



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**ALTERACIONES EN LOS SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS
NIGROESTRIATAL Y MESOLÍMBICO POR LA EXPOSICIÓN CRÓNICA
AL HERBICIDA ATRAZINA Y SUS IMPLICACIONES EN LA CONDUCTA
DE LA RATA ALBINA.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)**

P R E S E N T A

Biól. Ulises III Pacheco Bardullas

Dirigida por:

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

Dra. María Magdalena Giordano Noyola

Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva

Campus Juriquilla, Qro. Agosto del 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Instituto de Neurobiología

Universidad Nacional Autónoma de México

Los miembros del Comité de Tesis certificamos que la tesis elaborada por Ulises Pacheco Bardullas titulada: “Alteraciones en los sistemas dopaminérgicos nigroestriatal y mesolímbico por la exposición crónica al herbicida atrazina y sus implicaciones en la conducta de la rata albina” y presentada como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Manuel Salas Alvarado

Secretario (Tutor)

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

Vocal

Dra. Jacqueline Calderón Hernández

Suplente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Suplente

Dr. Alfonso Cárabez Trejo

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

RESUMEN

El herbicida atrazina (ATR) es un pesticida ampliamente utilizado en el mundo y ha sido implicado como un potencial tóxico para el sistema dopaminérgico. Las vías nigroestriatal y mesolímbica son los dos principales tractos dopaminérgicos en el sistema nervioso central, los cuales juegan un papel clave mediando amplios aspectos críticos de la actividad motora y cognitiva respectivamente. En el presente estudio nuestro objetivo fue determinar los efectos de la exposición crónica a atrazina en el sistema nigroestriatal y mesolímbico usando prueba motoras y cognitivas, además de determinar los niveles de monoaminas en el estriado y núcleo accumbens. Ratas macho expuestas crónicamente a 10 mg/kg de ATR en la dieta por 12 meses mostraron un incremento de la actividad motora espontánea en los meses 10 al 12 de exposición, además de una disminución en el desempeño de la coordinación con la prueba de rotorod. Adicionalmente, encontramos una disminución en el contenido de dopamina en estriado, sugiriendo que la vía nigroestriatal es un blanco de la exposición crónica a ATR. Por otro lado, la exposición a ATR no tuvo ningún efecto sobre las pruebas cognitivas, ni el contenido de monoaminas en el núcleo accumbens. Este resultado indica que la vía mesolímbica no es afectada por la exposición crónica a la ATR.

SUMMARY

The herbicide atrazine (ATR) is a very used pesticide in the world. It has also been implicated as a potential dopaminergic system toxicant. Nigrostriatal and mesolimbic pathways are the two major dopaminergic tracts of the central nervous system that play key roles in mediating a wide array of critical motor and cognitive function respectively. In the present study our objective was to determine the effects of the chronic exposure to ATR on nigrostriatal and mesolimbic systems using motor and cognitive tests and monoamine content levels in striatum and nucleus accumbens. Male rats chronically exposed to 10 mg/kg bw ATR in the diet for 12 months increase spontaneous motor activity at the 10 to 12 month of exposure and decrease coordination performance in rotorod test. Additionally, we found a decrease in dopamine content in the striatum, suggesting that nigrostriatal pathway is a target of ATR chronic exposure. In the other hand, exposure to ATR did not have any effect over cognitive tests and monoamine content in nucleus accumbens. This result indicates that mesolimbic pathway is not affected by chronic exposure to ATR.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profunda gratitud a mi tutora la Dra. Verónica Rodríguez Córdova por su amistad y guía durante el desarrollo de esta maestría, dado que sus consejos y observaciones oportunas me han brindado la formación académica y científica a la que aspiro.

Así mismo quiero agradecer a la Dra. Magdalena Giordano por sus imprescindibles comentarios, observaciones y opiniones que de igual manera han sido vitales para mi formación y la calidad del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (no. Registro 2286586) para la realización de este posgrado y el financiamiento del proyecto de investigación (CONACYT 60662). A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico y al Programa de Apoyo de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento otorgado (PAPIIT 214608-19)

A los integrantes de mi comité tutorial: los Doctores Alfonso Cárabez y Manuel Aguilar, por sus sugerencias, críticas y comentarios durante la realización de este proyecto.

Agradezco a mi comité de tesis, el Dr. Manuel Salas, Dr. Mauricio Díaz y la Dra. Jacqueline Calderón por sus valiosos comentarios y observaciones realizadas a este trabajo

De igual manera mi profunda gratitud para el Dr. Jorge Limón Pacheco por tener siempre la disposición para discutir y enseñar los intrincados caminos de la toxicología.

Un especial agradecimiento a la Biól. Soledad Mendoza Trejo y Laboratorista Fernando Rodríguez Flores por su apoyo técnico y soporte en el laboratorio. También quiero agradecer Med. Vet. Martín García por el apoyo técnico en el Bioterio y a la M. en C. Leonor Casanova Rico por su invaluable ayuda desde la coordinación de la Maestría. Y a la secretaria Yolanda Orduño Cruz por su siempre buena disposición para ayudar con los trámites que parecen nunca terminar.

A mis mujeres, Maty, Mely, Andrea, Frida, y Cami, por ser siempre mi motivo para seguir adelante...

Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

ATRAZINA

Generalidades

Propiedades fisicoquímicas

Toxicocinética

Metabolitos y biotransformación

Exposición

SISTEMA DOPAMINÉRGICO

Dopamina

a) Síntesis

b) Enzimas de síntesis

c) Vesiculación, liberación y recaptura de dopamina

d) Metabolismo

e) Receptores

2.2.2 *Vías dopaminérgicas*

a) Vía nigroestriatal

b) Vía mesolímbica

EFFECTOS TÓXICOS POR LA EXPOSICIÓN A LA ATRAZINA

EFFECTOS NEUROTÓXICOS POR LA EXPOSICIÓN A LA ATRAZINA

JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

Preparación de croquetas con atrazina

Pruebas motoras

Actividad locomotora espontánea

Coordinación motora (rotorod).....

Pruebas de aprendizaje y memoria **¡Error! Marcador no definido.**

 Laberinto radial de ocho brazos

 Laberinto en T.....

Determinación de monoaminas.....

Análisis estadístico.....

RESULTADOS.....

EFFECTO DE LA ATRAZINA SOBRE EL PESO COPORAL

EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A LA ATRAZINA EN LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA.

 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre la habituación en el registro de actividad locomotora espontánea.....

 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre la distancia en el centro

 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre la actividad espontánea durante 24 horas

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

 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre el perfil de actividad locomotora espontánea durante la fase de oscuridad

EVALUACION DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A LA ATRAZINA SOBRE LA COORDINACIÓN MOTORA

EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A LA ATRAZINA SOBRE TAREAS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA.....

 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre tareas de aprendizaje de tipo egocéntrico.....

 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre tareas de aprendizaje espacial

DETERMINACIÓN DE MONOAMINAS

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

 PESO CORPORAL

 ACTIVIDAD LOCOMOTORA ESPONTÁNEA

 COORDINACIÓN MOTORA

 PRUEBAS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA

 DETERMINACIÓN DE MONOAMINAS

CONCLUSIONES GENERALES DEL ESTUDIO

BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE FIGURAS.....

ÍNDICE DE TABLAS.....

1. INTRODUCCIÓN

La atrazina (6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina) (ATR) es un herbicida aplicado antes y después del cultivo y pertenece al grupo de las triazinas las cuales fueron introducidas a final de los años 50's por Ciba-Geigy conocido actualmente como Syngenta-Novartis (Gammon *et al.*, 2005). Aunque el uso de la atrazina se ha prohibido en varios países de la unión europea, en América y especialmente en Estados Unidos de América (EUA) continúa siendo el herbicida más utilizado por su bajo costo y su amplio espectro de acción como inhibidor del transporte de electrones en la fotosíntesis (Eldridge *et al.*, 1994; Gammon *et al.*, 2005). En México, la Secretaría de Economía reporta un valor total en importaciones de 350 toneladas en el año 2008, lo que lo ubica como el cuarto pesticida de mayor uso en nuestro país (Siavi, 2008).

Algunos estudios realizados en ratas adultas expuestas crónicamente a ATR reportan alteraciones tanto en el sistema reproductivo como en el endocrino (Cooper *et al.*, 1996; Eldridge *et al.*, 1999a; Friedmann, 2002; Stoker *et al.*, 2000). Asimismo, se han reportado alteraciones puntuales al sistema inmunológico, concretamente en la maduración de las células dendríticas y en el balance de las poblaciones entre las células CD4+ y CD8+ en una línea celular (JAWSII) y en ratones juveniles respectivamente (Filipov *et al.*, 2005; Pinchuk *et al.*, 2007). Sin embargo, pocos estudios han centrado su atención en los posibles efectos neurotóxicos por exposición a la ATR.

Para llevar a cabo la caracterización neuroconductual de la exposición crónica a ATR, se evaluaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley recién destetadas, las cuales fueron expuestas diariamente a una dosis de 10 mg de ATR por kg de peso, incorporados en las croquetas del alimento durante un año. En este estudio se propuso evaluar la integridad de los sistemas dopaminérgico, nigroestriatal y mesolímbico, además de sus estructuras relacionadas (estriado y núcleo accumbens, respectivamente), por lo que al final de la exposición se llevaron a cabo tareas conductuales relacionadas con la integridad de dichas regiones cerebrales.

ANTECEDENTES

ATRAZINA

Generalidades

La exposición a sustancias contaminantes del medio ambiente como son los pesticidas y metales se ha relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades particularmente carcinomas, alteraciones al sistema motor (Jackson & Grainge, 1975) y enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson (EP). La EP se manifiesta por alteraciones del movimiento resultado de la degeneración del sistema nigroestriatal. Desde la identificación del 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), un compuesto sintético de la heroína, el cual destruye selectivamente a las células dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNpc) provocando un fenotipo similar al de la EP (Langston et al., 1984), se ha especulado que el desarrollo de la EP de tipo idiopático pudiera estar ligado a factores epigenéticos. Apoyando esta teoría, estudios en modelos animales han mostrado que la administración simultánea del fungicida maneb y del herbicida paraquat (Thiruchelvam et al., 2000b) o del piscicida rotenona (Betarbet et al., 2000) provocaban la degeneración de la sustancia nigra pars compacta con el consecuente desarrollo del fenotipo de la EP en roedores.

A partir de entonces, se ha puesto especial atención sobre el efecto tóxico que los pesticidas ejercen sobre el sistema nervioso, particularmente aquellos que son de alta demanda en el mercado y que por su amplio uso implican potencialmente la exposición de mayor cantidad de individuos. La ATR es uno de ellos, con 50 años en el mercado su utilización ha ido en aumento, principalmente a principios del año 2000, donde se ubicó como el herbicida de mayor consumo en EUA y sexto a nivel mundial. Su éxito radica en su bajo costo y amplio espectro de acción para controlar el crecimiento de hierbas indeseables. La ATR es elaborada por las principales firmas mundiales de agroquímicos (Syngenta, Monsanto, Bayer,

Dow), y es distribuido a través de más de 130 productos que llevan a la ATR como sustancia activa (Newcomb, 2003).

Propiedades fisicoquímicas

La ATR tiene un coeficiente de carbono orgánico (K_{oc}) mayor a los 100 L/kg lo que le confiere una movilidad moderada a través del suelo, sin embargo tanto su coeficiente de absorción (2.61 Log K_{ow}) como su baja capacidad de volatilidad por su presión de vapor (3×10^{-7} mm Hg a 20 °C), le permite mantener una alta fijación al suelo. Su vida media ha sido calculada desde 60 días hasta 2 años en el suelo, la cual puede variar según las condiciones de pH. Adicionalmente, la ATR posee una baja solubilidad en agua (30 mg/L). Por las propiedades fisicoquímicas antes citadas, la ATR ha sido considerada como un contaminante potencial de aguas superficiales y profundas (Fan & Alexeeff, 1999).

Toxicocinética

La ATR se absorbe bien en el tracto gastrointestinal. Así, en un estudio previo se evaluó la absorción y excreción de la ATR en la rata después de administrar oralmente una dosis de 0.53 mg de ATR/kg de peso conteniendo 3.54 mCi de ^{14}C . Después de 72 horas el 20% de la ATR fue excretada en un 30% vía heces, 65% por orina y el 15% retenida en los tejidos. En ese estudio se determinó valores de absorción de ATR entre 70-80% de la dosis administrada, además de proponer al sistema urinario como la ruta primaria de excreción (Ciba-Geigy, 1987).

Por otro lado, aunque existe evidencia de que la ATR penetra al sistema nervioso, aún se desconoce el mecanismo mediante el cual atraviesa la barrera hematoencefálica. En un trabajo reciente se evaluó la distribución de la ATR en la leche marcada radioactivamente en distintos órganos de ratas lactantes expuestas a una sola dosis de 2 y 4 mg/kg vía intragástrica (Stoker & Cooper, 2007). Los

autores encontraron que los niveles de ATR se distribuyeron homogéneamente en estructuras como el hipotálamo y la hipófisis. Aunado a ello, las concentraciones en estas regiones, aumentaron en proporción con la dosis administrada. En contraste, algunas regiones periféricas como la glándula mamaria y pulmones mantuvieron los mismos niveles de ATR independientemente de la dosis administrada. Cabe señalar que las estructuras encefálicas analizadas representaron, después del hígado, riñón y plasma sanguíneo, las regiones con mayores niveles de ATR a la dosis de 4 mg/kg. Asimismo, Ross y colaboradores (2009) evaluaron *in vivo* la distribución de la ATR y sus metabolitos en ratón. En este estudio, se administraron dosis individuales de 5 a 250 mg ATR/kg peso por vía gástrica en ratones C57BL/6. Se observó que los niveles de ATR en cerebro se incrementaron de manera dosis-dependiente; adicionalmente, la depuración reportada en tejido nervioso fue mucho menor respecto a hígado, riñón o sangre (Ross *et al.*, 2008). Esto sugiere que dado el alto contenido lipídico en el cerebro, la ATR tiende a persistir en este tejido por mayor tiempo. Este resultado había sido reportado desde 1972 por Bakke en ratas, quien describió que los niveles de ATR radioactiva disminuían más lentamente en cerebro con respecto a otras estructuras periféricas después de administrar ATR-¹⁴C durante 8 días (Bakke *et al.*, 1972).

Metabolitos y biotransformación

La ATR es típicamente desalquilada en diferentes compuestos en los que se incluyen desetilatrazina (DEA), deisopropilatrazina (DIA) y diaminoclorotriazina (DACT) (Figura 1). Actualmente estos metabolitos son investigados por su posible papel tóxico.

La biotransformación en humanos ha sido poco caracterizada. Se ha reportado que en roedores la fase-I de biotransformación es la dominante para la desalquilación de la ATR, con una menor participación de la fase-II. Sin embargo existen reportes de la presencia de importantes mercapturatos de ATR en la orina

humana, sugiriendo un papel de la fase-II dependiente de glutatión para la desintoxicación del organismo por la exposición a la ATR. En estudios de exposición dérmica el principal metabolito obtenido en la orina son los mercapturatos de ATR, esto es importante ya que una de las principales vías de exposición ocupacional es a través del contacto dérmico (Lucas et al., 1993). Sin embargo, al parecer no constituye un riesgo para la exposición no-ocupacional, por lo que otros metabolitos como DACT dependiente de la fase I, deben ser evaluados (Barr et al., 2007).

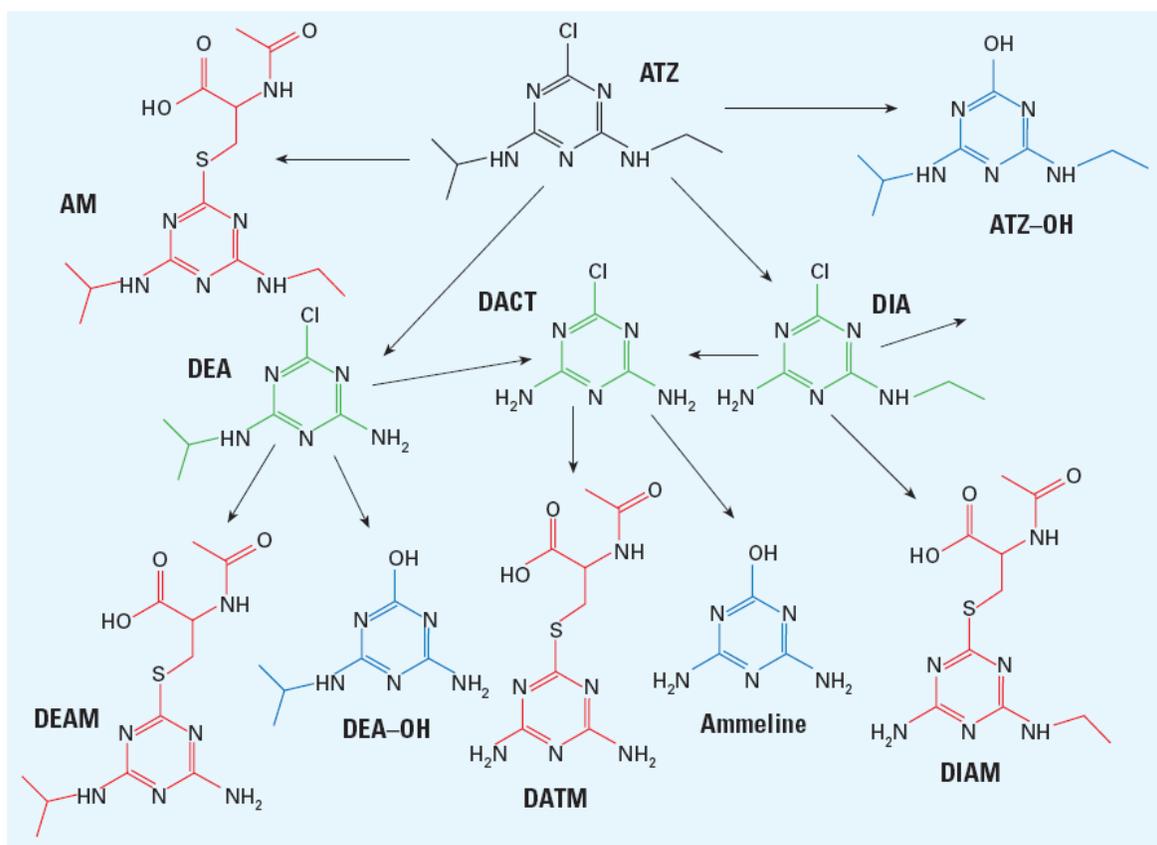


Figura 1. Metabolitos de la atrazina, formados en distintos sistemas biológicos. Abreviaciones: AM, mercapturato de atrazina; ATZ, atrazina; ATZ-OH, hidroxiatrastina; DEA, desetilatrastina; DIA, deisopropilatrastina; DACT, diaminocloroatrastina; DEAM; mercapturato de desetilatrastina; DAMT, mercapturato de diaminoatrastina; DIAM, mercapturato de deisopropilatrastina (Barr et al., 2007).

Exposición

En nuestro país no existe información sobre la presencia de la ATR en los mantos acuíferos, y aunque su uso es abundante, no se ha generado ninguna política sobre los límites permisibles para esta sustancia. Para los EUA, la Agencia de Protección al Ambiente (EPA por sus siglas en inglés) ha calculado que el límite permisible para una exposición crónica a esta sustancia es de 0.018 mg/kg/día. Este dato se basa en estudios en roedores de los cuales la dosis mínima a la cual no se observó efecto tóxico (NOAEL) por exposición crónica fue de 1.8 mg/kg/día (EPA 2003).

La ATR es considerado el pesticida más comúnmente detectado en aguas superficiales y pozos profundos en las zonas donde su uso es intensivo (Barbash et al., 2001). Se ha mostrado su presencia con una frecuencia mayor al 30% en alimentos y viviendas cercanos a sitios rurales donde se emplea este herbicida (Curwin et al., 2005; Gammon et al., 2005; Lioy et al., 2000), aunado a ello, se ha calculado una exposición ocupacional con base a un rango de absorción dérmica del 5.6% de 2.8 mg de ATR/día de trabajo, en los aplicadores de plaguicidas (Gammon et al., 2005). Sin embargo, aún son inciertos los niveles reales a los que está expuesto un individuo; los datos sugieren que la exposición a la ATR se produce a través de múltiples vías, siendo las más importantes la vía oral y la dérmica.

