterns in male rats. *Physiol Behav* **50**, 601-5.

Watanabe, Y., Gould, E., y McEwen, B. S. (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* **588**, 341-5.

Weinstock, M. (1997). Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci Biobehav Rev* **21**, 1-10.

Weinstock, M. (2001). Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol* **65**, 427-51.

Weinstock, M. (2005). The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun* **19**, 296-308.

Weinstock, M., Fride, E., y Hertzberg, R. (1988). Prenatal stress effects on functional development of the offspring. *Prog Brain Res* **73**, 319-31.

Weinstock, M., Matlina, E., Maor, G. I., Rosen, H., y McEwen, B. S. (1992). Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat. *Brain Res* **595**, 195-200.

White, P. C. (1994). Genetic diseases of steroid metabolism. *Vitam Horm* **49**, 131-95.

Woolley, C. S., Gould, E., y McEwen, B. S. (1990). Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* **531**, 225-31.

Yaka, R., Salomon, S., Matzner, H., y Weinstock, M. (2007). Effect of varied gestational stress on acquisition of spatial memory, hippocampal LTP and synaptic proteins in juvenile male rats. *Behav Brain Res* **179**, 126-32.

Yamashita, N., Kannan, K., Taniyasu, S., Horii, Y., Petrick, G., y Gamo, T. (2005). A global survey of perfluorinated acids in oceans. *Mar Pollut Bull* **51**, 658-68.

Zagron, G., y Weinstock, M. (2006). Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. *Behav Brain Res* **175**, 323-8.

Zambrana, R. E., Dunkel-Schetter, C., Collins, N. L., y Scrimshaw, S. C. (1999). Mediators of ethnic-associated differences in infant birth weight. *J Urban Health* **76**, 102-16.