

UNIVERSIDAD



NACIONAL

AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Efectos de la exposición crónica y simultánea al arsénico inorgánico y
atrazina sobre el sistema nigroestriatal

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. en C. Ulises Gregorio III Pacheco Bardullas

TUTOR

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova INB

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Alfonso Carabez Trejo INB

Dra. María Eugenia Gonsebatt IIB

MÉXICO MAYO 2014

Instituto de Neurobiología

Universidad Nacional Autónoma de México

Los miembros del Comité de Tesis certificamos que la tesis elaborada por Ulises Pacheco Bardullas titulada: “**Efectos de la exposición crónica y simultánea al arsénico inorgánico y atrazina sobre el sistema nigroestriatal**” y presentada como uno de los requisitos para obtener el grado de doctor en ciencias 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

Secretario (Tutor)

Vocal

Suplente

Suplente

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

RESUMEN

El herbicida atrazina (ATR) y el metaloide arsénico (As) son dos sustancias ampliamente distribuidas en el medio ambiente. En los últimos años ha crecido el interés con respecto a la toxicidad de estas sustancias en el sistema dopaminérgico nigroestriatal. Hasta la fecha, ningún estudio ha evaluado los efectos de la exposición crónica y simultánea a ATR y As, sustancias que comparten el mismo blanco neuronal. Con el fin de estudiar los efectos de la coexposición ATR+As seis grupos de 10 ratas cada uno recibieron ATR (10 mg ATR/kg), As (0.5 ó 50 mg de As/L en agua de beber) o sus combinaciones (ATR+0.5 mg As/L o ATR+50 mg As/L) diariamente durante un año. Se encontraron hipoactividad e hiperactividad en el grupo tratado con 50 mg As/L y el grupo tratado con ATR, respectivamente. Todos los tratamientos disminuyeron la coordinación motora, mientras que el contenido de DA disminuyó en los grupos ATR, 0.5 mg As/L, ATR+0.5 mg As/L y ATR+50 mg As/L. Por otro lado se encontró disminuido el número de células TH+ en los grupos ATR y ATR+0.5 mg As/L. Además, la evaluación de la integridad de las células de la sustancia nigra mostró una disminución en la reactividad a la citocromo oxidasa en todos los grupos tratados, sin observarse cambios en la inmunorreactividad al malondialdehído. Nuestros resultados indican que ATR tiene efectos deletéreos sobre las neuronas dopaminérgicas y que la combinación de ATR+As no exagera la toxicidad de ATR.

SUMMARY

The herbicide atrazine (ATR) and the metalloid arsenic (As) are substances widely distributed in the environment. In recent years interest has grown regarding the toxicity of these substances on the nigrostriatal dopaminergic system. To date, no study has evaluated the effects of the chronic and simultaneous exposure to ATR and As, substances that share the same neuronal target. In order to study the effects of the coexposure ATR+ As, six groups of rats were given atrazine (10 mg ATR/kg), arsenic (0.5 or 50 mg As/L of drinking water) or their combinations (ATR+0.5 mg As/L or ATR+50 mg As/L) daily for one year. There were found hypoactivity and hyperactivity in 50 mg As/L and ATR groups, respectively. All treatments decreased motor coordination, besides DA content was found diminished in ATR, 0.5 mg As/L, ATR+0.5 mg As/L and ATR+50 mg As/L groups. On the other hand, the number of TH+ cells was found decreased in ATR and ATR+0.5 mg As/L groups. Furthermore, the assessment of cell integrity in the substantia nigra showed decreases in cytochrome oxidase reactivity in all treatment groups, but no changes in malondialdehyde immunoreactivity. In summary, our results indicate that ATR has deleterious effects on dopaminergic neurons and that the combination of ATR and As does not exacerbate these effects.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mi tutora, colega y amiga la Dra. Verónica Rodríguez, por todos estos años de aprendizaje. Por ser una excelente tutora y guía de este increíble viaje a través del posgrado. Por ser colega, con su trato equitativo, justo, digno y respetuoso hacia el trabajo y esfuerzo del estudiante. Y por ser amiga, para compartir las experiencias de la vida diaria, de lo cotidiano, por recordar que ante todo somos personas comunes haciendo un trabajo extraordinario. Muchas gracias por todo.

A la Dra. Magda Giordano, le envié mi profunda gratitud y unas palabras de admiración. Cuando uno mira hacia atrás, se da cuenta que inevitablemente se lleva en su formación un estilo, una forma de pensar y trabajar de sus mentores, y creo que la Dra Giordano tiene un inconfundible estilo que imprime a cada uno de los estudiantes que pasa por el laboratorio.

Un especial agradecimiento a mis tutores durante el doctorado. Al Dr. Alfonso Carabez y la Dra. Maria Eugenia Gonsebatt porque cada semestre y en otras tantas estuvieron presentes con sus comentarios y mejoras tanto al proyecto como a mi persona.

Un especial agradecimiento a la Biól. Soledad Mendoza Trejo 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.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (no. registro 228586) para la realización de este posgrado y el financiamiento del proyecto de investigación (CONACYT 60662, 103907 y 152842). A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico y al Programa de Apoyo de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT 214608, 202013-2) por el financiamiento otorgado

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 SISTEMA NIGROESTRIATAL	3
2.1.1 Anatomía del sistema nigroestriatal dopaminérgico	3
2.1.2 Neuroquímica del sistema dopaminérgico nigroestriatal	4
2.2 ATRAZINA.....	8
2.2.1 Contexto histórico y económico.....	8
2.2.2 Propiedades fisicoquímicas	9
2.2.3 Atrazina en el medio ambiente.....	9
2.2.4 Exposición en humanos	10
2.2.5 Situación de la atrazina en México.....	11
2.2.6 Toxicocinética.....	12
2.2.7 Metabolismo	14
2.2.8 Mecanismo de toxicidad de la atrazina.....	15
2.2.9 Efectos de la atrazina sobre el sistema nervioso central.....	16
2.3 ARSÉNICO.....	18
2.3.1 Exposición y distribución.....	18
2.3.2 Toxicocinética.....	19
2.3.3 Metabolismo	20
2.3.4 Mecanismo de toxicidad del arsénico.....	22
2.3.5 Efectos del arsénico sobre el sistema nervioso central.....	23
2.4 TOXICOLOGÍA DE MEZCLAS QUÍMICAS.....	27
2.4.1 tipos de interacción toxicológica	27
2.4.2 estudios de mezclas química en modelos animales.....	27
3. IMPACTO Y RELEVANCIA	30
4. HIPÓTESIS	30

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
6. ESTRATEGIA GENERAL Y METODOLOGÍA	31
6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	31
6.2 SUJETOS.....	32
6.3 PREPARACIÓN DE CROQUETAS CON ATRAZINA.....	32
6.4 PREPARACIÓN DE AGUA DE BEBIDA CON AS	34
6.5 ACTIVIDAD LOCOMOTORA ESPONTÁNEA	34
6.6 COORDINACIÓN MOTORA	35
6.7 TAREA DE APRENDIZAJE DE RESPUESTA Y LUGAR	35
6.8 MARCADORES BIOQUÍMICOS Y DE DAÑO MUSCULAR	37
6.9 DETERMINACIÓN DE DOPAMINA Y SU METABOLITO DOPAC	38
6.9.1 Preparación de la muestra.	38
6.9.2 Cromatografía de líquidos.	38
6.10 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	39
6.10.1 Histoquímica de citocromo oxidasa.....	39
6.10.2 Inmunohistoquímica de células th+ y malondialdehido	40
6.11 DETERMINACIÓN DE TRANSPORTADORES DE DA POR WESTERN BLOT	42
7. RESULTADOS	44
7.1 Peso corporal.....	44
7.2 Consumo de agua	45
7.3 Marcadores bioquímicos y de daño muscular	45
7.4 Actividad locomotora espontánea.....	46
7.5 Coordinación motora.....	48
7.6 Tarea de aprendizaje y memoria.....	48
7.7. Determinación de dopamina y DOPAC.....	50
7.8 Reactividad de Citocromo oxidasa (CO)	51
7.9 Inmunohistoquímica de células TH+.....	52
7.10 Inmunohistoquímica de Malondialdehido.....	55

7.11 Determinación de transportadores de dopamina	56
8. DISCUSIÓN	57
9. CONCLUSIONES GENERALES	69
10. REFLEXIONES FINALES.	70
BIBLIOGRAFIA	74
INDICE DE FIGURAS	83
INDICE DE TABLAS	85

1. INTRODUCCIÓN

En un escenario real, existen una gran cantidad de sustancias a las que podemos estar expuestos, ya sea por periodos prolongados o de manera ocasional. Sin embargo, existen poblaciones que dada su geografía o su actividad laboral están expuestos crónicamente a una variedad de tóxicos del ambiente. Sin embargo, pocos son los estudios toxicológicos en la literatura que reportan los efectos de la exposición crónica y simultánea a múltiples sustancias.

La exposición a sustancias tóxicas presentes en el medio ambiente, se ha relacionado con el desarrollo o la predisposición a alteraciones en el neurodesarrollo y enfermedades neurodegenerativas. El ejemplo más representativo de estas últimas es el papel que juega el medio ambiente en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson de tipo idiopático, donde estudios epidemiológicos relacionan la exposición a metales pesados y pesticidas con el desarrollo de esta enfermedad.

La atrazina (ATR: 6-cloro-N²-etil-N⁴-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) es de los herbicidas más usados mundialmente por su bajo costo y alta efectividad. Es también considerado el pesticida más común detectado en aguas superficiales y profundas (Barbash et al., 2001), en alimentos y en viviendas cercanas a sitios rurales donde se emplea este herbicida (Gammon et al., 2005; Liroy et al., 2000). En México, la Secretaría de Economía reporta cifras de importación por más de 325 toneladas anuales de la sustancia activa en el 2007, lo que posiciona a la ATR como el cuarto pesticida más usado en México (SIAVI 2008). Por otro lado, estudios en roedores expuestos a ATR muestran alteraciones en la actividad locomotora (Bardullas et al., 2011; Rodriguez et al., 2013; Ugazio et al., 1991) en la liberación y contenido estriatal de catecolaminas

(Coban & Filipov 2007; Das et al., 2001; Das et al., 2000) y disminución en la cantidad de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Coban & Filipov 2007).

El arsénico (As) es un metaloide presente en suelos, polvos, agua o alimentos contaminados de manera natural o antropogénica. Además el As es utilizado frecuentemente como la sustancia activa en una variedad de plaguicidas (ácido cacodílico). La exposición crónica a arsenicales se ha asociado principalmente al desarrollo de cáncer de piel y órganos internos, enfermedades vasculares, entre otras (Jackson & Grainge 1975). Los límites permisibles de As en agua decretados por la Secretaría de Salud (México) son de 0.025 mg As/L. Sin embargo, se han reportado concentraciones de hasta 0.6 mg As/L en agua de bebida en México (Del Razo et al., 1990). Estudios epidemiológicos de la exposición crónica a As tanto ocupacional como ambiental reportan afectaciones neurológicas en la memoria y disminución en el cociente intelectual (CI) (Rosado et al., 2007) en adultos y niños. Por otro lado, modelos murinos de exposición crónica a dosis tan bajas como 0.05 ó 0.5 mg As/kg de peso, muestran alteraciones en la actividad locomotora, en los sistemas de neurotransmisión y de antioxidantes (Bardullas et al., 2009; Itoh et al., 1990; Rodriguez et al., 2001; Rodriguez et al., 2010).

