

BIÓL. DULCE YASMIN
REYES BRAVO

EFFECTOS NEUROTÓXICOS DE LA ATRAZINA SOBRE LA
LIBERACIÓN DE GABA Y GLUTAMATO EN VÍA NIGROESTRIATAL

2019



Universidad Autónoma de Querétaro

EFFECTOS NEUROTÓXICOS DE LA ATRAZINA SOBRE LA
LIBERACIÓN DE GABA Y GLUTAMATO EN VÍA NIGROESTRIATAL

Tesis

Que como parte de los requisitos
para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

Presenta:

Biól. Dulce Yasmin Reyes Bravo

Dirigido por:

Dra. Nancy Georgina Hernández Chan



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Biomedicina

“EFECTOS NEUROTÓXICOS DE LA ATRAZINA SOBRE LA LIBERACIÓN DE
GABA Y GLUTAMATO EN VÍA NIGROESTRIATAL”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biomedicina

Presenta:

Biól. Dulce Yasmin Reyes Bravo

Dirigido por:

Dra. Nancy Georgina Hernández Chan

Co-dirigido por:

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

Dra. Nancy Georgina Hernández Chan

Presidente

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

Secretario

Dra. Mónica Andrea López Hidalgo

Vocal

Dr. Julián Valeriano Reyes López

Suplente

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro. a
31 de Octubre de 2019
México

Resumen

Varios estudios en roedores han demostrado que la exposición al ampliamente utilizado herbicida atrazina (ATR; 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) causa déficits en la vía dopaminérgica nigroestriatal tales como alteraciones en la actividad locomotora, disminución de los niveles estriatales de dopamina y del recuento de células positivas para tirosina hidroxilasa en la sustancia *nigra pars compacta*. Sin embargo, los efectos de la exposición a ATR en otros neurotransmisores como GABA y glutamato han sido poco estudiados. Para probar si la ATR también afecta a otros sistemas de neurotransmisión, en este estudio se evaluaron los efectos de la exposición crónica (un año) a 1 ó 10 mg de ATR/kg de peso corporal, en 30 ratas macho de la cepa Spregue-Dawley, a través del comportamiento conductual, el cual incluyó una batería de pruebas conductuales como actividad locomotora espontánea, barra de equilibrio, coordinación motora y laberinto elevado en cruz. Para determinar la liberación de GABA y glutamato, en la sustancia *nigra pars reticulata* y estriado (respectivamente), se realizó la técnica de microdiálisis y los dializados obtenidos fueron analizados posteriormente por cromatografía líquida. Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron evaluados a través del análisis de varianza (ANDEVA) de medidas repetidas y ANDEVA de una vía, seguido de un análisis *post hoc* Fisher's PLSD. Los datos de conducta mostraron que la exposición crónica a 10 mg ATR/kg causa hiperactividad y aumenta la ansiedad evaluada en el laberinto elevado en cruz. Mientras que la liberación estriatal de glutamato a nivel basal extracelular y en la estimulación con alto potasio se incrementó en el grupo expuesto a 10 mg de ATR/kg, pero no incrementó la liberación de glutamato en el grupo tratado con 1mgATR/kg en comparación con el grupo control. Estos datos muestran que la exposición crónica a ATR causa alteraciones no sólo en los marcadores dopaminérgicos sino también en la liberación de glutamato en el estriado que, en combinación, podría desencadenar los cambios conductuales observados.

Palabras clave: plaguicidas, conducta, ansiedad y neurotransmisores.

Summary

Several studies in rodents, have shown that exposure to the widely used herbicide atrazine (ATR; 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) causes deficits in the nigrostriatal pathway such as alterations in locomotor activity, decreased striatal dopamine levels, and diminished counts of tyrosine hydroxylase positive cells in substantia *nigra pars compacta*. However, the effects of ATR on other neurotransmitters such as GABA and glutamate have been scarcely studied. To test if ATR also affects other neurotransmitter systems in this study, we evaluated the effects of chronic exposure (one year) to 1 or 10 mg ATR/kg of body weight in 30 male rats of the Sprague-Dawley strain. Through the behavioral behavior that included a battery of behavioral tests such as locomotor activity, beam walking, motor coordination and elevated plus maze. To determine the release of GABA and glutamate, in the substance *nigra pars reticulata* and striatum (respectively), the microdialysis technique was performed and the dialysates obtained were subsequently evaluated by liquid chromatography. Behavioral results showed that chronic ATR exposure to 10 mg ATR/kg causes hyperactivity, and increased anxiety. While the striatal release of glutamate at the extracellular basal level and in stimulation with high potassium was increased in the group exposed to 10 mg of ATR /kg but did not increase the release of glutamate in the group treated with 1mgATR / kg compared to the control group. These data show that chronic ATR exposure causes alterations not only on dopaminergic markers but also on levels release of glutamate in striatum, which in combination could trigger the behavioral changes observed.

Key words: pesticides, behavior, anxiety and neurotransmitters

Dedicatorias

A mi madre: **Sixta Bravo Castro (DEP)**

Porque a pesar de que nos encontramos en diferentes dimensiones, siempre ha sido mi principal motivo para seguir superándome día a día. Los bellos momentos vividos a tu lado son los que me han impulsado a no rendirme y luchar siempre para alcanzar la meta.

A mi padre: **Mario Reyes Linares**

Por su apoyo moral y por hacerme crecer como persona. Por confiar en que podría salir adelante a pesar de todas las dificultades emocionales a las que me enfrenté.

A mis hermanos: **Mario y Carlos Aday**

Por ser la familia que necesito, por sus sabios consejos y su incondicional apoyo emocional. Sé que sin ustedes esto habría sido más difícil de lo normal, gracias por confiar en que lo lograría y por siempre ayudarme a salir adelante cuando sentía que no podía más.

A mis cuñadas: **Nallely y Silvia Sughey**

Por formar parte de mi familia, por brindarme todo su apoyo y darme sabios consejos, por las risas y tristezas que hemos compartido, porque me han demostrado todo el cariño que sienten hacia mí. Por ayudarme a ser mejor persona, a pesar de los obstáculos que encontramos en el camino.

A mis sobrinos: **Mario Marlon, Sharon Mayte, Carlos Kaled, Dasha Sughey, Briana Malinally y Milán Arael**

Por confiar en mí, por siempre creer que lo lograría, por contagiarme de alegría y paz, por ser el reforzador emocional que más necesito, por las bellas palabras que comparten conmigo. Por enseñarme que la familia es el mejor regalo que te da la vida. Sin ustedes esto habría sido sumamente difícil, sin embargo, Dios los envió a mi vida para alegrar mis días y para enseñarles que podemos llegar hasta donde nos lo propongamos. Los amo chiquitines.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada 628655 para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias en Biomedicina. Así como al Programa de Apoyo de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológicas UNAM-DGAPA-PAPIIT IN203916 y 208119 y proyecto CONACYT 251510 por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto de investigación.

Gracias a Dios y a ese hermoso ángel, por guiarme y no dejarme vencer en el camino, porque siempre me sentí confortada al saber que siempre están ahí cuidándome.

A mi codirectora Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova, por permitirme trabajar en este proyecto dentro de su laboratorio, por su apoyo incondicional, por su amistad, por sus sabios y acertados consejos, por enseñarme que todo es posible y por no dejarme rendir. Por todas las observaciones que contribuyeron a que este trabajo sea un trabajo de calidad.

A mi directora de Tesis Dra. Nancy Georgina Hernández Chan, por sus comentarios, observaciones oportunas que ayudaron a que este trabajo mejorara su calidad. Por el apoyo incondicional brindado durante todo el proceso de la maestría.

A los integrantes del comité evaluador de tesis, la Dra. Mónica Andrea López Hidalgo, a la Dra. María del Carmen Mejía Vázquez y al Dr. Julián Valeriano Reyes López, por sus valiosos comentarios que sin duda alguna hicieron que este trabajo sea de gran calidad.

Agradezco especialmente a la Bióloga Soledad Mendoza Trejo y a la M. en C. Patricia Villalobos por enseñarme la realización de las técnicas adecuadas para llevar a cabo exitosamente este proyecto de investigación. Gracias por siempre tener la disponibilidad de ayudarme y por compartir todos sus conocimientos, para conmigo.

A mis compañeras de generación María de los Ángeles e Hilda Edith por el apoyo mutuo que siempre existió, tanto emocional como académicamente hablando.

A mis amigos José y Alejandra, porque en ellos encontré apoyo incondicional en todo momento, porque sin ustedes este proceso hubiera sido tan solitario y complicado. Ustedes siempre han estado en los buenos, en los malos y en los peores momentos, gracias a la vida por hacerme coincidir con seres tan maravillosos como ustedes, los quiero demasiado chicos.

Finalmente, agradezco infinitamente a cada integrante de mi familia, por depositar su confianza en mí y por siempre creer que lo lograría. Al fin lo logramos, porque ustedes también han contribuido a que esto no solo sea un sueño, sino que sea una hermosa realidad. Gracias Dios por darme una familia imperfecta, pero que sabe amar sinceramente.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II. 1 Atrazina.....	3
II.1.1 Generalidades	3
II.1.2 Propiedades fisicoquímicas	4
II.1.3 Metabolismo y biotransformación de ATR.....	5
II.1.4 Mecanismo de acción en las plantas	5
II.1.5 Toxicocinética en animales y humanos	5
II.1.6 Fuentes de exposición a la atrazina.....	7
II.2 Efectos tóxicos del herbicida atrazina	8
II.3 Efectos neurotóxicos del herbicida atrazina	8
II.4 Sistemas de neurotransmisión glutamatérgico y GABAérgico	10
II.4.1 Sistema glutamatérgico	10
II.4.1.1 Glutamato	10
II.4.1.2 Síntesis de glutamato.....	10
II.4.1.3 Vesiculación, liberación, recaptura y metabolismo de glutamato.....	11
II.4.1.4 Receptores ionotrópicos	11
II.4.1.5 Receptores metabotrópicos	12
II.4.2 Sistema GABAérgico	13
II.4.2.1 Ácido γ - aminobutírico	13
II.4.2.2 Síntesis.....	13
II.4.2.3 Vesiculación, liberación, recaptura y metabolismo de GABA	13
II.4.2.4 Receptores GABA _A	13
II.4.2.5 Receptores GABA _B	14
II.5 Circuito motor	14
II.5.1 Anatomía y fisiología de los ganglios basales.....	14
II.5.2 Vía directa e indirecta	15
III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	17

IV. HIPÓTESIS	17
V.1 Objetivo General	17
V.2 Objetivos Específicos	17
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	18
VI.1 Tipo de investigación	18
VI.2 Población /Animales	18
VI.3 Muestra y tipo de muestra	18
VI.3.1 Criterios de selección	18
VI.3.2 Variables estudiadas	19
VI.4 Técnicas e instrumentos	20
VI.4.1 Actividad locomotora espontánea	20
VI.4.2 Barra de equilibrio	20
VI.4.3 Coordinación motora	21
VI.4.4 Laberinto elevado en cruz	22
VI.4.5 Determinación de los niveles de glutamato y GABA en microdializados	23
VI.4.6 Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia	24
VI.5 Procedimientos	25
VI.5.1 Análisis estadístico	25
VI.5.2 Consideraciones éticas	26
VII. RESULTADOS	27
VII.1 Actividad locomotora	27
VII.1.1 Efecto de la exposición crónica a atrazina sobre la exploración en el registro de actividad locomotora	27
VII.1.2 Efecto de la exposición crónica a la atrazina durante la fase de oscuridad, sobre la actividad locomotora espontánea	28
VII.1.3 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre la actividad locomotora espontánea durante 24 horas a lo largo de 12 meses	29
VII.1.4 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre la actividad locomotora espontánea durante 24 horas	30

VII.2 Barra de equilibrio.....	31
VII.3 Coordinación motora.....	32
VII.4 Laberinto elevado en cruz.....	33
VII.5 Liberación estriatal de glutamato.....	34
VII.6 Liberación de GABA en la sustancia <i>nigra pars reticulata</i>	35
VIII. DISCUSIÓN.....	36
VIII.1 Actividad Locomotora espontánea.....	36
VIII.2 Barra de equilibrio.....	37
VIII.4 Laberinto elevado en cruz.....	38
VIII.5 Liberación estriatal de glutamato.....	40
VIII.6 Liberación de GABA en sustancia <i>nigra pars reticulata</i>	40
IX. CONCLUSIÓN.....	42
X. PROPUESTAS.....	44
XI. BILIOGRAFÍA.....	45
XII. ANEXOS.....	52
XI.1 Glía.....	52

Abreviaturas y siglas

5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindol acético
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
ANDEVA	Análisis de varianza
ATR	Atrazina
ATR-Mercap	Atrazina mercapturato
ATR-SG	Atrazina glutationada
COX	Citocromo oxidasa
DA	Dopamina
DACT	Diaminoclorotriazina
DE	Desetilatrazina
DIP	Deisopropil atrazina
EP	Enfermedad de Parkinson
GABA	Ácido γ - aminobutírico
GABAT	Transportador de GABA
GAD	Enzima ácido glutámico descarboxilasa
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
GSH	Glutación
GST	Glutación transferasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
KA	Kainato
mGluR	Receptor metabotrópico
NMDA	N-metil-d-aspartato
NST	Núcleo subtalámico
OPA	Ortoftaldehído
SNC	Sistema nervioso central
SNpc	Substancia <i>nigra pars compacta</i>
SNpr	Sustancia <i>nigra pars reticulata</i>
STR	Estriado
VGAT	Transportador vesicular de GABA
VGLuT	Transportador vesicular de glutamato

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los seres humanos estamos expuestos a una variedad de sustancias tóxicas presentes en el medio ambiente como: metales y plaguicidas entre otros. Los plaguicidas son compuestos químicos destinados a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, se clasifican de acuerdo con el organismo que controlan o eliminan, insectos (insecticidas), fungicidas (hongos), acaricidas (ácaros) y herbicidas (malezas) (Costa, 2008). Dentro de esta amplia gama de plaguicidas, los más utilizados a nivel mundial son los herbicidas, siendo la atrazina (ATR) un herbicida de uso común dentro de la agricultura. Esta sustancia ha sido considerada un herbicida que posee una solubilidad en agua de 35 mg/L a 25°C. Esta característica hace que dicha sustancia sea persistente en los mantos acuíferos y en el suelo por varios años. Existe evidencia de la presencia de ATR en el agua de consumo humano en la Unión Europea por lo que se prohibió el uso de dicho herbicida desde el año 2004, sin embargo, en México no existe información al respecto y se sigue usando de manera indiscriminada.

La exposición a ATR en roedores se ha asociado con la producción del fenotipo de la enfermedad de Parkinson. Estudios en ratas (Bardullas *et al.*, 2011;2013; Rodríguez *et al.*, 2013) y ratones (Coban y Filipov 2007; Lin *et al.*, 2013) muestran que la exposición a este herbicida produce alteraciones dopaminérgicas que dan como consecuencia una disminución o un aumento en la actividad locomotora de los animales posterior a la exposición aguda o crónica (respectivamente) a dicho herbicida. Cabe mencionar que un estudio realizado en ratas (Rodríguez *et al.*, 2017) muestra que las neuronas dopaminérgicas no son las únicas neuronas sensibles a ATR y que existen otras regiones cerebrales (mesencéfalo ventral y dorsal, amígdala, núcleo subtalámico, colículo superior) que presentan sensibilidad a este herbicida. Resultados preliminares de nuestro laboratorio, reportan que la exposición crónica de 1 mg ATR/kg de peso corporal en el estriado de las ratas macho disminuye la concentración de glutamato mientras que en ratas expuestas a 10 mg ATR/kg de peso corporal aumenta la concentración de glutamina. Otro hallazgo importante reportado es que al evaluar la

concentración de GABA, glutamina y glutamato en mesencéfalo ventral, se observa que estas concentraciones se ven elevadas en el grupo de ratas expuestas a 10 mg ATR/kg de peso corporal (datos no publicados). Estos hallazgos hacen sospechar que la exposición crónica a ATR podría estar influyendo en la liberación de estos neurotransmisores. Por tal motivo este proyecto tiene como objetivo evaluar si la administración crónica a ATR causará alteraciones en la conducta motora de los animales y si estas alteraciones afectarán la liberación de GABA y glutamato.

Existen sistemas de neurotransmisión como: los sistemas GABAérgico y glutamatérgico que son modulados por el sistema dopaminérgico. Y debido a los antecedentes mencionados, se sabe que el sistema dopaminérgico está siendo alterado posterior a una exposición al herbicida atrazina, sin embargo, a la fecha se desconoce si dicha exposición altera el sistema GABAérgico y/o glutamatérgico de manera paralela al sistema dopaminérgico. Por lo tanto, es importante evaluar si la exposición crónica al herbicida ATR provoca alteraciones cuantificables a través del empleo de una batería de pruebas conductuales y si esto se correlaciona con la liberación de GABA y glutamato en el estriado (estructura blanco de la vía dopaminérgica nigroestriatal).