Por otro lado, la naturaleza y grado de exposición de la ATR en humanos continúa siendo tema de debate. Aunque diversos estudios confirman la exposición en humanos (Adgate *et al.*, 2001; Barr *et al.*, 2007; Catenacci *et al.*, 1997), la problemática se ha centrado en dos aspectos: (1) no existe un biomarcador universal que determine los niveles de ATR a los que ha estado expuesto un individuo, debido principalmente a la falta de información sobre el metabolismo de la ATR (Mcmullin *et al.*, 2003) y limitaciones metodológicas para la determinación de la ATR y sus metabolitos en sangre, orina y tejidos (Ross & Filipov, 2006); además, recientemente se ha demostrado que la presencia de metabolitos de la ATR en orina está en función del tipo de exposición, es decir que

durante una exposición crónica o aguda el metabolito primario detectado es distinto. Lo mismo ocurre si las dosis son altas o bajas (Barr et al., 2007). (2) el segundo aspecto es la falta de información acerca de los niveles reales de ATR en individuos sin actividad agrícola. Se ha reportado que menos del 3% de los participantes se encontraban por arriba del límite de detección, por lo que se concluyó que el riesgo no-ocupacional era mínimo (Alavanja *et al.*, 1994; Lioy *et al.*, 2000; Macintosh *et al.*, 1999). Por el contrario, Curwin y colaboradores analizaron los niveles de mercapturatos de ATR en orina en una zona rural, tanto en familias donde el padre era agricultor, como en aquellas donde su actividad era distinta, encontrando que el porcentaje de individuos por arriba de los niveles del límite de detección en familias de padre agricultor, eran 45% para el padre, 28% para la madre y 26% para los hijos; mientras que para las familias de padre no-agricultor los porcentajes eran del orden de 18% para el padre, 15 % para la madre y 12% para los hijos; muy por arriba de lo reportado en estudios previos. Esto sugería, que aunque la exposición ocupacional es mayor, existe un factor de riesgo inherente para aquellas personas cercanas a la actividad agrícola, e inclusive para las que no tiene relación con ésta (Curwin *et al.*, 2005; Curwin *et al.*, 2007b,). No obstante, estos estudios han considerado únicamente la determinación de mercapturatos de ATR, un metabolito poco frecuente (< 10% de las muestras). Por lo anterior, Barr y colaboradores (2007) señalan que la exposición no-ocupacional podría constituir un factor de riesgo subestimado si sólo se analizan los niveles de mercapturatos de atrazina, ya que la determinación de estos compuestos constituye una vía de biotransformación menos importante.

SISTEMA DOPAMINÉRGICO

Dopamina

a) Síntesis

El neurotransmisor dopamina (DA) pertenece al grupo de las catecolaminas que se caracteriza por contener en su estructura química un grupo catecol (anillo

de benceno con dos radicales hidroxilo adyacentes) y un grupo amino (Smeets & Gonzalez, 2000). La DA se sintetiza a partir del aminoácido L-tirosina (Figura 2), que es hidroxilado por acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). La hidroxilación de tirosina representa el paso limitante en la vía de biosíntesis de las catecolaminas y para su reacción es necesaria la presencia de la coenzima tetrahidrobiopterina, oxígeno y el hierro como cofactor (Fitzpatrick, 1999). La segunda enzima que interviene en el proceso de síntesis es la DOPA-descarboxilasa la cual utiliza como coenzima el fosfato de piridoxal que activa a la enzima y cataliza la remoción del grupo carboxilo de L-DOPA transformándola en dopamina (Siegel et al., 2007).

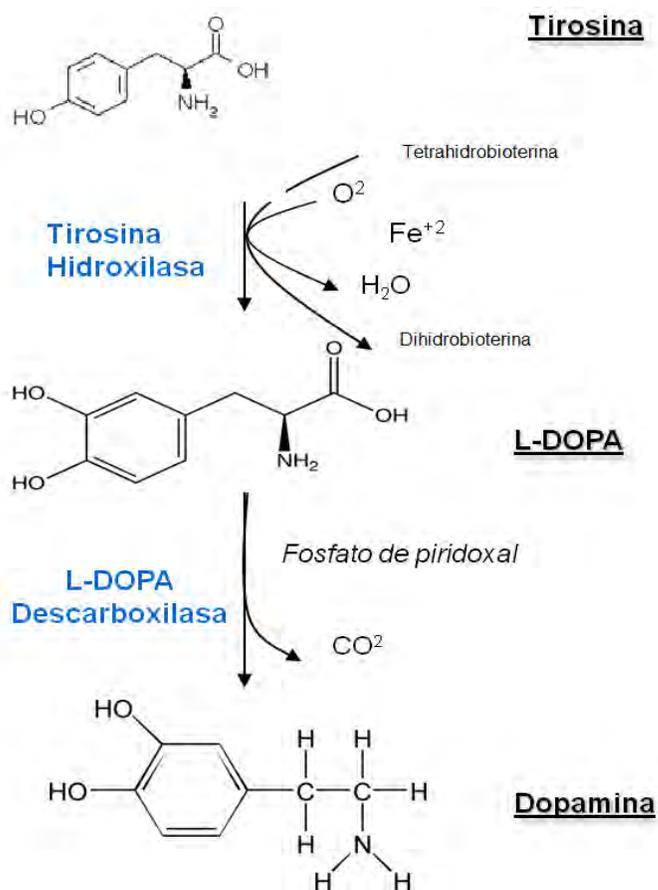


Figura 2. Biosíntesis de dopamina.

b) *Enzimas de síntesis.*

Tirosina hidroxilasa (TH). La TH pertenece a la familia de las enzimas dependientes de tetrahidrobiopterina (BH₄), las cuales contienen hierro en su estructura. La enzima TH es un tetrámero con una masa molecular de 240 kDa la cual existe en cuatro isoformas en el ser humano y sólo una en la rata (Lewis *et al.*, 1993). Se encuentra TH en cerebro, retina, y en el sistema nervioso simpático. La actividad de la TH puede ser modulada mediante dos mecanismos: primero, de mediano a largo plazo, a través la regulación de su expresión génica (regulación transcripcional y traducción, y segundo, a corto plazo, mediante la actividad enzimática (regulación alostérica, retroalimentación negativa y fosforilación (Kumer & Vrana, 1996). Recientemente se ha propuesto que el principal mecanismo de regulación de la TH es a través de la fosforilación de sus múltiples residuos de serina (residuos 8, 19, 31, 40) (Dunkley *et al.*, 2004). Este proceso parece ser el principal responsable de la regulación de los niveles celulares de catecolaminas. Sin embargo se ha demostrado que la expresión de TH en los tejidos puede aumentar por factores estresantes tales como el ayuno, ciclos circadianos, estrés, etc. Particularmente en el ayuno, la expresión de TH se ha reportado disminuida o aumentada en el área ventral tegmental (AVT) mientras que la sustancia nigra pars compacta (SNpc) no muestra cambios en la expresión de TH (Sabban & Kvetnansky, 2001).

DOPA-descarboxilasa (DCC). La DDC es una enzima dependiente de fosfato de piridoxal, la cual descarboxila de manera muy eficiente al L-DOPA intracelular convirtiéndolo en dopamina. La DCC también llamada descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos, por su capacidad de actuar sobre el 5-hidrotriptófano convirtiéndolo en serotonina. Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en los cuerpos neuronales dopaminérgicos y serotoninérgicos así como también se encuentra presente en tejidos no-neurales como riñón y arterias (Siegel *et al.*, 2007).

c) Vesiculación, liberación y recaptura de dopamina

Posterior a su síntesis la dopamina es almacenada en vesículas, aunque es normal que una baja cantidad de DA permanezca libre en el citosol y sea metabolizada por la monoamina oxidasa (MAO-A). La vesiculación de DA es llevada a cabo por el transportador vesicular de membrana (VMAT-2) el cual puede ser bloqueado *in vivo* con reserpina. La acción de VMAT-2 es bombear con gasto energético hacia el exterior un protón de H⁺ e internalizar una molécula de DA, se llegan a alcanzar concentraciones de 0.5 mol/l de DA en las vesículas (Siegel et al., 2007). Las vesículas juegan un papel clave abasteciendo al sistema de DA disponible para su liberación cuando un potencial de acción alcanza la terminal axónica y el flujo intracelular de Ca²⁺ aumenta lo suficiente para promover la fusión de las vesículas con la membrana y descargar su contenido al espacio sináptico. La DA extracelular es recapturada a través del transportador de dopamina (DAT), el cual es una proteína de membrana de 620 aminoácidos que recaptura de 2-5 moléculas de DA por segundo con gasto energético (Cragg & Rice, 2004). Algunos neurotóxicos como el MPTP y la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) son también recapturados por DAT, lo que constituye uno de los mecanismos neurotóxicos más estudiados para la generación de modelos de la EP inducidos por la muerte de neuronas dopaminérgicas. Por otro lado drogas como la cocaína y antidepresivos tricíclicos pueden bloquear de manera selectiva a este transportador (Siegel et al., 2007).

d) Metabolismo

El exceso de dopamina intracelular que no es vesiculada es rápidamente metabolizada por la enzima monoamina oxidasa (MAO). La MAO es una flavoproteína localizada en la membrana mitocondrial externa que cataliza la desaminación de DA al ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) como se muestra en la Figura 3. EL DOPAC puede difundirse fácilmente fuera de la neurona (Edmondson et al., 2004); en el espacio extracelular el DOPAC es metabolizado por una segunda enzima de degradación, la catecol-O-metiltransferasa (COMT), la cual se encuentra presente en la glía y en la terminal postsináptica. La COMT

cataliza la transferencia de un grupo metilo al DOPAC para formar el ácido homovanílico (HVA). Aunque una también puede producirse extracelularmente una pequeña cantidad de 3-metoxitiramina a través de la actividad de la COMT

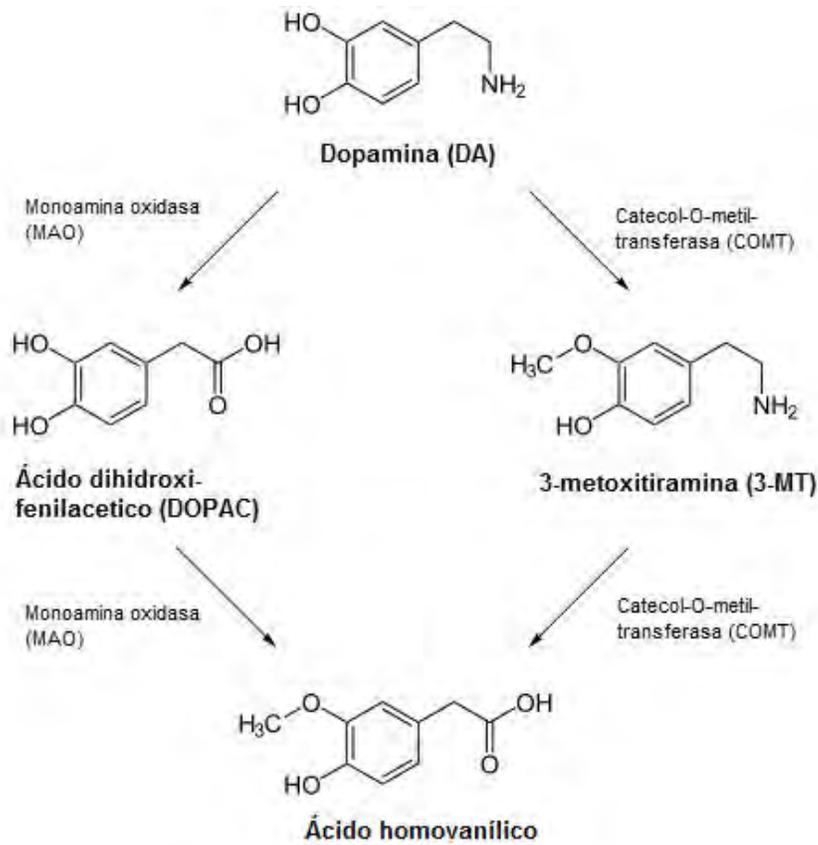


Figura 3. Metabolismo de la dopamina.

e) *Receptores*

El efecto fisiológico de la dopamina es mediado a través dos familias de receptores metabotrópicos de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G: los receptores de dopamina tipo 1 (D1) y los receptores de dopamina tipo 2 (D2) (Spano *et al.*, 1978) los cuales son subdivididos según su capacidad para estimular o inhibir respectivamente la actividad de la adenilato ciclasa (AC). Con el advenimiento de los métodos de clonación las dos familias fueron

ampliadas clasificándose finalmente en: receptores tipo D1 (D1 y D5) y los receptores tipo D2 (D2, D3, D4).

Características de los receptores tipo D1. Los receptores tipo D1 se encuentran acoplados a una proteína G estimuladora (Gs), la cual estimula la actividad de la adenilato ciclasa y cataliza la conversión de adenosin trifosfato (ATP) a adenosin monofosfato ciclico (AMPc). El aumento en los niveles de AMPc causa la disociación de la unidad reguladora de la proteína cinasa A (PKA) y por consiguiente el sitio catalítico de la PKA queda expuesto para fosforilar numerosos substratos. PKA puede activar varios factores de transcripción que al entrar al núcleo estimulen la expresión de algunos genes de respuesta inmediata como c-fos, c-jun y knox, o bien puede actuar uniéndose a otros factores de transcripción que estimulan la transducción de genes de respuesta a largo plazo, como es el caso del elemento de respuesta al AMPc (CRE). Tanto en roedores como primates el subtipo D1 se distribuye virtualmente por todo el cerebro con excepción de AVT y la glándula pituitaria (Boyson *et al.*, 1986), mientras que el subtipo D5 está confinado principalmente a la región del hipotálamo, corteza cerebral e hipocampo (Siegel *et al.*, 2007).

Características de los receptores tipo D2. Los receptores tipo D2 son más diversos y versátiles que los receptores tipo D1. Estos incluyen tres subtipos (D2, D3, D4) y dos isoformas (D₂L y D₂S) generados por *splicing* alternativo (Giros *et al.*, 1989). Los receptores tipo D2 se encuentran acoplados a proteína G inhibidora (G₀) de la adenilato ciclasa (AD), con la consecuente la disminución en los niveles de AMPc. Los receptores D2 también son activadores de canales de K⁺ que estimulan a la fosfolipasa A, la cual bloquea los canales de Ca²⁺ disminuyendo su concentración en la neurona (Bentivoglio & Morreli, 2005).

Numerosas investigaciones han confirmado que la mayor densidad de receptores del subtipo D2 se encuentra en el estriado ventral y dorsal de roedores y primates, mientras el subtipo D3 es más numeroso en el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio; finalmente el subtipo D4 está confinado principalmente a la corteza frontal, el bulbo raquídeo y al mesencéfalo (Bentivoglio & Morreli, 2005).

Vías dopaminérgicas

El estudio de las catecolaminas (CA) se inicia en los años sesenta con el descubrimiento por Carlsson *et al.* (1962) de dos grupos discretos uno dopaminérgico y otro noradrenérgico en el cerebro (Carlsson *et al.*, 1962). Dos años después, (Dahlstroem & Fuxe, 1964) extienden y detallan a 12 núcleos catecolaminérgicos en el cerebro de la rata (A1-A12), y posteriormente se adicionaron cinco grupos más (Bjorklund & Dunnett, 2007). Existen tres grandes núcleos dopaminérgicos mesencefálicos: área retrorrubral (A8), SNpc (A9) y AVT (A10). Estas áreas representan núcleos individuales con vías de proyección y funciones distintas (Figura 4).

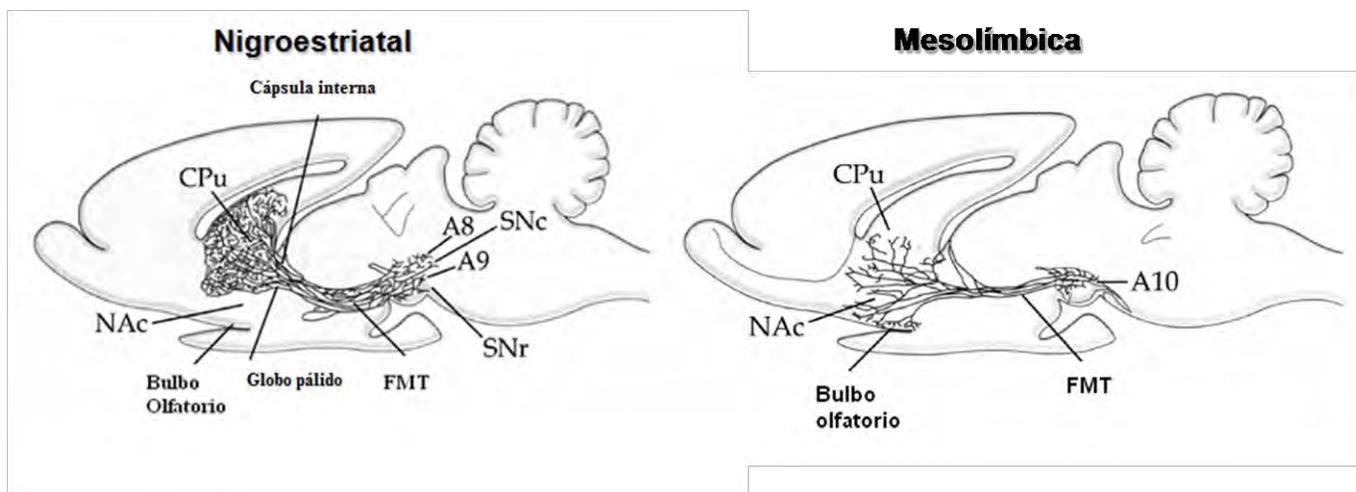


Figura 4. Esquema de las vías dopaminérgicas en cortes longitudinales de roedor. Fascículo Medial Telencefálico (FMT); Núcleo Accumbens (NAc); Sustancia Nigra *pars compacta* (SNpc); Caudado-Putamen (CPu); Sustancia Nigra *reticulata* (SNr).

a) Vía nigroestriatal

La vía mesoestriatal más conocida como nigroestriatal se origina en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Por su citoarquitectura y conexiones se divide en dos porciones, la dorsal y la ventral. La porción dorsal está caracterizada por neuronas con dendritas en dirección mediolateral, positivas a

calbindina-D_{28k}, las cuales se proyectan principalmente a la matriz del estriado. Por su parte las neuronas de la hilera ventral tienen un arreglo dorsoventral, son negativas a calbindina-D_{28k} y se proyectan a los parches del estriado (Smeets & Gonzalez, 2000).

La vía nigroestriatal se proyecta ipsilateralmente hacia el estriado estableciendo en su mayor parte sinapsis simétricas con las espinas y dendritas de las neuronas medianas espinosas (NME) las cuales conforman los sistemas de salida de esta región a través de las vías directa e indirecta. La dopamina ejerce su efecto modulador por la vía directa principalmente a través de los receptores D1 que tienen alta expresión en las poblaciones estriatonigrales de NME positivas a sustancia P. Por otro lado, la vía indirecta es regulada por los receptores D2 los cuales son expresados en NME positivas a encefalina (Bentivoglio & Morreli, 2005).

La segregación de los receptores D1 y D2 en la vía directa e indirecta indica que la entrada dopaminérgica afecta diferencialmente la función de las poblaciones de neuronas estriatales, ya que los receptores D1 ejercen principalmente su papel excitatorio a través de la vía directa estriatonigral. Por otro lado los receptores D2 inhiben la función de las neuronas estriatopalidales de proyección a través de la vía indirecta. El balance entre estas dos vías resulta en la funcionalidad y coherencia de la actividad motora (Bentivoglio & Morreli, 2005).

b) Vía mesolímbica

La vía mesolímbica se origina en un segundo grupo de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas ubicadas en el AVT. Los axones de las neuronas de AVT se proyectan ipsilateralmente a la corteza frontal, el septum lateral, núcleos habenuares y de manera primordial al núcleo accumbens, tanto en la región central como cubierta. La vía mesolímbica provee una interfase con el sistema límbico y otras regiones cerebrales como la corteza y tronco encefálico.