Por lo anterior, la propuesta innovadora de este estudio se basa en evaluar desde una perspectiva relevante al medio ambiente, el efecto tóxico de la interacción de dos sustancias ampliamente distribuidas en nuestra geografía, a través de una exposición prolongada a dosis bajas, sobre el sistema nervioso de la rata albina.

2. ANTECEDENTES

2.1 Sistema nigroestriatal

2.1.1 ANATOMÍA DEL SISTEMA NIGROESTRIATAL DOPAMINÉRGICO

La vía nigroestriatal se genera en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNpc) y se proyecta ipsilateralmente hacia el estriado (ver figura 1) estableciendo en su mayor parte sinapsis simétricas con las espinas y dendritas de las neuronas medianas espinosas (NME). Por su citoarquitectura y proyecciones la SNpc se divide en la porción ventral y dorsal. La porción dorsal está compuesta por neuronas con dendritas en dirección mediolateral y positivas a calbindina-D28k, además de proyectar en su mayoría a la matriz del estriado. Por otro lado las neuronas de la porción ventral tienen un arreglo en dirección dorso ventral, además de ser negativas a calbindina-D28k y proyectar a los parches del estriado (Smeets & Gonzalez 2000).

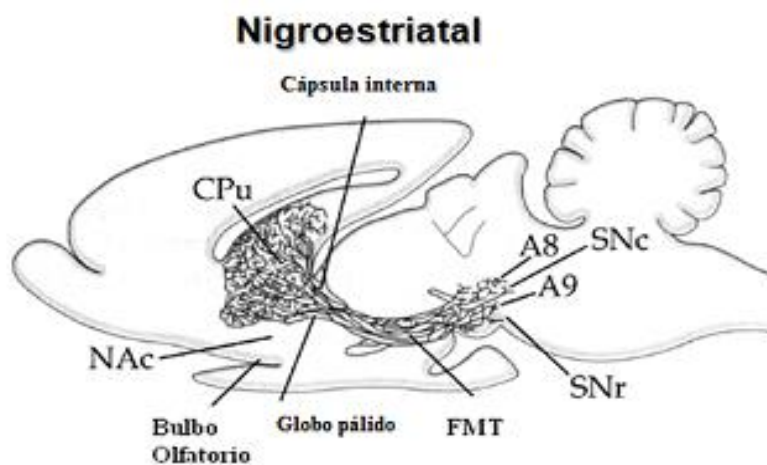


Figura 1. Esquema de la vía nigroestriatal en corte longitudinal de roedor. La Fascículo Medial Telencefálico (FMT); Núcleo Accumbens (NAc); Sustancia Nigra *pars compacta* (SNpc); Caudado-Putamen (CPu); dopamina (DA) Sustancia Nigra *reticulata*(SNr). ejerce su efecto modulador por la vía directa principalmente 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).

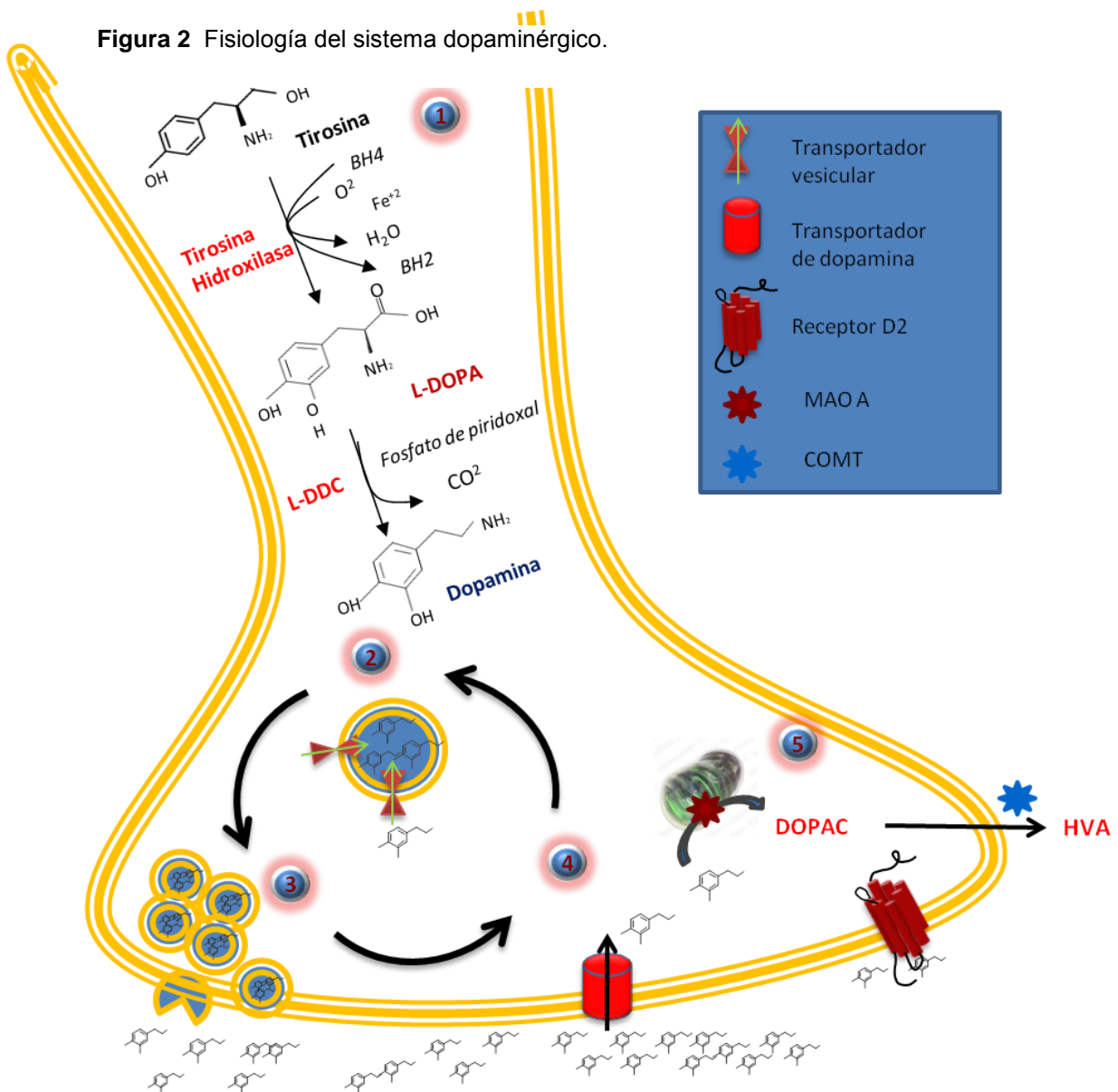
2.1.2 NEUROQUÍMICA DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO NIGROESTRIATAL

2.1.2.1 Fisiología del sistema dopaminérgico

La Da es un neuromodulador del sistema nervioso perteneciente a la familia de las catecolaminas. Su síntesis inicia con la hidroxilación del aminoácido tirosina por la tirosina hidroxilasa (TH) a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Durante esta reacción es necesaria la presencia de la coenzima tetrahidrobiopterina, oxígeno y el hierro como cofactor (Fitzpatrick 1999). Seguido de ello, la DOPA-descarboxilasa utiliza al fosfato de piridoxal como cofactor, para catalizar la remoción del grupo carboxilo de L-DOPA transformándose en DA (Siegel et al., 2007). Rápidamente gran parte de la DA es

almacenada en vesículas a través del el transportador vesicular (VMAT-2) evitando su oxidación en el citosol y la generación de DA-quinonas, moléculas altamente reactivas. La proteína VMAT-2 intercambia un protón de H^+ del interior de la vesícula lo que permite internalizar una molécula de DA del exterior, esto se produce hasta alcanzar concentraciones de 0.5 mol/L de DA en las vesículas (Siegel et al., 2007). Después de ser liberada, la DA extracelular es recapturada en la presinapsis a través del transportador de DA (DAT), una proteína de membrana capaz de recapturar de 2-5 moléculas de DA por segundo (Cragg & Rice 2004). El bloqueo del transportador de DA constituye el mecanismo de toxicidad por el cual el MPTP y la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) producen sus efectos sobre las neuronas dopaminérgicas de la vía nigrostriatal, lo que constituye uno de los mecanismos neurotóxicos más estudiados para la generación de modelos de la Enfermedad de Parkinson (EP) inducidos por la muerte de neuronas dopaminérgicas (ver figura 2).

Figura 2 Fisiología del sistema dopaminérgico.



2.1.2.2 Metabolismo

La DA libre en el citosol, debe ser metabolizada rápidamente a fin de evitar su oxidación. Durante el metabolismo de la DA, la MAO una flavoproteína de la membrana mitocondrial, cataliza la desaminación de DA en ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) (Figura 3). EL DOPAC una sustancia permeable a la membrana puede difundir fuera de la neurona (Edmondson et al., 2004) hacia el espacio extracelular, donde es metabolizada por una segunda enzima, la catecol-O-metiltransferasa (COMT), la cual está presente en la glía y en la terminal postsináptica. Por su parte, la COMT cataliza la transferencia de un grupo metilo al DOPAC para formar el ácido homovanílico (HVA). De manera alterna puede producirse extracelularmente una pequeña cantidad de 3-metoxitiramina a través de la actividad de la COMT.