II. ANTECEDENTES

II. 1 Atrazina

II.1.1 Generalidades

Actualmente existe evidencia de que la exposición a sustancias tóxicas presentes en el medio ambiente tales como: metales y plaguicidas entre otros, juega un papel importante en la etiología de las patologías de los ganglios basales (Hossain y Filipov 2008). La exposición ocupacional a productos químicos agrícolas se ha considerado como un factor de riesgo de la enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Parkinson es considerada una enfermedad multifactorial, sin embargo, la exposición a plaguicidas ha recibido atención especial, debido a que se ha asociado con una mayor incidencia de la enfermedad de Parkinson en trabajadores agrícolas (Priyadarshi *et al.*, 2000). Se trata de una enfermedad neurodegenerativa, que se caracteriza por la pérdida del 80% o más de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) y se manifiesta por alteraciones en el movimiento (Ros-Bernal *et al.*, 2009), debido a que se ha alterado el sistema nigroestriatal que es el encargado de la funcionalidad y coherencia de la actividad motora (Bentivoglio y Morreli, 2005).

Los plaguicidas (según la FAO, 2006) son sustancias o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga. Se clasifican de acuerdo con el organismo que controlan o eliminan, insecticidas (insectos), herbicidas (malezas), fungicidas (hongos) y acaricidas (ácaros) entre otros (Costa, 2008). Los plaguicidas que se han asociado con el fenotipo de la enfermedad de Parkinson son: maneb (fungicida), paraquat (herbicida) y rotenona (piscicida), siendo los primeros dos, los que presentan mayor toxicidad dopaminérgica debido a que provocan la degeneración de la SNpc en roedores (Thiruchelvam *et al.*, 2000; Betarbet *et al.*, 2000). Sin embargo, no existen estudios que asocien la exposición a la atrazina (ATR) con el fenotipo de la enfermedad de Parkinson. Por tal motivo, el papel que juegan los plaguicidas en el sistema nervioso ha recibido especial atención, particularmente aquellos que son altamente comerciales ya que su uso frecuente implica una exposición continua a la población. La ATR es un herbicida que se introdujo a nivel mundial en 1958, pero su utilización ha incrementado constantemente en los últimos 50 años (Golla *et al.*, 2011). En México se empezó a

utilizar en 1975 (SAGARPA 2007), actualmente son varias empresas las encargadas de la producción de este herbicida en nuestro país. Gesaprim es el nombre comercial más conocido, pero cabe mencionar que existen otros productos con el mismo ingrediente activo. Villa-Canela (2006) calculó que en 2005 se aplicaban aproximadamente 1078 toneladas de ATR al año, en todo el país.

II.1.2 Propiedades fisicoquímicas

La ATR pura es una sustancia manufacturada y no ocurre naturalmente es un polvo blanco, sin olor y poco volátil(ATSDR, 2003). Pertenece al grupo de los herbicidas triazínicos clorados. Su nombre químico es 6-cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina, su número CAS es 1912-24-9 (Figura 1). La ATR tiene un peso molecular de 215.68 g/mol y su punto de fusión oscila entre 173-177 °C. La movilidad de la ATR y de sus metabolitos en el medio ambiente, está determinada por su baja afinidad a los componentes del suelo (2.0 L/kg) y su elevada persistencia (10-5824 días). Asimismo, su baja volatilidad está determinada por los valores de presión de vapor (3.8×10^{-5} Pa) y de la constante de la Ley de Henry (3.04×10^{-9} atm m³/mol). Adicionalmente la ATR presenta baja solubilidad en agua (35 mg/L en agua a 25°C). Estas propiedades fisicoquímicas le confieren a la ATR características para ser considerada un potencial contaminante de aguas superficiales y profundas (Hansen *et al.*, 2013).

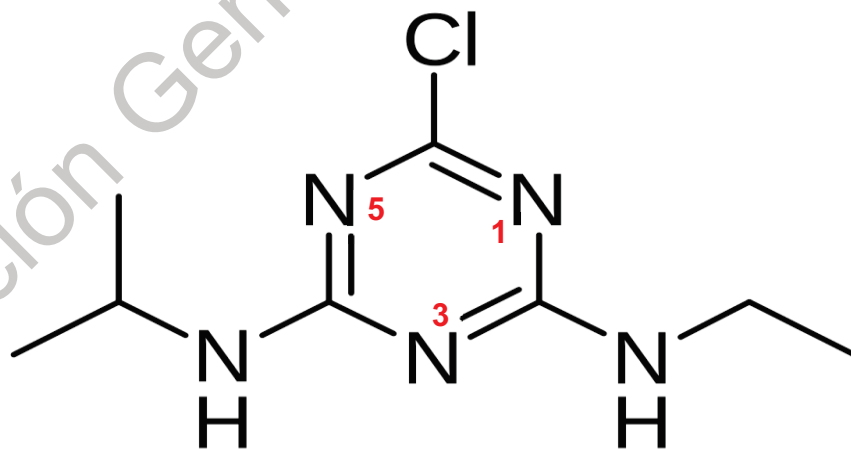


Figura 1. Estructura química de la ATR. 6-cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina, CAS1912-24-9.

II.1.3 Metabolismo y biotransformación de ATR

El metabolismo de la ATR se ha estudiado en varias especies. Los principales metabolitos reportados en humanos y mamíferos son desetilatrazina (DE), deisopropilatrazina (DIP) y diaminoclorotriazina (DACT). La ATR se metaboliza ampliamente por isoenzimas P450 a metabolitos clorados desalquilados. Sin embargo, la ATR y sus metabolitos clorados también pueden ser metabolizados a metabolitos no clorados a través de la conjugación mediada por glutatión transferasa (GST) (Figura 2).

II.1.4 Mecanismo de acción en plantas

La absorción de los herbicidas ocurre cuando las malezas lo incorporan en su interior, ya sea a través de sus partes aéreas (hojas, tallo) o sus partes subterráneas (raíces, rizomas o bulbos) (Anzalone, 2008). La atrazina puede ser absorbida por las raíces o las hojas de las malezas inhibiendo la fotosíntesis. Este proceso tiene lugar en los cloroplastos. Según Rao (2002), hasta el momento solo se ha comprobado que los mecanismos de acción importantes de los herbicidas, son la inhibición del fotosistema II y el desvío o secuestro de electrones a nivel de fotosistema I.

La atrazina interactúa con las proteínas del fotosistema II en el sitio de unión a la plastoquinona B (lípidos sintetizados por los cloroplastos) y bloquea el transporte de electrones fotosintéticos (Rutherford y Krieger-Liszkay 2001), evitando así la fijación del CO₂ con la subsiguiente producción de energía en malezas “diana”. La muerte de las malas hierbas “diana” se produce principalmente debido a la desecación posterior al daño de la membrana, debido a la formación de especies reactivas del oxígeno que desencadenan una reacción en cadena de la peroxidación lipídica (Marchetti *et al.*, 2013).

II.1.5 Toxicocinética en animales y humanos

La ATR se absorbe en el tracto gastrointestinal de los animales y humanos que consumen agua contaminada con este herbicida. Un estudio controlado evaluó la absorción y excreción de la ATR en un modelo murino (rata), después de administrar oralmente una dosis de 0.53 mg de ATR/kg de peso. Después de 72 horas el 20% de la

ATR fue excretada vía heces, 65 % por orina y el 15 % retenida en los tejidos. En este estudio se determinaron valores de absorción de ATR entre 70-80 % de la dosis administrada, además de proponer al sistema urinario como ruta principal de excreción (Ciba-Geigy, 1987).

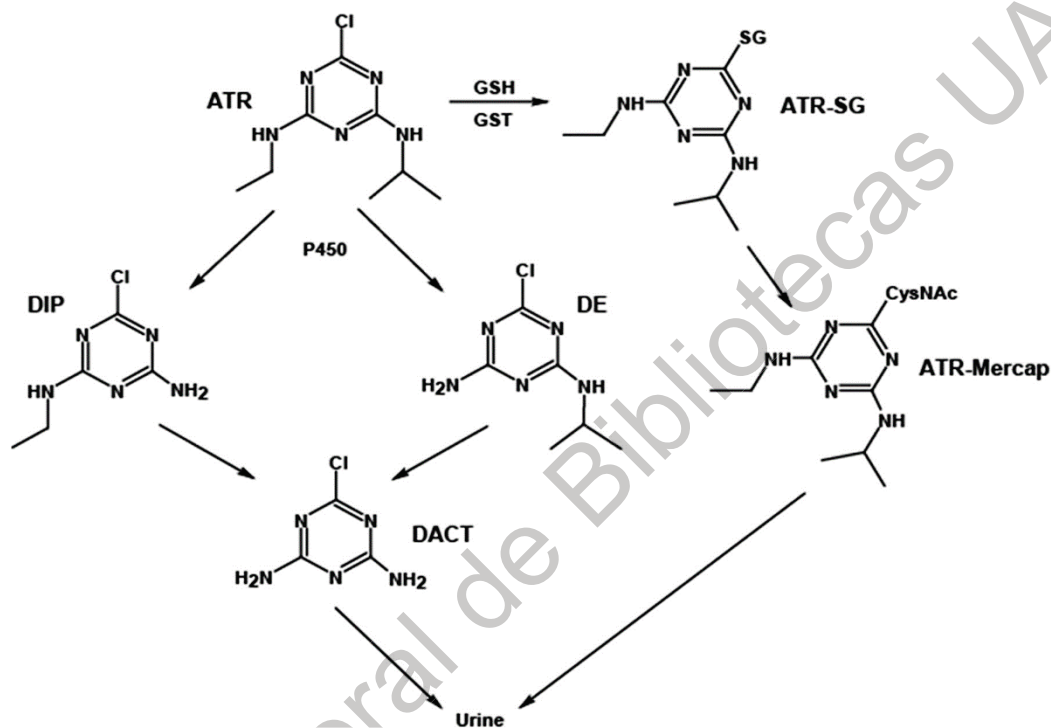


Figura 2. Metabolismo de la ATR. La ATR se metaboliza principalmente por citocromo P450 y en menor medida, por GST. Los principales metabolitos derivados de P450 de ATR son los N-desalquilados, desetilatrastina (DE), deisopropil atrazina (DIP), diaminoclotriazina (DACT). DACT ha sido el principal metabolito de ATR detectado en estudios *in vivo* en ratas, aunque hasta el momento se desconoce la enzima responsable de su formación. Sin embargo, el metabolismo de ATR mediado por GST humana, tiene como metabolito la ATR-mercaptopuro, que también ha sido detectado en orina humana, lo que demuestra que la conjugación de ATR con glutatión ocurre en humanos y que este metabolito podría ser un biomarcador útil para detectar ATR.

En un estudio se reporta que la ATR ingresa al sistema nervioso, aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual logra atravesar la barrera hematoencefálica (Stoker y Cooper 2007). Este estudio evaluó la distribución de la ATR en la leche marcada radiactivamente con carbono 14 (C-14) en diferentes órganos y tejidos, de ratas lactantes expuestas a 2 ó 4 mg/kg vía intragástrica. Los autores reportan que los niveles

de ATR se distribuyen homogéneamente en hipotálamo e hipófisis, sin embargo, las concentraciones aumentan en proporción con la dosis administrada. Mientras que algunas regiones periféricas como la glándula mamaria y pulmones mantuvieron los mismos niveles de ATR independientemente de la dosis administrada.

Sin embargo, el estudio realizado por Ross *et al.* (2009) en ratones expuestos a una única dosis a 5, 25, 125 ó 250 mg/kg vía intragástrica, evaluó los niveles de ATR y sus principales metabolitos (DACT, DE y DIP) en plasma, orina, materia fecal, hígado, riñón, bazo, timo y cerebro. Estos autores reportan que la principal vía de excreción de la ATR es por orina (siendo DACT el metabolito más abundante) durante las primeras 24 horas posteriores a la administración. En relación con el análisis del contenido de ATR en materia fecal, no reveló cantidades significativas de ATR ni de los principales metabolitos. Asimismo, reportan que en plasma, hígado, riñón, bazo, timo y cerebro el principal metabolito que se encuentra es el DACT y que sus concentraciones son dependientes de la dosis de ATR administrada, mientras que los otros metabolitos no fueron detectables. Estos datos sugieren que la ATR se distribuye y se metaboliza ampliamente en ratones; lo que propone que ATR y su metabolito DACT persisten en el cerebro mayor tiempo, debido a una eliminación lenta puesto que es un tejido rico en lípidos y que presenta cantidades dispersas de enzima P450. Pocos estudios han cuantificado ATR y sus metabolitos en roedores, sin embargo, Bakke *et al.* en 1972 reportaron que los niveles de ATR marcada radioactivamente (ATR-¹⁴C) disminuían lentamente en el cerebro, con respecto a otros tejidos periféricos, en ratas.

A pesar de que, el mecanismo por el cual la ATR ingresa al cerebro aún no es exactamente conocido, un estudio realizado en ratas hembras en el 2006 (Dooley *et al.*) propone que la ATR forma aductos con la hemoglobina, a través del ataque nucleofílico del residuo de cisteína de la hemoglobina al cloro de la diaminoclorotriazina.

II.1.6 Fuentes de exposición a la atrazina

En nuestro país no existe información sobre la presencia de la ATR en los mantos acuíferos, a pesar de la amplia extensión del terreno dedicado a la agricultura, por lo que

no se ha generado ninguna política sobre los límites permisibles para esta sustancia. Sin embargo, en los países que pertenecen a la Unión Europea se ha establecido como límite permisible de ATR presente en el agua potable 0.1 µg /L (Jablonowski *et al.*, 2010). Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece 2 µg/L, mientras que la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (USEPA por sus siglas en inglés) establece 3 µg/L (Mela *et al.*, 2013). La atrazina se ha considerado el plaguicida más comúnmente detectado en aguas superficiales y pozos profundos en las zonas que presentan uso frecuente de plaguicidas, a la vez esta agua es utilizada con frecuencia en el riego de la agricultura (Barbash *et al.*, 2001). Adicionalmente se reportan exposiciones ocupacionales, principalmente en aplicadores de plaguicidas (Gammon *et al.*, 2005).

II.2 Efectos tóxicos del herbicida atrazina

En estudios de laboratorio, se ha demostrado que la exposición excesiva a ATR es perjudicial para varios órganos y sistemas, incluyendo los sistemas inmune, reproductivo y nervioso (Cooper *et al.*, 2007). Estudios epidemiológicos han reportado una correlación positiva entre la ingesta de agua de pozo, el trabajo de agricultor, la exposición a plaguicidas/herbicidas, el vivir en un área rural con un elevado riesgo a desarrollar la enfermedad de Parkinson (Priyadarshi *et al.*, 2001). Existen estudios en diferentes modelos animales que nos indican que varias especies se ven afectadas por este herbicida. En los peces, la ATR afecta a los parámetros hematológicos, la actividad locomotora, la respuesta inmune, el metabolismo, el estrés oxidativo y la reproducción (Mela *et al.*, 2013).

II.3 Efectos neurotóxicos del herbicida atrazina

Estudios previos sugieren que la exposición a ATR produce alteraciones en la fisiología de los sistemas de neurotransmisión dopaminérgica (Coban y Filipov 2007; Bardullas *et al.*, 2011, 2013; Rodríguez *et al.*, 2013, Márquez-Ramos *et al.*, 2017). Este sistema es de suma importancia para la planeación e iniciación de conductas motoras a través de la vía nigroestriatal.

Rodríguez *et al.* (2013) reportaron que la exposición repetida a seis inyecciones de 100 mg ATR/kg vía intraperitoneal durante dos semanas causó hipoactividad, disminución en los niveles de dopamina (DA) y sus metabolitos, del ácido 5- hidroxindol acético (5-HIAA; metabolito de la serotonina) en estriado, una disminución en la expresión del gen antioxidante tioredoxina en núcleo *accumbens*; mientras que en mesencéfalo se observó una disminución de la expresión de los genes de tirosina hidroxilasa (enzima involucrada en la producción de catecolaminas) y del transportador de dopamina (recaptura) pero aumentó en la expresión del gen del transportador vesicular de dopamina-2 (vesiculación). Dos meses posteriores al tratamiento con ATR, un reto farmacológico (1 mg/kg de sulfato de anfetamina) indujo hiperactividad; lo que indica que la exposición a ATR modifica diferencialmente los sistemas dopaminérgicos de los animales tratados. Es importante recordar que la DA participa en la regulación de diversas funciones, como la conducta motora, la emotividad, la afectividad, la ingestión de agua y alimentos, así como en la comunicación neuroendocrina.

En estudios realizados por Bardullas *et al.* (2011, 2013) se encontró que la exposición a 10 mg ATR/kg por 12 meses causó hiperactividad, disminuida en la coordinación motora, decremento en la concentración de dopamina en el estriado y en el número de células positivas a tirosina hidroxilasa en la SNpc; de la misma manera, se observó disminución de marcadores de estrés celular como citocromo oxidasa (COX) en la misma región cerebral. Estos resultados indican que la ATR tiene efecto sobre las neuronas dopaminérgicas de la vía dopaminérgica nigroestriatal.