EFFECTOS TÓXICOS POR LA EXPOSICIÓN A LA ATRAZINA

Los estudios realizados para evaluar la toxicidad causada por exposición a la ATR presentan una alta heterogeneidad, esto en gran parte debido a la dificultad para comparar tanto los modelos experimentales utilizados, como las vías, dosis y tiempos de exposición al tóxico. Aún cuando en un inicio se intentó probar su genotoxicidad los resultados han sido inconsistentes. La EPA señala que la exposición a bajas dosis de ATR no influye en procesos carcinogénicos. Un estudio reportó un aumento en la incidencia de tumores mamarios en ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley expuestas crónicamente a 400 ppm de ATR/kg de comida (Wetzel et al., 1994). Trabajos posteriores propusieron que el aumento en la incidencia tumoral podría estar relacionado con la pérdida de la homeostasis catecolaminérgica en el hipotálamo por la exposición a la ATR (Cooper *et al.*, 1996; Wise & Naylor, 1987). Dicha hipótesis se basa en estudios de exposición crónica a bajas dosis de ATR, realizados por Eldridge (1999) en los que usaron ratas de la cepa Sprague-Dawley expuestas a 40-400 ppm de ATR durante un periodo de 13 a 26 semanas, observando un aumento en la actividad y cantidad de estrógenos en la glándula mamaria, posiblemente debido a una disminución en la actividad noradrenérgica del hipotálamo, lo cual provoca una disminución en la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), alterando a su vez el ciclo de la hormona luteinizante y folículo estimulante. Tales alteraciones hormonales resultan en que el animal ingrese a la fase de estro de manera repetida y se aumente la secreción de estrógenos gonadales (Eldridge *et al.*, 1999b; Eldridge *et al.*, 1999a). Dicha hiperactividad en el eje hipotálamo-pituitaria-gónadas ha sido relacionado previamente con senescencia ovárica temprana y un aumento en la incidencia de tumores mamarios en ratas (Nagasawa & Morii, 1981). Sin embargo, aún se desconocen con exactitud los mecanismos mediante los cuales la ATR produce estas alteraciones catecolaminérgicas que resultan en el desajuste del eje endocrino-reproductivo.

EFFECTOS NEUROTÓXICOS POR LA EXPOSICIÓN A LA ATRAZINA

En 1982 se reportó el primer estudio neurotoxicológico de la ATR. En aquel tiempo Castano *et al.* (1982) observaron que la administración crónica de ATR en ratas producía alteraciones en el equilibrio, espasmos tónicos y nistagmo. En años posteriores, Ugazio *et al.* (1991) reportó una disminución en la actividad motora vertical en ratas expuestas a una dosis de 1 g ATR/kg durante 4 días; de la misma manera Rodríguez *et al.* (2005) observaron el efecto contrario en la actividad locomotora espontánea en ratas expuestas diariamente a una dosis de 10 mg ATR/kg durante seis meses.

Las alteraciones motoras, podrían explicarse por los múltiples efectos sobre los sistemas de neurotransmisión dopaminérgica reportados recientemente. Por ejemplo, se ha demostrado tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* que la exposición a la ATR resulta en decremento en los niveles de dopamina en estriado (Filipov *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2005), pérdida de neuronas TH+ y TH- en SNpc y AVT (Coban & Filipov, 2007; Rodríguez *et al.*, 2005) y disminución en la liberación de dopamina (Rodríguez *et al.*, 2005). Lo anterior se correlaciona con lo observado previamente por el grupo de Das (Das *et al.*, 2000, 2001, 2003) en estudios *in vitro*, quienes proponen que las enzimas que sintetizan a las catecolaminas pudieran ser un blanco de la ATR. Esto último resulta interesante ya que datos recientes (Rodríguez, comunicación personal), indican que la administración aguda de 100 mg ATR/kg en ratas Long-Evans incrementa la actividad de la TH por fosforilación de las serinas de los sitios 19 y 40, posiblemente a través de inhibir a la fosfodiesterasa. Aunado a ello, en un reciente estudio *in vitro*, se observó una disminución en la recaptura de DA intracelular por el transportador vesicular (VMAT-2). A concentraciones de 1 μ M de ATR la recaptura decayó un 17% mientras que a la concentración más alta de 250 μ M, la disminución fue cercana al 50% (Hossain & Filipov, 2008). Los autores señalan que al haber más DA no vesiculada en el citosol, la neurona se encuentra susceptible a las especies reactivas de oxígeno generadas por la auto-oxidación

de la DA y la generación de quinonas de dopamina. Estos eventos podrían producir un aumento significativo en la generación de especies reactivas, aumentando el estrés oxidante en la neurona.

Hasta el momento no existe ningún reporte en la literatura que haya evaluado los posibles efectos neurotóxicos de la ATR dentro de un contexto conductual. Esto resulta pertinente por las implicaciones que tiene la exposición a ATR en los sistemas catecolaminérgicos, los cuales se encuentran ligados a diversas funciones como son el control del movimiento (sistema dopaminérgico nigroestriatal), en la recompensa y emociones (sistema dopaminérgico mesolímbico) (Viggiano *et al.*, 2003). Por lo tanto el presente estudio pretende evaluar las posibles alteraciones en los sistemas dopaminérgicos, provocados por la exposición crónica a la ATR, mediante una batería de pruebas motoras, cognitivas y neuroquímicas.

JUSTIFICACIÓN

Estudios previos (Rodríguez *et al.*, 2005) sugieren que la exposición a la ATR produce alteraciones en la fisiología de los sistemas de neurotransmisión incluyendo el dopaminérgico. Dada la importancia de este sistema para la planeación e iniciación de conductas motoras a través de la vía nigroestriatal y la realización de tareas de aprendizaje y memoria mediante la vía mesolímbica, 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 el contenido de dopamina y sus metabolitos en estructuras blanco de las vías dopaminérgicas

HIPÓTESIS

La exposición crónica a la ATR tiene efectos deletéreos en los sistemas nigroestriatal y mesolímbico, los cuales se ven reflejados en la conducta y en la neuroquímica dopaminérgica de la rata macho de la cepa Sprague-Dawley.

Hipótesis 1

La exposición crónica a 10 mg de ATR/kg de peso produce alteraciones en la expresión de pruebas conductuales.

Hipótesis 2

La exposición crónica a 10 mg de ATR/kg de peso produce alteraciones en los niveles de monoaminas cuantificados en el estriado y del núcleo accumbens de ratas macho Sprague-Dawley

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la neurotoxicidad provocada por la exposición crónica a la ATR en los sistemas dopaminérgicos mesolímbico y nigroestriatal de la rata albina de la cepa Sprague-Dawley.

Objetivos Específicos

- a. Evaluar mediante tareas conductuales relacionadas con el cuerpo estriado y núcleo accumbens el efecto de la exposición crónica a 10 mg de ATR/kg de peso en los sistemas nigroestriatal y mesolímbico en la rata Sprague-Dawley.
- b. Medir el contenido de monoaminas en el cuerpo estriado, núcleo accumbens de ratas Sprague-Dawley expuestas crónicamente a 10 mg de ATR/kg de peso.

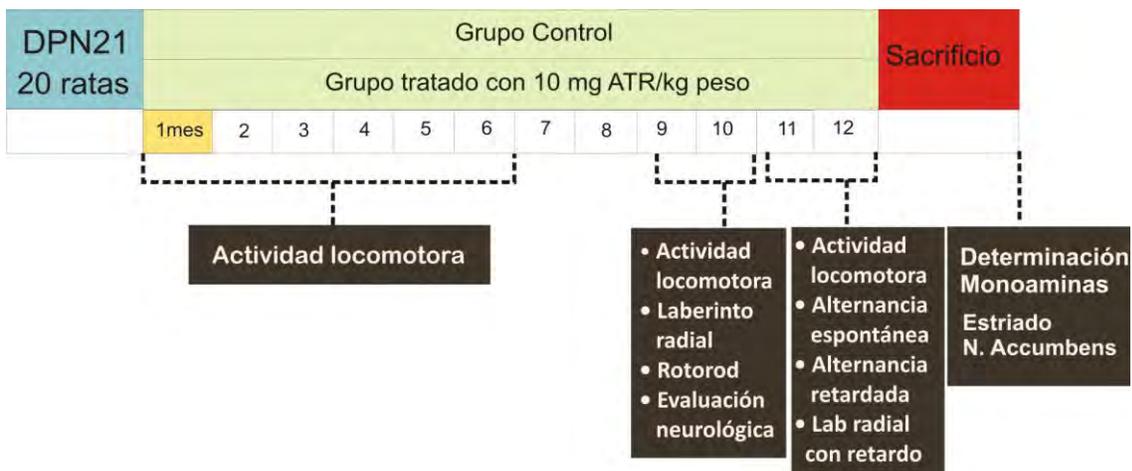
DISEÑO EXPERIMENTAL

Método General

Se utilizaron 20 ratas macho recién destetadas (DPN 21) de la cepa Sprague-Dawley, las cuales fueron habituadas a un ciclo de luz/obscuridad (8:00/20:00 hrs). A las ratas control se les administró alimento (LabDiet 5001), mientras que el grupo tratado con ATR recibieron alimento (LabDiet 5001) el cual contenía 300 mg de ATR/kg, del cual se administraba diariamente una dosis de 10 mg/kg de peso del animal durante 12 meses. Esta dosis fue seleccionada de un estudio previo de (Rodríguez *et al.*, 2005), en el cual se observó disminución de DA dependiente de la dosis y un aumento en la actividad motora espontánea también dependiente de la dosis.

Una vez que las ratas alcanzaron los 300 g de peso, el acceso al alimento fue restringido para mantener al animal en este peso. El agua se mantuvo *ad libitum* durante el curso del experimento. El peso corporal se registró diariamente.

Se evaluó mensualmente la actividad locomotora espontánea de los animales y antes de finalizar la exposición se les sometió a una batería de pruebas cognitivas y motoras. Finalizada la exposición los animales fueron sacrificados por decapitación, se extrajo el cerebro y se realizó la disección del cuerpo estriado y del núcleo accumbens. Posteriormente el tejido se congeló a -80 °C para el análisis de monoaminas por HPLC. A continuación se ejemplifica el diseño experimental:



MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

Se utilizaron 20 ratas macho recién destetadas (DPN21) de la cepa Sprague-Dawley con un peso inicial de 40-60 g, obtenidas del Bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM.

Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo siguieron las regulaciones establecidas por “El reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación de la Salud” de la Secretaría de Salud (publicada en enero de 1987) y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”.

Preparación de croquetas con atrazina

Las croquetas se prepararon mezclando el alimento de purina (Rat Chow formula 5001) con agua desionizada para formar una mezcla homogénea a la cual se le añadió la ATR obtenida de Chem Service (West Chester, PA, USA). Posteriormente, la mezcla fue cortada en trozos y secada al sol o en un horno a 50-60 °C. Las croquetas para el grupo control fueron preparadas de la misma manera pero sin ATR.

Pruebas motoras

Actividad locomotora espontánea

La actividad se registró utilizando un sistema automatizado que consistió en cajas (40 x 40 x 30 cm) de acrílico transparente [Digiscan Animal Activity Monitors, Accuscan Inc. (Columbus, Ohio, USA)] rodeadas por dos niveles de sensores infrarrojos los cuales detectan los movimientos del animal. Estos datos son transmitidos a una interfase que los cuantifica y envía a un sistema de cómputo donde son clasificados en distintos parámetros de actividad. El registro tiene una

duración por 25 horas. Durante el experimento los animales tienen libre acceso al agua y alimento (Bardullas et al., 2008).

Los tipos de variables analizadas en este estudio se definen de la siguiente manera:

Actividad Horizontal (AH).- El número total de interrupciones en el sensor horizontal en un tiempo de muestreo determinado.

Distancia total: (DT).- Indica la distancia recorrida (cm) por el animal en un tiempo de muestra determinado. Este parámetro es el mayor componente de la actividad ambulatoria.

Número de movimientos (NM).- Número de movimientos horizontales realizados por la rata en un tiempo de muestreo determinado. Los movimientos individuales están separados por un periodo de al menos un segundo.

Tiempo en movimiento (TM).- Es el tiempo (segundos) que el animal está en actividad ambulatoria durante un periodo determinado de tiempo.

Actividad Vertical (AV).- El número total de interrupciones en el sensor vertical en un tiempo de muestreo determinado.

Tiempo de Actividad Vertical (TV).- Es el tiempo (segundos) que el animal se encuentra obstruyendo el sensor vertical al incorporarse, de esta manera la variable se incrementa hasta que el animal está por debajo del sensor vertical.

Cuentas estereotipadas (CE).- Número de veces que el animal interrumpe repetidamente (más de un segundo) el mismo sensor durante la actividad estereotipada.

Número de estereotipias (NE).- Número de veces que el sistema capta comportamiento estereotipado en el animal. Se requiere que el movimiento dure 1 segundo o más para separar un episodio estereotipado del siguiente.

Distancia en el margen (DM).- La distancia en cm que el animal recorre en el margen o esquina de la caja.

Distancia en el centro (DC).- La distancia en cm que el animal recorre en el centro de la caja.



Coordinación motora (rotorod)

Para evaluar la coordinación motora en la ratas expuestas a 10 mg de ATR/kg se utilizó el aparato [IITC 755 ROTOROD, (San Diego, CA, USA)] el cual consiste en una estructura metálica con 5 cilindros internos de 3.75" de diámetro movidos por un motor; al cilindro se ha adherido una superficie rugosa que le permite al animal sujetarse al cilindro. En la parte inferior del cilindro se encuentra una plataforma la cual al caer el animal activa dos sensores los cuales detienen al cilindro en movimiento. El aparato proporciona el tiempo al cual el animal cae, así como la velocidad del cilindro en revoluciones por minuto (rpm).

Protocolo de aceleración. Este protocolo fue adaptado de (Monville *et al.*, 2006). Brevemente, los animales fueron habituados al aparato colocándolos en la rueda sin movimiento durante 2 minutos. Seguido de esto, se entrenaron a los animales durante tres días en dos sesiones diarias a una aceleración de 4 a 20 rpm por 60 segundos hasta estandarizar que todos los animales terminaran la prueba en al menos una ocasión. Los animales que al término de las sesiones no cumplieron con este criterio fueron descartados.

Después de la fase de entrenamiento se realizaron 3 ensayos consecutivos uno cada día, a la misma hora (12:00 pm), en donde se registró el tiempo y las

rpm en caer del cilindro en movimiento. Los parámetros programados en el aparato fueron los siguientes:

Tiempo total 240 segundos

Velocidad inicial 10 rpm

Velocidad final 45 rpm

Aceleración 45 rpm en 180 segundos



Pruebas de aprendizaje y memoria

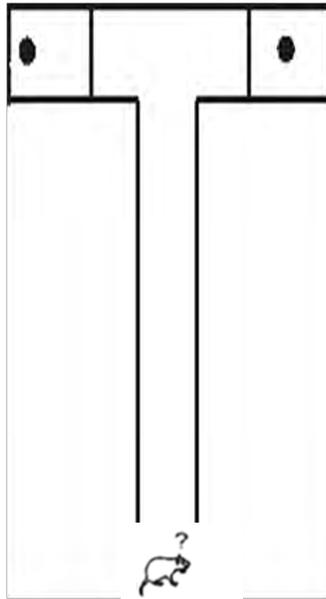
Laberinto en T

Alternancia retardada

Se utiliza un laberinto en T modificado con una cámara de inicio que termina en un área de elección dividida por una pared con una entrada a cada compartimiento, al final del cual se encuentra el reforzador. El experimentador puede controlar el acceso al reforzador mediante una puerta estilo guillotina que se localiza a la mitad del compartimiento.

Se coloca a la rata en la cámara de inicio y se registra el compartimiento elegido para consumir el reforzador. En el siguiente ensayo se cierra la puerta del

compartimiento previamente visitado, dejando la entrada libre al compartimiento restante. Si la rata entró en el compartimiento abierto, éste se cierra en el siguiente ensayo y se refuerza el compartimiento contrario y así sucesivamente hasta completar un número determinado de ensayos durante 5 días. Se registra como error si la rata entra al compartimiento cerrado. Esta prueba ha sido utilizada para observar alteraciones en el estriado a través del aprendizaje de contexto (Whishaw & Kolb, 2004)



Laberinto en T
Variante espontánea y alternada

Laberinto radial de ocho brazos

Aparato. El laberinto radial de ocho brazos es un aparato de acrílico con un área octagonal en el centro la cual une a 8 brazos de 58 cm de largo, 10.5 cm de ancho y 10.5 cm de alto. Al final de cada brazo se encuentra un recipiente donde se coloca el reforzador. En el cuarto de registro se sitúan claves espaciales distribuidas en dirección a los brazos para facilitar la orientación espacial del animal.

Variante gana y cambia con retardo.

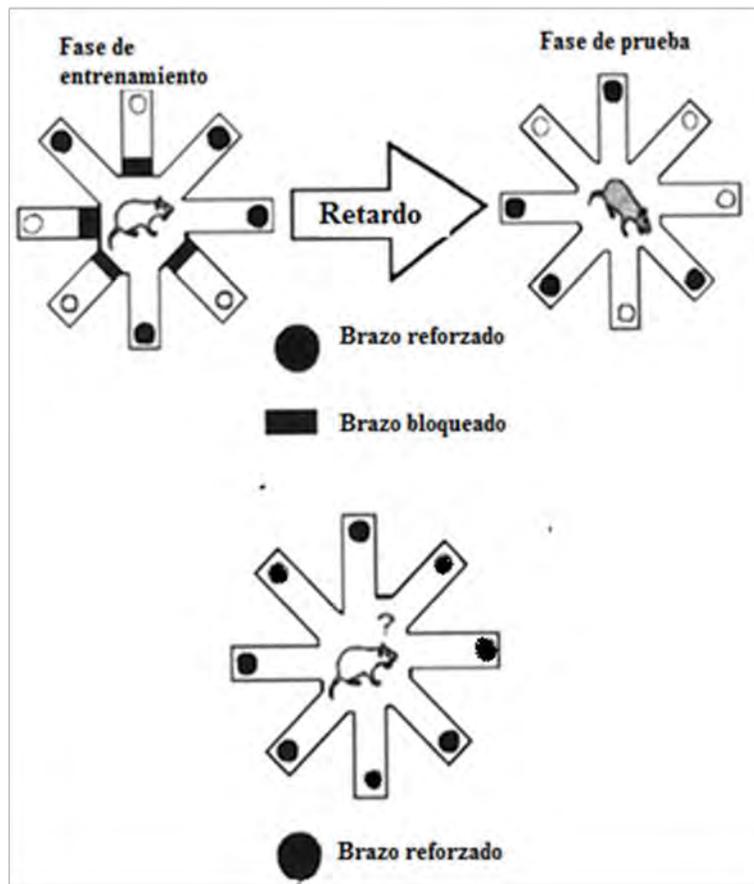
Los ensayos consisten en una fase de entrenamiento y otra de prueba separadas por un retardo de 5 minutos. Antes de la fase de entrenamiento, son seleccionados aleatoriamente 4 brazos del laberinto en los que se deposita el reforzador (pastilla de azúcar) mientras que el resto de los brazos se cierran y se permite que el animal pueda comer el reforzador que se encuentra en los brazos abiertos (tiempo de corte 300 segundos). Posteriormente se retira al animal durante 5 minutos, se limpia el laberinto con una solución de ácido acético al 1%, se coloca el reforzador en los brazos que estuvieron cerrados y se abren todas las puertas (cerrados previamente). Se califica como error si la rata no entra a los brazos reforzados. Este protocolo ha sido empleado para evaluar daños en el núcleo accumbens (Floresco *et al.*, 1997).

Variante gana y cambia

Entrenamiento. La rata recibe un periodo de habituación en donde tiene acceso al laberinto por 5 minutos sin el reforzador.

Prueba. Cada ensayo se inicia introduciendo a la rata al área central del laberinto radial registrando sus visitas a cada uno de los ocho brazos, los cuales contienen el reforzador (pastilla de azúcar). Se considera como error si la rata entra a un brazo previamente visitado. El tiempo de corte es 300 segundos o cuando la rata ha visitado los ocho brazos. Se realizan 2 ensayos por día durante 5 días. Esta prueba ha sido ampliamente utilizada para observar alteraciones en el aprendizaje espacial, el cual está relacionado con la integridad del hipocampo (McDonald & White, 1995).

Gana y cambia con retardo



Gana y cambia sin retardo

Determinación de monoaminas

Preparación de la muestra.

Se utilizó un sonicador Branson Sonifier 250 a 2 Hz para disgregar el tejido cerebral en 0.1 N de ácido perclórico, posteriormente se centrifuga (10,000 rpm x 30 min) y se recupera el sobrenadante el cual es almacenado a -80 °C hasta su análisis. El precipitado se digiere con NaOH 0.5 M para posteriormente determinar el contenido de proteínas mediante la técnica de Bradford.