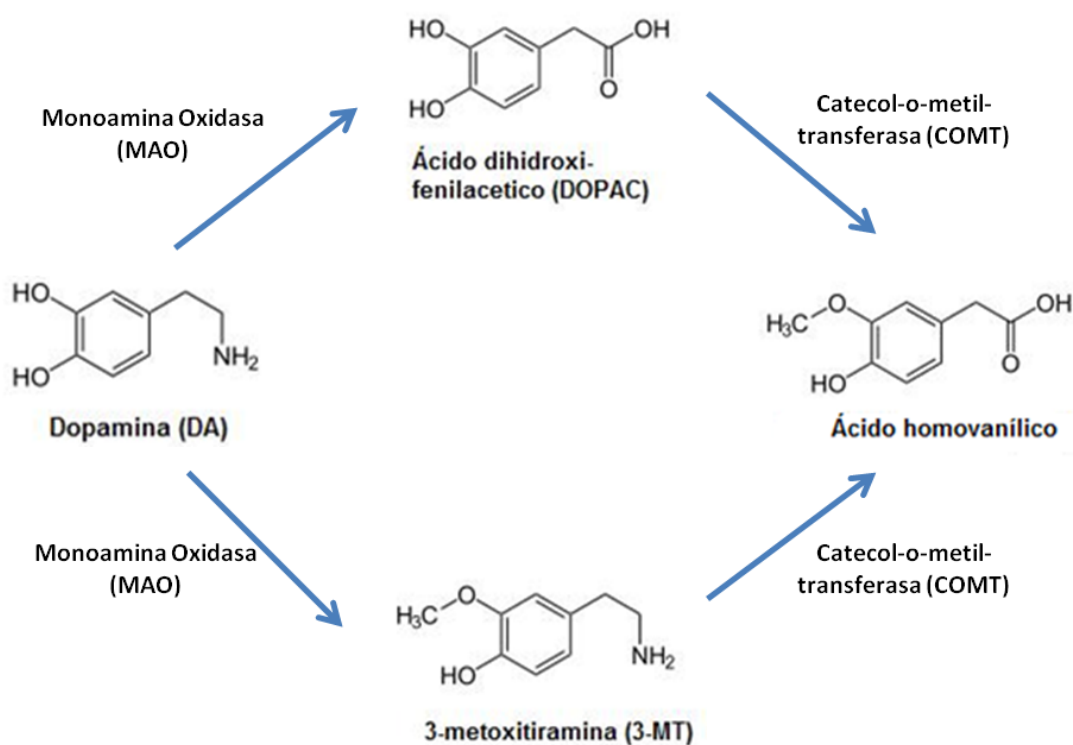


Figura 3. Esquema que muestra el metabolismo de la dopamina.

2.2 Atrazina

2.2.1 CONTEXTO HISTÓRICO Y ECONÓMICO

Durante los años de la revolución verde en la década de los 50's se produjo una explosión en la alimentación mundial, con un marcado aumento en la producción de insumos agrícolas, que prometían ser una solución a los problemas de hambre en el mundo. La consecuencia fue un aumento exponencial en la investigación, creación y aplicación intensiva de agroquímicos. La ATR es un herbicida creado a finales de la década de los 50's y pronto se abrió paso en el competitivo mercado de los plaguicidas. A lo largo de 50 años la ATR ha sido comercializada en todo el mundo bajo más de 130 formulaciones, con ganancias de venta al 2011 de 4.8 mil millones de dólares anuales (<http://agsense.org/expert-panel-atrazines-economic-environmental-benefits-up-to-4-8-billion-annually/>). Su aplicación se da principalmente en cultivos extensivos como el maíz, la soya y el sorgo, así como en zonas no agrícolas como campos de golf o en el control de maleza a lo largo de las autopistas. Estos diversos usos colocó a la ATR por muchos años como el pesticida más vendido en el mundo, y hasta hoy sigue siendo unos de los principales plaguicidas utilizados en cuanto a su volumen (Newcomb 2003). Su popularidad en el mercado se debe en gran parte a su bajo costo y efectividad para eliminar todo tipo de hierbas indeseables en los cultivos. Debido a ello se ha especulado que la prohibición de este herbicida tendría como consecuencia el aumento dramático en los costos de producción de cultivos clave para la alimentación mundial, además de un efecto colateral con el consecuente aumento de los insumos que utilizan al maíz como materia prima, aunado a una reducción en la cantidad de acres de maíz plantados anualmente (<http://agsense.org/expert-panel-atrazines-economic-environmental-benefits-up-to-4-8-billion-annually/>). Sin embargo, un estudio reciente realizado por Ackerman et al. (2007) sobre el impacto económico en Estados Unidos señala que los

beneficios económicos de la ATR han sido exagerados y que la implementación de compuestos alternativos a la ATR, apenas aumentaría el costo del maíz en alrededor del 1% por acre, por lo que la regulación de su uso para una sustancia como la ATR depende en gran medida de la información obtenida a través de los estudios toxicológicos (Ackerman 2007).

2.2.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

La ATR tiene un peso molecular de 214.68 g/mol con una moderada solubilidad en el agua (30 mg/L) y un coeficiente de carbono orgánico (Koc) mayor a los 100 mL/g lo que le confiere una movilidad moderada a través del suelo, sin embargo tanto su coeficiente de absorción (2.61 Log Kow) como su baja capacidad de volatilidad por su presión de vapor (3×10^{-6} mm Hg), le permite mantener una alta fijación al suelo.

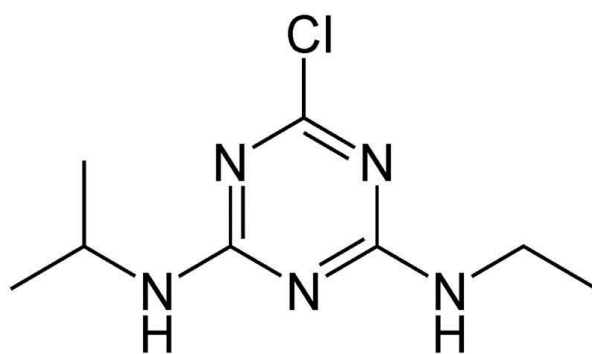


Figura 4. Estructura molecular de la 6-cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina. Atrazina

2.2.3 ATRAZINA EN EL MEDIO AMBIENTE

Por las propiedades fisicoquímicas, la ATR ha sido considerada como un contaminante potencial de aguas superficiales y profundas (Fan & Alexeeff 1999). En el ambiente, debido a su uso abundante como herbicida pre y post-cosecha, la ATR es un plaguicida comúnmente detectado en agua superficiales y pozos profundos en las regiones donde su uso es intensivo (Barbash et al., 2001), así como en alimentos y viviendas cercanas a sitios agrícolas donde se emplea el herbicida (Curwin et al., 2002; Gammon et al., 2005; Lioy et al., 2000). Aunque en un principio su vida media se calculó en 2 años, en un estudio reciente se evaluó la persistencia de ¹⁴C-ATR en campos experimentales aplicada 22 años atrás recuperándose hasta un 60% de la ATR utilizada originalmente, lo que indica que bajo ciertas condiciones ambientales el compuesto es altamente persistente en los suelos donde se emplea (Jablonowski et al., 2011).

2.2.4 EXPOSICIÓN EN HUMANOS

Diversos estudios confirman la exposición en humanos (Adgate et al., 2001; Adgate et al., 2000; Catenacci et al., 1990). Para EUA, la Agencia de Protección al Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés) ha calculado que el límite permisible para una exposición crónica a la ATR de 0.018 mg/kg/día. Este dato se basa en estudios en roedores en los cuales la dosis mínima a la cual no se observó ningún efecto tóxico (NOAEL) por exposición crónica fue de 1.8 mg/kg/día. La exposición ocupacional se calcula en 5.6% de 2.8 mg ATR/día de trabajo, en los aplicadores de plaguicidas (Gammon et al., 2005). Sin embargo, el grado de exposición en la población en general continúa siendo tema de debate. La problemática para vigilar los niveles de ATR en la población, se basa en la falta de un biomarcador universal que determine el grado de exposición a la ATR, tarea que ha resultado compleja debido principalmente a la falta de información sobre el metabolismo de la ATR en humanos (McMullin et al., 2003) y a las limitaciones metodológicas para la determinación de la ATR y sus metabolitos en

sangre, orina y tejidos (Ross et al., 2008). En años previos, diferentes estudios fracasaron en detectar los niveles de ATR en individuos sin actividad agrícola, reportando que solo <3% de los participantes se encontraban por arriba del límite de detección, por lo que se sugería que el riesgo de exposición a la ATR en la población general era mínimo (Alavanja et al., 1994; Lioy et al., 2000; MacIntosh et al., 1999). En contraste, Curwin y colaboradores en el 2007, analizaron los niveles de mercapturatos de ATR en orina en una zona rural tanto en familias donde el padre es agricultor, como en aquellas familias donde la actividad del padre es distinta, reportando que el porcentaje de individuos por arriba de los niveles del límite de detección para las familias de padre no-agricultor eran del orden de 18% para el padre, 15 % para la madre y 12% para los hijos, muy por arriba de lo reportado previamente, esta información sugiere que existe un riesgo que se había subestimado para aquellas personas que viven en zonas cercanas a la actividad agrícola (Curwin et al., 2005; Curwin et al., 2007; Curwin et al., 2007).

2.2.5 SITUACIÓN DE LA ATRAZINA EN MÉXICO

En el año 2006, el consumo de plaguicidas en México se situó en 95,025 toneladas y el 47% correspondió a los herbicidas (González et al., 2009). Para el caso de la ATR, la Secretaría de Economía (SE) ha reportado un valor total en importaciones de 350 toneladas en el año 2008 (Secretaría de Energía, SENER 2007), lo que lo ubica como el cuarto plaguicidas de mayor uso en nuestro país [Sistema de información comercial vía internet (SIAVI 2008)]. Sin embargo, los datos sobre su uso en el país solo se basan en el número de importaciones registradas por la SE al año, esto en gran parte a que el uso y aplicación de los plaguicidas en México es realizada a discreción por los agricultores, lo que genera escasas de información acerca de los sitios e intensidad del uso de estas sustancias en las diversas zonas agrícolas del país. Por ejemplo, Villada-

Canela en el 2006 reportó que la ATR es utilizada en al menos 60% de los distritos de riego (DR) en el país, en dosis que van de los 0.1 a 4 kg/hectárea (ha) al año, lo que equivale aproximadamente a 1.7 millones de ha sembradas con ATR al año. Si consideramos un uso moderado de ATR de 1 kg por ha al año, es razonable considerar que su aplicación anual es de aproximadamente 1700 toneladas de ATR solo en los DR registrados, un dato subestimado si consideramos que los DR en el país solo representan el 20% de la superficie sembrada en México. A pesar de su uso intensivo, es notable que a la fecha no se haya generado ninguna política sobre los límites permisibles de ATR en agua de uso y consumo humano. Debido a lo anterior y dado que no se incluye a la ATR en las guías ambientales ni en los métodos analíticos rutinarios para la vigilancia de la calidad del agua, se desconoce el destino ambiental de este herbicida en México y el grado de exposición de la población.