Así mismo Rodríguez *et al.* (2017) reportaron que una inyección de 100 mg ATR/kg causó hipoactividad y aumentó el número de células positivas a c-Fos en regiones del cerebro como tálamo, amígdala, núcleo subtalámico, colículo superior y sustancia *nigra*. Estos resultados indican que el herbicida ATR tiene un efecto inmediato en la actividad locomotora espontánea y corroboran su efecto inductor de hipoactividad en los animales tratados, mostrando que otras células distintas a las dopaminérgicas en regiones del circuito motor que forman los ganglios basales, responden a una administración aguda de ATR.

Los antecedentes ya mencionados indican que el sistema dopaminérgico puede ser un blanco de acción del herbicida ATR, aunque los mecanismos por los cuales actúa aún no se conocen con precisión. Las alteraciones conductuales observadas en los modelos animales sugieren que la ATR puede estar afectando otros sistemas de neurotransmisión, tales como los sistemas glutamatérgicos y GABAérgicos cerebrales.

II.4 Sistemas de neurotransmisión glutamatérgico y GABAérgico

II.4.1 Sistema glutamatérgico

II.4.1.1 Glutamato

El glutamato un aminoácido no esencial, es el neurotransmisor excitatorio más abundante en el SNC de los mamíferos, desempeña funciones clave en la memoria, desarrollo neuronal y en la plasticidad cerebral (Crupi *et al.*, 2019). Clínicamente, se ha asociado con adicciones, psicosis, neurodegeneración y muerte glial (Stallar y Saadabadi, 2018).

En el cerebro, el proceso de síntesis de glutamato en las terminales nerviosas se origina de dos fuentes: 1) de la glucosa a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, tanto en neuronas como en astrocitos (Hertz 2004) y a través de 2) la transaminación de α -cetoglutarato y de glutamina que es sintetizada en células gliales y posteriormente es transportada a las terminales nerviosas (Cooper *et al.*, 2003).

II.4.1.2 Síntesis de glutamato

El glutamato se caracteriza por tener un esqueleto de cuatro carbonos y un grupo amino, que lo obtiene a través de una transaminación del aminoácido glutamina. El glutamato se sintetiza a través de la enzima glutaminasa a partir de la glutamina que proviene del astrocito (Stallar y Saadabadi, 2018). La glutamina ingresa a la neurona presináptica a través del transportador de glutamina sistema N y A (SN y SA) y por acción de la enzima glutaminasa se sintetiza a glutamato (Siegel *et al.*, 2006).

II.4.1.3 Vesiculación, liberación, recaptura y metabolismo de glutamato

Posterior a su síntesis, el glutamato es almacenado en vesículas por el transportador vesicular de glutamato (VGluT), el cual funge como un antiporte protón/glutamato, se estima que cada vesícula contiene de 60-250 mmol/L de glutamato. Las vesículas juegan un papel clave abasteciendo al sistema de glutamato disponible para su liberación cuando un potencial de acción alcanza la terminal axónica y el flujo intracelular de Ca^{2+} aumenta lo suficiente para promover la fusión de las vesículas con la membrana y descargar su contenido al espacio sináptico para actuar sobre los receptores ionotrópicos (acoplados a canales iónicos) o los metabotrópicos (acoplados a proteínas G) (Siegel *et al.*, 2006).

Este aminoácido es rápidamente eliminado del espacio extracelular por una familia de transporte de alta afinidad, dependiente de sodio (Olivares-Bañuelos *et al.*, 2019), llamada transportadores de aminoácidos excitadores tipo 1 y 2 (EAAT1 y EAAT2) en humanos (Siegel *et al.*, 2006), ubicados principalmente en la membrana plasmática de astrocitos perisinápticos y en menor medida en las neuronas (Olivares-Bañuelos *et al.*, 2019). Si el glutamato es reingresado a la neurona presináptica nuevamente es vesiculado, mientras que el glutamato que ingresa hacia el astrocito es convertido a glutamina a través de la enzima glutamina sintetasa para que nuevamente esta glutamina sea transportada a la neurona presináptica por transportadores de glutamina (SN y SA) (Siegel *et al.*, 2006).

II.4.1.4 Receptores ionotrópicos

Los receptores ionotrópicos son canales de cationes cuya apertura aumenta cuando el glutamato se une al receptor. En función del agonista que produce la activación de éstos con mayor afinidad o selectividad, los receptores ionotrópicos de glutamato se han clasificado en tres tipos: N-metil-d-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) y kainato (KA).

Los receptores AMPA sirven como receptores para la transmisión sináptica excitatoria rápida, mediada por glutamato, una clase importante de antagonistas no competitivos selectivos para los receptores AMPA está representada por las 2,3-

benzodiazepinas. Los receptores NMDA, son los receptores que están más estrictamente regulados y son permeables a Na^+ , K^+ y principalmente a Ca^{2+} . Para que se activen estos receptores es necesario la presencia de tres elementos 1) la presencia de glutamato en el espacio sináptico, 2) que ocurra una despolarización de la membrana para que pueda removerse el Mg^{2+} que bloquea el poro de estos receptores, 3) la presencia de un coagonista (glicina o D-serina). Un freno muy importante en la activación de los receptores NMDA es el proporcionado por el Mg^{2+} extracelular, que ejerce un bloqueo dependiente del voltaje del poro del canal iónico, otro inhibidor alostérico endógeno son los protones de H^+ . Es importante mencionar que también existen inhibidores exógenos dependientes del voltaje de los canales del receptor NMDA como, ketamina (anestésico), fenilciclidina (droga de abuso) y MK-801 (dizolcipina) (Siegel *et al.*, 2006).

II.4.1.5 Receptores metabotrópicos

Los receptores metabotrópicos no son canales y no permiten el flujo de cationes, estos receptores activan a proteínas G cuando el glutamato se une a ellos. Se han identificado ocho receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR1- mGluR8) y se han clasificado en tres grupos de acuerdo a los mecanismos de transducción de señales (Siegel *et al.*, 2006). Los receptores metabotrópicos del grupo I incluyen a mGLUR1 y mGLUR5, que normalmente son estimulantes y están asociados con la activación de la fosfolipasa C y segundos mensajeros que llevan a cabo la producción de inositol y diacilglicerol. Los receptores metabotrópicos que pertenecen al grupo II incluyen mGLUR2 y mGLUR3, mientras que los receptores metabotrópicos del grupo III incluyen mGLUR4, mGLUR6, mGLUR7 y mGLUR8. Los receptores que pertenecen al grupo II y III comparten una homología de secuencia (~ 70 %) y ambos grupos están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa (Crupi *et al.*, 2019).

II.4.2 Sistema GABAérgico

II.4.2.1 Ácido γ -aminobutírico

El ácido γ -aminobutírico (GABA), es el neurotransmisor inhibitor por excelencia del SNC y esta presente en altas concentraciones (milimolar) en muchas regiones del cerebro (Siegel *et al.*, 2006). La probabilidad de que el GABA funcione como un neurotransmisor inhibitor en el cerebro, ha estimulado un prodigioso esfuerzo de investigación para implicar a GABA en la etiología de una serie de trastornos neurológicos y psiquiátricos. En la actualidad, el GABA ha sido incluido de manera más convincente, directa e indirectamente en la patogénesis de la epilepsia y se ha relacionado intimamente con el metabolismo oxidativo de los carbohidratos del SNC.

II.4.2.2 Síntesis

El GABA se sintetiza a partir del glutamato, por acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) enzima que está presente únicamente en neuronas GABAérgicas y que es la encargada de catalizar la descarboxilación del ácido glutámico.

II.4.2.3 Vesiculación, liberación, recaptura y metabolismo de GABA

Una vez sintetizado el GABA es introducido en vesículas a través del transportador vesicular de GABA (VGAT), estas vesículas juegan un papel clave en el abastecimiento de GABA disponible para su liberación. La liberación ocurre en respuesta a una despolarización de la membrana y la exocitosis dependiente de calcio. El GABA puede entonces unirse a sus receptores GABA_A (canal iónico) y GABA_B (acoplados a proteínas G). La acción de GABA en la sinapsis finaliza mediante la recaptura de GABA en las terminales nerviosas presinápticas y células gliales circundantes, por acción del transportador de GABA (GABAT) hacia la neurona presináptica (Siegel *et al.*, 2006).

II.4.2.4 Receptores GABA_A

Los receptores GABA_A son receptores ionotrópicos que forman un canal específico para el ión Cl⁻. Básicamente están compuestos por dos subunidades α , dos β y dos γ , formando así heterodímeros (Uusi-Oukari y Korpi, 2010). Se ha reportado que

el aumento en la concentración de GABA tiene como resultado un aumento en el tiempo que el canal permanece abierto (Siegel *et al.*, 2006).

El canal de Cl⁻ esta modulado por varias clases de fármacos (benzodiazepinas, barbitúricos y anestésicos como etomidato y propofol) que se unen a sitios alostéricos en el complejo del receptor. El antagonista del receptor GABA_A clásico es la bicuculina, que reduce la frecuencia y tiempo de apertura del canal de Cl⁻. Por otra parte, los neuroesteroides actúan como moduladores fisiológicos de la actividad cerebral, mejorando la función del receptor GABA_A (Siegel *et al.*, 2006).

II.4.2.5 Receptores GABA_B

Los receptores GABA_B (heterodímero) son receptores acoplados a proteínas G. Son miembros de los receptores del grupo III y poseen gran similitud con los receptores metabotrópicos de glutamato. Los receptores GABA_B pueden mediar la inhibición tanto postsináptica como presináptica cuando disminuye el flujo intracelular de Ca²⁺, y por lo tanto disminuye la liberación del neurotransmisor, mediante el acoplamiento a una variedad de sistemas efectores. Algunos receptores GABA_B están acoplados a la activación de ciertos canales de K⁺, produciendo corrientes sinápticas inhibitorias lentas. Otros receptores GABA_B pueden disminuir la conductancia de Ca²⁺ (Siegel *et al.*, 2006).

Se ha reportado que el agonista potente y selectivo para GABA_B es el baclofeno [ácido β- (4-cloro-fenil) -γ-aminobutírico], mientras que el principal antagonista del receptor es el flaclofeno.

II.5 Circuito motor

II.5.1 Anatomía y fisiología de los ganglios basales

Los ganglios basales son núcleos subcorticales que engloban al cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen), el globo pálido externo e interno (GPe y GPi), la sustancia *nigra pars compacta* y *reticulata* (SNpc y SNpr) y el núcleo subtalámico (NST) (Albin *et al.*, 1989; Parent y Hazarati, 1995). Estas estructuras son componentes de circuitos que involucran porciones de la corteza cerebral, el tálamo y el tallo cerebral.

II.5.2 Vía directa e indirecta

Debido a su relevancia para la comprensión de los trastornos del movimiento, el circuito motor ha recibido gran atención. Este circuito se centra en las cortezas somatosensoriales, motoras y premotoras, que envían proyecciones a las porciones motoras del cuerpo estriado. Las conexiones entre el estriado y los núcleos de salida de los ganglios basales (GPi/SNpr) se organizan en vías directas e indirectas.

El estriado recibe inervación de todas las áreas de la corteza, por lo cual se ha postulado como un sistema integrador de la información, mientras que el GPi y la SNpr sirven como estaciones de salida de los ganglios basales, que se proyectan a la parte ventral anterior (VA) y núcleos ventrolaterales (VL) del tálamo (Wichmann and DeLong, 2006).

La vía directa es una proyección monosináptica (GABAérgica) entre el cuerpo estriado, GPi/SNpr, que da como resultado un aumento de disparo en las células glutamatérgicas del tálamo que llegan a la corteza y esta respuesta, estimula el movimiento. Mientras que la vía indirecta es una conexión polisináptica (GABAérgica y glutamatérgica) que implica neuronas intercaladas en GPe y NST lo que causa una inhibición en las células glutamatérgicas del tálamo y por ende se inhibe el movimiento (figura 3) (Parent and Hazrati, 1995; Siegel *et al.*, 2006).

Pero para que el circuito motor de los ganglios basales funcione adecuadamente necesita ser modulado por la dopamina, que tiene un efecto dual al estimular las neuronas de la vía directa (receptores D1) e inhibiendo las neuronas de la vía indirecta (receptores D2), manteniendo así un balance entre la vía que estimula el movimiento y la vía que lo inhibe (Siegel *et al.*, 2006).

Sin embargo, en el modelo hipocinético (ej. enfermedad de Parkinson), el déficit de dopamina determinaría una desinhibición del GPi y SNpr en vía directa y una desinhibición del NST en la vía indirecta, dando como resultado una inhibición del tálamo

a la corteza motora, que disminuiría su excitabilidad explicando parcialmente la fisiopatología de la EP (Siegel *et al.*, 2006).

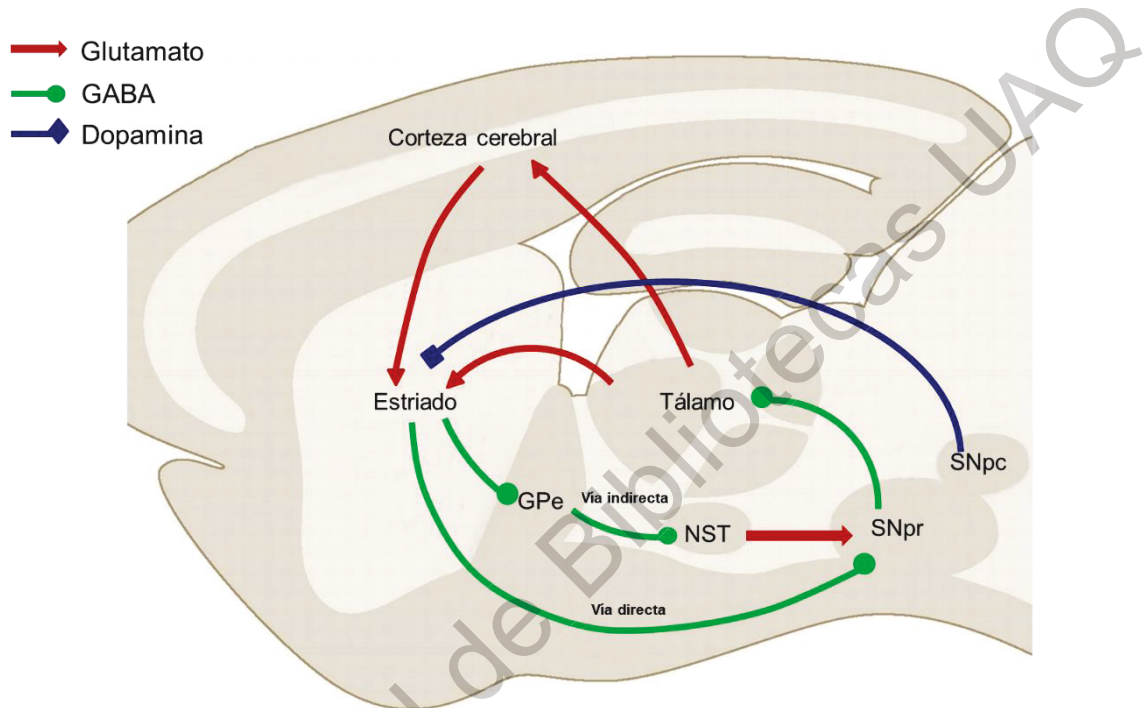


Figura 3. Circuito motor en un corte sagital de roedor. La vía directa es una proyección monosináptica (GABAérgica) entre el cuerpo estriado y GPi/SNpr, mientras que la vía indirecta es una conexión polisináptica que implica neuronas intercaladas en GPe y NST. La dopamina actúa como un neuromodulador, para mantener un balance entre la vía directa (activa el movimiento) y la vía indirecta (inhibe el movimiento). El color rojo representa proyecciones glutamatérgicas, el color verde indica proyecciones GABAérgicas y el color azul representa proyecciones dopaminérgicas. Abreviaciones, globo pálido externo (GPe), núcleo subtalámico (NST), *sustancia nigra pars reticulata* (SNpr), *sustancia nigra pars compacta* (SNpc).

III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Debido a que existen sistemas de neurotransmisión como son los sistemas GABAérgico y glutamatérgico que son modulados por el sistema dopaminérgico, es de suma importancia estudiar si la exposición crónica al herbicida atrazina altera al sistema GABAérgico y glutamatérgico de manera paralela al sistema dopaminérgico. Por lo tanto, es importante evaluar si la exposición crónica al herbicida ATR provoca alteraciones cuantificables a través del empleo de una batería de pruebas conductuales y si esto se correlaciona con la liberación de GABA y glutamato en el estriado (estructura blanco de la vía dopaminérgica nigroestriatal).

IV. HIPÓTESIS

La exposición crónica a bajas dosis del herbicida atrazina causará alteraciones en los sistemas de neurotransmisión GABAérgico y glutamatérgico, mismas que se asociarán con alteraciones conductuales de la rata de la cepa Sprague-Dawley.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo General

Evaluar los efectos neurotóxicos de la exposición crónica a bajas dosis del herbicida atrazina en la vía nigroestriatal de la rata macho Sprague-Dawley.

V.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar los efectos de la exposición a ATR en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley en conductas motoras espontáneas.