Cromatografía de líquidos.

Las monoaminas (DA, 5-HT y sus metabolitos) se cuantifican por HPLC con detección electroquímica como la descrita por (Bardullas *et al.*, 2008). Brevemente, se separan las monoaminas en una columna C-18 (Grace Davison Discovery Sciences, Deerfield, IL, USA) rellena con un absorbente de catecolaminas (3 μ m tamaño partícula, y una longitud de 100 mm x 4.8 mm de ancho la cual se encuentra conectada a una bomba (Perkin Elmer series 200) por donde se inyecta la fase móvil isocrática, la cual está compuesta de 0.1 M de fosfato monobásico, 0.5 mM octil sulfato de sodio, 0.03 mM EDTA y 11-13% de metanol. La detección se realiza mediante el uso de un detector electroquímico (Bioanalytical Systems, LC-4C) ajustado a un potencial amperométrico de 850 mV relacionado a un electrodo de referencia Ag/AgCl y una sensibilidad de 2 nA. Los resultados generados se analizaron con el software TotalChrom Navigator versión 6.3.1.0504 (PerkinElmer, San José, CA. USA).

Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se utiliza la técnica de Bradford, la cual se basa en la unión del colorante Comassie Blue a las proteínas, formando un complejo proteína-colorante, esta reacción se analizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Las muestras se interpolaron en una curva de calibración de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino. Los resultados generados se expresarán en ng de proteína/mg de tejido.

Análisis estadístico

La comparación estadística de los valores concernientes al peso, actividad locomotora espontánea, pruebas de aprendizaje y determinación de monoaminas, fue realizado con el análisis de varianza (ANDEVA) de una o dos vías según el caso, usando como prueba *post hoc* la LSD de Fisher.

Para la comparación entre grupos por mes individual, se utilizó una prueba t de Student. En todas las comparaciones que se llevaron a cabo, el nivel mínimo de significancia fue establecido en el 5%.

Los datos obtenidos de los sujetos expuestos a la ATR, fueron analizados mediante el paquete estadístico Statview versión 5.0

RESULTADOS

EFFECTO DE LA ATRAZINA SOBRE EL PESO COPORAL

El peso corporal de las ratas registrado durante 12 meses de exposición a la dosis de 10 mg/kg de ATR no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control. Sin embargo, a pesar de que los grupos estuvieron privados de alimento durante el experimento, y como se puede observar, el peso corporal se mantuvo constante a través del tiempo (Figura 5).

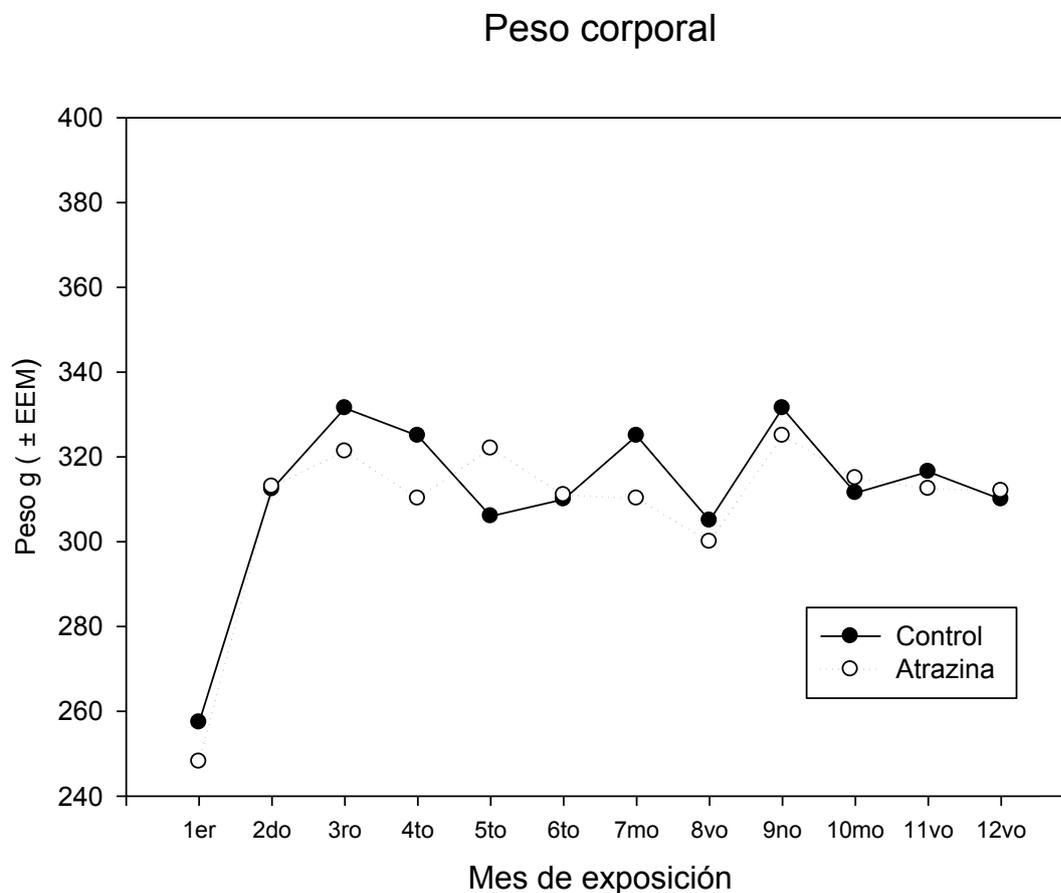


Figura 1. Peso corporal de los grupos control y ATR expuestos durante 12 meses a 10 mg ATR/kg peso administrados vía oral. Cada punto en la línea, representa el promedio del grupo por mes \pm EEM, $p > 0.05$.

EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A LA ATRAZINA EN LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA.

8.2.1 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre la habituación en el registro de actividad locomotora espontánea

Para valorar el proceso de habituación en la actividad locomotora espontánea se analizó la primera hora del registro, utilizando el parámetro de actividad horizontal. El ANDEVA de medidas repetidas no reveló un efecto significativo de grupo [F (1,16)= 1.451, $p>0.05$]; sin embargo se encontraron efectos significativos para el tiempo [F (1,16)= 3.12, $p<0.05$] y para la interacción entre los factores [F (1,16)= 3.86, $p<0.005$]. Por lo que se realizó una t no pareada para revelar efectos sobre cada mes de exposición encontrándose diferencias significativas en el octavo y doceavo mes de exposición [$t=-3.05-2.78$, $p<0.05$]. (Figura 6). Estos resultados muestran que los animales controles se habituaron a lo largo del periodo de exposición disminuyendo su respuesta en la caja de actividad locomotora.

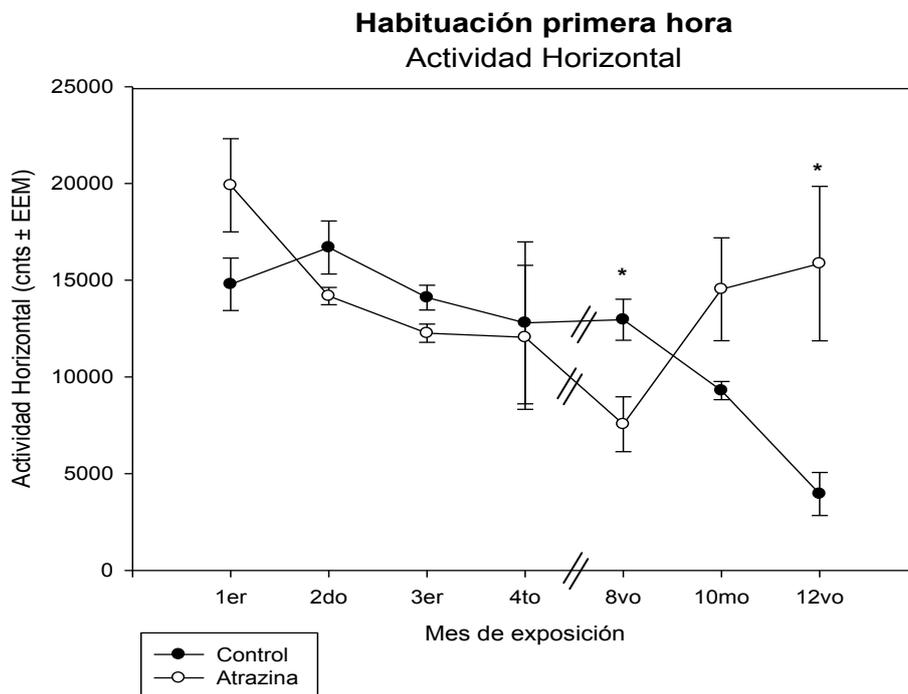


Figura 2. Actividad horizontal durante la primera hora del periodo de registro de la actividad locomotora espontánea en animales control y expuestos a 10 mg ATR/kg (vía oral) a lo largo de 12 meses de exposición. Cada punto de la gráfica representa el promedio del grupo (\pm EEM). *diferente al control $p < 0.05$.

Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre la distancia en el centro

Asimismo, se registró la preferencia del roedor por permanecer en el centro de la caja. Cabe mencionar que este parámetro se considera opuesto a la tigmotaxis que es la tendencia de los animales a recorrer la caja tocando las paredes (distancia en los márgenes). Se analizaron únicamente los datos obtenidos durante la primera hora del registro (para el análisis de esta variable no se consideró el quinto mes de exposición, debido a que no se cuenta con los datos de la primera hora). Los resultados mostraron que en el primer, décimo y décimo segundo mes de exposición se registró un efecto significativo de grupo (Figura 7). El grupo tratado con ATR mostró una preferencia por el centro en comparación al control [$t=2.33-6.07$, $p<0.05-0.001$].

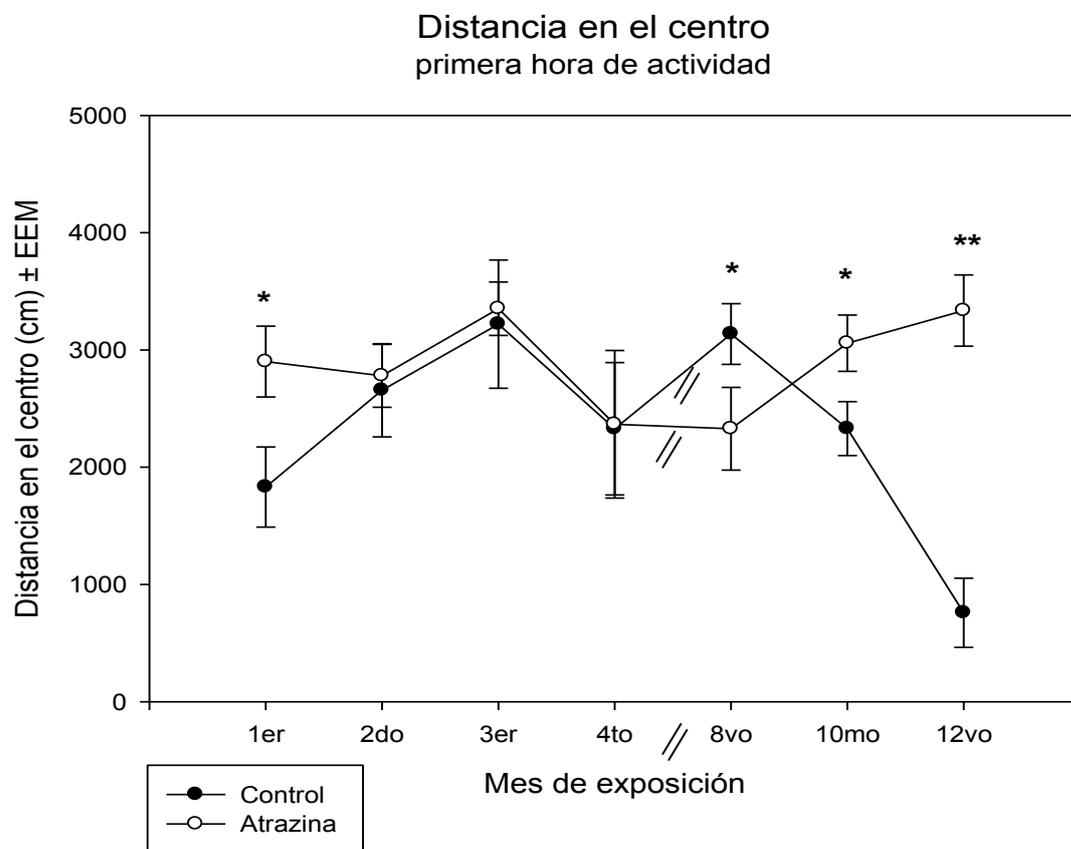


Figura 7. Distancia recorrida en el centro de la caja durante la primera hora del periodo de registro de la actividad locomotora espontánea en animales control y expuestos a 10 mg ATR/kg (vía oral) a lo largo de 12 meses de exposición. Cada punto de la grafica representa el promedio del grupo (\pm EEM). *diferente al control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre la actividad espontánea durante 24 horas

Para valorar el efecto de la ATR en la actividad locomotora espontánea a través de los 12 meses de exposición, se utilizaron 11 parámetros obtenidos mediante el sistema de registro automatizado. Tanto el grupo tratado como el control fueron registrados durante 24 horas, lo que representa 12 horas del ciclo de oscuridad y 12 horas del ciclo de luz. La evaluación de la actividad locomotora partió analizando cada parámetro durante las 24 horas mes con mes, lo cual es representado por el ANDEVA global. En la Tabla 1 se listan los resultados del análisis de las 24 horas para el octavo, décimo y décimo segundo mes de exposición. Se omiten los meses anteriores al no mostrar efectos significativos.

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

En la Figura 8 se muestran las diferencias en la actividad horizontal entre el grupo tratado con respecto al control durante el ciclo de luz- oscuridad, registrada durante el décimo segundo mes. Se encontró un efecto significativo de grupo [F (1,16)= 13.71, $p < 0.05$], tiempo [F (1,16)= 8.46, $p < 0.001$] e interacción entre factores [F (1,16)= 7.66, $p < 0.05$]. Es decir los animales presentan mayor actividad locomotora durante el periodo de oscuridad como habría de esperarse. Ahora bien tomando únicamente el registro de la fase de luz o el periodo inactivo de las ratas (12 horas), los resultados muestran que la exposición a 10 mg ATR/kg altera este ciclo a partir del octavo mes de exposición [F (1,16)= 7.66, $p < 0.05$]. En el décimo mes se encontró sólo un efecto de interacción: [F (1,16)= 1.63 $p < 0.05$]. Para el décimo segundo mes de exposición sólo el efecto de grupo fue significativo, mostrando el grupo tratado un aumento en la actividad motora [F(1,16)= 7.63, $p < 0.05$ (Figura 9).

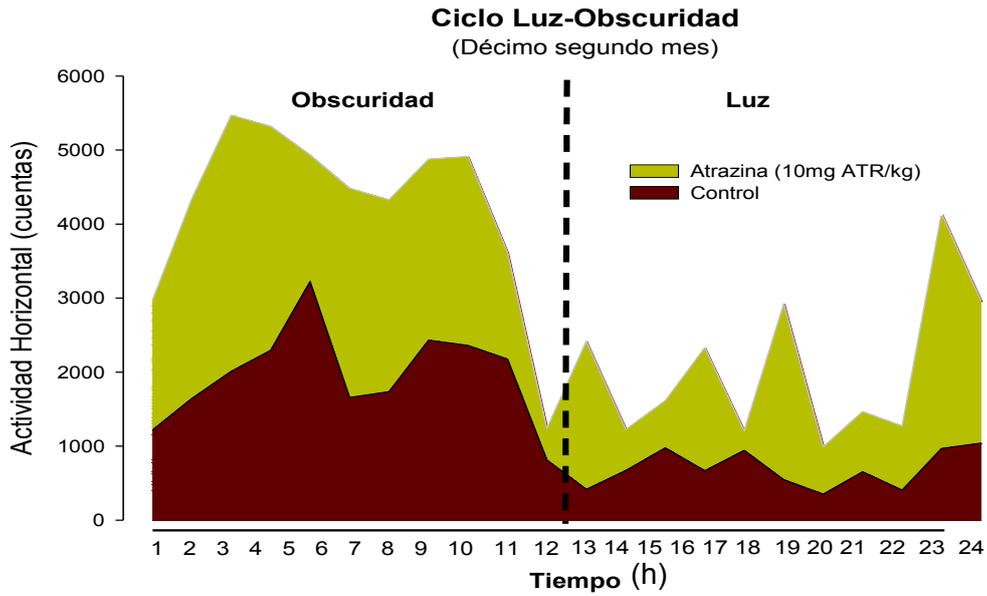


Figura 8. Actividad horizontal durante 24 horas en animales control y expuestos a 10 mg ATR/kg en el décimo segundo mes.

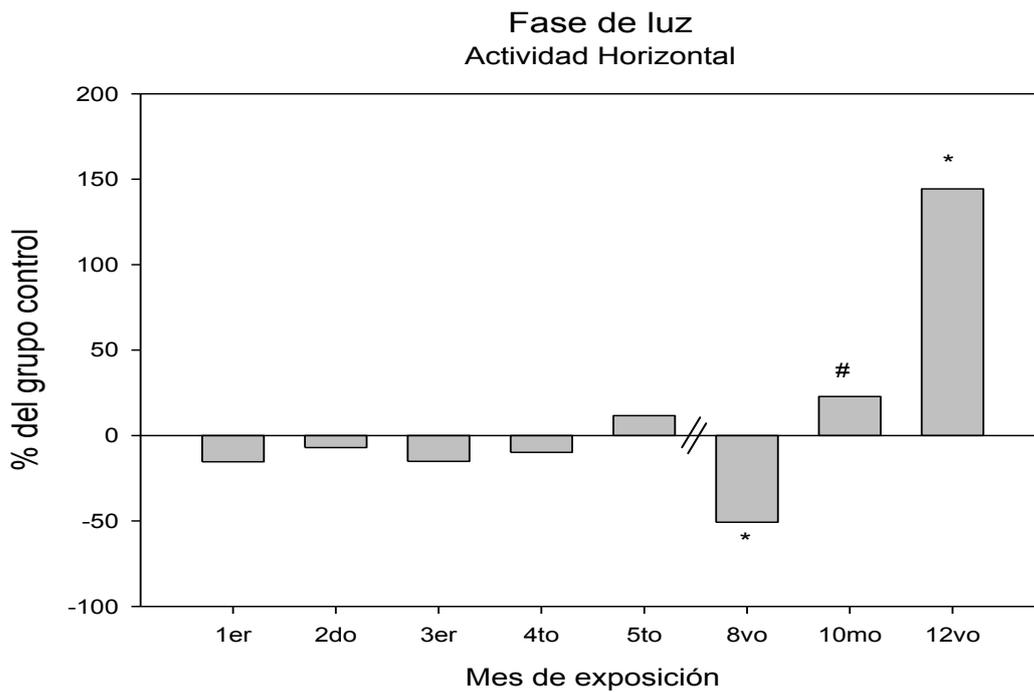


Figura 9. Cambio con respecto al control en la actividad horizontal durante la fase de luz de animales expuestos a 10 mg ATR/kg. *diferente al control, # efecto de interacción entre el grupo y el tiempo. * $p < 0.05$.

Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre la fase de oscuridad: actividad ambulatoria y estereotipias

Posterior a este análisis, se tomaron las 12 horas correspondientes al ciclo de oscuridad para cada mes, esto nos permitió construir las fFiguras 10-11 en donde se muestra el efecto de la exposición a la ATR mes con mes para los parámetros de distancia total como una medida directa de la actividad ambulatoria y las estereotipias. En la distancia total se muestra una disminución en el octavo mes y un aumento en la actividad locomotora en el doceavo. Por otro lado en las estereotipias el aumento en la actividad es consistente en el décimo y doceavo mes.

Se muestra el análisis estadístico solamente para los meses octavo, décimo y décimo segundo mes de exposición en (**Tabla 1**, 12 horas oscuridad, variables DT y CE).