2.2.6 TOXICOCINÉTICA

La absorción de la ATR inicia con su paso a través del tracto gastrointestinal, un estudio evaluó la absorción y excreción de la ATR en la rata expuesta a una dosis de 0.53 mg de ATR/kg de peso marcada radioactivamente con ^{14}C por vía oral. A las 72 horas el 20% de la ATR fue excretada con una relación de 20% a través de las heces, 65% por orina y el resto fue retenida en los tejidos. Además este estudio sugirió a la orina como la ruta primera de excreción, determinación basada en una absorción de entre 70-80% de la dosis administrada (Ciba-Geigy 1987). En años posteriores, un reporte evaluó la distribución de la ATR marcada radioactivamente en distintos órganos de ratas nodrizas expuestas por vía intragástrica a dosis de 2 ó 4 mg ATR/kg. Los resultados reportan que los niveles ATR se distribuyeron homogéneamente en estructuras como el hipotálamo, hipófisis y estriado en las madres lactantes (Tabla 1), además las concentraciones en estas estructuras aumentaron en proporción con las

dosis administradas (Stoker & Cooper 2007). Notablemente estructuras periféricas como pulmones, hígado y glándula mamaria mantuvieron los mismos niveles de ATR independientemente de la dosis administrada (tabla 1). Un estudio más reciente evaluó el metabolismo de la ATR en diversos tejidos de ratones C57BL/6, seguido de una exposición intragástrica a un rango de dosis de 5-250 mg/kg de ATR. Los resultados mostraron que la ATR es rápidamente metabolizada, ya que después de 1 hora de alcanzar su pico máximo en sangre esta decae rápidamente, aunque cantidades menores de ATR se pueden detectar en la orina después de 48-72 horas. Un estudio de Ross y colaboradores en el 2008, reportaron que la concentración máxima de ATR en cerebro es de 1 μM , la cual fue detectada hasta las 4 horas post-administración de dosis individuales de 5 a 250 mg ATR/kg de peso de ratón de la cepa C57BL/6, sin embargo 2 horas después la concentración decae a niveles indetectables, interesantemente la diaminoclorotriazina (DACT) el principal metabolito de la ATR, es detectado en cerebro mas allá de las 24 h en concentraciones superiores a los 50 μM para las dosis administradas más altas, sugiriendo que este compuesto podría tener un papel importante en la neurotoxicidad por ATR (Ross et al., 2008).

Tabla 1. Distribución de la ATR marcada radioactivamente en distintas regiones del cerebro de ratas lactantes. Modificado de Stoker et al. 2007

Distribución de ¹⁴C-ATR en nodrizas perfundidas después de 3h				
Stoker et al. 2007				
	% de 2 mg ¹⁴ C-ATR	ng/mg	% de 4 mg ¹⁴ C-ATR	ng/mg
Pituitaria	0.0001	0.19	0.0021	1.31
Hipotalamo	0.003	1.4	0.0034	3.07
Estriado	0.003	1.8	0.0027	3.08
Pulmón	0.090	.715	0.04	.786
Glándula mamaria	2.38	2.47	0.98	2.45

2.2.7 METABOLISMO

Durante el proceso de biotransformación de la ATR se forman múltiples metabolitos. De forma general la ATR es dealquilada a su forma de desetilatrizona (DEA), deisopropilatrizona (DIA) y diaminoclorotriazina (DACT) como se muestra en la figura 5.

A pesar del conocimiento adquirido del metabolismo de la ATR en modelos murinos, el metabolismo en humanos ha sido poco caracterizado. Se ha reportado que la biotransformación dominante para la ATR es la Fase-I dependiente de citocromo P450, particularmente la isoforma CYP2B6 (Abass et al., 2012). Sin embargo, existen reportes de la presencia de importantes mercapturatos de ATR en orina humana, sugiriendo la participación de la fase-II de biotransformación dependiente de glutatión (Barr et al., 2007). Cabe destacar que los mercapturatos de ATR fueron obtenidos principalmente a través de una exposición dérmica en trabajadores agrícolas. Sin embargo, debido a la baja volatilidad de la ATR, la exposición dérmica no constituye un

factor de riesgo no-ocupacional, por lo que otros metabolitos como DACT dependiente de la fase I podrían ser más relevantes (Barr et al., 2007).

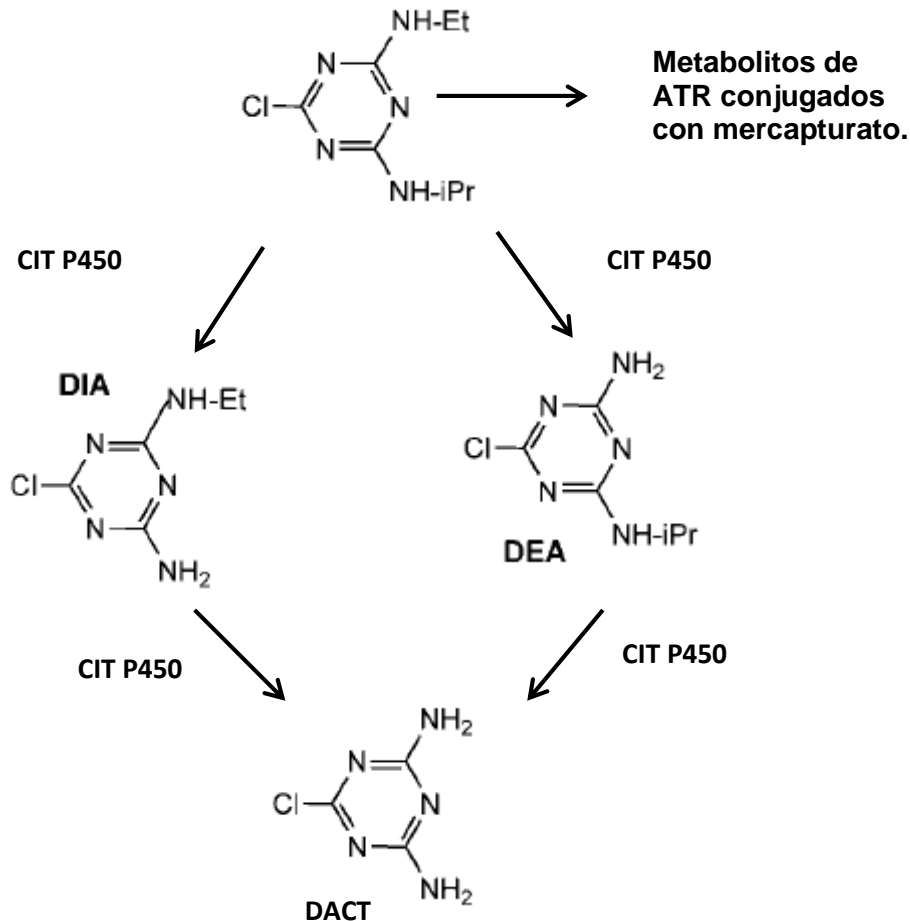


Figura 5. Metabolitos de la atrazina en mamíferos. Abreviaciones: DEA, desetilatrazina; DIA, deisopropilatrazina; DACT, diamonocloroatrazina.

2.2.8 MECANISMO DE TOXICIDAD DE LA ATRAZINA

Hasta el momento el mecanismo de toxicidad de la ATR es desconocido y el número de estudios mecanísticos sobre este herbicida es muy limitado. Los trabajos reportados a la fecha han sido incapaces de desarrollar una hipótesis que proponga un mecanismo de toxicidad general. Una de las líneas de investigación más consistentes hasta el momento reportan que el metabolito predominante de la ATR, DACT, es capaz

de inducir la formación de aductos covalentes con los grupos tiol de las cisteínas de la hemoglobina (Dooley et al., 2006), lo que potencialmente podría generar aductos con cualquier proteína que contenga grupos tiol reactivos, respecto a ello, el mismo grupo demostró la formación de aductos en múltiples proteínas en tres diferentes regiones del cerebro (corteza, área preóptica, hipotálamo medio-basal) después de una exposición a una dosis alta de 200 mg ATR/kg vía intragástrica, notablemente entre las proteínas identificadas que formaron aductos se encuentran las proteínas involucradas en la regulación energética, factores de transcripción y defensas celulares ante el estrés oxidante (Dooley et al., 2010). Sin embargo falta demostrar si la formación de estos aductos puede afectar el funcionamiento de la proteína alterando la viabilidad celular.

2.2.9 EFECTOS DE LA ATRAZINA SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

En los primeros estudios sobre el posible papel neurotóxico de la ATR se reportó que la administración crónica de ATR en ratas producía alteraciones en el equilibrio, espasmos tónicos y nistagmo (Castano et al., 1982). Posterior a ello, Ugazio et al. (1991) observaron disminución en la actividad motora vertical en ratas expuestas a la dosis alta de 1 g ATR/kg durante 4 días. Un estudio realizado por nuestro grupo reportó que una exposición crónica a 10 mg ATR/kg en ratas de la cepa Sprague-Dawley, generó importantes alteraciones en la actividad locomotora y alteraciones sustanciales en la coordinación de las ratas en la tarea de coordinación motora evaluada en el cilindro rotatorio o rotorod (Bardullas et al., 2011). Estas observaciones en el déficit motor también fueron reportadas por el grupo de Belloni et al. (2010) quienes observaron un aumento en la actividad exploratoria en ratones CD1 expuestos del día gestacional 14 hasta el postnatal 21 (PND21) a dosis bajas de 1 ó 100 µg/kg de ATR. Contrario al aumento en la actividad locomotora observado en los estudios con dosis bajas y tiempo prolongado de exposición a la ATR, dos estudios recientes demostraron que la

exposición aguda y subaguda a dosis altas de ATR producen una disminución en la actividad locomotora. El primer estudio reportó que la administración intraperitoneal de 100 mg ATR/kg durante dos semanas en ratas Sprague-Dawley produce una disminución en la actividad motora (Rodríguez et al., 2013), de igual forma Lin et al. (2013) observó hipoactividad en ratones C57BL/6 expuestos a 125 mg ATR/kg de ATR vía oral. Estos datos proponen a la ATR como una sustancia capaz de alterar la conducta en diferentes modelos murinos (Lin et al., 2013).

Los diversos estudios realizados sobre la neuroquímica del sistema dopaminérgico sugieren que el déficit motor podría estar vinculado a alteraciones en este sistema de neurotransmisión. De manera muy temprana, estudios en las células PC12 incubadas por 1-24 horas con 100 μM de ATR (Das et al., 2001; Das et al., 2000; Das et al., 2003) mostraron que la enzima TH la cual sintetiza a las catecolaminas pudieran ser un blanco de la ATR. En contraste, esta observación no ha podido replicarse en estudios *in vivo* donde los niveles de TH no se han visto afectados por exposición a la ATR. A pesar de ello, los reportes han sido consistentes en demostrar tanto *in vitro* (Filipov et al., 2007; Hossain & Filipov 2008) como *in vivo* (Bardullas et al., 2011; Coban & Filipov 2007; Rodríguez et al., 2013) que la exposición a ATR resulta en un decremento en los niveles de DA en el estriado y la pérdida de neuronas TH⁺ y TH⁻ en SNpc y área tegmento ventral (AVT) (Coban & Filipov 2007). Sin embargo hasta el día de hoy, el mecanismo por el cual la ATR disminuye los niveles de DA estriatal y acelera la muerte de neuronas TH⁺ continua siendo desconocido. Algunos indicios sugieren que la ATR puede disminuir la vesiculación de la DA, a este respecto un estudio utilizando sinaptosomas aislados del estriado de la rata los cuales fueron incubados por 15 minutos con dosis de 0.1-205 μM de ATR, se observó una disminución en la recaptura de DA intracelular por el transportador vesicular de DA (VMAT-2). Con un concentración de 1 μM de ATR la recaptura decayó un 17% mientras que la concentración de 250 μM , la disminución fue cercana al 50% (Hossain & Filipov 2008).