2. Evaluar los efectos de la exposición crónica a bajas dosis de ATR sobre la liberación de GABA y glutamato en el blanco de la vía nigroestriatal de la rata de la cepa Sprague-Dawley.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Tipo de investigación

El presente estudio es un estudio experimental longitudinal.

VI.2 Población

Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 21 días de edad postnatal, adquiridas de la empresa Envigo RMS, SA de CV. Las ratas fueron alojadas individualmente en una caja de policarbonato, se mantuvieron en condiciones controladas 23 ± 1 °C y se habituaron a un ciclo luz/oscuridad invertido (12 h/12 h). Los animales se asignaron aleatoriamente en tres grupos: control, 1 ó 10 mg ATR/kg de peso corporal. Una vez que alcanzaron los 300g se les mantuvo en este peso mediante restricción alimenticia y tuvieron libre acceso al agua durante los 12 meses de exposición. La ATR se obtuvo de Chem Service (West Chester, PA, USA) y fue administrada en croquetas de comida. El peso corporal se registró semanalmente.

VI.3 Muestra y tipo de muestra

Se realizó un muestreo probabilístico, el tipo de muestra perteneció a un muestreo aleatorio simple.

VI.3.1 Criterios de selección

Ratas sanas macho de la cepa Sprague-Dawley de 21 días de edad postnatal obtenidas de la empresa Envigo RMS, SA de CV.

VI.3.2 Variables estudiadas

Se realizó un registro mensual de actividad locomotora espontánea, a lo largo de los 12 meses de exposición, cada registro tuvo una duración de 25 horas. En esta prueba motora los parámetros evaluados fueron: actividad horizontal, actividad vertical y número de estereotipias.

Posterior a los doce meses de exposición a ATR se realizaron pruebas como barra de equilibrio, coordinación motora y laberinto elevado en cruz. A los 13 meses de exposición, los animales fueron sometidos a una microcirugía para realizar la técnica de microdiálisis y obtener dializados de la liberación de glutamato y GABA, en estriado y SNpr respectivamente, seguido de un análisis a través de cromatografía líquida.

Consecutivamente se realizó el sacrificio de los animales y la extracción del cerebro para realizar cortes histológicos y así verificar que la microdiálisis se haya llevado a cabo en la región de interés.

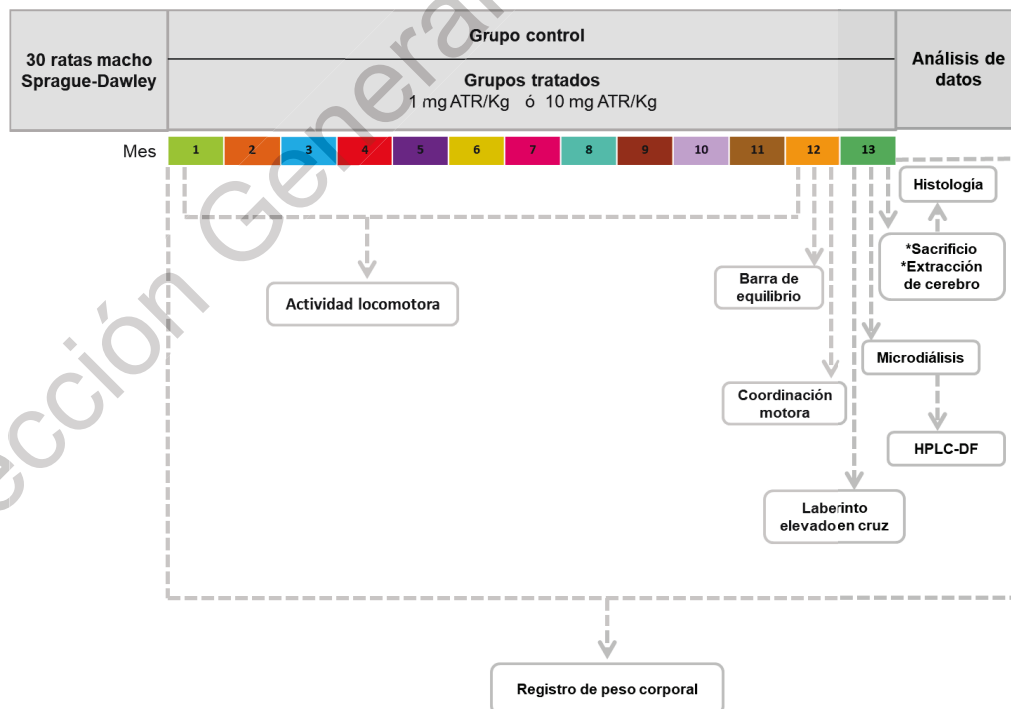


Figura 4. Variables estudiadas durante la exposición de doce meses a ATR.

VI.4 Técnicas e instrumentos

VI.4.1 Actividad locomotora espontánea

La actividad locomotora espontánea, es una prueba a la que frecuentemente se recurre en los estudios neurotoxicológicos ya que proporciona una referencia *in vivo* sobre el estado general del organismo durante el periodo de exposición a sustancias tóxicas.

Esta prueba se basó en la metodología descrita por Bardullas *et al* (2011; 2013) la cual se registró utilizando un sistema automatizado que consiste en cajas de acrílico transparente (40x40x30 cm) [VersaMax Animal Activity Monitors, AccuScan Instruments, Inc. (Columbus, Ohio, U.S.A)], rodeadas por sensores infrarrojos en los ejes verticales y horizontales los cuales son los encargados de detectar los movimientos del animal. Estos datos fueron recolectados en un sistema computarizado clasificado en distintas variables (software Fusion 4.8n VersaMax Edition). El registro tuvo una duración de 25 horas. Durante el experimento los animales tuvieron libre acceso al alimento y agua.

Las variables analizadas en este estudio son las siguientes:

Actividad horizontal (AH): Se define como el número total de interrupciones en el sensor horizontal en un tiempo de muestreo determinado.

Actividad vertical (AV): Se define como la acumulación de interrupciones del sensor vertical.

Número de estereotipias (NE): Se define como el número de veces que el sistema registra comportamiento estereotipado en el animal. Un espacio de un segundo o más se requiere para separar un episodio estereotipado del siguiente. El comportamiento estereotipado, se define como movimientos repetitivos sin un fin aparente.

VI.4.2 Barra de equilibrio

La barra de equilibrio es una prueba que permite la cuantificación del déficit motor a través del análisis del tiempo que tarda el roedor en alcanzar la plataforma de escape (tiempo de latencia) y del análisis del número total de errores cometidos durante la ejecución (Curzon *et al.*, 2009).

El aparato consiste en una barra de madera con superficie plana (1.70 m de largo x 7 cm de ancho x 2 cm de grosor) tanto para el entrenamiento como para la prueba, fue colocada a una altura de 75 cm con respecto al piso.

La prueba se realizó en condiciones de silencio absoluto y con luz roja. Se colocó una caja negra en un extremo de la barra, la cual fungió como plataforma de escape de las ratas. La barra se dividió en 4 distancias diferentes: 20, 80, 120 y 150 cm de distancia con respecto a la plataforma de escape. Se grabó la sesión con una cámara de video para el posterior análisis de los errores que cometen las ratas con las patas traseras. Un error lo definimos como un fallo que presenta la rata al agarrarse de la barra con cualquiera de sus extremidades (Curzon *et al.*, 2008).

Esta prueba se llevó a cabo durante tres días consecutivos: uno de entrenamiento y dos de prueba. En el día de entrenamiento se obligó a la rata a caminar sobre la barra (2 cm) y se colocó a la rata en los diferentes puntos: 20, 40, 120 y 150 cm de distancia con respecto a la plataforma de escape y se registró el tiempo de latencia en las diferentes distancias.

Los siguientes dos días se realizó la prueba con la barra de madera, en estos días solo se colocó a la rata en dos puntos diferentes 20 y 150 cm de distancia con respecto a la plataforma de escape, se registró el tiempo de latencia y se realizó una videograbación para registrar el número de errores que cometió la rata al recorrer la barra. Las grabaciones de video se utilizaron para el análisis del número de errores cometidos.

VI.4.3 Coordinación motora

La coordinación motora es una prueba que nos ayuda a evaluar la coordinación y el equilibrio de nuestras ratas debido a que esta tarea implica procesos cognitivos complejos que involucran la interacción de diversas estructuras cerebrales como el cerebelo, ganglios basales, corteza, tálamo, entre otras. Por lo que alteraciones sutiles

en dichas estructuras, producto del insulto por sustancias tóxicas que pueden manifestarse en acciones motoras descoordinadas o deficientes.

La prueba se realizó basándonos en la metodología descrita por Bardullas *et al.* (2011) utilizando el aparato IITC 755 ROTO-ROD (San Diego, CA, U.S.A), el cual posee una estructura metálica con 5 cilindros internos de 3.75'' de diámetro que son movidos por un motor; el cilindro fue forrado con una superficie rugosa, lo que permitió al animal sujetarse al cilindro. El aparato proporciona el tiempo de latencia (tiempo en el cual el animal tarda en caer), así como la velocidad del cilindro en revoluciones por minuto (rpm).

Los animales fueron habituados al aparato, colocándolos en el cilindro, sin movimiento durante dos minutos por un día. Seguido a la habituación los animales se entrenaron dos veces al día durante tres días, utilizando una aceleración de 4-20 rpm durante 60 segundos, hasta lograr que los animales fueran capaces de permanecer en el cilindro por lo menos una ocasión; los animales que no cumplieron con este criterio fueron descartados de esta tarea.

Después de la fase de entrenamiento, el animal recibió una sesión diaria durante 7 días consecutivos. El rotorod se programó para acelerar de 10 a 45 rpm en 180 segundos, el tiempo total de la evaluación fue de 240 segundos. Se registró el tiempo de latencia y las rpm alcanzadas por animal cuando cae del cilindro giratorio.

IV.4.4 Laberinto elevado en cruz

La prueba de laberinto elevado en cruz fue diseñada para proporcionar medidas de ansiedad, ya que se basa en la decisión de la rata por permanecer en un área "segura" y evitar la exploración de áreas abiertas.

El aparato estuvo elevado 50 cm con respecto al piso, y consta de dos brazos cerrados y dos brazos abiertos. Este protocolo consistió en colocar a la rata en el centro del aparato y dejarla ahí durante cinco minutos, la sesión se videograbó para su posterior análisis. Se registró el tiempo que el roedor permanece en cada brazo. Esta prueba se

realizó únicamente un día y fue una sesión por cada animal, se realizó en silencio absoluto y con luz roja.

VI.4.5 Determinación de los niveles de glutamato y GABA en microdializados

Para conocer los efectos de la exposición crónica a ATR sobre la liberación de glutamato y GABA en estriado (STR) y SNpr respectivamente, se empleó la técnica de microdiálisis para la colección de muestras y el posterior análisis por HPLC acoplada a un detector de fluorescencia para la determinación de GABA y glutamato.

Para llevar a cabo este experimento, los animales fueron anestesiados con isoflurano (PiSA, Ciudad de México), la presión del aire comprimido fue mantenida a 70 psi, el fluxómetro en 3 y el vaporizador en 1.8 – 2 L/min durante todo el experimento. Los animales se mantuvieron sobre una placa térmica para regular su temperatura a 37°C.

Posteriormente, fueron colocados en un estereotáxico (KOPF, Tujunga, CA, USA) y la piel y el músculo fueron removidos para identificar Bregma (punto de referencia craneal localizado rostralmente en la inserción de las fisuras craneales coronal y sagital). Las coordenadas para el estriado (AP: +1.6 mm, ML: +2.5 mm, DV: -6 mm) y la *sustancia nigra pars reticulata* (AP: -5.8 mm, ML: +2.4 mm, DV: -7.8 mm) fueron establecidas utilizando el atlas de Paxinos y Watson (2007).

Ambas regiones fueron microdializadas simultáneamente. Se utilizaron sondas (CMA/11, CMA/Microdialysis, Solna, Stockholm, Sweden) de acero inoxidable con un diámetro de 0.40 mm, un largo de 14 mm y con un volumen interno de 1 µL. La membrana de cuprofano, permitió el paso de moléculas de hasta 6 000 daltones y poseía un diámetro de 0.24 mm y de largo 1 mm para el caso de SNpr y de 2 mm para el caso de estriado. Se utilizó solución Ringer (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) y el flujo se mantuvo a 2.5 µL/min.

Una vez introducida la sonda, se dejó una hora para su estabilización. Posteriormente, se colectaron 9 muestras, en intervalos de 20 min cada una. Todas las

muestras fueron colectadas en viales que contenían 5 μ L de ácido perclórico 0.1 N. Las primeras tres muestras fueron consideradas como línea basal. Terminando la colecta del tercer dializado, se dializó con solución Ringer alto potasio (91 mM NaCl, 60 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) y se colectaron 3 muestras. Posteriormente, se regresó a la solución Ringer y se colectaron 3 muestras más (figura 5).

Al finalizar, los animales se sacrificaron por decapitación y el cerebro se fijó en paraformaldehído al 4% y posteriormente fue crioprotegido en sacarosa al 30%. Una vez fijados, los cerebros fueron congelados y cortados en microtomo (Leica SM 200R, Wetzlar, Hesse, Alemania) para análisis histológico para verificar la lesión. Los dializados fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de fluorescencia (HPLC- DF).

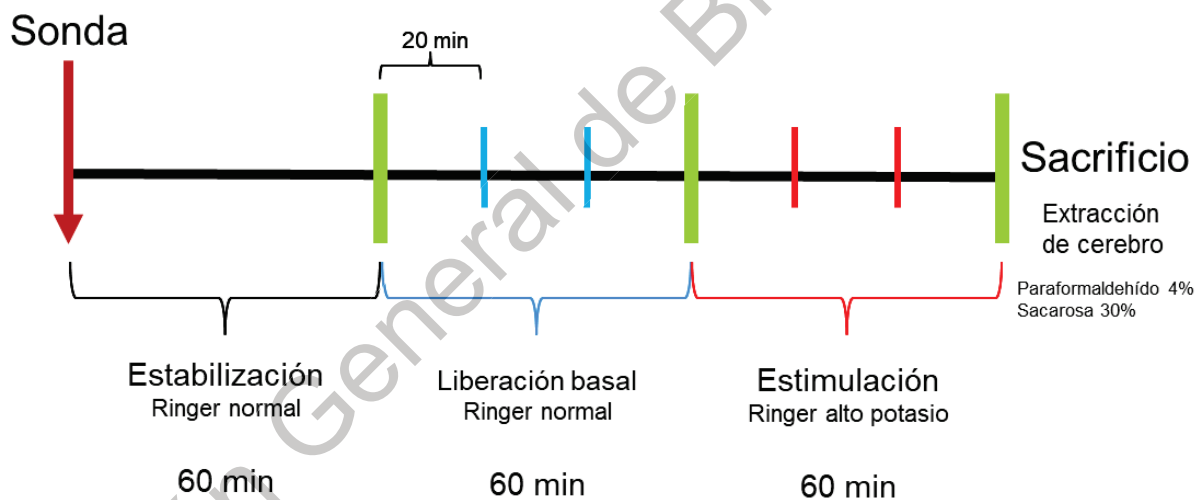


Figura 5. Protocolo de recolección de microdializados en estriado y sustancia *nigra pars reticulata*.

VI.4.6 Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia

La determinación de los niveles de liberación de los aminoácidos (glutamato y GABA) se realizó en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia, el cual consta, de una bomba (Perkin-Elmer serie 200,

Walthman, MA, USA) acoplada a una columna OPA-HS (5 μm de tamaño de partícula, longitud 100 mm x 4.6 mm, Grace Davison Discovery Sciences, Deerfield, IL, USA) y un detector de fluorescencia (Perkin-Elmer Flexar FL Detector) a una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 445 nm.

Para el procedimiento de derivatización previo a la columna se agregaron 40 μL de muestra con 17.3 μL del reactivo de ortoftaldehído (OPA) (13.5 mg de OPA, 2.5 μL de β -mercaptoetanol, 4.5 mL buffer de tetraboratos 0.1M, pH 9.3 y 500 μL de metanol). Las fases móviles consistieron en 50 mM de acetato sódico [1.5% v/v de tetrahidrofurano, pH=5.9 (solución A)]. Mientras que la elución de los OPA-aminoácidos se realizó a través de un gradiente de metanol al 100% (solución B).

Los resultados obtenidos fueron analizados en el programa Total Chrom Navigator versión 6.3.1.0504. La concentración de los aminoácidos fue cuantificada a partir de curvas de calibración de 0.78 a 200 ng/mL para glutamato y de 0.048 a 50 ng/mL para GABA. Los resultados de la concentración de aminoácidos en los microdializados se expresaron en ng/mL.

VI.5 Procedimientos

VI.5.1 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los valores obtenidos para la actividad locomotora espontánea, coordinación motora y la liberación de glutamato y GABA se realizó a través, de análisis de varianza (ANDEVA) de medidas repetidas, posteriormente un análisis de varianza de una vía y un análisis post hoc Fisher's PLSD que reveló el efecto significativo entre grupos.

Para los valores obtenidos en la barra de equilibrio y en el laberinto elevado en cruz, se realizó un ANDEVA de una vía seguido de un análisis post hoc Fisher's PLSD que reveló las diferencias estadísticas entre grupos.