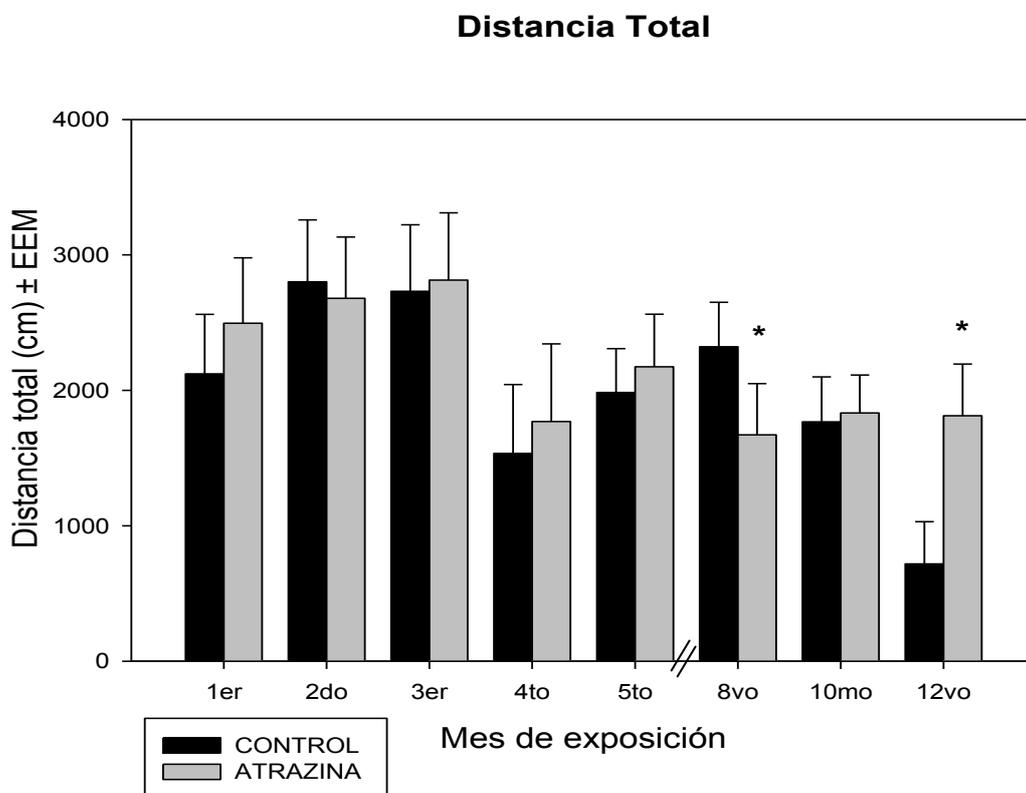


Figura 10. Distancia recorrida durante la fase de oscuridad (12 horas) en animales control y expuestos a 10 mg ATR/kg. Cada barra de la gráfica representa el promedio del grupo en un mes de exposición para la variable cuantificada. *diferente al control $p < 0.05$.

Estereotipias

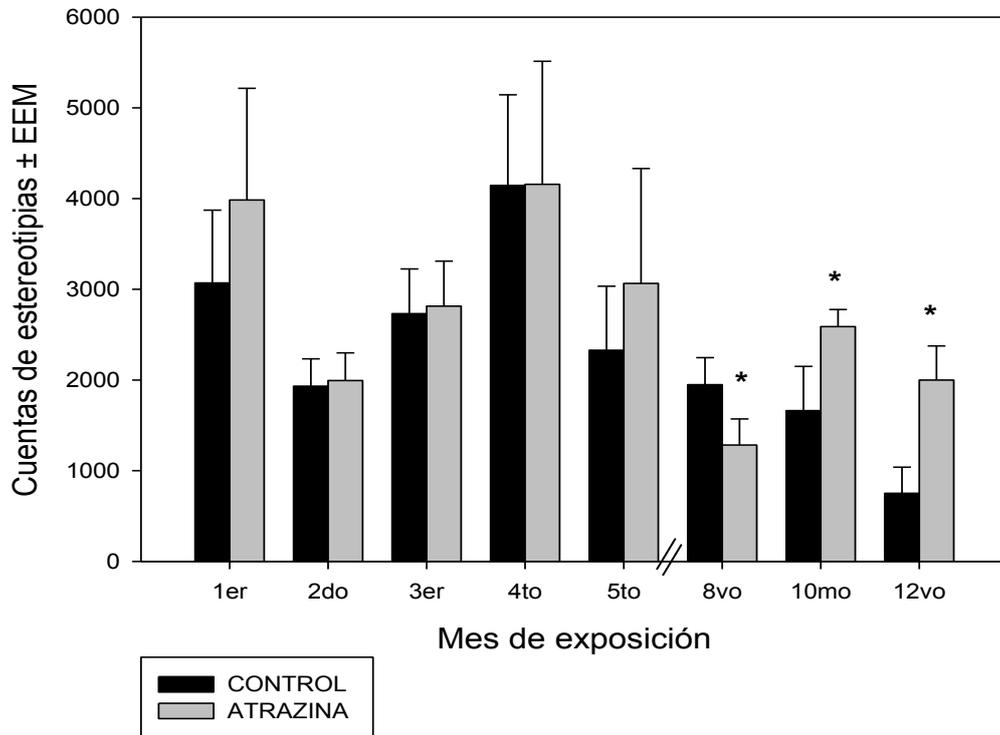


Figura 11. Actividad estereotipada durante la fase de obscuridad (12 horas) en animales control y expuestos a 10 mg ATR/kg. Cada barra de la gráfica representa el promedio del grupo en un mes de exposición para la variable cuantificada. *diferente al control, $p < 0.05$.

Tabla 1. Resumen de los valores de F para el análisis global (24 horas) y fase de obscuridad (12 horas) del registro de la actividad locomotora espontánea en el octavo, décimo y décimo segundo mes de exposición.

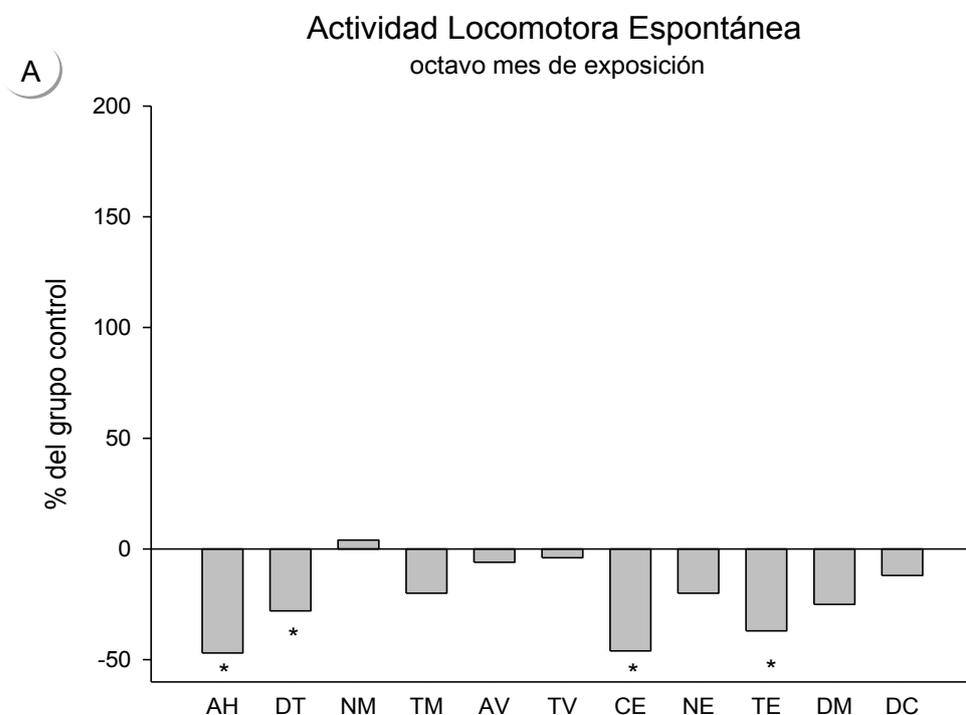
TABLA DE F's										
24 horas (global)										
Octavo mes	AH	DT	NM	TM	AV	CE	NE	TE	DM	DC
Grupo	(1,16)= 5.8*	(1,16)=4.4*	(1,16)=4.1	(1,16)=2.9	(1,16)=0.20	(1,16)=4.7*	(1,16)=1.451	(1,16)= 10.6*	(1,16)= 2.5	(1,16)= 1.2
Tiempo	(23,16)=20.5*	(23,16)=20.32*	(23,16)=30.6*	(23,16)=20.22*	(23,16)=25.8*	(23,16)=11.4*	(23,16)=21.32*	(23,16)=12.1*	(23,16)=17.14*	(23,16) =17.91*
Interacción	(23,368)=1.4	(23,368)=1.08	(23,368)=0.85	(23,368)=0.52	(23,368)=0.64	(23,368)=1.1	(23,368)=1.18	(23,368)=1.5	(23,368)=1.08	(23,368)=0.51
12 horas (obscuridad)										
Grupo	(1,16)=4.6	(1,16)= 4.3~	(1,16)=0.23	(1,16)=1.6	(1,16)=0.18	(1,16)=4.7*	(1,16)=1.2	(1,16)= 6.5	(1,16)= 2.5	(1,16)= 1.5
Tiempo	(11,16)=13.72*	(11,16)=9.6*	(11,16)=21.5*	(11,16)=15.5*	(11,16)=18.5*	(11,16)=9.6*	(11,16)=17.5*	(11,16)=11.83*	(11,16)=20.5*	(11,16)=10.97*
Interacción	(11,176)=1.5	(11,176)=1.1	(11,176)=1.0	(11,176)=0.40	(11,176)=0.90	(11,176)=1.5	(11,176)=1.1	(11,176)= 2.8 *	(11,176)=1.4	(11,176)=0.51
TABLA DE F's										
24 horas (global)										
Décimo mes	AH	DT	NM	TM	AV	CE	NE	TE	DM	DC
Grupo	(1,16)= 4.1*	(1,16)=.0004	(1,16)=1.1	(1,16)=.79	(1,16)=0.51	(1,16)=3.8 ~	(1,16)=9.4*	(1,16)= 6.4*	(1,16)=.01	(1,16)= 1.6
Tiempo	(23,16)=33.5*	(23,16)=27.32*	(23,16)=20.6*	(23,16)=10.22*	(23,16)=29.8*	(23,16)=11.4*	(23,16)=25.32*	(23,16)=16.2*	(23,16)=12.14*	(23,16) =3.6*
Interacción	(23,368)=1.9*	(23,368)=.77	(23,368)=0.56	(23,368)=0.22	(23,368)=0.39	(23,368)=2.02*	(23,368)=2.2*	(23,368)=2.02*	(23,368)=0.42	(23,368)=1.3
12 horas (obscuridad)										
Grupo	(1,16)=4.5	(1,16)=0.39~	(1,16)=1.23	(1,16)=1.6	(1,16)=2.8	(1,16)=4.6*	(1,16)=10.3*	(1,16)= 8.7	(1,16)= 1.5	(1,16)= .71
Tiempo	(11,16)=24.38*	(11,16)=17.98*	(11,16)=11.5*	(11,16)=15.5*	(11,16)=13.1*	(11,16)=13.6*	(11,16)=20.3*	(11,16)=13.43*	(11,16)=20.5*	(11,16)=2.2*
Interacción	(11,176)=1.3	(11,176)=.48	(11,176)=1.3	(11,176)=0.40	(11,176)=0.68	(11,176)=1.8*	(11,176)=1.8*	(11,176)= 1.7 ~	(11,176)=1.4	(11,176)=1.1
TABLA DE F's										
24 horas (global)										
Décimo segundo mes	AH	DT	NM	TM	AV	CE	NE	TE	DM	DC
Grupo	(1,16)= 13.6*	(1,16)=10.5*	(1,16)=10.4*	(1,16)=10.98*	(1,16)=0.78	(1,16)=11.1*	(1,16)=20.6*	(1,16)= 21.0*	(1,16)=.003	(1,16)= 10.2*
Tiempo	(23,16)=8.1*	(23,16)=10.3*	(23,16)=13.0*	(23,16)=10.12*	(23,16)=19.8*	(23,16)=8.4*	(23,16)=13.02*	(23,16)=5.9*	(23,16)=7.7*	(23,16) =9.4*
Interacción	(23,368)=1.5*	(23,368)=2.1*	(23,368)=1.8*	(23,368)=2.1*	(23,368)=0.89	(23,368)=1.5*	(23,368)=2.6*	(23,368)=1.7*	(23,368)=0.33	(23,368)=2.1*
12 horas (obscuridad)										
Grupo	(1,16)=13.6	(1,16)=9.45*	(1,16)=8.5*	(1,16)=9.98*	(1,16)=0.12	(1,16)=14.2*	(1,16)=22.3*	(1,16)=23.5*	(1,16)= 1.5	(1,16)= 9.8*
Tiempo	(11,16)=5.7*	(11,16)=5.08*	(11,16)=6.8*	(11,16)=5.96*	(11,16)=5.8*	(11,16)=3.8*	(11,16)=6.0*	(11,16)=6.0*	(11,16)=5.5*	(11,16)=4.6*
Interacción	(11,176)=1.0	(11,176)=1.02	(11,176)=1.1	(11,176)=1.2	(11,176)=0.45	(11,176)=.97	(11,176)=2.2*	(11,176)= 2.1*	(11,176)=1.3	(11,176)=1.1

Abreviaciones. AH, actividad horizontal; DT, distancia total; NM, numero de movimientos; TM, tiempo en movimiento; AV, actividad vertical; TV, tiempo vertical; CE, cuentas de estereotipias; NE, numero de estereotipias; TE, tiempo en estereotipias; DM, distancia en el margen; DC, distancia en el centro.

* $p < 0.05$ ~ en el límite de la significancia establecida $p < 0.06$

Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre el perfil de actividad locomotora espontánea durante la fase de oscuridad

Como se muestra en los resultados anteriores, la actividad locomotora espontánea se modificó a partir del octavo mes y hasta el décimo segundo mes de exposición. Por lo anterior, se decidió evaluar el efecto de la exposición a 10 mg ATR/kg sobre múltiples parámetros de la actividad locomotora espontánea; para ello se tomaron los últimos tres registros y se analizaron once parámetros registrados por el sistema automatizado de registro durante la fase de oscuridad. Los resultados del análisis de cada parámetro para el mes octavo, décimo y décimo segundo se muestran en la Tabla 1. Para el octavo mes de exposición (Figura 12-A) se observó una disminución en múltiples variables de la actividad motora. En contraste al décimo mes de exposición (Figura 12-B), el grupo tratado con ATR mostró un aumento significativo en AH, CE y TE. Finalmente, para el décimo segundo mes de exposición, el aumento se presenta de nuevo en las mismas variables, aunado a un incremento en parámetros que no se vieron alterados con anterioridad.



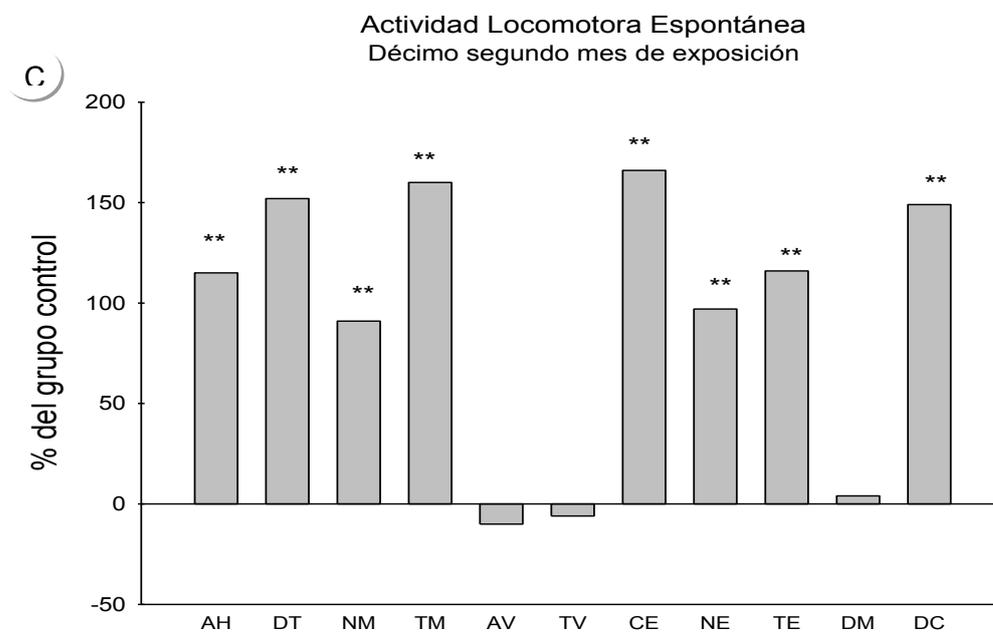
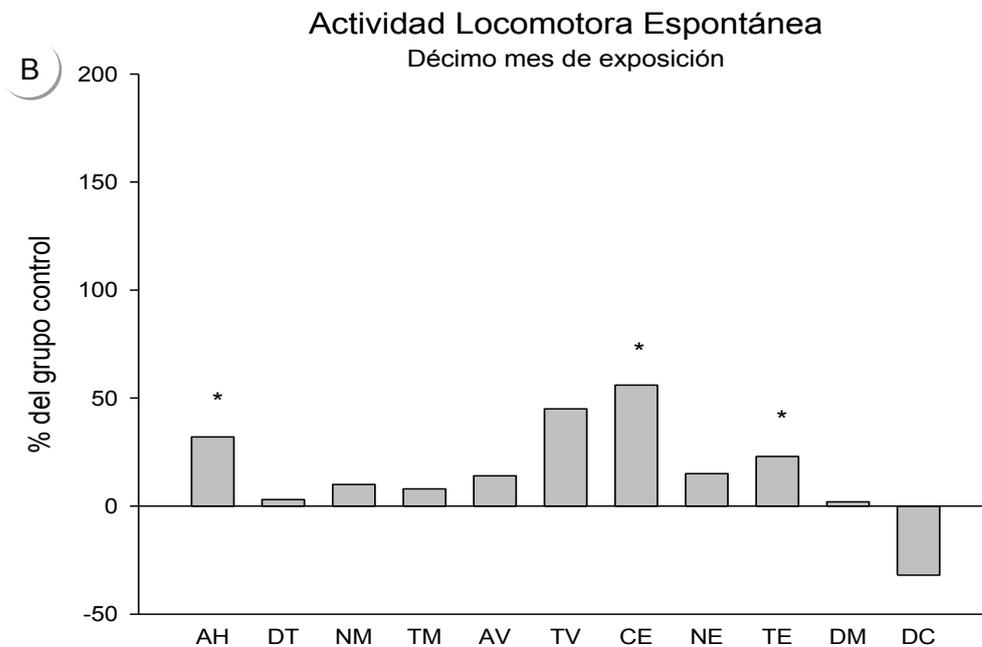


Figura 12. Porcentaje de cambio en la actividad locomotora espontánea durante la fase de obscuridad en animales expuestos a 10 mg ATR/kg, con respecto a los animales control. Se presentan diversos parámetros de actividad locomotora espontánea, registrados en el octavo (A); décimo (B); y décimo segundo mes de exposición (C). * diferente del control $p < 0.05$, ** diferente del control $p < 0.005$. Abreviaciones. AH, actividad horizontal; DT, distancia total; NM, número de movimientos; TM, tiempo en movimiento; AV, actividad vertical; TV, tiempo vertical; CE, cuentas de estereotipias; NE, número de estereotipias; TE, tiempo en estereotipias; DM, distancia en el margen; DC, distancia en el centro.

EVALUACION DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A LA ATRAZINA SOBRE LA COORDINACIÓN MOTORA

En la evaluación de la coordinación motora registrada a los 10 meses de exposición en un paradigma de aceleración, se encontró que el grupo tratado con 10 mg ATR tuvo una latencia de caída significativamente menor con respecto al grupo control [F (1,12)= 4.84 p<0.05] a lo largo de tres sesiones vespertinas. Un análisis post hoc con LSD de Fisher reveló un efecto significativo entre los ensayos.