Esto sugiere que al haber más DA no vesiculada en la terminal sináptica, 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 DA, lo que en parte podría explicar la pérdida de las neuronas TH+. Estos datos son reforzados, con un estudio reciente que mostró que la ATR induce una regulación a la baja del mRNA para la TH y el transportador DAT y de manera notable la regulación a la alta de la expresión del mRNA de VMAT2 en el mesencéfalo de ratas que recibieron seis inyecciones de 100 mg ATR/kg de peso corporal durante dos semanas. Lo que sugiere que esta desregulación del sistema dopaminérgico podría resultar en la disminución del contenido de DA estriatal (Rodríguez et al., 2013).

2.3 Arsénico

2.3.1 EXPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN

El As es un elemento ubicuo presente de manera natural en los suelos, su presencia en diversos mantos acuíferos alrededor del mundo sugieren que la ruta principal de exposición en el humano se produce a través del uso y consumo del agua contaminada con arsenicales. Actualmente se han documentado altas concentraciones de As en diversas regiones del mundo tales como Argentina 0.2 mg As/L (Concha et al., 1998); Taiwan 0.05-1.98 mg As/L (Yen et al., 2007); Bangladesh 0.8 mg As/L (Kinniburgh & Kosmus 2002). El límite permisible de As en agua en nuestro país determinado por la Secretaria de Salud es de 0.025 mg As/L. Sin embargo, se han reportado concentraciones mayores a 0.05 mg As/L en agua de consumo humano en Baja California Sur, Chihuahua (Delicias, Meoqui, Julimes), Coahuila (Torreón, Santa Ana), Nuevo León (Monterrey), Durango (Gómez Palacio), Sonora (Hermosillo,

Guaymas, Obregón), y San Luis Potosí (Villa de la Paz-Matehuala) (Cebrian et al., 1983; Del Razo et al., 1997; Edwards et al., 2010; Garcia-Vargas et al., 1991; Liao et al., 2010; Pimparkar & Bhave 2010).

2.3.2 TOXICOCINÉTICA

El As es un metaloide ampliamente distribuido en el ambiente, presente de manera inorgánica y orgánica en tres diferentes estados de oxidación (-3, +3, +5) (Lee et al., 2002). El As es bien absorbido (80-90%) por el tracto gastrointestinal, de ahí se distribuye a través del cuerpo y es metabolizado a través de una secuencia alternada de metilación y oxidación. La vida media en el organismo es de aproximadamente 10 horas y el 50-80 % del As es excretado a través de la orina en tres días. Por un mecanismo aún desconocido, el As ingresa al sistema nervioso y se acumula en los plexos coroideos. Se ha propuesto que en las células eucariotas las formas pentavalentes de As inorgánico (As^V) penetran a la célula a través del transportador de fosfatos (Hafeman et al., 2005) tanto que las formas de As trivalente (As^{III}) podría ser mediante la familia de proteínas de membrana llamadas aquaporinas (Dhar et al., 2005). Sin embargo, un estudio más reciente mostró que los transportadores de hexosas como los GLUT1 presentes en los eritrocitos y células epiteliales de la barrera hematoencefálica podrían explicar la entrada del arsénico inorgánico (As^I) y de sus especies metiladas hacia el sistema nervioso central (Liu et al., 2006).

Por otro lado, la utilización de la rata como modelo de toxicidad por As ha suscitado diversas críticas, esto es debido a su capacidad para secuestrar el As particularmente las especies metiladas ya que son capturadas por los eritrocitos mediante la unión del As con la hemoglobina. Este mecanismo podría reducir la concentración de As circulante y su distribución por otros órganos (Lu et al., 2004). Sin embargo diversos estudios han reportado la acumulación de As en el cerebro después

de una exposición prolongada (Bardullas et al., 2009; Rodriguez et al., 2010). Lo que sugiere que durante una exposición crónica, el As libre puede alcanzar una concentración estable circulante lo que permitiría su acumulación en otros órganos. Por ejemplo, el grupo de Shila et al. (2005) demostró que durante una exposición a 100 mg As/L durante 60 días el As era capaz de acumularse en distintas estructuras del cerebro en las que destaca el estriado y la corteza (tabla 2) (Shila et al., 2005).

Tabla 2. Distribución del As distintas regiones del cerebro de ratas expuestas a 100 mg As/L durante 60 días. Modificado de Shila et al. 2005.

Contenido de arsénico en regiones del cerebro		
Shila et al. 2005		
	Control	100 mg As/L
Corteza	0.063	0.26
Hipotálamo	0.068	0.21
Estriado	0.082	0.32
Cerebelo	0.047	0.13
Hipocampo	0.054	0.18

2.3.3 METABOLISMO

El As tiene un metabolismo complejo y juega un papel clave en la toxicidad por este metaloide. En la mayoría de los mamíferos incluidos el humano, el As es convertido rápidamente a sus formas metiladas, y es conocido que esta capacidad de metilación puede variar ampliamente entre las poblaciones humanas (Vahter 2007). El As es metabolizado por un proceso secuencial que inicia con la reducción del arsenato (As^{V}) a arsenito (As^{III}) en presencia de glutatión, seguido por una metilación oxidativa en donde participan la S-adenosil metionina (SAM) como donadora del grupo metilo y la enzima arsenitometiltransferasa, la cual cataliza la conversión del As^{III} en ácido monometilarsenico (MMA^{V}). Posteriormente el MMA^{V} es reducido a MMA^{III} para ser

metilado nuevamente a dimetilarsenato DMA^{V} y dimetilasenito DMA^{III} (Lee et al., 2002) (Figura 6). Actualmente se reconoce que el metabolismo del As constituye una vía de desintoxicación debido a su capacidad de formar especies metiladas de arsénico pentavalentes y se considera una vía de bioactivación ya que se ha demostrado que los metabolitos metilados trivalentes del As pueden ejercer un mayor efecto tóxico sobre algunos tipos celulares comparativamente con sus formas inorgánicas (de Burbure et al., 2006; Massrieh et al., 2006).

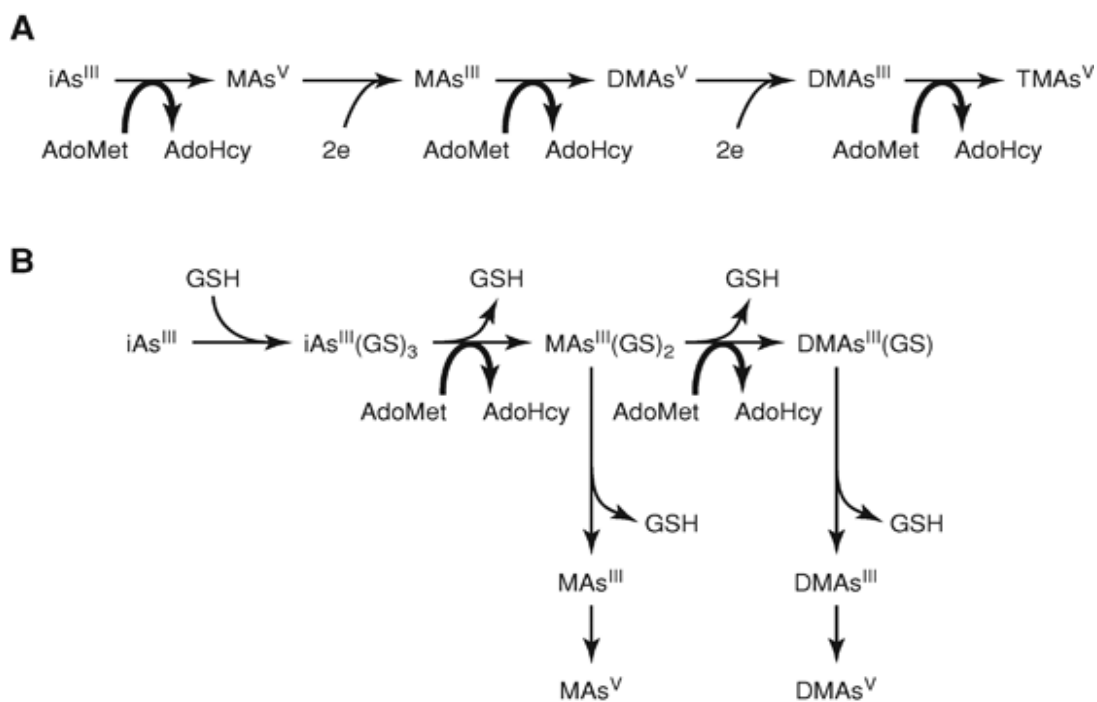


Figura 6. Modelos propuestos para el metabolismo de As. En el modelo A, la metilación oxidativa del As trivalente se alterna con la reducción del As pentavalente. En el modelo B, involucra en secuencia la adición de grupo metilo a las formas de As trivalente, a través de la acción del glutatión (GSH). En ambos modelos la S-adenosilmetionina (AdoMet) funciona como el donador de grupos metilo transformándose en S-adenosilhomocisteina (AdoHcy). Tomado de Thomas et al. 2007.

2.3.4 MECANISMO DE TOXICIDAD DEL ARSÉNICO

A pesar de que el As es una de las sustancias tóxicas más estudiadas, hasta el momento el mecanismo de toxicidad no es bien conocido, sin embargo se han generalizado un par de hipótesis. En principio es necesario dividir los avances obtenidos en la dilucidación del mecanismo de toxicidad en las dos formas predominantes de As. Por un lado se tiene mayor conocimiento del mecanismo de toxicidad del arsenato en su forma pentavalente (As^{V}) el cual es capaz de remplazar al fosfato en múltiples reacciones biológicas dada su similitud estructural (Hughes 2002). Respecto a ello, un experimento clásico mostró que el arsenato era capaz de remplazar el fosfato en la bomba sodio/potasio y el transportador de intercambio aniónico en los eritrocitos (Kenney & Kaplan 1988), posteriormente se demostró que el arsenato disminuía la formación de ATP en múltiples sistemas celulares (Winski & Carter 1998). Por el contrario el mecanismo de toxicidad del arsenito la forma trivalente (As^{III}) del As ha sido más complejo de dilucidar, posiblemente debido a su versatilidad y complejidad metabólica, por lo que potencialmente los mecanismos de toxicidad puedan ser múltiples, selectivos de la dosis y el órgano blanco. Desde hace algunas décadas se demostró que el arsenito es capaz de reaccionar con los grupos tiol de las proteínas (Delnomdedieu et al., 1994; Scott et al., 1993). Por lo que potencialmente la unión del arsenito con grupos tiol críticos en las proteínas puede inhabilitar su función desencadenando alteraciones en el funcionamiento celular. Por otro lado numerosos trabajos reportaron que las formas trivalentes de As como el arsenito y particularmente MMA^{III} es capaz de inhibir a la piruvato deshidrogenasa (PDH), una enzima mitocondrial multimérica del ciclo de Krebs que requiere un grupo ditiol para su funcionamiento (Petrick et al., 2001). La PDH es una enzima clave en el metabolismo energético celular, catalizando la conversión de piruvato a Acetil CoA, molécula precursora en el ciclo del ácido cítrico, por lo que su inhibición podría tener como consecuencia alteraciones en el metabolismo mitocondrial.