VI.5.2 Consideraciones éticas

Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo, siguieron las regulaciones establecidas por “El reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud” de la Secretaría de Salud (vigente a partir del 01/07/1984) y la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (vigente desde 28/08/2001).

Dirección General de Bibliotecas UNQ

VII. RESULTADOS

VII.1 Actividad locomotora

VII.1.1 Efecto de la exposición crónica a atrazina sobre la exploración en el registro de actividad locomotora

Para evaluar el proceso de exploración de la actividad locomotora espontánea, se analizó la primera hora de registro utilizando los parámetros de actividad horizontal (A), actividad vertical (B) y estereotipias (C). El ANDEVA de medidas repetidas reveló durante la primera hora de registro a lo largo de los doce meses de exposición a ATR, efectos significativos en el tiempo de registro [$F(11, 275) = 42.06, p < 0.0001$], [$F(11, 275) = 2.54, p = 0.0046$] y [$F(11, 275) = 22.50, p < 0.0001$]. Sin embargo, no mostró diferencias entre los grupos, [$F(2, 25) = 0.37, p = 0.70$], [$F(2, 25) = 0.24, p = 0.79$] y [$F(2, 25) = 1.27, p = 0.30$]. Ni de interacción entre factores (grupo X tiempo) [$F(22, 275) = 0.58, p = 0.94$], [$F(2, 275) = 0.51, p = 0.97$] y [$F(22, 275) = 0.60, p = 0.92$] (figura 6).

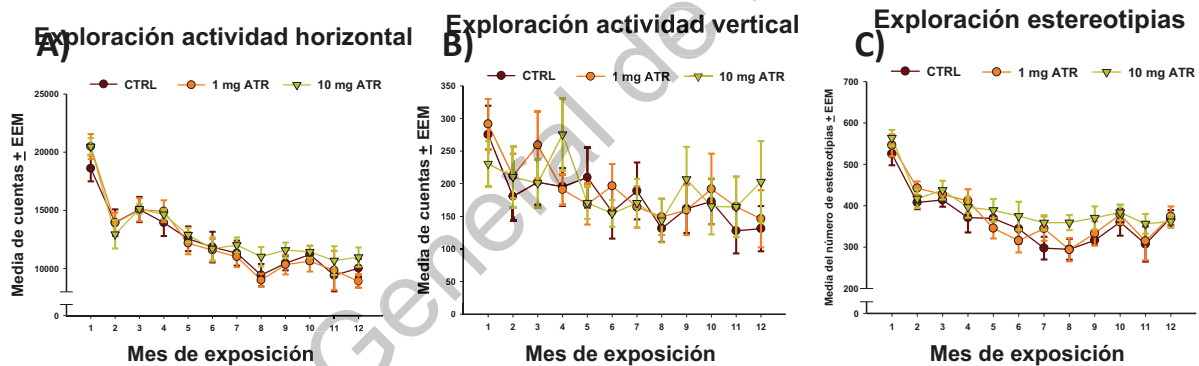


Figura 6. Registro de la hora de exploración. La primera hora de la actividad locomotora espontánea, corresponde a la hora de exploración en animales control y expuestos a 1 ó 10 mg ATR/kg de peso corporal, evaluados durante doce meses de exposición. A) actividad horizontal, B) actividad vertical y C) estereotipias, cada punto de la gráfica representa la media del grupo \pm EEM ($n = 9 - 10$).

VII.1.2 Efecto de la exposición crónica a la atrazina durante la fase de oscuridad, sobre la actividad locomotora espontánea

Para evaluar los efectos de la exposición crónica a ATR durante la fase de oscuridad en la actividad locomotora espontánea, se analizaron las doce horas que pertenecen a dicha fase, utilizando los parámetros de actividad horizontal (A), actividad vertical (B) y estereotipias (C). El ANDEVA de medidas repetidas mostró efecto de interacción entre factores (grupo X tiempo) en el parámetro de actividad vertical (Figura 7B) [F (10,120) = 1.94, p = 0.046], posteriormente un ANDEVA de una vía seguido de un análisis post hoc Fisher's PLSD reveló que este efecto se presentó en el mes cuatro [F (2,24) = 3.82, p = 0.026] y en el mes doce de exposición [F (2,24) = 4.12, p = 0.029]. Sin embargo, no se presentaron efectos significativos de grupo [F (2,24) = 0.76, p = 0.48] ni de tiempo de registro [F (5,120) = 0.88, p = 0.50]. Mientras que en actividad horizontal (figura 7A) y en estereotipias (figura 7C), no se presentó efecto de interacción de factores (grupo X tiempo) [F (10, 125) = 0.75 p = 0.68] y [F (10,125) = 0.83, p = 0.61]. Ni de grupo [F (2, 25) = 0.30 p = 0.74], [F (2,25) = 1.08, p = 0.35], sin embargo, mostró efecto significativo en el tiempo de registro de ambos [F (5, 125) = 8.93 p < 0.0001] y [F (5,125) = 23.54, p < 0.0001].

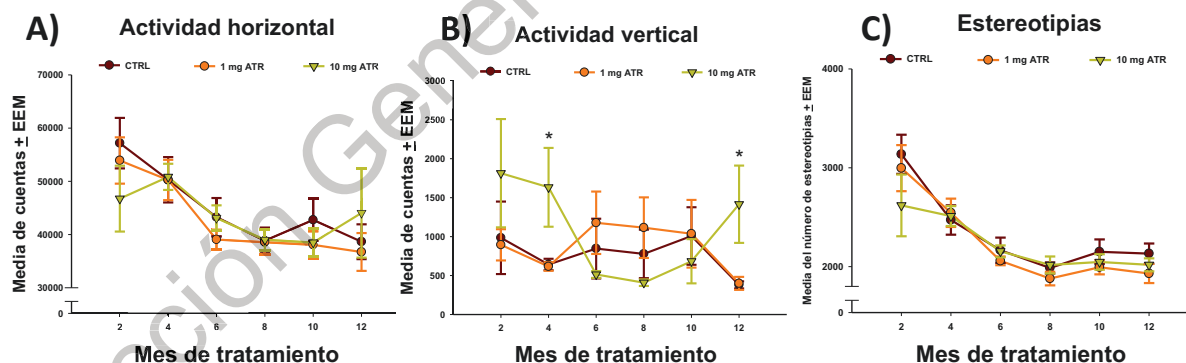


Figura 7. Registro de la actividad locomotora espontánea durante la fase de oscuridad. Fase de oscuridad en animales control y expuestos a 1 ó 10 mg ATR/kg de peso corporal, evaluados durante los doce meses de exposición. A) actividad horizontal, B) actividad vertical y C) estereotipias, cada punto de la gráfica representa la media del grupo ± EEM. * Denota diferencias con respecto al grupo control, p < 0.05 (n = 9 - 10).

VII.1.3 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre la actividad locomotora espontánea durante 24 horas a lo largo de 12 meses

Para evaluar los efectos de la exposición crónica a ATR durante las 24 horas a lo largo de los doce meses se evaluaron los parámetros de actividad horizontal (A), actividad vertical (B) y estereotipias (C). El ANDEVA de medidas repetidas mostró efecto de interacción entre factores (grupo X tiempo) en el parámetro de actividad vertical (Figura 8B) [F (20, 230) = 1.69, $p = 0.036$], posteriormente un análisis de ANDEVA de una vía, seguido de una análisis *post hoc* Fisher's LSD reveló que este efecto se observó al mes cuatro [F (2,23) = 4.85, $p = 0.018$] y al mes doce [F (2,23) = 4.84, $p = 0.018$] de exposición. Sin embargo, no se observaron efectos de grupo [F (2,23) = 3.21, $p = 0.73$] ni de tiempo de registro [F (10, 230) = 0.64, $p = 0.78$]. Mientras que en actividad horizontal (figura 8A) y en estereotipias (figura 8C) no se presentó efecto de interacción entre factores (grupo X tiempo) [F (20, 250) = 0.6, $p = 0.91$], [F (20, 250) = 0.55, $p = 0.94$]. Ni efecto de grupo [F (2,25) = 0.64, $p = 0.54$], [F (2, 25) = 1.57, $p = 0.23$]. Sin embargo, si se observó efecto significativo de tiempo de registro [F (10, 250) = 20.28, $p < 0.0001$], [F (10, 250) = 91.53, $p < 0.0001$].

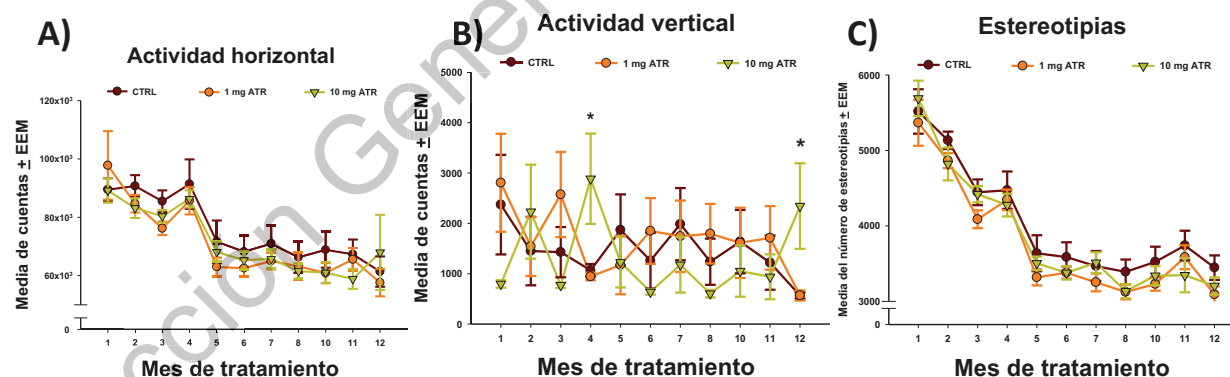


Figura 8. Registro de la actividad locomotora espontánea durante 24 horas. Registro de 24 horas en animales control y expuestos a 1 ó 10 mg ATR/kg de peso corporal, evaluados durante los doce meses de exposición. A) actividad horizontal, B) actividad vertical y C) estereotipias, cada punto de la gráfica representa la media del grupo \pm EEM. * Denota diferencias con respecto al grupo control, $p < 0.05$ ($n = 9 - 10$).

VII.1.4 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre la actividad locomotora espontánea durante 24 horas

Con la finalidad de conocer el efecto de la exposición crónica a ATR en el mes doce se evaluaron las veinticuatro horas de la variable actividad vertical y se observó un efecto significativo de grupo [$F(2,23) = 4.56, p = 0.022$], y de interacción entre factores (grupo x tiempo) [$F(14,161) = 2.29, p = 0.007$]. Asimismo, se observó efecto significativo de tiempo de registro [$F(7,161) = 14.45, p < 0.0001$] Lo que nos indica que los animales del grupo 10 mg ATR/kg de peso corporal presentan mayor actividad, tanto en la fase oscura como en la fase de luz, que

Actividad vertical 24 horas

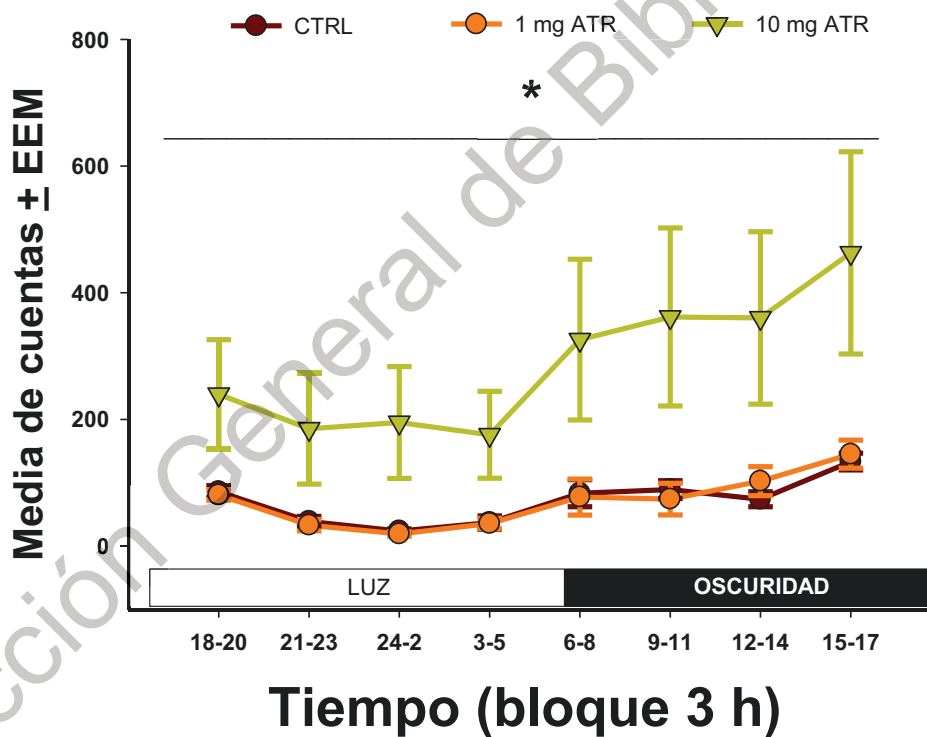


Figura 9. Actividad vertical registrada durante 24 horas del mes doce. Se registró la actividad vertical en animales control y expuestos a 1 ó 10 mg ATR/kg. Los datos se muestran en bloques de tres horas, los cuatro primeros corresponden a la fase de luz, y los siguientes cuatro corresponden a la fase de oscuridad. Cada punto de la gráfica representa la media del grupo \pm EEM. * Denota diferencias del grupo de 10 mg ATR/ kg de peso corporal con respecto al grupo control, $p < 0.05$ ($n = 8 - 9$).

VII.2 Barra de equilibrio

Para evaluar daños a nivel del sistema nigroestriatal se analizó el tiempo de latencia (figura 10A) y el número de errores cometidos (figura 10B) durante el recorrido a la plataforma de escape, en la barra de madera de 2 cm, de las ratas control y expuestas a 1 ó 10 mg ATR/ kg de peso corporal. El ANDEVA de una vía no reveló efecto significativo de tiempo [$F(2, 24) = 2.57, p = 0.098$], tampoco se observó efecto significativo en el conteo de número de errores [$F(2, 24) = 4.16, p = 0.455$].

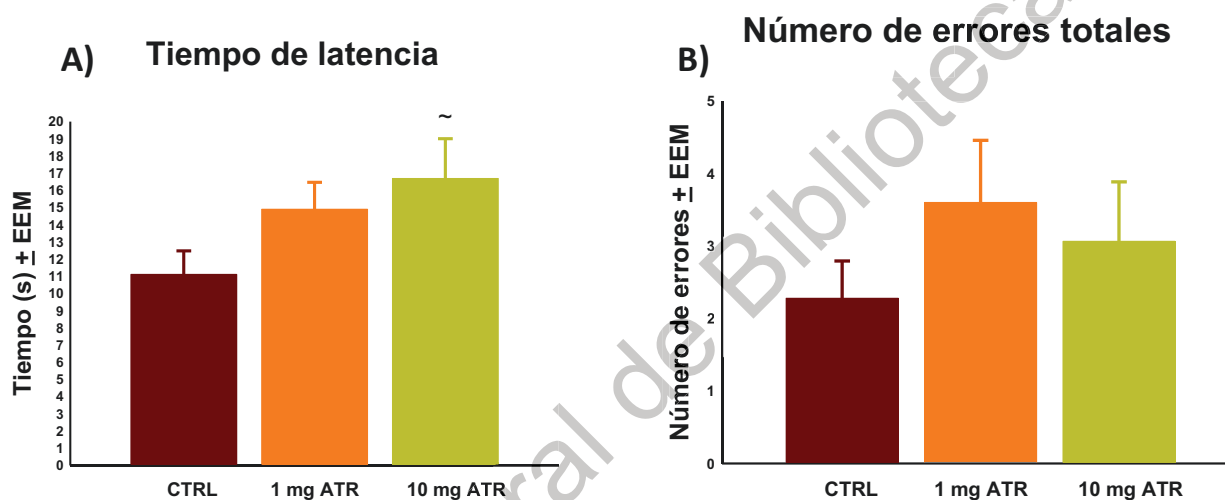


Figura 10. Prueba barra de equilibrio evaluada a los doce meses de exposición. El equilibrio se evaluó en ratas control y expuestas a 1 ó 10 mg ATR/ kg de peso corporal. A) Tiempo de latencia en llegar a la plataforma de escape y B) número de errores cometidos. Cada punto de la gráfica representa la media del grupo \pm EEM. ~ Denota una tendencia a ser diferente el grupo de 10 mg ATR/ kg de peso corporal con respecto al grupo control, $p = 0.098$ ($n = 7 - 10$).

VII.3 Coordinación motora

Para evaluar la coordinación motora de las ratas se analizaron las siete sesiones durante las cuales se llevó a cabo la prueba. El ANDEVA de medidas repetidas reveló efecto significativo de tiempo de registro [F (6, 144) = 6.20, $p < 0.0001$] y de interacción entre factores [F (12, 144) = 2.53, $p = 0.0047$] durante las 7 sesiones de registro de la coordinación motora. Sin embargo, no se mostró efecto de tratamiento [F (2, 24) = 0.17, $p = 0.85$] (figura 11).