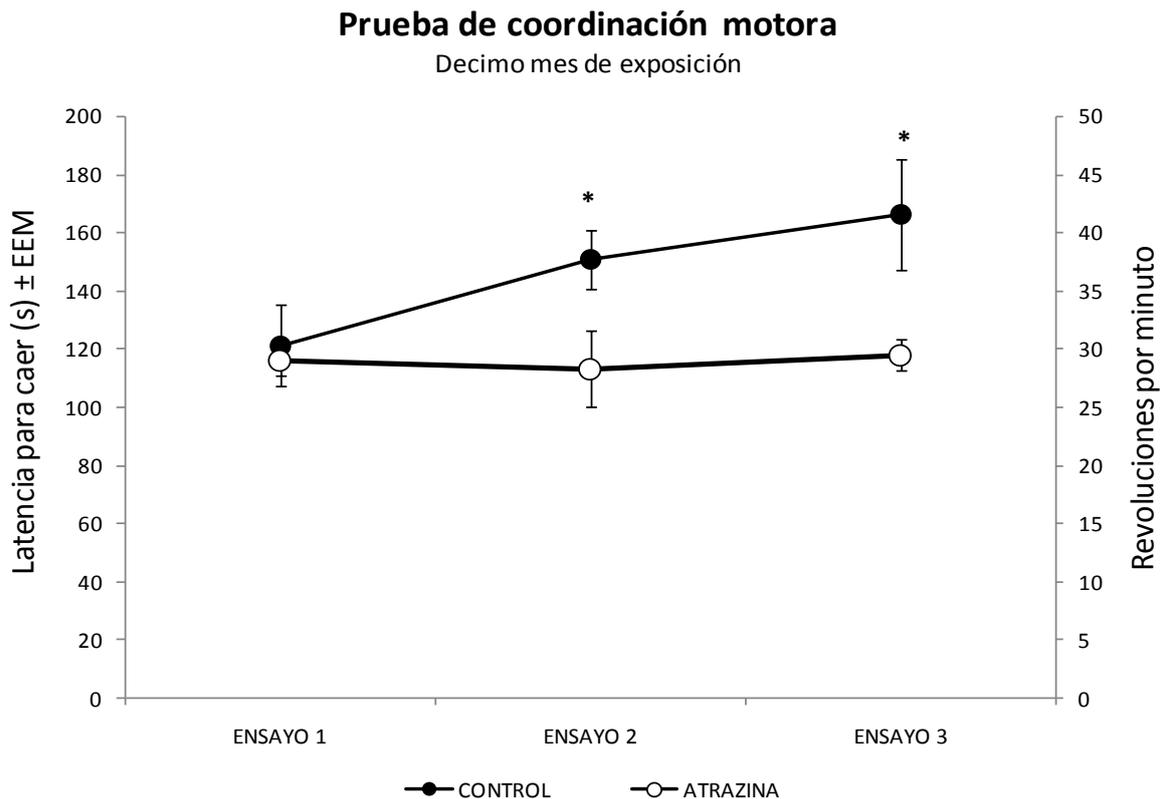


Figura 13. Tiempo de permanencia en el cilindro en tres ensayos consecutivos. La exposición a 10 mg de ATR/kg peso previno el incremento en el tiempo de permanencia que se observó en el grupo control. Cada símbolo representa el promedio de latencia y las revoluciones por minuto. * Diferente del control $p < 0.05$.

Al día siguiente del último ensayo de la prueba de coordinación motora se realizó una evaluación neurológica en la que no se detectaron alteraciones gruesas en el sistema sensorial o motor en los animales tratados con atrazina.

EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A LA ATRAZINA SOBRE TAREAS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA.

Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre tareas de aprendizaje de tipo egocéntrico.

Con respecto a las tareas de aprendizaje y memoria, se evaluó *el aprendizaje egocéntrico* con el uso del laberinto en T a través de la variante *alternancia retardada*, durante cinco ensayos consecutivos, uno cada día a la misma hora (12 horas). En todos los ensayos el experimentador permaneció ciego al tratamiento recibido por el animal. No se encontraron efectos significativos de grupo en el número de errores. Ambos grupos cometieron un número similar de errores y realizaron la prueba con la misma eficacia. Solamente fue significativa la disminución de errores a través de los días de prueba [$F(4,52) = 8.2$ $p < 0.05$].

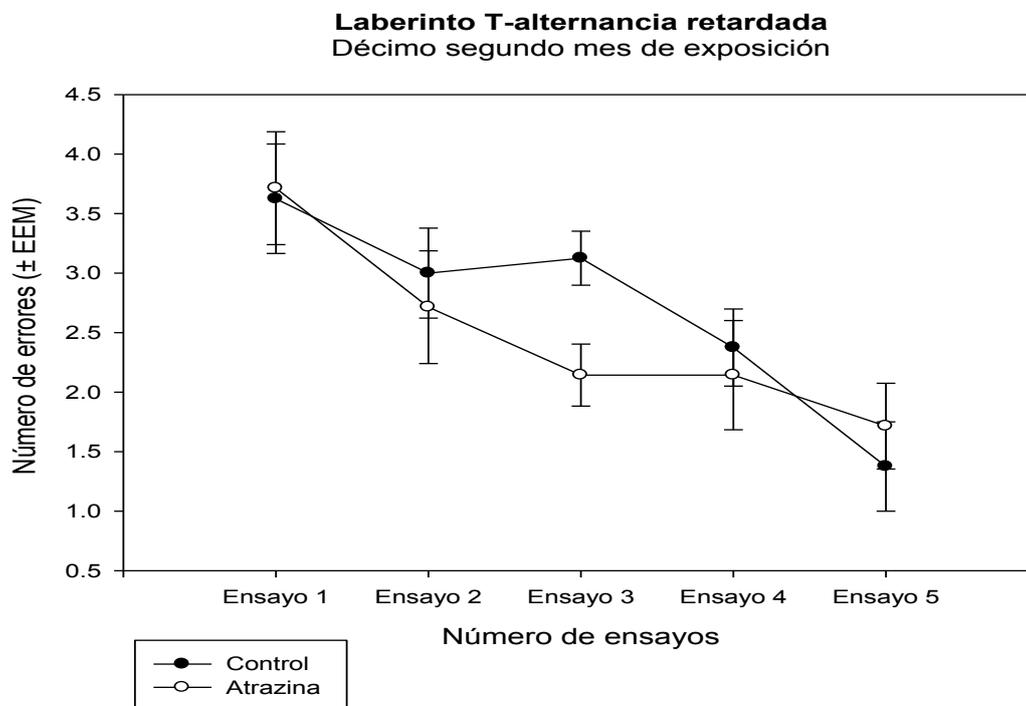


Figura 14. Promedio de los errores \pm EEM para la tarea de alternancia retardada evaluada durante 5 días consecutivos. La exposición a 10 mg de ATR/kg no alteró el número de errores en comparación con el grupo control. $p > 0.05$. Obsérvese cómo disminuyó en ambos grupos el número de errores a través de los ensayos.

Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre tareas de aprendizaje espacial

Para valorar el efecto de la exposición a la ATR sobre la integridad de la vía mesolímbica se utilizaron pruebas de aprendizaje y de memoria espacial, las cuales

fueron evaluadas con el uso del laberinto radial a través de los paradigmas *gana y cambia con y sin retardo*, durante tres ensayos consecutivos, uno cada día a la misma hora (12 horas). En todos los ensayos el experimentador fue ciego al tratamiento. Los resultados no mostraron un efecto significativo de grupo en cuanto a la ejecución de la prueba, es decir ambos grupos mostraron un promedio de error similar. Sólo se encontró efecto significativo en la disminución de los errores con respecto a los días de entrenamiento (Figura 15) [F (2,32)= 3.3 $p < 0.05$] para la tarea *gana y cambia*; y para la variante *gana y cambia con retardo* [F (4,64)= 2.93 $p < 0.05$] (datos no mostrados).

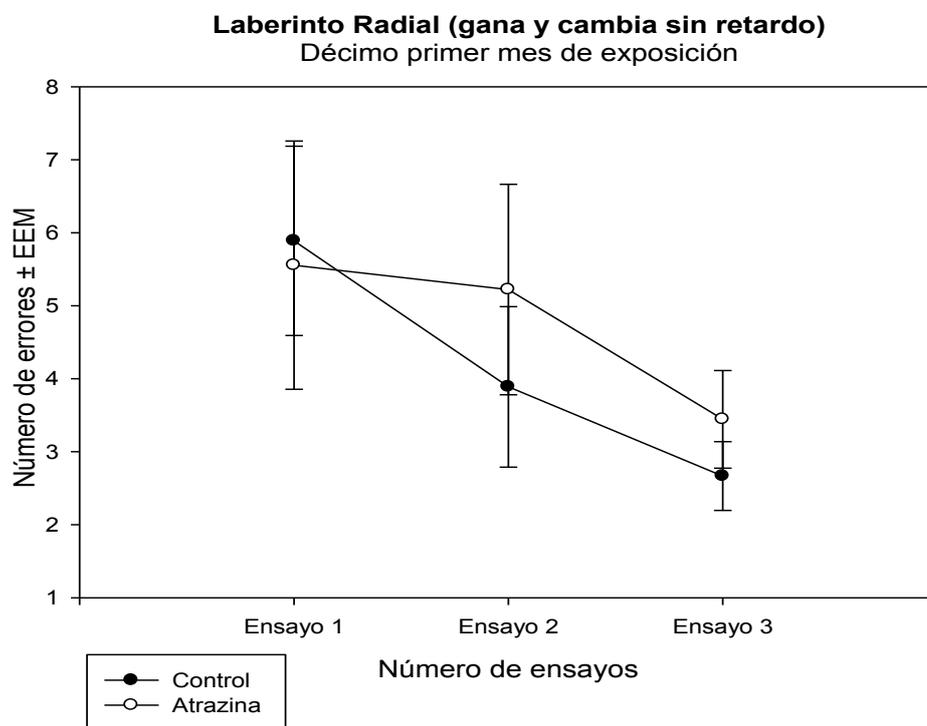


Figura 3. Promedio de errores \pm EEM para la tarea de laberinto radial variante gana y cambia sin retardo, evaluada durante 3 días consecutivos. La exposición a 10 mg de ATR/kg peso no alteró el número de errores en comparación con el grupo control. Obsérvese cómo disminuyó en ambos grupos el número de errores a través de los ensayos.

DETERMINACIÓN DE MONOAMINAS

Al concluir los 12 meses de exposición a 10 mg ATR/kg, se determinó la concentración de monoaminas en el estriado y el núcleo accumbens (Tabla 2) con el fin relacionar los cambios conductuales observados con posibles alteraciones neuroquímicas. En el estriado se observó disminución significativa en el contenido de dopamina con respecto al control [F (1,16) = 5.1, $p \leq 0.05$] mientras que para DOPAC, 5-HIAA y 5-HT no hubo alteraciones en el grupo tratado [F's (1,16)= .043-.067 $p > 0.05$]. En contraste, el análisis del contenido de monoaminas en núcleo accumbens no mostró ningún efecto significativo sobre el contenido de monoaminas entre el grupo tratado con 10 mg ATR/kg y el grupo control [F's (1,16)= .011-1.02 $p > 0.05$]. Finalmente, no se observó en ninguna región cerebral, diferencias significativas en el recambio DOPAC/DA [F's (1,11-1,16) .009-327 $p > 0.05$].

Tabla 2. Concentración de monoaminas y sus metabolitos (ng/mg proteína) en el estriado y núcleo accumbens de ratas expuestas a 10 mg ATR/kg vía oral durante 12 meses.

<i>Estriado</i>					
	DOPAC	DA	5-HIAA	5-HT	DOPAC/DA
Control	11.01 ± 1.43	181.6 ± 24.53	3.8 ± .261	22.8 ± 3.6	.063 ± .006
Atrazina	9.83 ± 1.54	118.9 ± .12.23 *	4.03 ± .479	27.84 ± 4.8	.089 ± .017
<i>Núcleo accumbens</i>					
Control	9.74 ± 2.13	58.23 ± 11.91	6.12 ± .521	67.06 ± 8.17	.185 ± 0.29
Atrazina	9.63 ± 2.14	50.72 ± 10.08	5.3 ± .564	60.15 ± 7.07	.226 ± .088

Los valores representan la media de los valores absolutos en (ng/mg proteína) en cada grupo ± EEM (n=6-9). * $p < 0.05$ diferente del grupo control.

Abreviaciones. **DOPAC**, ácido dihidroxifenilacético; **DA**, dopamina; **5-HIAA**, ácido 5-hidroxiindoleacético; **5-HT**, serotonina.

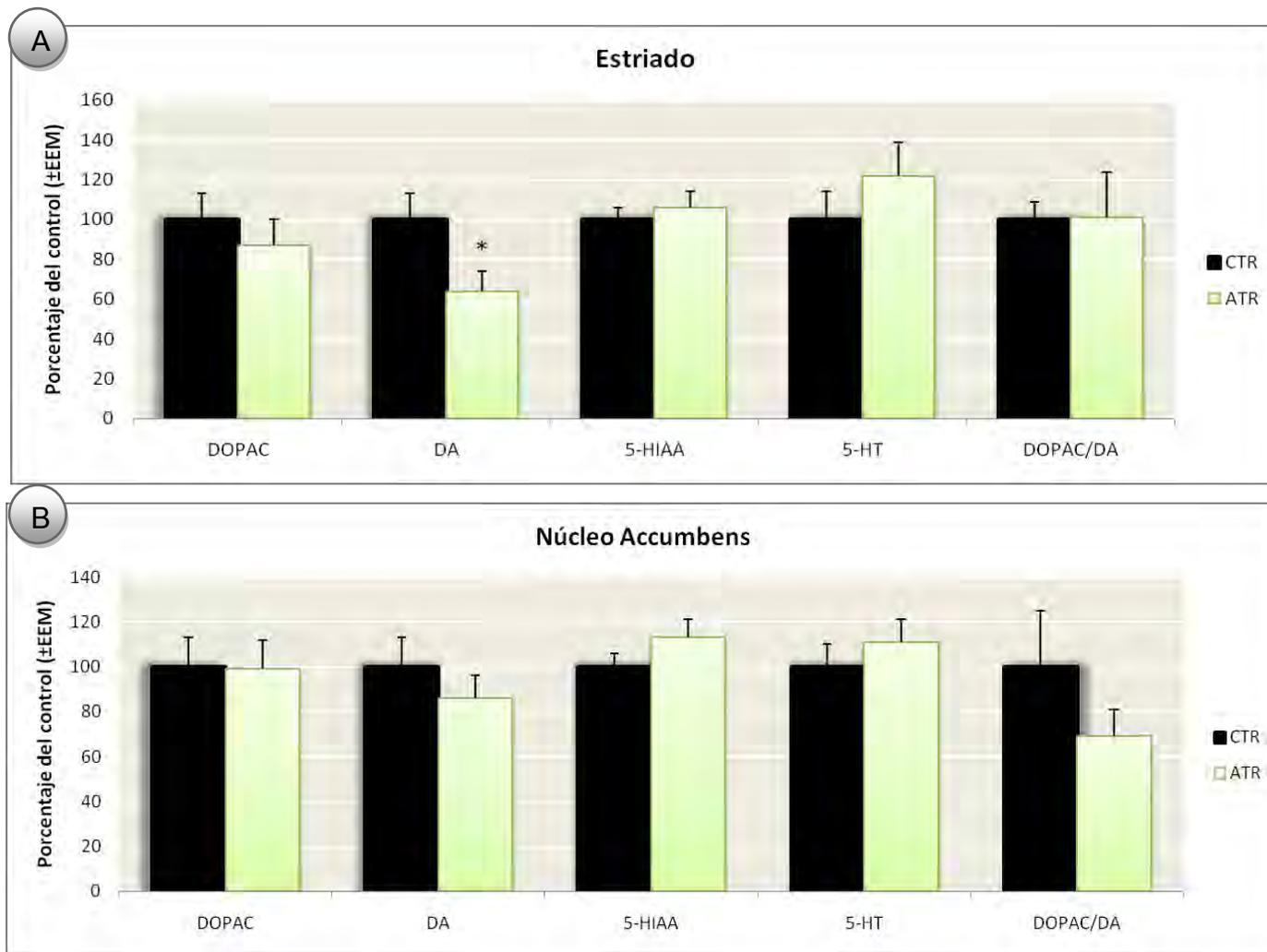


Figura 4. Contenido de monoaminas en estradiol y núcleo accumbens de ratas expuestas a 10 mg de ATR/kg por 12 meses. Cada barra representa el promedio del grupo en porcentaje respecto al control \pm EEM. **Los asteriscos indican diferencia con respecto al control * $p < 0.05$.** (n=6-9). **Abreviaciones, DOPAC, ácido dihidroxifenilacético; DA, dopamina; 5-HIAA, ácido 5-hidroxiindoleacético; 5-HT, serotonina.**

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

PESO CORPORAL

La administración de ATR no causó alteraciones en la ganancia de peso, una vez alcanzados los 300 gramos de peso tanto el grupo control como el tratado se sometieron a restricción de alimento para mantenerlos en ese peso durante los 12 meses de la exposición. Estos resultados se correlacionan con estudios previos que indican que la exposición a 10 mg ATR/kg peso, no causa alteraciones sobre el peso de los roedores (Rodríguez *et al.*, 2005).

Dado que los grupos estuvieron sometidos a privación de alimento a partir del destete y durante todo el experimento, el efecto de la exposición a 10 mg de ATR/kg sobre el peso del animal con una alimentación *ad libitum* no fue evaluada en este estudio. Sin embargo, (Eldridge *et al.*, 1999a) observaron una disminución del 11.4% en el peso de ratas Sprague-Dawley tratadas vía intragástrica por 6 semanas con dosis de 40 mg/kg, por lo que no se puede descartar que la exposición a 10 mg de ATR/kg cause alteraciones sobre el peso corporal de los roedores.

ACTIVIDAD LOCOMOTORA ESPONTÁNEA

La actividad motora es un paradigma conductual al que se recurre frecuentemente en los estudios neurotoxicológicos (Niesink *et al.*, 1998). El estudio de la activación locomotora en roedores, tiene la ventaja inherente de no demandar un entrenamiento exhaustivo como se requiere para otras tareas conductuales; además funge como un filtro inicial antes de la evaluación toxicológica de una conducta compleja (Pierce & Kalivas, 2007). Es evidente que la magnitud de una tarea como la motora, involucra el uso de múltiples circuitos

neuronales distribuidos a diferentes niveles del sistema nervioso central y periférico. Empero, existen regiones bien conocidas en el encéfalo a las cuales se les atribuye un papel específico dentro de la conducta motora. Por ejemplo, el estriado dorsal regula la planeación e iniciación de los movimientos voluntarios, tales como los observados durante la actividad locomotora espontánea. Sin embargo, tal acción es ineficaz sin la participación de la vía nigroestriatal modulando la actividad de las aferencias corticales glutamatérgicas en el estriado (Surmeier, 2007). Ahora bien, numerosos estudios han demostrado la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriada ante el insulto de drogas (Langston & Ballard, 1984; Langston *et al.*, 1984), metales pesados (Bardullas *et al.*, 2008; Mejía *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2001) y pesticidas (Betarbet *et al.*, 2000; Thiruchelvam *et al.*, 2000a), por lo que en el marco de este contexto resulta de suma importancia la evaluación de la actividad motora en ratas expuestas al herbicida ATR, como parte de una evaluación de la integridad de la vía nigroestriatal.

Uno de los primeros reportes que demuestran alteraciones en la actividad locomotora después de la exposición a ATR, fue llevado a cabo por Ugazio *et al.*, en 1991, quien observó que al administrar una dosis subaguda de 1 g ATR/kg durante 4 días y colocar a la rata inmediatamente después en un campo abierto, el grupo expuesto reducía drásticamente su actividad motora (Ugazio *et al.*, 1991). Sin embargo, este efecto podría corresponder a un estado de malestar generalizado ante una dosis extrema, más que a una alteración conductual por efecto neurotóxico de la ATR. Por ejemplo, en estudios llevados a cabo en este laboratorio hemos observado que la administración aguda de 100 mg ATR/kg vía intraperitoneal en la rata, induce un estado profundo de hipoactividad en el roedor del cual se recupera horas después, lo cual es similar a lo observado por Ugazio *et al.*

Usando dosis menores (10 mg/kg peso) del herbicida durante un periodo prolongado encontramos de manera semejante a lo observado por otros autores que la actividad locomotora espontánea es una conducta susceptible a ser

alterada por exposición a la ATR. Sin embargo el efecto no es inmediato, ya que durante los primeros 7 meses no se encontraron cambios en la actividad locomotora espontánea en los animales expuestos. Con respecto al octavo mes de exposición los resultados muestran una visible disminución en la actividad locomotora espontánea en el grupo tratado con 10 mg ATR/kg, tanto para la distancia total recorrida (Figura 10) como para el número de estereotipias (Figura 11), las cuales, posteriormente, durante el mes 10 y 12 de exposición se incrementan. Ahora bien, un punto central para validar que las observaciones sobre el grupo tratado con ATR es analizar el proceso de habituación de los animales ante la prueba; se espera que los animales control disminuyan a través del tiempo la respuesta ante un ambiente novedoso (Pollard & Howard, 1996). En la Figura 6 se muestra cómo los animales control disminuyen su actividad horizontal a través del tiempo, en respuesta a la habituación a la caja de registro. En contraste, el grupo tratado con 10 mg ATR/kg incrementa su actividad durante los dos últimos registros coincidiendo con el periodo donde se reportan las alteraciones para otras variables.