Una de las hipótesis más aceptadas sobre el mecanismo de toxicidad del As basado en un gran número de estudios experimentales demuestra que el As es capaz de generar estrés celular tanto *in vitro* (Wang et al., 1996) como *in vivo* (Liu et al., 2001) a través de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en numerosos sistemas celulares; sin embargo, aún no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual el As induce ROS. Se ha sugerido que las mitocondrias pueden ser fuentes de producción de ROS debido a que el aumento de ROS inducido por As el cual es abrogado con la adición de rotenona, un insecticida que tiene la capacidad de inhibir al complejo I mitocondrial (el complejo NADH-ubiquinona reductasa), bloqueando la respiración celular y la generación de ROS (Corsini et al., 1999). Otro mecanismo probable de inducción de ROS fue propuesto en 1997 por el grupo de Yamanaka et al. que demostraron que durante la metilación del arsénico inorgánico a dimetilarsénico se produce la formación de especies intermedias como el radical de dimetilarsénico ($[(CH_3)_2As^*]$) el cual es causante de aumentar el estrés oxidativo celular (Yamanaka et al. 1997). Finalmente, se ha demostrado *in vitro* que el As es capaz de inducir la liberación de cationes como el hierro (Fe^{2+}) de la ferritina (Ahmad et al., 2000) lo que en presencia de O_2^* , y H_2O_2 por reacciones de Fenton puede favorecer la formación del radical hidroxilo (OH^*) (Graf et al., 1984) una molécula altamente oxidante capaz de dañar múltiples sistemas celulares.

2.3.5 EFECTOS DEL ARSÉNICO SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Se han descrito diversos efectos sobre el sistema nervioso central por exposición al As como son: encefalopatía (Díaz et al., 2005), alteraciones en diversos procesos cognitivos como el aprendizaje, memoria y la atención (Rodríguez et al., 2005) así como una disminución significativa en el coeficiente intelectual (Calderon et al., 2001; Carpenter 1987; Tsai et al., 2003). En un caso de exposición ocupacional por el periodo

de un año se presentaron dos casos de encefalopatía, en los cuales los síntomas tendieron a desaparecer tiempo después de terminada la exposición, lo que sugiere que el grado de afectación neurológica está relacionado con la presencia del As en el sistema (Neiger et al., 2004).

Tabla 3. Alteraciones en el sistema nervioso central asociadas a la exposición con As en humanos.

Alteraciones	Vía de exposición	Concentración	Referencia
Alteraciones en la memoria, confusión y sensaciones visuales	Agua de bebida	9000-10900 µg/L	(Franzblau & Lilis 1989)
Disminución del coeficiente intelectual	No se determina una vía de exposición, se asume que son múltiples vías como aire, agua de bebida, alimentos	40.2±0.03 (µg As/g creatina) 9.7±0.02 (µg As/g creatina)	(Calderón et al., 2001)
Irritabilidad, deficiencias en la atención	Agua de bebida	100 µ/L	(Mukherjee et al., 2005)
Disminución en las funciones intelectuales (verbales, escala completa y ejecución)	Agua de bebida	0.094-790 µg/L	(Wasserman et al., 2004)
Disminución en las funciones intelectuales (verbales, escala completa y ejecución)	Agua de bebida	58.1± 33.2 µ/L	(Rosado et al., 2007)

Diversos reportes ubican al sistema nigroestriatal como uno de los blancos tóxicos al As (Bardullas et al., 2009; Gonsebatt et al., 1994; Liu et al., 2006; Mejia et al., 1997). Mejia *et al.* (1997) reportaron un aumento en el contenido de DA y DOPAC en el estriado, después de la administración subaguda por 14 días con 13.8 mg/kg arsenito de sodio en ratones. Otros estudios también han observado estas mismas alteraciones

neuroquímicas mediante diversos modelos toxicológicos (Bardullas et al., 2009; Concha et al., 1998; Chakraborti et al., 2004; Itoh et al., 1990; Rodríguez et al., 2010). Así mismo se han documentado alteraciones en la actividad locomotora espontánea, una conducta motora fuertemente ligada a la modulación por sistema nigroestriatal (Korff et al., 2008; Meyer & Potter 1993). Tal es el caso de lo reportado por Rodríguez et al. (2001) quienes observaron una disminución significativa en el activad locomotora después de la administración de 5-20 mg As/kg intragástrica durante 2-4 semanas en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley. Posteriormente, (Bardullas et al., 2009) reportaron un aumento en la actividad motora en ratones de la cepa C57Bl/6J, expuestos a una dosis de 0.5 mg As/L de agua de bebida, notablemente esta hiperactividad se presentó de manera más importante en las hembras que en los machos. Este último estudio sugiere respecto al realizado por (Rodríguez et al., 2001), que el tiempo, dosis, cepa utilizada, y el género es son factores que podrían influir en la variabilidad que se observa en la conducta y neuroquímica monoaminérgica a través de los estudios cuando los organismos son expuestos al As.

Tabla 4. Alteraciones conductuales asociadas a la exposición de As en modelos animales.

Efecto en la conducta	Dosis y ruta de administración	Tiempo de exposición	Modelo	Referencia
-----------------------	--------------------------------	----------------------	--------	------------

↑ Actividad locomotora	3 mg/kg de peso, intragástrica, trióxido de As.	2 semanas	Ratón	Itoh et al. 1990
↓ Actividad locomotora	10 mg/kg de peso intragástrica, trióxido de As.			
↓ Actividad locomotora	5, 10 ó 20 mg/kg intragástrica, arsenito de sodio	2 a 4 semanas	Rata	Rodríguez et al. 2002
↑ Actividad locomotora	0.05, 0.5, 5 ó 50 mg/L, agua de bebida, arsenito de sodio	4 meses	Ratón	Bardullas et al. 2009

Tabla 5. Alteraciones en la neuroquímica del sistema nervioso asociadas a la exposición de As en modelos animales.

Efecto en la neuroquímica	Dosis y ruta de administración	Tiempo de exposición	Modelo	Referencia
↓ Dopamina en estriado	5 mg/kg de peso, intragástrica, arsenito de sodio	2 meses	Rata	(Nagaraja & Desiraju 1993)
↑ Dopamina en mesencéfalo	20 mg/kg intragástrica, arsenito de sodio	2 a 4 semanas	Rata	(Rodríguez et al. 2001)
↑ Dopamina en estriado	50 mg/L, agua de bebida, arsenito de sodio	12 meses	Rata	(Rodríguez et al. 2010)
↓ Dopamina en estriado	0.05, 0.5, 5 y 50 mg/kg, agua de bebida, arsenito de sodio	4 meses	Ratón	(Bardullas et al. 2009)

2.4 Toxicología de mezclas químicas

2.4.1 TIPOS DE INTERACCIÓN TOXICOLÓGICA

La interacción toxicológica puede definirse como la combinación de dos o más productos químicos, biológicos y agentes físicos que resulta en una respuesta biológica cuantitativamente alterada en relación con que se predeciría a partir de un solo agente. Una causa de confusión en la literatura respecto a los tipos de interacción toxicológica, es debido a las múltiples definiciones dada por los autores. Sin embargo, la mayoría de los autores están de acuerdo en que hay al menos 3 tipos de interacción entre cualquier agente químico. Berenbaum et al. (1989) define como la interacción cero cuando se espera que el efecto de la combinación sea la suma de los agentes individuales, a lo que comúnmente se nombra aditividad o adición. El efecto sinérgico se produce cuando el efecto combinado de ambos productos químicos es mucho mayor que la suma esperada de los agentes individuales. El antagonismo resulta cuando la toxicidad de dos agentes químicos administrados conjuntamente es menor de lo que cabría esperar de la suma de las sustancias individuales (Berenbaum 1989). Sin embargo las interacciones se definen como las desviaciones de los resultados esperados sobre la base de aditividad, por tal motivo Filov et al. (1979) [citado en (McCarty & Borgert 2006)], propuso utilizar únicamente el término de aditividad. Los resultados producto de la combinación de químicos son referidos como aditivo, más-que-aditivo o menos-que-aditivo dependiendo si la suma de los efectos individuales, es igual, mayor o menor.

2.4.2 ESTUDIOS DE MEZCLAS QUÍMICA EN MODELOS ANIMALES

Existe un número muy limitado de estudios que hayan evaluado el efecto tóxico de la interacción entre metales y pesticidas, y menor es aun los que se han enfocado sobre el sistema nervioso. Una serie de estudios llevados a cabo en ratones C57BL/6 expuestos a 10 mg/kg de paraquat (PQ) y 30 mg/kg de Maneb (MN) por 6 semanas (Thiruchelvam et al., 2000; Thiruchelvam et al., 2000) muestran que la administración combinada, y no las dosis individuales, producen diversas alteraciones relacionadas con el sistema dopaminérgico, como la disminución de la actividad ambulatoria, niveles de DA, DOPAC y HVA en estriado, así como la pérdida de neuronas positivas para TH en SNpc. Se ha propuesto que una posible razón por la que se observan estos efectos con la combinación de PQ + MN y no individualmente, podría estar basado en un efecto sinérgico entre ambas sustancias. Por otro lado son también escasos los estudios sobre el efecto de las mezclas de metales sobre el sistema monoaminérgico, a este respecto, después la administración subaguda por 14 días con 13.8 mg As/kg como arsenito de sodio y 116 mg de plomo/kg/día en ratones reportaron un aumento respecto a los tratamientos individuales en el contenido de serotonina en el mesencéfalo y corteza frontal del 100 y 90%, respectivamente. Lo que indica que selectivamente la mezclas de estos dos metales tiene la capacidad de generar una mayor alteración respecto a sus dosis individuales (Mejia et al., 1997). Otros estudios reportan el efecto de la coexposición al As más un pesticida (endosulfan o malation) sobre el sistema de enzimas de biotransformación, en este estudio, el doble tratamiento no produjo mayores alteraciones respecto a las dosis individuales en la mayoría de los parámetros analizados, por ejemplo, el doble tratamiento de As (4 ó 40 mg) más el pesticida malation (50 ó 500 mg) por 28 días, no generó ningún efecto sobre enzimas del sistema de biotransformación I y II incluso con las dosis más altas; solo la exposición a las dosis individuales disminuía de manera importante los niveles en plasma enzimas de detoxificación en sangre (Naraharisetti et al., 2008). En otro estudio del mismo grupo realizado en gallinas mostró que la coexposición a 3.7 mg As/L y 30 mg/L de endosulfan

por 60 días, contrario a lo esperado, las dosis individuales aumentaron los niveles de glucosa y hemoglobina glicosilada, mientras que el doble tratamiento los disminuyó, sugiriendo un efecto antagónico. En otras variables como la actividad de la ATPasa, no se presentó algún efecto por el tratamiento, lo que nos indica que la complejidad en la interacción entre ambas sustancias no permite predecir el efecto adverso que causarán (Naraharisetti et al., 2009). Finalmente solo dos estudios han evaluado los efectos de la exposición simultánea a ATR+As en las células no neuronales. En un primer estudio la exposición a la ATR potenció fuertemente la citotoxicidad inducida por trióxido-arsénico y la activación transcripcional de genes relacionados con el estrés celular en una línea celular humana de carcinoma de hígado (HepG2) coexpuesta *in vitro* a dosis de 0.3 -5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de trióxido de arsénico + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ATR en 1% DMSO durante 24 horas. (Tchounwou et al., 2001). Recientemente en un estudio *in vivo* de Cimino-Real et al. 2008, demostró que la coexposición a ATR+As incremento de manera sinérgica el porcentaje de colonias formadoras de unidades de granulocitos/macrofagos (CFU-GM) extraídos de ratones CD1 coexpuestos a 1mg/L arsenato + 1 mg/L de ATR durante 4 meses, además la coexposición tuvo importantes efectos en el aumento de la expresión de ARNm de receptores de estrógenos beta ($\text{ER}\beta$) (Cimino-Reale et al., 2008).