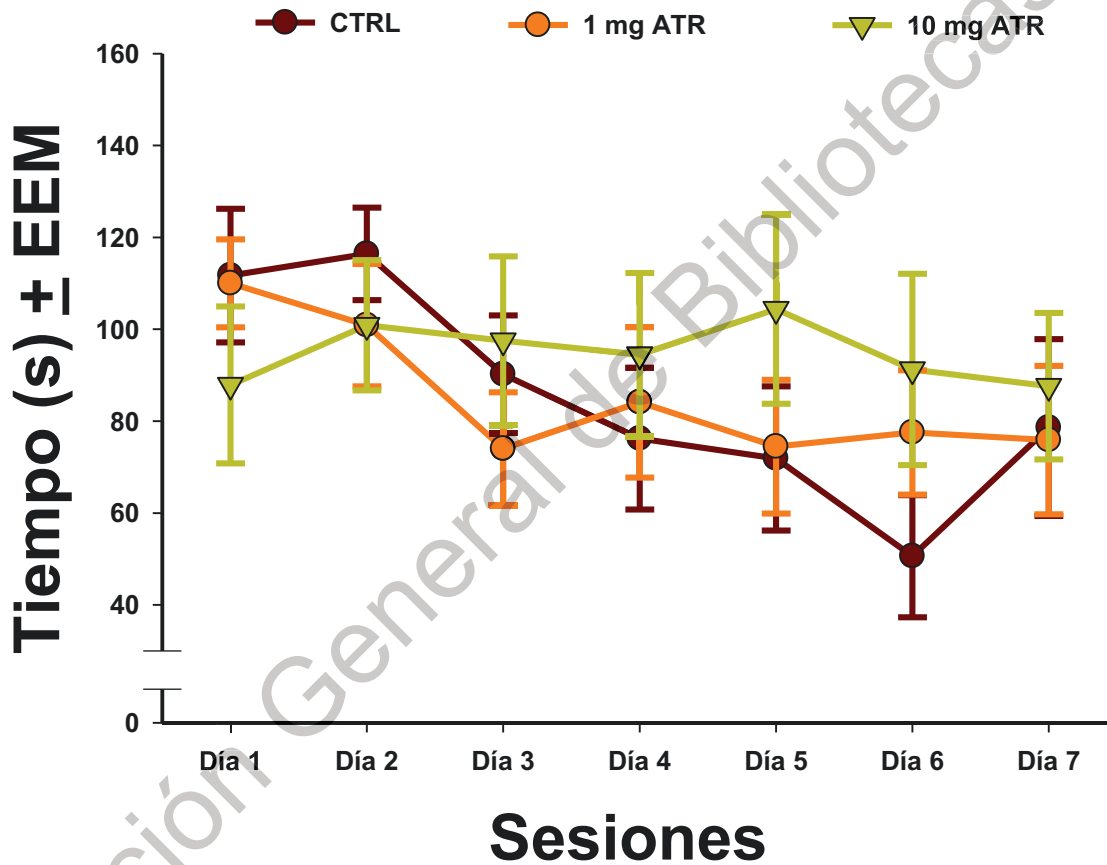


Figura 11. Coordinación motora registrada en el mes doce. La coordinación motora se registró durante siete sesiones, en el mes 12 de exposición a ATR, en animales control y expuestos a 1 ó 10 mg ATR/kg. Cada punto de la gráfica representa la media del grupo \pm EEM ($n = 8 - 10$).

VII.4 Laberinto elevado en cruz

Para evaluar la ansiedad de las ratas se analizó el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados del laberinto elevado en cruz. El ANDEVA de una vía reveló efectos de tratamiento [$F(2,24) = 5.55, p = 0.011$] en los brazos abiertos. El análisis post hoc Fisher's PLSD reveló que las ratas expuestas a 10 mg ATR/kg de peso corporal mostraron una disminución en el tiempo de permanencia en el brazo abierto. Sin embargo, posterior al ANDEVA de una vía, los brazos cerrados mostraron una tendencia [$F(2,24) = 2.95, p = 0.07$] del grupo expuesto a 10 mg ATR/kg a permanecer mayor tiempo en los brazos cerrados.

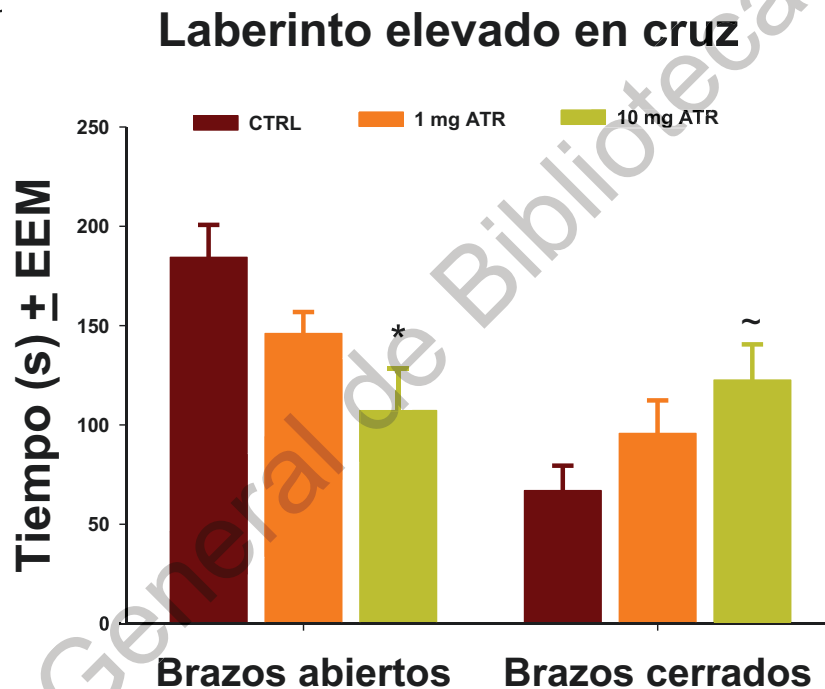


Figura 12: Laberinto elevado en cruz registrado al mes trece de exposición a ATR. Cada barra de la gráfica representa la media del grupo \pm EEM. * Denota diferencias del grupo de 10 mg ATR/kg de peso corporal con respecto al grupo control, $p < 0.05$ y ~ denota una tendencia a ser diferente el grupo de 10 mg ATR/kg de peso corporal con respecto al grupo control, $p = 0.07$.

VII.5 Liberación estriatal de glutamato

Para evaluar el efecto de la exposición a ATR sobre la liberación estriatal de glutamato, se evaluaron los niveles extracelulares de glutamato. El ANDEVA de medidas repetidas reveló que existe efecto significativo de grupo [$F(2, 15) = 4.58, p = 0.028$] y de tiempo de registro [$F(1, 15) = 10.53, p = 0.0054$]. Posterior a esto se realizó un ANDEVA de una vía, seguido de un análisis post hoc Fisher's PLSD, y mostró que las ratas expuestas a 10 mg ATR/kg de peso corporal presentaron mayor liberación de glutamato durante la liberación basal [$F(2, 15) = 3.80, p = 0.046$] y la liberación estimulada por alto potasio [$F(2, 15) = 4.58, p = 0.028$].

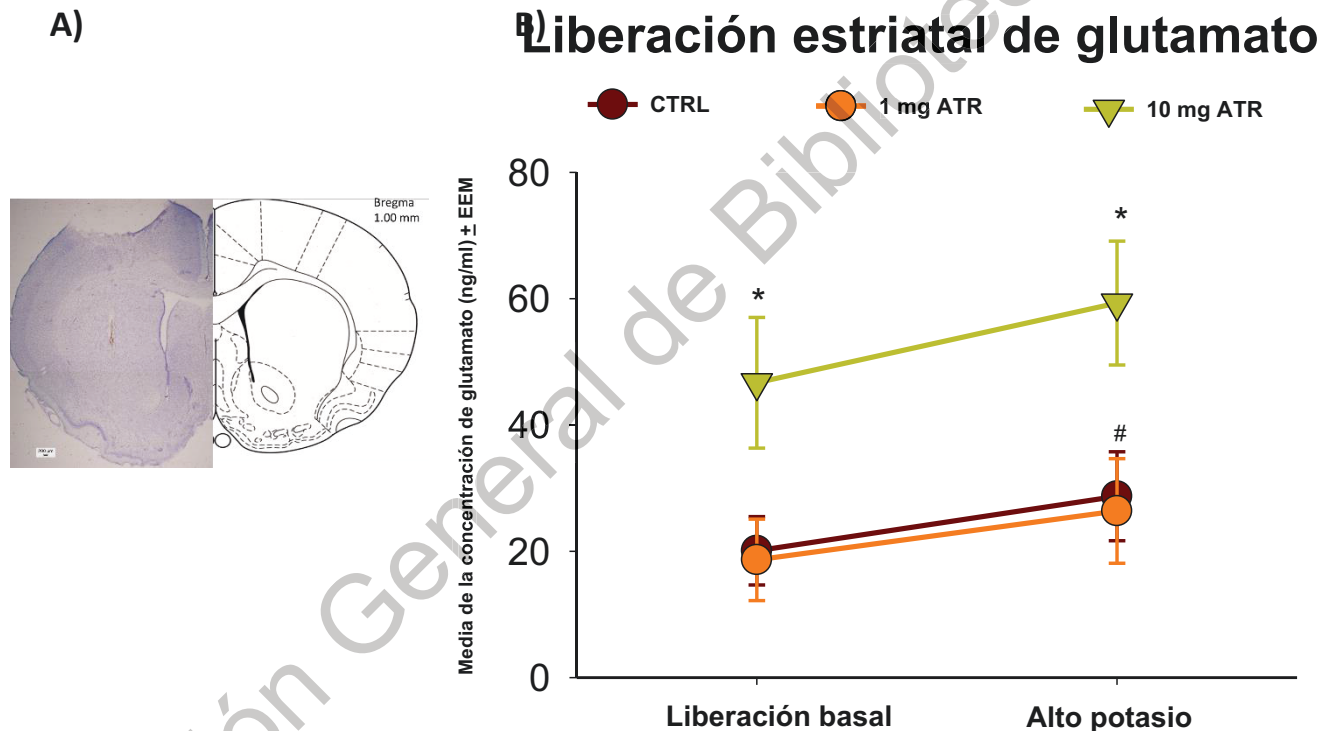


Figura 13. Liberación estriatal de glutamato. A) Corte transversal de cerebro de rata Sprague-Dawley, a nivel de STR, obtenido con microtomo y teñido con cresil violeta. Microfotografía representativa del daño realizado por la inserción de la sonda de microdiálisis. B) Concentración de glutamato en liberación basal y estimulada con alto potasio. Cada punto de la gráfica representa la media del grupo \pm EEM. * Denota diferencias del grupo de 10 mg ATR/kg de peso corporal con respecto al grupo control, $p < 0.05$. # Denota diferencias entre la liberación estimulada con alto potasio y la liberación basal del grupo control, $p < 0.05$ ($n = 4 - 7$).

VII.6 Liberación de GABA en la sustancia *nigra pars reticulata*

Para evaluar el efecto de la exposición a ATR sobre la liberación de GABA en la sustancia *nigra pars reticulata*, se evaluaron los niveles extracelulares de GABA. El análisis de medidas repetidas mostró que no existe efecto significativo de grupo [$F(2, 15) = 0.205, p = 0.82$], tampoco de tiempo [$F(1, 15) = 2.91, p = 0.11$] ni de interacción entre factores (grupo X tiempo) [$F(1, 15) = 0.208, p = 0.81$].

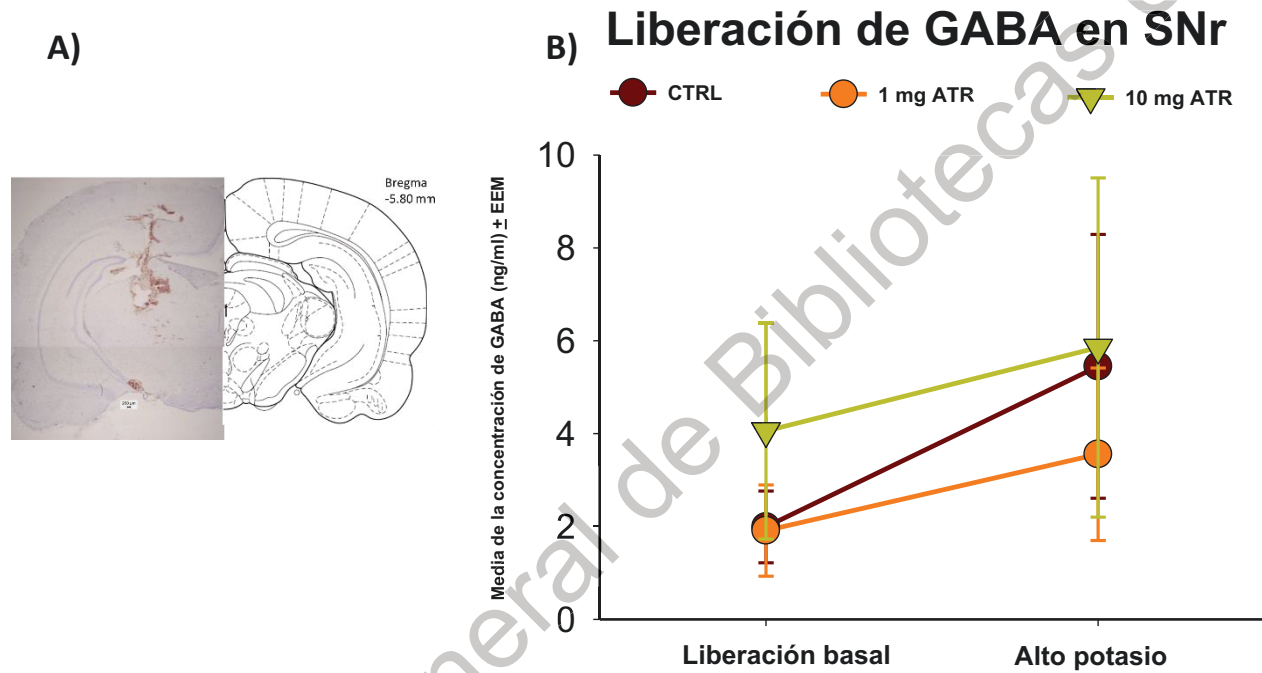


Figura 14. Liberación de GABA en sustancia *nigra pars reticulata* (SNpr). A) Corte transversal de cerebro de rata Sprague-Dawley, a nivel de SNpr, teñido con cresil violeta. Microfotografía representativa del daño realizado por la inserción de la sonda de microdiálisis. B) Concentración de GABA en liberación basal y estimulada con alto potasio. Cada punto de la gráfica representa la media del grupo \pm EEM ($n = 4 - 7$).

VIII. DISCUSIÓN

Es muy importante resaltar que, aunque la ATR fue diseñada para eliminar y controlar malas hierbas de hoja ancha, se ha demostrado que este compuesto también afecta a roedores, afectando principalmente al sistema dopaminérgico (Coban y Filipov 2007; Bardullas *et al.*, 2011, 2013; Lin *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2013). Sin embargo, en humanos, la exposición a ATR no ha sido asociada con la presencia de la enfermedad de Parkinson, pero existe evidencia de que el uso constante de otros plaguicidas como maneb, paraquat y rotenona se han relacionado con una alta incidencia en la presencia de la enfermedad de Parkinson (Cicchetti *et al.*, 2009). No obstante, es importante mencionar que el mecanismo por el cual la ATR ingresa al cerebro es un mecanismo aún desconocido. A pesar de ello, existe un estudio (Dooley *et al.*, 2006) que monitoreó la exposición a ATR, a través de la formación de uniones covalentes (aductos) de ATR con la hemoglobina y reportaron que la formación de aductos fue dependiente a la dosis de exposición.

VIII.1 Actividad locomotora espontánea

En el presente estudio se evaluó la actividad locomotora espontánea, que está relacionada con la regulación a través de la vía nigroestriatal para que funcione adecuadamente y pudo verse comprometida posterior a la exposición a ATR como estudios anteriores de nuestro grupo lo han mostrado (Bardullas *et al.*, 2011, 2013; Rodríguez *et al.*, 2013, Márquez-Ramos *et al.*, 2017). La actividad locomotora es un paradigma conductual al que se recurre en los estudios neurotoxicológicos. Los parámetros evaluados fueron actividad horizontal, actividad vertical y el número de estereotipias, se decidió evaluar el comportamiento estereotipado ya que está, relacionado principalmente con un exceso de actividad dopaminérgica en los ganglios basales (Ridley, 1994).