Partiendo de los datos anteriores, se realizó un análisis más detallado sobre los meses que mostraron consistentemente un efecto en la actividad locomotora por la exposición a la ATR. El análisis mostró alteraciones en múltiples parámetros de la actividad locomotora. En el último mes de exposición (Figura 12-C), se encontró un cambio significativo respecto al control en los parámetros evaluados. Esto indica que el efecto de la exposición crónica a la ATR es dependiente del tiempo de exposición, puesto que antes del último mes de exposición las alteraciones mostradas por los roedores tratados fueron sutiles o nulas.

En los tres últimos registros las alteraciones en la actividad motora se presentan a través de todo el ciclo vigilia/sueño (Figura 9), sugiriendo que también hay alteraciones en la fase de luz. Dado que los roedores son animales nocturnos, presentan una mayor actividad promedio durante la fase oscura y se esperaba que fuera principalmente durante esta fase que se presentaran las alteraciones motoras, debido a que en la fase de luz los animales más bien están descansando

y se mueven poco. Sin embargo, se encuentra que también durante la luz, los animales expuestos presentan periodos de actividad incrementada. En este momento no es posible discernir si esta hiperactividad es el resultado de alteraciones en el ciclo vigilia-sueño como resultado de un efecto directo sobre los circuitos que regulan los ciclos circadianos o bien de alteraciones en el control del movimiento.

Por otro lado, las estereotipias se definen como patrones de movimiento topológicamente invariantes, repetitivos y sin motivo aparente (Ridley, 1994), y han sido ampliamente estudiadas como un modelo de conductas relacionadas con el trastorno obsesivo-compulsivo. Varias líneas de investigación apoyan la idea que la actividad estereotipada se produce a través de la actividad neuronal del circuito cortico-estriado-cortical, en donde se ha demostrado la importancia de la vía nigroestriatal para inducir o inhibir las conductas estereotipadas a través de la manipulación farmacológica (Presti *et al.*, 2003). Los estudios indican que la vía nigroestriatal modula esta conducta, ya que la administración de agonistas opioides en la SNpc produce una intensa actividad estereotipada, posiblemente por la desinhibición de las proyecciones dopaminérgicas nigroestriatales (Iwamoto & Way, 1977). En este sentido, el presente estudio es el primero en reportar un efecto sobre la actividad estereotipada como indicador de la integridad del sistema nigroestriatal. Notablemente estos resultados muestran a las estereotipias como una de las variables más afectadas por la exposición a la ATR. En las Figuras 12-B y C se observa un marcado incremento en el número de las estereotipias en el grupo tratado con 10 mg ATR/kg en los dos últimos registros (50% y 160%, respectivamente). Esto sugiere, que la exposición crónica a ATR es capaz de producir otro tipo de alteraciones conductuales distintas a la actividad ambulatoria, las cuales están directamente relacionadas con la modulación que ejerce la vía nigroestriatal sobre el estriado.

Comparativamente a estos resultados, Rodríguez *et al.*, (2005) evaluaron el efecto de la exposición a la ATR a una dosis semejante a la utilizada por este

estudio durante 6 meses en ratas Long-Evans, y reportan un incremento en la actividad locomotora espontánea a partir del tercer mes de exposición. Sin embargo, en nuestro estudio, esta conducta es observada sólo a partir del décimo mes de exposición. En principio, los dos trabajos difieren de manera importante en dos aspectos:

Primero, en ambos se utilizaron distintas cepas de ratas. Existen numerosos estudios que confirman variaciones especie específicas entre la cepas de ratas utilizadas en este estudio y el de Rodríguez et al., (Gulley, 2007). Un trabajo reciente reportó como las ratas Long-Evans exhibían una mayor hiperactividad respecto a la cepa Sprague-Dawley, ante un reto farmacológico con anfetamina (Swerdlow et al., 2006). Más aun, existen diferencias entre ambas cepas en cuanto a la susceptibilidad a la ATR. Por ejemplo, Narotsky (2000) demostró que la cepa Long-Evans es más sensible a sufrir alteraciones en la hormona luteinizante y prolactina a bajas dosis de ATR (25 mg ATR/kg peso), en comparación con la cepa Sprague-Dawley. Por lo tanto, es plausible pensar que la cepa utilizada en nuestro estudio exhibe una mayor resistencia ante el insulto con la ATR, retardando la aparición de alteraciones sobre la actividad locomotora espontánea.

Segundo, en el estudio de Rodríguez et al., (2005) se utilizó un reto farmacológico con anfetamina, como estrategia experimental para desenmascarar los posibles efectos sobre la actividad motora por exposición a la ATR. En contraste, en este estudio se muestran los cambios en la conducta motora espontánea por exposición a la ATR, la cual posiblemente necesita de un mayor tiempo para ejercer su efecto nocivo. De cualquier forma, es notable cómo ambas aproximaciones experimentales a dosis semejantes producen un mismo efecto conductual, sugiriendo que hasta el momento la dosis mínima necesaria para producir un efecto sobre la actividad ambulatoria es de 10 mg ATR/kg.

Otro aspecto notable a mencionar se refiere a que en el presente trabajo la aparición de los efectos se produce hasta el octavo mes de exposición, para lo cual las ratas tratadas tenían ya 9 meses de edad. En el caso del estudio de

Rodríguez et al. (2005) el tratamiento inicia a partir del noveno mes de edad, y las alteraciones en la actividad locomotora se presentan a partir del segundo mes de exposición lo que corresponde al onceavo mes de edad. En las Figuras 11-B y C podemos observar cómo los individuos tratados en nuestro estudio mostraron un aumento en la actividad horizontal (AH) correspondiente al mes 11 y 12 de edad, similar a lo reportado por Rodríguez. En otras palabras, en ambos estudios el aumento de la actividad locomotora se manifiesta aproximadamente a la misma edad del animal y sólo difiere en la duración de la exposición, sugiriendo que la edad de los individuos puede ser un factor determinante para el inicio de las alteraciones por exposición a la ATR.

Finalmente, el análisis detallado de las variables registradas por el sistema de registro automatizado reveló un importante efecto sobre la distancia recorrida en el centro de la caja para el grupo tratado con 10 mg ATR/kg con respecto al grupo control (Figura 7). Dicha variable es utilizada como una medida directa para evaluar la preferencia del animal por permanecer en el centro la caja, lo cual es inverso a la tigmotaxis o distancia recorrida en el margen de la caja. Se ha observado en numerosas especies, incluido el ser humano, que ante un ambiente novedoso el animal tiende a presentar un cierto grado de miedo y ansiedad. Si un animal es colocado en una superficie abierta con paredes formando esquinas, el animal tenderá a permanecer en el margen evitando el centro de la caja (Kallai et al., 2007; Lamprea et al., 2008). Esta conducta cumple un importante papel ecológico y evolutivo en numerosas especies, pues le permite al organismo partir de una estrategia de exploración espacial segura, evitando la exposición a los depredadores (Jeanson et al., 2003). Sorpresivamente, nuestros resultados muestran que el grupo tratado con 10 mg ATR/kg permanece significativamente mayor tiempo en el centro de la caja durante la primera hora de habituación respecto al grupo control, sugiriendo un menor grado de ansiedad y miedo a explorar el centro de la caja.

Ahora bien, dentro del contexto de este estudio, resulta complejo evaluar el significado de tal conducta, ya que algunos trabajos sugieren la participación de

las vías dopaminérgicas especialmente la mesocortical (Schwartz *et al.*, 1991). Sin embargo la tigmotaxis es una conducta altamente sensible a los efectos de los ansiolíticos, por ello es utilizada comúnmente como un parámetro para el estudio de los trastornos de ansiedad (Treit & Fundytus, 1988) y se reconoce que estos trastornos de etiología compleja, son producto de la alteración de múltiples sistemas neuroquímicos.

En conclusión, estos resultados muestran hasta este punto, que la administración crónica a 10 mg ATR/kg tiene la capacidad de producir importantes alteraciones sobre múltiples aspectos de la actividad locomotora espontánea de la rata. Esta conducta está fuertemente ligada a la regulación por la vía nigroestriatal para un correcto funcionamiento, por lo que su integridad pudo haberse visto comprometida por la exposición al herbicida ATR.

COORDINACIÓN MOTORA

La coordinación motora es un proceso complejo que requiere la interacción de diversas estructuras cerebrales como el cerebelo, ganglios basales, corteza, tálamo entre otras. Frecuentemente, alteraciones sutiles en dichas estructuras se manifiestan en acciones motoras descoordinadas o ineficientes. La prueba del cilindro giratorio (*rotorod*) ha sido ampliamente usada para evaluar el efecto farmacológico (Bennett & Amrick, 1987) y toxicológico (Romano & Landauer, 1986) de diferentes sustancias, sobre la coordinación y el balance de una actividad motora compleja. En el cilindro en movimiento el roedor requiere detectar los cambios de aceleración y realizar los ajustes necesarios para mantener el balance y dar respuesta al cambio. El aumento paulatino en la velocidad va en detrimento de su capacidad precisamente para responder, el cual se vuelve evidente si el roedor presenta alteraciones en las estructuras cerebrales que coordinan dicha acción. Estudios de lesiones sobre SNpc y AVT muestran cómo los organismos son incapaces de mantenerse en el cilindro por un tiempo

mayor que los controles (Whishaw *et al.*, 2003). Se ha visto inclusive que es posible discriminar entre dos tipos de lesiones estriatales gracias a la sensibilidad de la prueba (Monville *et al.*, 2006).

En el grupo expuesto crónicamente a 10 mg ATR/kg peso los animales se mantienen en el cilindro el mismo tiempo a lo largo de las sesiones de prueba no más de 140 segundos, es decir no mejoran su desempeño. En contraste, los animales control van mejorando, por lo que en los ensayos 2 y 3 se encontraron diferencias entre los grupos. Un parámetro clave es la velocidad máxima a la que las ratas tratadas pudieron responder adecuadamente; la mayoría de las veces esta velocidad no superó las 35 rpm. De manera notable, en los resultados se observa como los dos grupos iniciaron con una efectividad similar; sin embargo en ensayos posteriores, el grupo control aumentó considerablemente su desempeño (43 rpm), con respecto al grupo tratado con ATR (30 rpm).

Además de los efectos de la ATR sobre el sistema nervioso central, no se pueden descartar la existencia de alteraciones en el sistema nervioso periférico o en el tejido muscular, las cuales pueden haber afectado la realización de la prueba en las ratas tratadas con ATR. En un reporte previo Castano encontró alteraciones en fibras mielinizadas y amielínicas del nervio ciático de ratas tratadas con 40 mg ATR/ kg por vía intraperitoneal (Castano *et al.*, 1982). Por lo tanto, es necesario realizar más experimentos para descartar un daño periférico por la exposición a 10 mg ATR/kg.

PRUEBAS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA

La habilidad de memorizar la localización del alimento de manera eficiente es una estrategia de supervivencia esencial en los animales. El sustrato neural de esta conducta ha sido extensivamente evaluado en roedores mediante el uso del laberinto radial (Olton & Samuelson, 1976). Contrario a la presente hipótesis de trabajo, la exposición a 10 mg ATR/kg durante 12 meses no causó alteraciones en

las pruebas de aprendizaje y memoria egocéntricas y allocéntricas, evaluadas a través de los laberintos en T y radial, respectivamente. Ahora bien, si consideramos que ambas tareas involucran la participación de la vía mesolímbica (Floresco *et al.*, 1996, 1997), nuestra primera conclusión sería que, bajo las condiciones experimentales de nuestro estudio, la exposición a 10 mg ATR/kg vía oral durante 12 meses en la rata de la cepa Sprague-Dawley no parece producir alteraciones en la vía mesolímbica. La aparente ausencia de efecto sobre esta vía por la exposición de ATR, podría deberse a varias razones: (1) las tareas utilizadas para evaluar el efecto sobre esta vía dopaminérgica no fueron lo suficiente sensibles para desenmascarar un efecto por exposición a la ATR. De hecho un estudio reciente observó cómo sólo la administración de una dosis elevada (500 ng) de un antagonista específico del receptor D1, administrado intracerebralmente en el núcleo accumbens, aumentó el número de errores en una prueba de laberinto radial, mientras que dosis menores del antagonista no tuvieron efecto alguno sobre el desempeño de la prueba (Floresco, 2007). (2) Con respecto al contenido de monoaminas en núcleo accumbens tanto nuestro estudio (Tabla 1) como el de Rodríguez, et al. (2005) sugieren esta posibilidad, ya que en ninguno se encontró que la exposición a 10 mg ATR/kg alterara el contenido de monoaminas para dicha región. Sin embargo es necesario realizar más estudios moleculares y conductuales para determinar si efectivamente las neuronas de la vía mesolímbica, tanto en VTA como en su proyección al núcleo accumbens, presentan una mayor resistencia ante la exposición a la ATR.

DETERMINACIÓN DE MONOAMINAS

Nuestros resultados muestran una disminución significativa en el contenido de dopamina (DA) estriatal, lo cual se correlaciona con lo reportado previamente por Rodríguez et al. (2005), quienes encontraron que a una dosis de 10 mg de ATR/kg administrada por 6 meses, los niveles de dopamina en el estriado disminuyen significativamente en alrededor de un 15%. Adicionalmente, otros

estudios han encontrado una disminución en los niveles de DA, pero sólo después de la administración de dosis elevadas de ATR en ratones (125 mg ATR/kg) (Coban & Filipov, 2007).

Estos resultados demuestran que la vía nigroestriatal es un blanco susceptible al efecto tóxico de la ATR y que este efecto no es dependiente de la cepa o especie de animal utilizada. De la misma manera, estos hallazgos confirman que hasta este momento la dosis mínima efectiva para producir un efecto adverso sobre el contenido de monoaminas es de 10 mg ATR/kg.

Respecto a lo anterior, el incremento en la hiperactividad en los animales tratados aunado a la disminución en el contenido de dopamina estriatal, pudiera estar reflejando la plasticidad del sistema dopaminérgico, especialmente a nivel del receptor. Los receptores de dopamina no son traductores pasivos de la señal transmitida, sino que tienen la capacidad de adaptarse dinámicamente a los niveles del neurotransmisor liberado. Numerosos estudios han observado como la administración de bajas dosis de agonistas dopaminérgicos en animales con lesiones de la vía nigroestriatal exhiben una conducta hiperactiva al incrementar la sensibilidad del receptor por su ligando (Besret *et al.*, 2000; Tarazi *et al.*, 1997). Adicionalmente la densidad de receptores dopaminérgicos en el estriado puede incrementarse como consecuencia de la reducción de los niveles basales de DA, produciendo el aumento en la actividad observada (Browman *et al.*, 1998).

Por otro lado, el análisis en el núcleo accumbens no mostró alteraciones en el contenido de monoaminas, lo cual es similar a lo reportado por otros autores (Rodríguez *et al.*, 2005). Respecto a ello, una posible explicación a la falta de efecto tanto en la neuroquímica como en las conductas asociadas a la regulación de la vía mesolímbica, radica en estudios llevados a cabo desde hace poco más de una década. En ellos se ha observado consistentemente una vulnerabilidad selectiva entre los grupos dopaminérgicos mesencefálicos (Liang *et al.*, 1996). Los reportes señalan que las regiones conformadas por AVT y la hilera dorsal de la SNpc (HDSNpc) son selectivamente más resistentes respecto a la hilera ventral, ante el insulto con MPTP (Ng *et al.*, 1996) o el herbicida paraquat (Shimizu *et al.*,

2003). Esta resistencia podría ser debida a la presencia de calbindina-D28k una proteína capaz de secuestrar calcio y brindar un papel protector ante el estrés oxidante, tanto en AVT como en HDSNpc. Sin embargo, existen reportes que no replican este papel neuroprotector (Airaksinen *et al.*, 1997). Estudios recientes especulan que la combinación de factores, entre ellos la falta de calbindina asociada con una mayor densidad de DAT y VMAT-2 en la neuronas de la hilera ventral, propician el aumento de especies reactivas de oxígeno, lo que genera una mayor vulnerabilidad en este grupo (Kanaan *et al.*, 2008). Por ello, es importante proponer experimentos a futuro, que permitan determinar si efectivamente existe esta vulnerabilidad selectiva en ambas regiones cerebrales por exposición a la ATR.

Es preciso hacer notar, que la determinación de monoaminas en las regiones blanco de las vías dopaminérgicas analizadas en este estudio (estriado y núcleo accumbens) representa sólo un aspecto de la fisiología de este sistema de neurotransmisión que indica solamente el contenido total de estos neurotransmisores. Sin embargo, se desconoce si otros componentes del sistema de neurotransmisión dopaminérgico como son la vesiculación, liberación, recaptura o expresión de receptores estén resultando afectados por la ATR. Algunos estudios en los cuales se administró una dosis alta de ATR, han demostrado alteraciones sobre la liberación (Rodríguez *et al.*, 2005), vesiculación (Hossain & Filipov, 2008) y actividad de la tirosina hidroxilasa (Rodríguez, datos no publicados). Por lo tanto el análisis integral de todo el sistema de neurotransmisión en experimentos posteriores, permitirá establecer una mejor correlación entre la conducta observada y el estado fisiológico del sistema de neurotransmisión.

En conclusión la disminución en el contenido de monoaminas en el cuerpo estriado podría explicar en parte los efectos observados durante los registros de la actividad locomotora espontánea; sin embargo, es posible que existan otras alteraciones en la neuroquímica monoaminérgica que subyacen a estos resultados. En contraste los niveles normales de monoaminas en el núcleo

accumbens podrían correlacionarse con la falta de efectos sobre las pruebas de aprendizaje y memoria observadas en este estudio.

Conclusiones generales del estudio

La ATR es un pesticida polémico. Su alta efectividad y bajo costo para erradicar las principales plagas vegetales en cultivos de amplia distribución como el maíz y sorgo, ha provocado el debate entre los grupos en contra y a favor de la ATR. Uno de los argumentos principales de los grupos que promueven su uso, se basa en el hecho que no existe evidencia definitiva que demuestre su efecto nocivo sobre la salud de los seres humanos por exposición crónica a bajas dosis. Sin embargo, cada día son más los estudios que reportan efectos tóxicos en modelos murinos tales como: (a) diversas anormalidades reproductivas, producto principalmente de la disminución de la hormona luteinizante en ratas hembras (Cooper et al., 1996; Cooper et al., 2000; Narotsky et al., 2001); (b) alteraciones inmunológicas como disminución celular en el timo y bazo, toxicidad sobre células dendríticas y granulocitos (Cimino-Reale et al., 2008; Filipov et al., 2005; Pruett et al., 2003); (c) diversos efectos sobre el sistema nervioso en roedores (Castano *et al.*, 1982; Coban & Filipov, 2007; Podda *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2005).

Apoyando lo anterior, nuestros resultados en este estudio muestran que la administración crónica a una dosis de 10 mg de ATR/kg tiene la capacidad de producir alteraciones en la actividad y coordinación locomotora, dos procesos estrechamente regulados por la vía nigroestriatal (Hikosaka, 1991; Monville *et al.*, 2006). Además estas alteraciones podrían deberse a la disminución en el contenido de monoaminas en el estriado. En contraste, la exposición a la dosis de 10 mg ATR/kg durante 12 meses no tuvo efecto sobre el contenido de monoaminas en la región del núcleo accumbens, lo que podría estar relacionado con la ausencia de alteraciones sobre las pruebas de aprendizaje y memoria, procesos ligados a la modulación por el sistema mesolímbico (Floresco *et al.*, 1997)

Finalmente, este estudio es el primero en reportar importantes efectos por la exposición crónica a 10 mg ATR/kg sobre la tigmotaxis y alteraciones en la actividad locomotora espontánea tanto en la fase de luz como en la de oscuridad. La literatura indica que muchas de estas conductas son el resultado de alteraciones en la neuroquímica monoaminérgica en regiones como el hipotálamo o la corteza prefrontal. No obstante es posible que estas alteraciones se deban a modificaciones de múltiples sistemas neuroquímicos en el cerebro de las ratas expuestas, y no a alteraciones de la regulación dopaminérgica únicamente. Por lo anterior, es claro que es necesario ampliar el estudio de la exposición crónica a la ATR a otros sistemas de neurotransmisión.