3. IMPACTO Y RELEVANCIA

Dada la abundancia de la ATR y el As en el medio ambiente, es importante evaluar si la exposición simultánea y crónica de As inorgánico y ATR, provocará mayores alteraciones con respecto a las dosis individuales en el sistema nigroestriatal, lo que podría constituir un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

4. HIPÓTESIS

El efecto neurotóxico de la exposición crónica y simultánea al As inorgánico y ATR será mayor con respecto a la exposición a las sustancias individuales.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar los efectos de la exposición a arsenito de sodio y ATR en el desempeño en tareas conductuales y motoras relacionadas con el sistema nigrostriatal.
2. Evaluar los efectos por la exposición crónica a arsenito de sodio y ATR en la neuroquímica dopaminérgica estriatal.
3. Evaluar los efectos de la exposición a arsenito de sodio y ATR en número de células positivas a TH+ como un indicador de muerte celular en la sustancia nigra pars compacta.
4. Evaluar los efectos de la exposición crónica a As y ATR en el estatus oxidante en estriado utilizando la técnica de citocromo oxidasa como marcador de daño celular.

6. ESTRATEGIA GENERAL Y METODOLOGÍA

6.1 Descripción del diseño experimental

Ratas macho de edad postnatal 21 (destete) de la cepa Sprague-Dawley se trataron con As (agua de bebida), ATR (comida) y la combinación de ambos de manera crónica (durante doce meses). La concentración de ATR fue seleccionada en base a un trabajo publicado por nuestro grupo (Bardullas et al., 2011). En ese estudio 10 mg ATR/kg fue utilizada como la concentración mínima que mostro efectos tóxicos durante 1 año de exposición. Esta concentración mínima efectiva nos permitió la posibilidad de detectar la presencia de mayores efectos tóxicos cuando es administrada de manera conjunta con el As, además de fortalecer los hallazgos anteriores con la replicación de los datos. Por otro lado, se utilizaron dos concentraciones de arsénico, ambas habían sido reportadas previamente por nuestro grupo en modelos murinos (Bardullas et al., 2011; Rodriguez et al., 2010) La concentración baja de arsénico de 0.5 mg As/L se seleccionó principalmente porque representa una concentración relevante al medio ambiente, en sitios con alta contaminación de arsénico. La concentración alta de As de 50 mg As/L fue seleccionada para contrastar los resultados con la dosis menor de As además de asegurar la aparición de efectos tóxicos observables. Es importante mencionar que para ambas concentraciones, los animales no desarrollan enfermedades sistémicas mayores durante una exposición crónica.

Cada mes se evaluó la actividad locomotora y a los 11 meses de tratamiento se iniciaron las pruebas de aprendizaje. Posteriormente las ratas estuvieron en ayuno para el sacrificio el cual se realizó por decapitación. Durante el cual se recolectó el plasma para la realización de las pruebas bioquímicas de daño muscular y hepático, utilizando

como marcadores creatina cinasa (CK), lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato transaminasa (AST) y glucosa. La disección del cerebro se realizó con un corte coronal del cerebro en la parte media, la porción caudal se utilizó para el análisis histológico del mesencéfalo, la porción rostral fue utilizado para la determinación de DA en un hemiestriado y en el restante se determinó los niveles de transportadores de proteína DAT. El diseño experimental se muestra en la figura 7.

6.2 Sujetos

Se utilizaron 60 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.

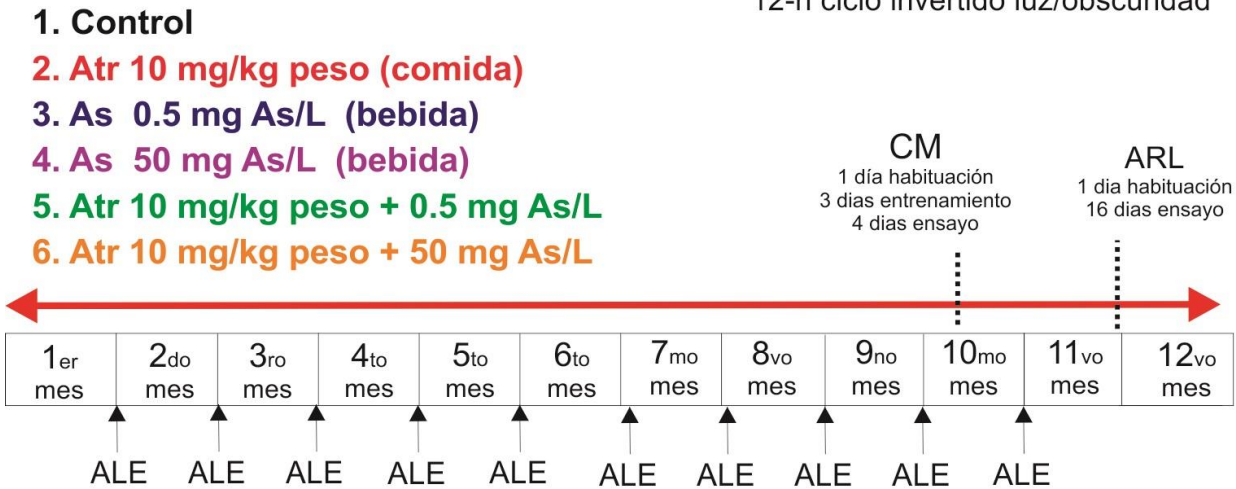
Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo siguieron las regulaciones establecidas por “El reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación de la Salud” de la Secretaría de Salud (publicada en enero de 1987) y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999 “Especificaciones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

6.3 Preparación de croquetas con atrazina

Las croquetas se preparan mezclando el alimento de purina (Rat Chow formula 5001, St. Luis, MO, EUA) con agua desionizada para formar una mezcla homogénea a la cual se le añadió la ATR obtenida de ChemService (West Chester, PA, EUA). Posteriormente, la mezcla se corta en trozos y es secada al sol o en un horno a 50-60 °C. Para el grupo control se utilizó el alimento normal (RatChow formula 5001).

Ratas Sprague-Dawley DPN 21

12-h ciclo invertido luz/obscuridad



ALE: Actividad Locomotora Espontánea.
 CM: Coordinación motora
 ARL: Aprendizaje de respuesta y lugar

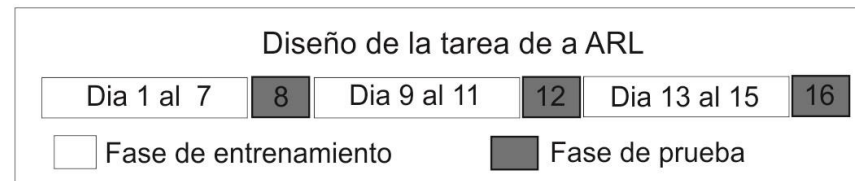
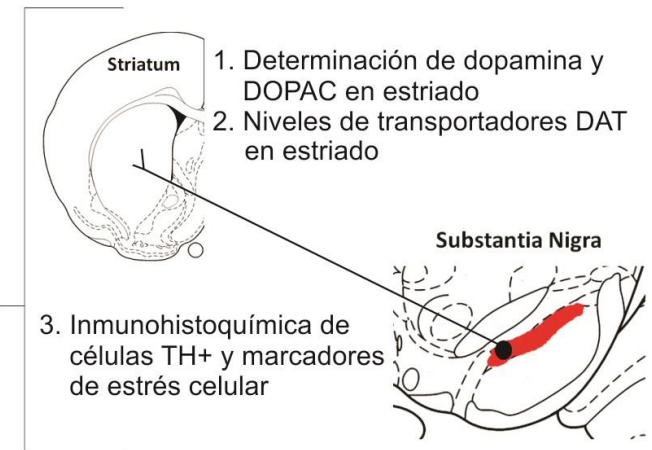


Figura 7. Diseño experimental general. En el inserto se muestra el diseño de la tarea de aprendizaje de respuesta y lugar.

6.4 Preparación de agua de bebida con As

El agua con As en dosis de 0.5 mg As/L se elaboró diariamente mientras que el agua de 50 mg As/L se preparó semanalmente. Las soluciones de As se prepararon a partir de un solución madre de 1000 mg As/L de arsenito de sodio disuelto en agua desionizada. El pH de las soluciones fue ajustado a 7.0 para minimizar oxidación de arsenito a arsenato. El resto de los grupos recibieron agua desionizada a pH 7.0. El consumo de agua fue medido durante los últimos tres meses de exposición

6.5 Actividad locomotora espontánea

La actividad locomotora espontanea 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, EUA)] rodeadas por dos niveles de sensores infrarrojos los cuales detectaban los movimientos del animal. Estos datos son transmitidos a una interface 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., 2009). Los tipos de variables analizadas en este estudio se definen de la siguiente manera:

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.

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

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

6.6 Coordinación motora

Las ratas se entrenaron utilizando el aparato IITC 755 ROTOROD (San Diego, CA, EUA) el cual consiste en una estructura metálica con 5 cilindros internos de 3.75" de diámetro accionado por un motor; al cilindro se ha adherido una superficie rugosa que le permitió al animal sujetarse. El aparato proporciona el tiempo al cual el animal cae, así como la velocidad del cilindro en revoluciones por minuto (rpm). Después permitir al animal familiarizarse al cilindro sin movimiento por 2 minutos, los animales fueron entrenados durante tres días con dos sesiones diarias de permanecer en el cilindro giratorio, mientras que aceleraba de 4 a 20 rpm durante 60 segundos hasta estandarizar que todos los animales terminaran la prueba por lo menos en una ocasión. Los animales que al término de las sesiones no cumplieron con este criterio fueron descartados. Después de la fase de entrenamiento, los animales fueron probados por cinco días consecutivos con una sesión diaria a la misma hora (12:00 pm). Para cada ensayo de la barra giratoria se programó para acelerar de 10 a 45 rpm en 180 segundos, y el tiempo total de evaluación fue de 240 segundos. Al final se registró la latencia de caída para cada animal.