El presente estudio mostró que la exposición a 10 mg ATR/kg de peso corporal causó alteraciones motoras, presentando hiperactividad, tanto en el mes 4 como en el mes 12 de la exposición. Por tal motivo nuestro estudio concuerda con resultados previos de la literatura (Bardullas *et al.*, 2011) que mostraron que la exposición a ATR causa

hiperactividad en el mes 12 de tratamiento. Adicionalmente Bardullas *et al.* (2011) también reportó que al mes ocho de exposición a ATR causa hipoactividad en el grupo expuesto a 10 mg ATR/kg de peso corporal. Estos efectos oscilantes en la actividad locomotora espontánea, posterior a la administración de 1 o 10 mg ATR/kg de peso corporal se pueden atribuir a la biología misma de cada animal, que, a pesar de la exposición prolongada a este herbicida las ratas tienden a mantener cierta estabilidad de las condiciones internas; esto es posible gracias a los múltiples ajustes dinámicos del equilibrio y a los mecanismos de autorregulación, que se presentan en todos los seres vivos.

VIII.2 Barra de equilibrio

En el presente estudio evaluamos cambios sutiles en los roedores, producto de la exposición crónica a ATR durante 12 meses, utilizando una barra de equilibrio. Y se observó que a los doce meses de tratamiento con ATR, las ratas no presentan ningún cambio. Aunque existe una tendencia en el grupo tratado con 10 mg ATR/kg, a aumentar el tiempo en recorrer la barra de madera y llegar a la plataforma de escape, con respecto al grupo control. Esta tendencia podría indicarnos, que debemos aumentar la n de nuestros grupos para que el efecto pueda ser visible.

En esta prueba evaluamos el tiempo de latencia y el número de errores cometidos en el trayecto de la barra de madera (Curzon *et al.* 2009) según lo reportado en la literatura; para conocer si existen alteraciones a nivel de sistema nigroestriatal. Un estudio previo realizado por Quinn *et al.* (2007) posterior a la administración de 30 mg/kg de MPTP (neurotoxina del sistema nigroestriatal), en ratones macho de la cepa C56BL/6J, reportó un mayor número de errores cometidos en la barra de madera. Por tal motivo el hecho de que no se hayan encontrado cambios sutiles en el presente estudio, no indica que no haya cambios más gruesos. Para evaluar estos cambios más gruesos evaluó la coordinación motora.

VIII.3 Coordinación motora

En este trabajo se evaluó la coordinación motora de los animales expuestos a ATR en el mes 12 de tratamiento y no observamos ningún efecto significativo de tratamiento. Estos resultados son contrarios a lo reportado en la literatura por Bardullas *et al.* (2011), quien posterior a una administración oral de ATR durante doce meses, reporta que las ratas tratadas con 10 mg ATR/kg de peso corporal, presentan hipoactividad en esta tarea. Es importante resaltar que las diferencias de resultados entre ambos estudios pueden deberse a la temporalidad en la que se realizó la prueba, Bardullas *et al.* (2011) evaluó dicha tarea al mes 10 de exposición y en la presente investigación la prueba fue evaluada al mes 12 de exposición.

Así mismo es importante tener en cuenta el origen de los animales, ya que las variables de manejo, temperatura e instalaciones influyen mucho en el comportamiento de los roedores. Los animales utilizados en el presente estudio se obtuvieron de la empresa Envigo RMS, SA de CV. Mientras que los animales utilizados por Bardullas *et al.* (2011) fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM.

Otra observación en nuestro estudio, que cabe mencionarse, es el comportamiento del grupo control. Con los resultados adquiridos podemos inferir que dicho grupo, no presentó una curva de aprendizaje, como era de esperarse y que sí sucedió en un estudio previo (Bardullas *et al.*, 2011). Lo que nos hace a sospechar que la prueba generó mucho estrés a los animales del presente estudio, motivo por el cual los roedores generaron una estrategia para bajarse del rodillo giratorio, lo que impidió la evaluación de su desempeño en dicha tarea.

VIII.4 Laberinto elevado en cruz

Otro hallazgo importante en el presente trabajo reveló, que los animales expuestos a 10 mg ATR/kg de peso corporal, evaluados a los trece meses de exposición, presentaron mayor grado de ansiedad con respecto a los animales del grupo control. Con los resultados obtenidos pudimos observar que los animales tratados con 10 mg ATR/kg, permanecen menor tiempo en áreas peligrosas (brazos abiertos) y tienden a

permanecer mayor tiempo en los lugares seguros (brazos cerrados). Con respecto al grupo control se observó que presentan menor grado de ansiedad, debido a que este grupo tiende a explorar más tiempo áreas abiertas y peligrosas, debido a que permanece mayor tiempo en los brazos abiertos.

Varias regiones del cerebro y diferentes neurotransmisores están involucrados en el desarrollo de la ansiedad (Canteras *et al.*, 2010), entre ellos el neurotransmisor más importante involucrado es la dopamina, que juega un papel muy importante en respuestas conductuales a los estímulos ambientales naturalmente ansiogénicos, que desempeñan un papel importante en la ansiedad y el miedo (Kienast *et al.*, 2008; De la Mora *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2011). Se ha reportado que el agotamiento de dopamina sería el inductor de ansiedad y comportamientos similares a la depresión (Bonomaully *et al.*, 2014; Eskow *et al.*, 2012).

La asociación del agotamiento de DA con la generación de ansiedad y miedo se ve apoyada por lo reportado en la literatura. Bardullas *et al.* (2011) reportó que posterior a una administración de 10 mg ATR/kg de peso corporal, durante doce meses, disminuye la concentración de DA estriatal, por tal motivo podemos apostar que la disminución de DA estriatal estaría generando ansiedad en los animales. Sin embargo, en dicho estudio no se evaluó los niveles de ansiedad, no obstante, en el presente estudio se observó que animales expuestos a 10 mg ATR/kg de peso corporal durante 13 meses presentan mayor grado de ansiedad con respecto al grupo control, pero no se midió la concentración de DA en el estriado, pero se puede inferir que disminuye la concentración de DA porque se utiliza el mismo protocolo de exposición a ATR que el reportado por Bardullas *et al.* (2011). Por tal motivo los resultados de ambos estudios estarían apoyando lo reportado por Bonomaully *et al.* (2014) quien reportó que el agotamiento de DA estaría generando ansiedad en los roedores.

Adicionalmente Rodríguez *et al.* (2017), reportó que posterior a una administración única de 100 mg ATR/kg de peso corporal aumenta la expresión de células positivas a c-Fos en la amígdala. Previamente se ha documentado que la

amígdala se relaciona con la ansiedad, debido a que esta estructura cerebral regula las reacciones de alarma involucradas en el miedo y la ansiedad. Por lo tanto, este estudio también apoya al aumento de ansiedad de animales expuestos a ATR.

VIII.5 Liberación estriatal de glutamato

Los resultados del experimento de microdiálisis muestran que la administración crónica a 10 mg ATR/kg de peso corporal, aumenta los niveles estriatales de glutamato extracelular y la liberación inducida con alto potasio.

Proponemos que 1) la ATR podría aumentar la síntesis de glutamato a través de un aumento en el ingreso de glutamina a la neurona presináptica que a su vez aumentaría la actividad de la enzima glutaminasa, 2) la ATR podría modificar la velocidad de vesiculación o bien podría modificar la movilización de las vesículas que contienen el glutamato hacia la membrana extracelular, generando un aumento de glutamato en el espacio extracelular, 3) la ATR podría disminuir la recaptura del glutamato, a través de una baja actividad del transportador de aminoácidos excitatorios. Este último punto se ve soportado por el estudio realizado por Chung *et al.* (2008) quienes reportan que después de la administración unilateral de 6-hidroxidopamina en un modelo animal, se reduce significativamente la proteína de los transportadores de aminoácidos excitatorios tipo 1 y 2 (EAAT1 y EAAT2) en el estriado lesionado; indicando que la disminución de estos transportadores puede afectar la homeostasis de neurotransmisión glutamatérgica.

Los mismos mecanismos pueden ser los responsables para el aumento que se observó en la liberación estimulada con alto potasio. A este respecto, un estudio previo realizado por Rodríguez *et al.* (2017), mostró que una única administración de 100 mg ATR/kg de peso corporal no encontró efectos significativos en los niveles tisulares de GABA y glutamato en corteza prefrontal, estriado, núcleo accumbens, mesencéfalo ventral y dorsal, amígdala e hipocampo.

Mientras que la exposición crónica a 1 mg ATR/kg durante un año reportó disminución del contenido total de glutamato en mesencéfalo ventral. Sin embargo, al

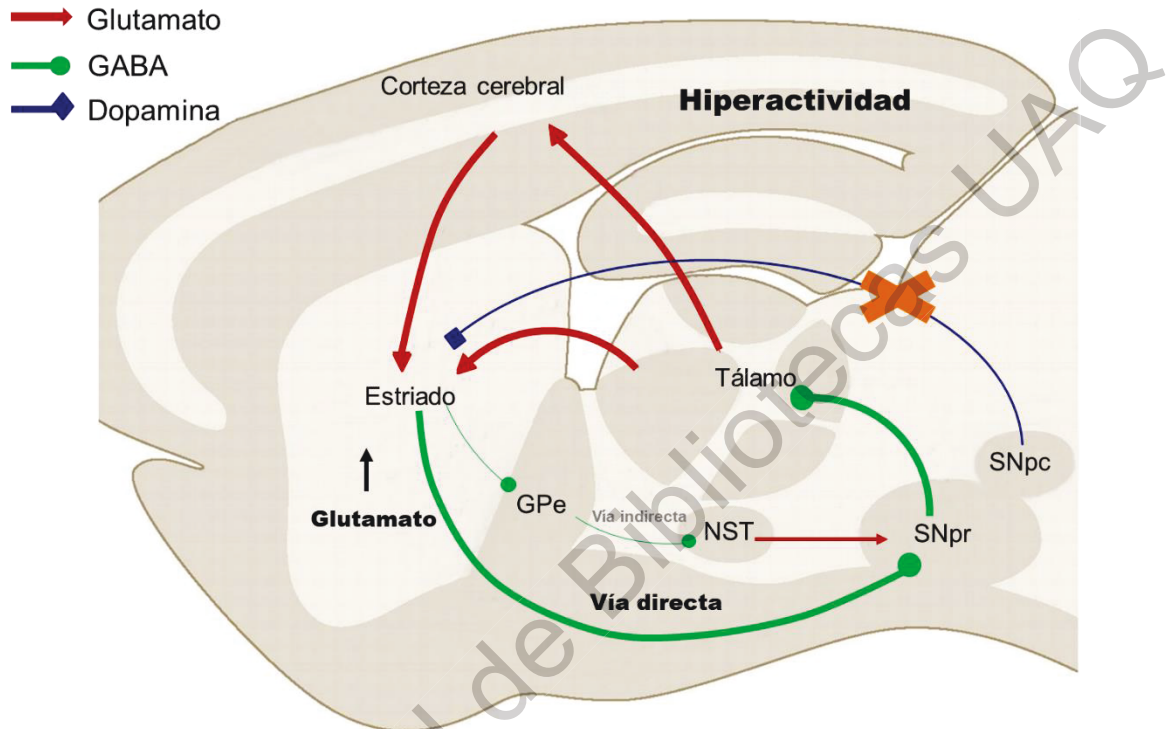
evaluar los efectos por la exposición a 10 mg ATR/kg en el mesencéfalo ventral se observó que aumentan las concentraciones de GABA, glutamato y glutamina en el grupo expuesto a 10 mg ATR/kg de peso corporal. Por otra parte, el mismo grupo mostró, un aumento en el contenido total de glutamina en el estriado (Chávez-Pichardo *et al.*, en preparación).

Cabe resaltar que en los estudios anteriores existen ciertas variaciones con respecto al presente estudio, como lo son: 1) dosis de exposición alta (100 mg ATR/kg; Rodríguez *et al.*, 2017) o bajas (1 ó 10 mg ATR/kg Chávez-Pichardo *et al.*, en preparación), 2) tipo de exposición aguda (Rodríguez *et al.*, 2017) o crónica (Chávez-Pichardo *et al.*, en preparación) y 3) nivel de evaluación tisular (Rodríguez *et al.*, 2017; Chávez-Pichardo *et al.*, en preparación). Por tal motivo, los resultados obtenidos en el presente trabajo y mostraron que el grupo expuesto a 10 mg ATR/kg de peso corporal, altera las concentraciones de glutamato ya sea en la liberación extracelular como en el contenido tisular (de acuerdo a lo reportado en la literatura).

VIII.6 Liberación de GABA en sustancia *nigra pars reticulata*

Los resultados del experimento de microdiálisis no mostraron efectos significativos entre los grupos expuestos a ATR. Podemos inferir que esto es debido a que en la microcirugía no llegamos a la región de interés que fue la SNpr, y la región en la que estábamos ubicados en la mayoría de los animales fue en el pedúnculo cerebeloso, sin embargo, con la microcirugía que se realizó en STR, se pudo corroborar que el método funcionó adecuadamente para el estriado. Por tal motivo, no podemos descartar que la ATR no haya causado ningún efecto, y podemos inferir que la ausencia de algún efecto significativo se debe a la localización de la sonda en la microdiálisis.

IX.CONCLUSIÓN



El estriado, principalmente esta formado por células GABAérgicas y funge como un núcleo de entrada que recibe inervaciones de la corteza del cíngulo, corteza somatosensorial primaria y de la corteza motora primaria; sus proyecciones actúan directamente sobre la vía directa, vía directa e indirecta y vía indirecta respectivamente. Los núcleos de salida de dicha información son el GPi y la SNpr, formados principalmente por células GABAérgicas, si envían sus proyecciones inhibitorias al tálamo generan una inhibición del movimiento a través de la activación de la vía indirecta, pero si dichas proyecciones inhibitorias que van al tálamo quedan inhibidas, se facilitaría el movimiento debido a la activación de la vía directa.

La exposición crónica a 10 mg ATR/kg de peso corporal causa un aumento en la concentración de glutamato estriatal, en la liberación basal como en la liberación

estimulada con potasio, por tal motivo las proyecciones excitatorias que llegan a las células GABAérgicas del STR se ven mayormente activadas y por tal motivo se envían mayor número de proyecciones inhibitorias al núcleo de salida (SNpr), que a su vez inhibirá mayormente las proyecciones inhibitorias que salen del núcleo de salida hacia el tálamo, y por ende se genera mayor activación del tálamo que a su vez generaría más movimientos, que se traduce como mayor excitación al tálamo y por lo tanto generaría mayor movimiento del roedor . Esto puede estar sucediendo debido a que existe un desbalance en la producción de DA estriatal, posterior a una exposición con ATR como se ha reportado previamente. A su vez estaría alterando los sistemas de neurotransmisión involucrados en el circuito de los ganglios basales. Adicionalmente se ha documentado que en estriado existe alteraciones en la unión de DA con el receptor D1, que es la encargada de activar la vía directa del circuito de los ganglios basales. Lo que nos hace a sospechar que se podría estar estimulando mayormente la vía directa del circuito de los ganglios basales, dando como resultado un aumento en la actividad motora espontánea, que se ve reflejada como hiperactividad.

X. PROPUESTAS

Realizar más estudios para conocer el mecanismo exacto por el cual la atrazina y sus metabolitos ingresan al SNC. Porque solo existe un artículo que propone el mecanismo mediante el cual ingresa ATR y sus metabolitos al cerebro.

Determinar si a dosis relevantes al medio ambiente, la exposición a ATR en periodos crónicos (un año o más) causa efectos a nivel de expresión de mensajero y proteína en genes involucrados en los circuitos de neurotransmisión que se han visto alterados, posterior a la administración del herbicida. Debido a que podemos observar un aumento en los mensajeros, dicho aumento no indicaría que la proteína sea funcional, por tal motivo es de suma importancia evaluar a la par ambos parámetros para identificar si existe alguna correlación entre ambas mediciones.

Realizar exposiciones crónicas en ratas y evaluar la conectividad funcional, debido a que estudios previos incluyendo el presente trabajo, muestran que varios circuitos de neurotransmisión se ven involucrados. A través de la técnica de resonancia magnética se podría observar los cambios en la conectividad funcional, mes con mes sin necesidad de sacrificar los animales, a lo largo de todo el período de exposición al herbicida ATR.

XI. BILIOGRAFÍA

Anzalone A. (2008). Herbicidas: Modos y mecanismos de acción en plantas. *ResearchGate*. 1-72.

ATSDR. (2016). Atrazina (Atrazine). En: Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades.

Bakke JE, Larson JD, and Price CE. (1972). Metabolism of atrazine and 2-hydroxyatrazine by the rat. *J Agric Food Chem* 20:602–607.

Barbash JE, Thelin GP, Kolpin DW, Gilliom RJ. (2001). Major herbicides in ground water: results from the National Water-Quality Assessment. *J Environ Qual*. 30: 831–845.

Bardullas U, Giordano M and Rodríguez VM. (2011). Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicol Teratol*, 33: 263-272.

Bardullas U, Giordano M and Rodríguez VM. (2013). Atrazine is primarily responsible for the toxicity of long-term exposure to a combination of atrazine and inorganic arsenic in the nigrostriatal system of the albino rat. *Neurotoxicol Teratol*, 40: 59-66.

Bentivoglio M and Morreli M. (2005). The organization and circuit of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, 21.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV and Greenamyre JT. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 3: 1301-1306.