BIBLIOGRAFÍA

- Adgate J. L., Barr D. B., Clayton C. A., Eberly L. E., Freeman N. C., Liou P. J., Needham L. L., Pellizzari E. D., Quackenboss J. J., Roy A., Sexton K. (2001) Measurement of children's exposure to pesticides: analysis of urinary metabolite levels in a probability-based sample. *Environ Health Perspect* 109:583-590.
- Airaksinen M. S., Thoenen H., Meyer M. (1997) Vulnerability of midbrain dopaminergic neurons in calbindin-D28k-deficient mice: lack of evidence for a neuroprotective role of endogenous calbindin in MPTP-treated and weaver mice. *Eur J Neurosci* 9:120-127.
- Alavanja M. C., Akland G., Baird D., Blair A., Bond A., Dosemeci M., Kamel F., Lewis R., Lubin J., Lynch C., Et Al. (1994) Cancer and noncancer risk to women in agriculture and pest control: the Agricultural Health Study. *J Occup Med* 36:1247-1250.
- Bakke J. E., Larson J. D., Price C. E. (1972) Metabolism of atrazine and 2-hydroxyatrazine by the rat. *J Agric Food Chem* 20:602-607.
- Barbash J. E., Thelin G. P., Kolpin D. W., Gilliom R. J. (2001) Major herbicides in ground water: results from the National Water-Quality Assessment. *J Environ Qual* 30:831-845.
- Bardullas U., Limon-Pacheco J. H., Giordano M., Carrizales L., Mendoza-Trejo M. S., Rodriguez V. M. (2008) Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*.
- Barr D. B., Panuwet P., Nguyen J. V., Udunka S., Needham L. L. (2007) Assessing exposure to atrazine and its metabolites using biomonitoring. *Environ Health Perspect* 115:1474-1478.
- Bennett D. A., Amrick C. L. (1987) Home cage pretreatment with diazepam: effects on subsequent conflict testing and rotorod assessment. *J Pharmacol Exp Ther* 242:595-599.
- Bentivoglio M., 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.
- Besret L., Page K. J., Dunnett S. B. (2000) The problem of antipsychotic treatment for functional imaging in Huntington's disease: receptor binding, gene expression and locomotor activity after sub-chronic administration and wash-out of haloperidol in the rat. *Brain Res* 853:125-135.
- Betarbet R., Sherer T. B., Mackenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A. V., Greenamyre J. T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3:1301-1306.
- Bjorklund A., Dunnett S. B. (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194-202.

- Boyson S. J., Mcgonigle P., Molinoff P. B. (1986) Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *J Neurosci* 6:3177-3188.
- Browman K. E., Badiani A., Robinson T. E. (1998) Modulatory effect of environmental stimuli on the susceptibility to amphetamine sensitization: a dose-effect study in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 287:1007-1014.
- Carlsson A., Falck B., Hillarp N. A. (1962) Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiol Scand Suppl* 56:1-28.
- Castano P., Ferrario V. F., Vizzotto L. (1982) Sciatic nerve fibers in albino rats after atrazine treatment: a morpho-quantitative study. *Int J Tissue React* 4:269-275.
- Catenacci G., Tringali S., Terzi R. (1997) [Retrospective study of morbidity in a group professionally exposed to chlorotriazine herbicides]. *G Ital Med Lav Ergon* 19:23-25.
- Ciba-Geigy (1987) Disposition of atrazine in rat (general metabolism).
- Cimino-Reale G., Ferrario D., Casati B., Brustio R., Diodovich C., Collotta A., Vahter M., Gribaldo L. (2008) Combined in utero and juvenile exposure of mice to arsenate and atrazine in drinking water modulates gene expression and clonogenicity of myeloid progenitors. *Toxicol Lett* 180:59-66.
- Coban A., Filipov N. M. (2007) Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. *J Neurochem* 100:1177-1187.
- Cooper R. L., Stoker T. E., Goldman J. M., Parrish M. B., Tyrey L. (1996) Effect of atrazine on ovarian function in the rat. *Reprod Toxicol* 10:257-264.
- Cooper R. L., Stoker T. E., Tyrey L., Goldman J. M., Mcelroy W. K. (2000) Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol Sci* 53:297-307.
- Cragg S. J., Rice M. E. (2004) DANCING past the DAT at a DA synapse. *Trends Neurosci* 27:270-277.
- Curwin B. D., Hein M. J., Sanderson W. T., Nishioka M. G., Reynolds S. J., Ward E. M., Alavanja M. C. (2005) Pesticide contamination inside farm and nonfarm homes. *J Occup Environ Hyg* 2:357-367.
- Curwin B. D., Hein M. J., Sanderson W. T., Striley C., Heederik D., Kromhout H., Reynolds S. J., Alavanja M. C. (2007a) Urinary pesticide concentrations among children, mothers and fathers living in farm and non-farm households in Iowa. *Ann Occup Hyg* 51:53-65.
- Curwin B. D., Hein M. J., Sanderson W. T., Striley C., Heederik D., Kromhout H., Reynolds S. J., Alavanja M. C. (2007b) Pesticide dose estimates for children of Iowa farmers and non-farmers. *Environ Res* 105:307-315.
- Dahlstroem A., Fuxe K. (1964) Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*: 232:231-255.
- Das P. C., Mcelroy W. K., Cooper R. L. (2000) Differential modulation of catecholamines by chlorotriazine herbicides in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro. *Toxicol Sci* 56:324-331.

- Das P. C., Mcelroy W. K., Cooper R. L. (2001) Alteration of catecholamines in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro by the metabolites of chlorotriazine herbicide. *Toxicol Sci* 59:127-137.
- Das P. C., Mcelroy W. K., Cooper R. L. (2003) Potential mechanisms responsible for chlorotriazine-induced alterations in catecholamines in pheochromocytoma (PC12) cells. *Life Sci* 73:3123-3138.
- Dunkley P. R., Bobrovskaya L., Graham M. E., Von Nagy-Felsobuki E. I., Dickson P. W. (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem* 91:1025-1043.
- Edmondson D. E., Mattevi A., Binda C., Li M., Hubalek F. (2004) Structure and mechanism of monoamine oxidase. *Curr Med Chem* 11:1983-1993.
- Eldridge J. C., Wetzel L. T., Tyrey L. (1999a) Estrous cycle patterns of Sprague-Dawley rats during acute and chronic atrazine administration. *Reprod Toxicol* 13:491-499.
- Eldridge J. C., Wetzel L. T., Stevens J. T., Simpkins J. W. (1999b) The mammary tumor response in triazine-treated female rats: a threshold-mediated interaction with strain and species-specific reproductive senescence. *Steroids* 64:672-678.
- Eldridge J. C., Tennant M. K., Wetzel L. T., Breckenridge C. B., Stevens J. T. (1994) Factors affecting mammary tumor incidence in chlorotriazine-treated female rats: hormonal properties, dosage, and animal strain. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 11:29-36.
- Fan A., Alexeeff G. (1999) Public Health Goal for Atrazine In Drinking Water. Environmental Protection Agency.
- Filipov N. M., Pinchuk L. M., Boyd B. L., Crittenden P. L. (2005) Immunotoxic effects of short-term atrazine exposure in young male C57BL/6 mice. *Toxicol Sci* 86:324-332.
- Filipov N. M., Stewart M. A., Carr R. L., Sistrunk S. C. (2007) Dopaminergic toxicity of the herbicide atrazine in rat striatal slices. *Toxicology* 232:68-78.
- Fitzpatrick P. F. (1999) Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* 68:355-381.
- Floresco S. B. (2007) Dopaminergic regulation of limbic-striatal interplay. *J Psychiatry Neurosci* 32:400-411.
- Floresco S. B., Seamans J. K., Phillips A. G. (1996) A selective role for dopamine in the nucleus accumbens of the rat in random foraging but not delayed spatial win-shift-based foraging. *Behav Brain Res* 80:161-168.
- Floresco S. B., Seamans J. K., Phillips A. G. (1997) Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J Neurosci* 17:1880-1890.
- Friedmann A. S. (2002) Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reprod Toxicol* 16:275-279.
- Gammon D. W., Aldous C. N., Carr W. C., Jr., Sanborn J. R., Pfeifer K. F. (2005) A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects. *Pest Manag Sci* 61:331-355.
- Giros B., Sokoloff P., Martres M. P., Riou J. F., Emorine L. J., Schwartz J. C. (1989) Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342:923-926.

- Gulley J. M. (2007) Individual differences in novelty- and cocaine-induced locomotor activity as predictors of food-reinforced operant behavior in two outbred rat strains. *Pharmacol Biochem Behav* 86:749-757.
- Hikosaka O. (1991) Basal ganglia--possible role in motor coordination and learning. *Curr Opin Neurobiol* 1:638-643.
- Hossain M. M., Filipov N. M. (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.
- Iwamoto E. T., Way E. L. (1977) Circling behavior and stereotypy induced by intranigral opiate microinjections. *J Pharmacol Exp Ther* 203:347-359.
- Jackson R., Grainge J. W. (1975) Arsenic and cancer. *Can Med Assoc J* 113:396-401.
- Jeanson R., Blanco S., Fournier R., Deneubourg J. L., Fourcassie V., Theraulaz G. (2003) A model of animal movements in a bounded space. *J Theor Biol* 225:443-451.
- Kallai J., Makany T., Csatho A., Karadi K., Horvath D., Kovacs-Labadi B., Jarai R., Nadel L., Jacobs J. W. (2007) Cognitive and affective aspects of thigmotaxis strategy in humans. *Behav Neurosci* 121:21-30.
- Kanaan N. M., Kordower J. H., Collier T. J. (2008) Age-related changes in dopamine transporters and accumulation of 3-nitrotyrosine in rhesus monkey midbrain dopamine neurons: relevance in selective neuronal vulnerability to degeneration. *Eur J Neurosci* 27:3205-3215.
- Kumer S. C., Vrana K. E. (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67:443-462.
- Lamprea M. R., Cardenas F. P., Setem J., Morato S. (2008) Thigmotactic responses in an open-field. *Braz J Med Biol Res* 41:135-140.
- Langston J. W., Ballard P. (1984) Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci* 11:160-165.
- Langston J. W., Forno L. S., Rebert C. S., Irwin I. (1984) Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res* 292:390-394.
- Lewis D. A., Melchitzky D. S., Haycock J. W. (1993) Four isoforms of tyrosine hydroxylase are expressed in human brain. *Neuroscience* 54:477-492.
- Liang C. L., Sinton C. M., Sonsalla P. K., German D. C. (1996) Midbrain dopaminergic neurons in the mouse that contain calbindin-D28k exhibit reduced vulnerability to MPTP-induced neurodegeneration. *Neurodegeneration* 5:313-318.
- Lioy P. J., Edwards R. D., Freeman N., Gurunathan S., Pellizzari E., Adgate J. L., Quackenboss J., Sexton K. (2000) House dust levels of selected insecticides and a herbicide measured by the EL and LWW samplers and comparisons to hand rinses and urine metabolites. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 10:327-340.
- Lucas A. D., Jones A. D., Goodrow M. H., Saiz S. G., Blewett C., Seiber J. N., Hammock B. D. (1993) Determination of atrazine metabolites in human urine: development of a biomarker of exposure. *Chem Res Toxicol* 6:107-116.

- Macintosh D. L., Needham L. L., Hammerstrom K. A., Ryan P. B. (1999) A longitudinal investigation of selected pesticide metabolites in urine. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 9:494-501.
- Mcdonald R. J., White N. M. (1995) Information acquired by the hippocampus interferes with acquisition of the amygdala-based conditioned-cue preference in the rat. *Hippocampus* 5:189-197.
- Mcmullin T. S., Brzezicki J. M., Cranmer B. K., Tessari J. D., Andersen M. E. (2003) Pharmacokinetic modeling of disposition and time-course studies with [¹⁴C]atrazine. *J Toxicol Environ Health A* 66:941-964.
- Mejia J. J., Diaz-Barriga F., Calderon J., Rios C., Jimenez-Capdeville M. E. (1997) Effects of lead-arsenic combined exposure on central monoaminergic systems. *Neurotoxicol Teratol* 19:489-497.
- Monville C., Torres E. M., Dunnett S. B. (2006) Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *J Neurosci Methods* 158:219-223.
- Nagasawa H., Morii S. (1981) Prophylaxis of spontaneous mammary tumorigenesis by temporal inhibition of prolactin secretion in rats at young ages. *Cancer Res* 41:1935-1937.
- Narotsky M. G., Best D. S., Guidici D. L., Cooper R. L. (2001) Strain comparisons of atrazine-induced pregnancy loss in the rat. *Reprod Toxicol* 15:61-69.
- Newcomb J. (2003) A Plague of Frogs: What does the battle over atrazine mean for agriculture and agrochemicals? In: Cambridge: Bio Economic Research Associates.
- Ng M. C., Iacopino A. M., Quintero E. M., Marches F., Sonsalla P. K., Liang C. L., Speciale S. G., German D. C. (1996) The neurotoxin MPTP increases calbindin-D28k levels in mouse midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 36:329-336.
- Niesink R., Jaspers R. M. A., Kornet L. M. W. (1998) *Neurobehavioral Toxicology* In: CRC Press.
- Olton D., Samuelson R. (1976) Remembrance of places past: spatial memory in rats. *Anim Behav Proc* 2:97-116.
- Pierce R. C., Kalivas P. W. (2007) Locomotor behavior. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:Unit 8 1.
- Pinchuk L. M., Lee S. R., Filipov N. M. (2007) In vitro atrazine exposure affects the phenotypic and functional maturation of dendritic cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 223:206-217.
- Podda M. V., Deriu F., Solinas A., Demontis M. P., Varoni M. V., Spissu A., Anania V., Tolu E. (1997) Effect of atrazine administration on spontaneous and evoked cerebellar activity in the rat. *Pharmacol Res* 36:199-202.
- Pollard G. T., Howard J. L. (1996) Single-subject design for measuring locomotor activity. In: *Measuring Movement and Locomotion: From Invertebrates to Human* (Ossenkopp K., Kavaliers M., Sanberg P. R., eds), p 223. New York: Chapman & Hall.
- Presti M. F., Mikes H. M., Lewis M. H. (2003) Selective blockade of spontaneous motor stereotypy via intrastriatal pharmacological manipulation. *Pharmacol Biochem Behav* 74:833-839.

- Pruett S. B., Fan R., Zheng Q., Myers L. P., Hebert P. (2003) Modeling and predicting immunological effects of chemical stressors: characterization of a quantitative biomarker for immunological changes caused by atrazine and ethanol. *Toxicol Sci* 75:343-354.
- Ridley R. M. (1994) The psychology of perseverative and stereotyped behaviour. *Prog Neurobiol* 44:221-231.
- Rodriguez V. M., Thiruchelvam M., Cory-Slechta D. A. (2005) Sustained exposure to the widely used herbicide atrazine: altered function and loss of neurons in brain monoamine systems. *Environ Health Perspect* 113:708-715.
- Rodriguez V. M., Carrizales L., Jimenez-Capdeville M. E., Dufour L., Giordano M. (2001) The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat. *Brain Res Bull* 55:301-308.
- Romano J. A., Jr., Landauer M. R. (1986) Effects of the organophosphorus compound, O-ethyl-N-dimethyl-phosphoramidocyanidate (tabun), on flavor aversions, locomotor activity, and rotarod performance in rats. *Fundam Appl Toxicol* 6:62-68.
- Ross M. K., Filipov N. M. (2006) Determination of atrazine and its metabolites in mouse urine and plasma by LC-MS analysis. *Anal Biochem* 351:161-173.
- Ross M. K., Jones T. L., Filipov N. M. (2008) Disposition of the herbicide atrazine and its major metabolites in mice: An LC-MS analysis of urine, plasma, and tissue levels. *Drug Metab Dispos*.
- Sabban E. L., Kvetnansky R. (2001) Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci* 24:91-98.
- Schwartz R. K., Steiner H., Huston J. P. (1991) Asymmetries in thigmotactic scanning: evidence for a role of dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* 103:19-27.
- Shimizu K., Matsubara K., Ohtaki K., Shiono H. (2003) Paraquat leads to dopaminergic neural vulnerability in organotypic midbrain culture. *Neurosci Res* 46:523-532.
- Siavi (2008) Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (SIAVI) . <http://www.economia-snci.gob.mx>. In. México: Secretaría de Economía.
- Siegel G., Albers W., Brady S., (2007) Basic Neurochemistry. In, Seventh Edition (Elsevier, ed), pp 211-225 San Diego California EUA.
- Smeets W. J., Gonzalez A. (2000) Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Brain Res Rev* 33:308-379.
- Spano P. F., Govoni S., Trabucchi M. (1978) Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol* 19:155-165.
- Stoker T. E., Cooper R. L. (2007) Distribution of ¹⁴C-atrazine following an acute lactational exposure in the Wistar rat. *Reprod Toxicol* 23:607-610.
- Stoker T. E., Laws S. C., Guidici D. L., Cooper R. L. (2000) The effect of atrazine on puberty in male wistar rats: an evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. *Toxicol Sci* 58:50-59.

- Surmeier D. J. (2007) Dopamine and working memory mechanisms in prefrontal cortex. *J Physiol* 581:885.
- Swerdlow N. R., Krupin A. S., Bongiovanni M. J., Shoemaker J. M., Goins J. C., Hammer R. P., Jr. (2006) Heritable differences in the dopaminergic regulation of behavior in rats: relationship to D2-like receptor G-protein function. *Neuropsychopharmacology* 31:721-729.
- Tarazi F. I., Florijn W. J., Creese I. (1997) Differential regulation of dopamine receptors after chronic typical and atypical antipsychotic drug treatment. *Neuroscience* 78:985-996.
- Thiruchelvam M., Brockel B. J., Richfield E. K., Baggs R. B., Cory-Slechta D. A. (2000a) 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.
- Thiruchelvam M., Richfield E. K., Baggs R. B., Tank A. W., Cory-Slechta D. A. (2000b) The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci* 20:9207-9214.
- Treit D., Fundytus M. (1988) Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 31:959-962.
- Ugazio G., Bosio A., Burdino E., Ghigo L., Nebbia C. (1991) Lethality, hexobarbital narcosis and behavior in rats exposed to atrazine, bentazon or molinate. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 74:349-361.
- Viggiano D., Ruocco L. A., Sadile A. G. (2003) Dopamine phenotype and behaviour in animal models: in relation to attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 27:623-637.
- Wetzel L. T., Luempert L. G., 3rd, Breckenridge C. B., Tisdell M. O., Stevens J. T., Thakur A. K., Extrom P. J., Eldridge J. C. (1994) Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health* 43:169-182.
- Whishaw I., Kolb B. (2004) *The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests* First Edition. USA: Oxford University Press.
- Whishaw I. Q., Li K., Whishaw P. A., Gorny B., Metz G. A. (2003) Distinct forelimb and hind limb stepping impairments in unilateral dopamine-depleted rats: use of the rotorod as a method for the qualitative analysis of skilled walking. *J Neurosci Methods* 126:13-23.
- Wise R. R., Naylor A. W. (1987) Chilling-enhanced photooxidation : The peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. *Plant Physiol* 83:272-277.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolitos de la atrazina.....	
Figura 2. Biosíntesis de dopamina.....	
Figura 3. Metabolismo de dopamina.....	
Figura 4. Vías dopaminérgicas.....	
Figura 5. Peso corporal del grupo control y tratado.....	
Figura 6. Habitación en la primera hora de registro.....	
Figura 7. Distancia recorrida en el centro de la caja.....	
Figura 8. Actividad horizontal durante 24 horas.....	
Figura 9. Actividad horizontal durante fase de luz.....	
Figura 10. Distancia recorrida durante la fase de oscuridad.....	
Figura 11. Actividad estereotipada durante la fase de oscuridad.....	
Figura 12. Porcentaje de cambio en la actividad locomotora espontánea...	
Figura 13. Prueba de coordinación motora.....	
Figura 14. Tarea de alternancia retardada.....	
Figura 15. Tarea de gana y cambia sin retardo.....	
Figura 16. Contenido de monoaminas en estriado y núcleo accumbens.....	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los valores de F para el análisis global (24 horas) y fase de obscuridad (12 horas) del registro de la actividad locomotora espontánea.....

Tabla 2. Concentración de monoaminas y sus metabolitos.....