Bonomaully M, Khong T, Fotriadou M and Tully J. (2014). Anxiety and depression related to elevated dopamine in a patient with multiple mediastinal paragangliomas. *Gen Hosp Psychiatry*. 4: 449- 478.

Canteras NS, Resstel LB, Bertoglio LJ, Carobrez AP and Guimaraes FS. (2010). Neuroanatomy of anxiety. *Curr Top Behav Neurosci*. 2: 77-96.

Chung EK, Chen LW, Chan YS and Yung KK. (2008). Downregulation of glial glutamate transporters after dopamine denervation in striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Comp Neurol*. 4: 421-437.

Ciba Geigy. (1987). Disposition of atrazine in rat (general metabolism).

Cicchetti F, Drouin-Ouellet J and Gross RE. (2009). Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models?. *Trends Pharmacol Sci*. 9: 475-483.

Coban A and Filipov NM. (2007). Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. *J Neurochem*. 100: 1177-1187.

Cooper JR, Bloom FE and Roth RH. (2003). Amino acid transmitters. In the biochemical basis of neuropharmacology. Eight edition. p.p. 105-150.

Cooper RL, Laws SC, Das PC, Narotsky MG, Goldman JM, Lee Tyrey E and Stoker TE. (2007). Atrazine and reproductive function: mode and mechanism of action studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 80: 98-112.

Costa L. (2008). Toxic effects of pesticides. In: Toxicology: The basic science of poisons. Klaassen DC (ed). Mc. Graw Hill. 7° ed. USA. p.p. 883-930.

Crupi R, Impellizzeri D and Cuzzocrea S. (2019). Role of metabotropic glutamate receptors in neurological disorders. *Front Mol Neurosci*. 8: 12-20.

Curzon P, Zhang M, Radek RJ and Fox GB. (2009). The behavioral assessment of sensorimotor processes in the mouse. In: *methods of behavior analysis in Neuroscience*. (ed) Jerry J. Buccafusco. 2° ed. Georgia. p.p. 145-178.

De la Mora MP, Gallegos-Cari A, Arizmendi-García Y, Marcellino D and Fuxe K. (2010). Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: structural and functional analysis. *Prog Neurobiol*. 2: 198-216.

Díaz MR, Chappell AM, Christian DT, Anderson NJ and McCool BA. (2011). Dopamine D3-like receptors modulate anxiety-like behavior and regulate GABAergic transmission in the rat lateral/basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*. 5: 1090-1103.

Dooley GP, Prenni JE, Prentiss PL, Cranmer BK, Andersen ME and Tessari JD. (2006). Identification of a novel hemoglobin adduct in Sprague Dawley rats exposed to atrazine. *Chem Res Toxicol*. 19: 692-700.

Eskow-Jaunarajs KL, George JA and Bishop C. (2012). L-DOPA induced dysregulation of extrastriatal dopamine and serotonin and affective symptoms in a bilateral rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 218: 243-256.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación) (2006). Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. p.p. 7.

Gammon DW, Aldous CN, Carr WC Jr, Sanborn JR, Pfeifer KF. (2005). A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects. *Pest Manag Sci*. 61:331-55.

Golla V, Nelms J, Taylor R and Mishra S. (2011). Pesticide concentrations in drinking water from farm homes: Variation between community water supply and wellwater. *J Environ Sci.* 5: 955-961.

Hansen MA, Treviño-Quintanilla LG, Máquez-Pacheco H, Villada.Canela M, González-Márquez LC, Guillén-Garcés RA y Hernández-Antonio A. (2013). Atrazina: un herbicida polémico. *Rev Int Contam Ambie.* 29: 65-84.

Hertz L. (2004). Intercellular metabolic compartmentation in the brain: past, present and future. *Neurochem.* 3: 285-296.

Hossain MM and Filipov NM. (2008). Alteration of dopamine uptake into rat striatal vesicles and synaptosomes caused by an in vitro exposure to atrazine and some of its metabolites. *Toxicology.* 248: 52-58.

Jablonowski ND, Schaffer A and Burauel P. (2011). Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. *Environ Sci Pollut Res Int.* 18: 328–31.

Kienast T, Hairri AR, Schlangehauf F, Wrase J, Sterzer P, Buchholz HG, Smolja MN, Gründer G, Cumming P, Kumakura Y, Bartenstein P, Dolan RJ and Heinz A. (2008). Dopamine in amygdala gates limbic processing of aversive stimuli in humans. *Nat Neurosci.* 12: 1381-1382.

Lin Z, Dodd CA and Filipov NM. (2013b). Short –term atrazine exposure causes behavioral deficits and disrupts monoaminergic systems in male C57BL/6 mice. *Neurotoxicol Teratol.* 39: 26-35.

Marchetti G, Minella M, Maurino V, Minero C and Vione D. (2013). Photochemical transformation of atrazine and formation of photointermediates under conditions relevant to sunlit surface waters: laboratory measures and modeling. *Wat Res.* 47: 6211–6222.

Márquez-Ramos JA, Hernández-Plata I, Díaz-Muñoz M y Rodríguez VM. (2017). The hypoactivity associated with the repeated exposure to atrazine is related to decreases in the Specific Binding to D1-DA Receptors in the Striatum of Rats. *J Toxicol*. 2017: 1-9.

Mela M, Guiloski IC, Doria HB, Randi MAF, DeOliveiraRibeiro CA, Pereira L, Maraschi AC, Prodocimo V, Freire CA and SilvadeAssis HC. (2013). Effects of the herbicide atrazine in neotropical Catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol Environ Saf*. 93: 13-21.

Olivares-Bañuelos TN, Chi-Castañeda D and Ortega A. (2019). Glutamate transporters: Gene expression regulation and signaling properties. *Neuropharmacology*.

Parent A and Hazrati LN. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev*, 20: 91-127.

Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA and Priyadarshi SS. (2001). Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res* 86: 122-127.

Quinn LP, Perren MJ, Brackenborough KT, Woodhams PL, Vidgeon-Hart M, Chapman H, Pangalos MN, Upton N and Virley DJ. (2007). A beam-walking apparatus to assess behavioural impairments in MPTP-treated mice: pharmacological validation with R(-)-deprenyl. *J Neurosci Methods*. 1: 43-49.

Rao V. (2002). Principles of Weed Science. Second edition reprinted. Science publishers. Inc. U.S.A. p.p. 555.

Ridley RM. (1994). The psychology of perseverative and stereotyped behaviour. *Prog Neurobiol*. 22: 221-231.

Rodriguez VM, Limon-Pacheco JH, Mendoza-Trejo MS, Gonzalez-Gallardo A, Hernandez-Plata I and Giordano M. (2013). Repeated exposure to the herbicide atrazine

alters locomotor activity and the nigrostriatal dopaminergic system of the albino rat. *Neurotoxicology*. 34C: 82-94.

Rodriguez VM, Mendoza-Trejo MS, Hernandez-Plata I and Giordano M. (2017). Behavioral effects and neuroanatomical targets of acute atrazine exposure in the male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicology*. 58: 161-170.

Ros-Bernal, Barcia C, Fernández-Villalba E, de Pablos V and Herrero MT. (2009). Modelos experimentales en la enfermedad de Parkinson. En: Guía oficial de práctica clínica en la Enfermedad de Parkinson. p.p 1-38.

Ross MK, Jones TL and Filipov NM. (2009). Disposition of the herbicide 2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine (Atrazine) and its major metabolites in mice: a liquid chromatography/mass spectrometry analysis of urine, plasma, and tissue levels. *Drug Metab Dispos*. 37: 776-786.

Rutherford AW and Krieger-Liszkay A (2001) Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem Sci* 6:648–653.

SAGARPA (2007). Anteproyecto de Modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-032-FITO-1995. Por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarios para la realización de estudios de efectividad biológica de plaguicidas agrícolas y su dictamen técnico. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Siegel GJ, Albers RW, Brady ST and Price DL. (2006). GABA and Glycine. In: Basic Neurochemistry. (ed) Academic Press. 7° ed. Canada. p.p. 291-316.

Siegel GJ, Albers RW, Brady ST and Price DL. (2006). Glutamate. In: Basic Neurochemistry. (ed) Academic Press. 7° ed. Canada. p.p. 267-290.

Siegel GJ, Albers RW, Brady ST and Price DL. (2006). Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. In: Basic Neurochemistry. (ed) Academic Press. 7° ed. Canada. p.p. 761-780.

Stallard CN and Saadabadi A. (2018). Biochemistry, Glutamate. *Starpearls*. [Internet]

Stoker TE and Cooper RL. (2007). Distribution of (14)C-atrazine following an acute lactational exposure in the Wistar rat. *Reprod Toxicol*. 23: 607–610.

Stoker TE and Cooper RL. (2007). Distribution of 14C-atrazine following an acute lactational exposure in the wistar rat. *Reprod Toxicol*. 4:607-610.

Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB and Cory-Slechta DA. (2000). Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease?. *Brain Res*. 873: 225-234.

Uusi-Oukari M and Korpi ER. (2010). Regulation of GABA (A) receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol Rev*. 1: 97-135.

Villada-Canela M. (2006). Estimación del riesgo de contaminar mantos freáticos por infiltración de herbicida atrazina en distritos de riego en México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Morelos, México. 128 p.

Wihmann T and DeLong MR. (2006). Basal ganglia discharge abnormalities in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 70: 21-25.

XII. ANEXOS

XI.1 Glía

Las células gliales se ha considerado el grupo de células más abundante del sistema nervioso central (SNC), anteriormente se les había considerado como células que brindaban soporte neuronal y que no desempeñaban ningún papel funcional. Estas células fueron descritas en 1846 por el médico y biólogo Rudolf Virchow. La glía está presente desde los nemátodos hasta los humanos y se ha reportado que la porción glía-neurona se incrementa con el tamaño del cerebro. El cerebro de un ratón presenta un 65 por ciento de glía, mientras que en el cerebro humano esta proporción aumenta a un 90 por ciento, esto nos indica que la glía desempeña un papel muy importante para que se lleve a cabo el buen funcionamiento en el cerebro (Reyes-Haro *et al.*, 2014).

Existen diferentes tipos de glía que se han clasificado de acuerdo con su tamaño, forma y localización. Esta clasificación está dividida en 1) microglía; 2) oligodendroglía; 3) glía NG2 y 4) astroglía (Nácher-Carda V).

La **microglía** desempeña el papel de sistema inmune en el cerebro, impidiendo el paso de sustancias nocivas para el cerebro mediante fagocitosis, lo que conlleva a mantener la integridad del cerebro. La microglía se activa en enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, no se ha podido dilucidar si esto es benéfico o nocivo (Kettenmann *et al.*, 2013).

La **oligodendroglía** su principal papel es facilitar la comunicación eléctrica entre las neuronas. Son células pequeñas con núcleos redondeados (que ocupan gran parte del volumen) y con pocas prolongaciones, y ramificaciones en los extremos. Estas células son las encargadas de producir mielina, lipoproteína que envuelve a los axones de las neuronas haciendo eficiente la comunicación neuronal (Lee *et al.*, 2012).

La **glía NG2** células gliales postsinápticas, precursoras de los oligodendrocitos, producen la proteína NG2. Inicialmente se creía que eran las precursoras de los

oligodendrocitos, sin embargo, actualmente se ha demostrado que puede formar neuronas y astrocitos (Chung *et al.*, 2013).

La **astroglía**, célula en forma de estrella regulan la homeostasis cerebral, brindando apoyo estructural y metabólico. Se han clasificado a los astrocitos en protoplasmáticos (Rudolf Albert von Kölliker, 1889) y en fibrosos (William Lloyd Andriezen, 1893). Los astrocitos fibrosos los encontramos primordialmente en la sustancia blanca y se asocian a los axones, en cambio, los astrocitos protoplasmáticos han sido asociados a los somas neuronales y a las sinapsis y los encontramos principalmente en la sustancia gris (Nácher-Carda V). Los astrocitos participan en la sinapsis tripartita que consta de tres elementos neurona presináptica, neurona postsináptica y astrocitos, estos últimos están funcionando como reguladores de la información en el SNC. Los astrocitos expresan una gran cantidad de canales, transportadores y receptores que proporcionan una variedad de funciones homeostáticas y sinápticas. Es decir, los astrocitos pueden expresar muchos de los mismos receptores de neurotransmisores expresados en las neuronas. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los astrocitos en diversas áreas cerebrales responden a diferentes neurotransmisores liberados sinápticamente (Durkee y Araque, 2018). La mayoría de estas respuestas ocurren a través de la activación de los receptores acoplados a proteínas G y la elevación de calcio (Shigetomi *et al.*, 2013). Estudios al medir los cambios de calcio han descubierto que los astrocitos responden a glutamato (Perea y Araque, 2005; Panatier *et al.*, 2011), acetilcolina (Perea y Araque, 2005; Chen *et al.*, 2012), ATP (Perea y Araque 2007), GABA (Covelo y Araque 2018; Mariotti *et al.*, 2018) y endocannabinoides (Navarrete y Araque, 2010; Robin *et al.*, 2018). Lo que nos demuestra que los astrocitos pueden ser activados por los neurotransmisores más abundantes en el cerebro.

Se ha demostrado que los astrocitos pueden liberar una variedad de moléculas de señalización como glutamato, D-serina, ATP/ adenosina y GABA (Araque *et al.*, 2014; Savtchouck Volterra, 2018). El efecto de cada gliotransmisor en la sinapsis depende de la ubicación de la unión al gliotransmisor y específicamente al tipo de receptor que se

una, además de los componentes pre y postsinápticos de la sinapsis tripartita (Durkee y Araque, 2018).

Un estudio reciente reporta que en el estriado existen dos poblaciones diferentes de astrocitos que interactúan selectivamente con neuronas medianas espinosas y sinapsis que pertenecen a las dos vías corticoestriatales: vía directa y vía indirecta, que pertenecen al circuito motor de los ganglios basales. E indica que los astrocitos que están presentes en el estriado pueden liberar glutamato al elevar los niveles de calcio y que los efectos sobre la función sináptica están regulados por astrocitos y neuronas en el estriado. Y que las redes astro-neuronales comprenden astrocitos, neuronas y sinapsis pertenecientes a circuitos cerebrales específicos, que pueden controlar diferencialmente la actividad específica del circuito de los ganglios basales a través de señalizaciones entre astrocitos y neuronas (Martín *et al.*, 2015).

Referencias

Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R and Volterra A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*. 81: 728-739.

Chen N, Sugihara J, Sharma J, Perea G, Petravicz J, Le C and Sur M. (2012). Nucleus basalis-enabled stimulus-specific plasticity in the visual cortex is mediated by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109: E2832-E2841.

Chung S, Guo F, Jiang P, Pleasure DE and Deng W. (2013). Olig2/Plp-positive progenitor cells give to Bergmann glia in the cerebellum. *Cell Death Dis*. 4: 1-13.

Covelo A and Araque A. (2018). Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *eLife*. 7: 1-19.

Durkee CA and Araque A. (2018). Diversity and specificity of astrocyte-neuron communication. *Neuroscience*. 396: 73-78.

Kettenman H, Kirchhoff F and Verkhratsky A. (2013). Microglia: new roles for synaptic stripper. *Neuron*. 77: 10-18.

Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ and Rothstein JD. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*. 487: 443-448.

Mariotti L, Losi G, Lia A, Melone M, Chiavegato A, Gomez-Gonzalo M, Sessolo M, Bovetti S, Forli A, Zonta M, Reque LM, Marcon I, Pugliese A, Viollet C, Bettler B, Fellin T, Conti F and Carmignoto G. (2018). Interneuron-specific signaling evokes distinctive somatostatin-mediated responses in adult cortical astrocytes. *Nat Commun*. 9: 1-14.

Martin R, Bajo-Graneras R, Moratalla R, Perea G and Araque A. (2015). Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science*. 349: 730-734.
Nácher-Carda V. La microglía y su función inmunitaria en el sistema nervioso. p.p. 1-16.

Navarrete M and Araque A. (2010). Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*. 68: 113-126.

Panatier A, Vallee J, Haber M, Murai KK, Lacaille JC and Robitaille R. (2011). Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*. 146: 785-798.

Perea G and Araque A. (2005). Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium*. 38: 375-382.

Perea G and Araque A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*. 317: 1083-1086.

Reyes-Haro D, Bulavina L y Pivneva T. (2014). La glía el pegamento de las ideas. *Ciencia*. 12-18.

Robin LM, Oliveira da Cruz JF, Langlais VC, Martin-Fernandez M, Metna-Laurent M, Busquets-Garcia A, Bellocchio L, Soria-Gomez E, Popouin T, Varilh M, Sherwood MW, Belluomo I, Balcells G, Boiser B, Drago F, Van Eeckhaut A, Smolders I, Georges F, Araque A, Panatier A, Oliet SHR and Marsicano G. (2018). Astroglial CB1 receptors determine synaptic D-Serine availability to enable recognition memory. *Neuron*. 5: 935-944.

Savtchouk I and Volterra A. (2018). Gliotransmission: beyond black-and-white. *J Neurosci*. 38: 14-25.

Shigetomi E, Jackson-Weaver O, Huckstepp RT, O'Dell TJ and Khakh BS. (2013). TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *J Neurosci*. 33: 10143-10153.