6.7 Tarea de aprendizaje de respuesta y lugar

Para valorar el efecto de la exposición al As y la ATR en una tarea cognitiva que involucra la participación de la vía nigroestriatal se utilizó la prueba del laberinto en cruz, el cual fue realizado durante 16 días consecutivos (Packard & McGaugh 1996).

Aparato. El laberinto radial fue modificado y se colocaron solo 4 brazos de acrílico con un área octagonal que une a los 4 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.

La prueba consistió en dos fases, durante la fase de entrenamiento los animales iniciaban en el brazo sur y se le reforzaba el brazo oeste. Cada animal recibía 2 ensayos cada día reforzando el mismo brazo. Durante el primer día de entrenamiento si los animales entraban al brazo no reforzado (brazo este) se les permitía rectificar. En los días subsecuentes se contabilizaba como error y se sacaba al animal sin obtener el reforzador. Durante toda la prueba se colocaron claves espaciales distribuidas en el cuarto. El primer día de prueba se realizó en el día 8 consecutivo. La prueba se realizó colocando el animal el brazo opuesto de inicio (norte) y registrando en un único ensayo si entraban al brazo reforzado (oeste) o no reforzado (este). Si el animal elegía el oeste se registraba como aprendizaje de *lugar*, si por el contrario prefería el brazo este se registraba como aprendizaje de *respuesta*. El día 9 se repetía el procedimiento de entrenamiento de la misma forma como se describió, y así hasta el próximo día de prueba en el día 12 y 16.



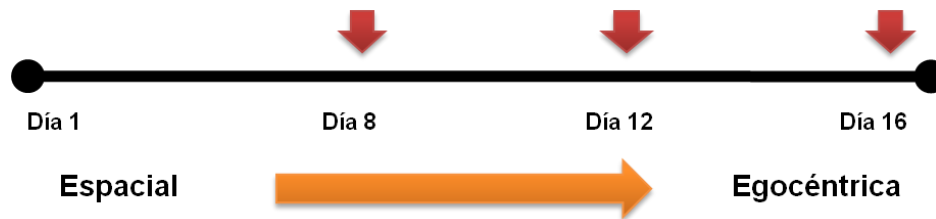


Figura 8. Diseño de la tarea de aprendizaje de respuesta y lugar. A: Fase de entrenamiento en donde los animales ingresan al laberinto por el lado sur y deben de girar a lado izquierdo donde se encuentra el reforzador. B: Durante la fase de prueba, el reforzador permanece en el lado izquierdo pero los animales ingresan por el lado norte del laberinto, según giren hacia lado izquierdo o derecho se considera aprendizaje de lugar o de respuesta.

6.8 Marcadores bioquímicos y de daño muscular

Para la determinación de aspartato transaminasa (AST) (WeinerLab, Rosario, Ar), creatina cinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH) (STANBIO, Boerne, TX, EUA) se utilizaron los kits con las especificaciones del fabricante. Brevemente, por cada muestra de plasma se coloca 1.0 mL del reactivo de trabajo dentro de una celda de 1 cm de paso luz, y se incuba a 37°C por 3 minutos. Posteriormente se adiciona 50 µL de la muestra a su respectivo tubo, se incuba por un 1-2 minutos a 37°C. Se registra el incremento en la absorbancia a intervalos de 60 seg ($\Delta A/\text{min}$) durante 3 minutos. Los valores se obtienen con base al “coeficiente de extinción de absortividad micromolar” de NADH a 340 nm (0.00622) utilizado para las tres enzimas. Una unidad por litro (U/L) de

actividad de LDH, AST o CK es la cantidad de enzima que produce un $\mu\text{mol/L}$ de NADH por minuto.

6.9 Determinación de Dopamina y su metabolito DOPAC

6.9.1 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 centrifugó (10,000 rpm x 30 min) y se recuperó el sobrenadante el cual fue almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. El precipitado se digirió con NaOH 0.5 M para posteriormente se determinó el contenido de proteínas mediante la técnica de lowry (Lowry et al., 1951).

6.9.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS.

La DA y su metabolito DOPAC se cuantificaron mediante el HPLC con detección electroquímica como fue descrito por (Bardullas et al., 2009). Brevemente, se separan la DA y el DOPAC en una columna C-18 (Grace Davison Discovery Sciences, Deerfield, IL, EUA) rellena con un material absorbente para catecolaminas (3 μm 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, San José, CA. EUA) 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, West Lafayette, IN, EUA) 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 Total Chrom Navigator versión 6.3.1.0504 (Perkin Elmer). El contenido de DA y DOPAC se expresan en ng/mg de proteína de tejido.

6.10 Técnicas histológicas

Se utilizaron de 4 a 5 cerebros previamente fijados en paraformaldehído seleccionados aleatoriamente de cada grupo, de los cuales se obtuvieron secciones coronales seriadas (figura 9) de 30 μm iniciando aproximadamente de Bregma -4.80 a -6.3. Las secciones dirigidas al análisis inmunohistoquímico fueron preservados en anticongelante y almacenadas -20 $^{\circ}\text{C}$. Otra serie de secciones fueron coladas en PB 0.1 M, pH 7.4, las cuales fueron procesadas inmediatamente para los estudios de histoquímica para citocromo oxidasa.

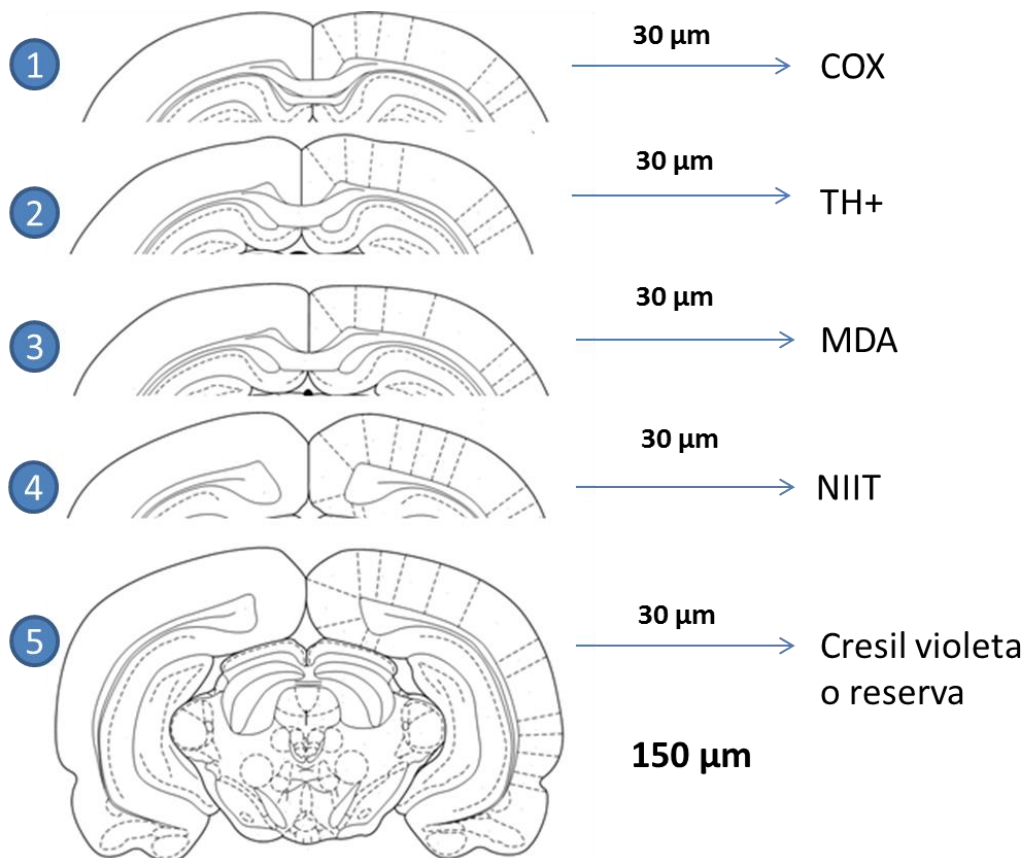


Figura 9. Secciones coronales seriadas de Bregma -4.80 a -6.3 y seleccionadas aleatoriamente para las diferentes técnicas histológicas.

6.10.1 HISTOQUÍMICA DE CITOCROMO OXIDASA

Inmediatamente antes de su uso se incubó durante 30 minutos a 37 °C una solución conteniendo: sacarosa, 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y 5 mg de citocromo oxidasa (Gonzalez-Lima & Garrosa 1991). Las secciones cerebrales fueron simultáneamente incubadas toda la noche bajo las mismas condiciones, en el mismo plato. Finalmente se lavaron tres veces con agua destilada para detener la reacción, los cortes se deshidrataron con etanol, y se aclararon con xileno y fueron montados con Permout™ (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ). Las secciones fueron analizadas por densitometría óptica con un microscopio Leica DMLB microscope (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany).

6.10.2 INMUNOHISTOQUÍMICA DE CÉLULAS TH+ Y MALONDIALDEHIDO

La técnica de inmunohistoquímica tanto para TH como malondialdehido (MDA) se realizó mediante el método descrito anteriormente (Hoffman et al., 2008). Las secciones fueron lavadas seis veces por 10 minutos con buffer salino de fosfato de potasio (KPBS) 0.5 M a pH 7.4. A continuación las secciones fueron expuestas por 15 minutos a H₂O₂ (30 %) y posteriormente lavadas con KPBS tres veces más. Las secciones fueron incubadas por 72 horas a 4 °C en agitación constante en KPBS-triton X-100 y 3% de suero de caballo como bloqueador más su respectivo anticuerpo primario anti-TH (dilución 1:5000) de conejo (Chemicon, Tamecula, CA, EUA) o MDA (Alpha Diagnostic, San Antonio, TX, EUA) (dilución 1:300). Seguido de ello, las secciones fueron incubadas con el segundo anticuerpo anti-conejo (dil 1:800) por una hora a temperatura ambiente. Las secciones fueron lavadas e incubadas con una solución de avidina-biotina de Vectastain ABC reagents (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por 30 minutos. Posteriormente se revelaron con de 3–3'-3-diaminobencidina y H₂O₂ en acetato de sodio 0.175 M. Las secciones fueron analizadas utilizando un microscopio LEICA DMLB brevemente se explica el procedimiento. Las células TH+ fueron contadas manualmente a un aumento de 5X de ambos lados de la SN. Se analizaron de 6-9

secciones de las regiones rostral, caudal y medial de la sustancia nigra, que corresponden a Bregma -4.80 a -6.3 como se muestra en la figura 10. Para la identificación de la SNpc a diferentes niveles del mesencéfalo se utilizaron como referencia artículos previos que muestran la citoarquitectura de esta región (Baquet et al., 2009; McRitchie et al., 1996; Xavier et al., 2005).

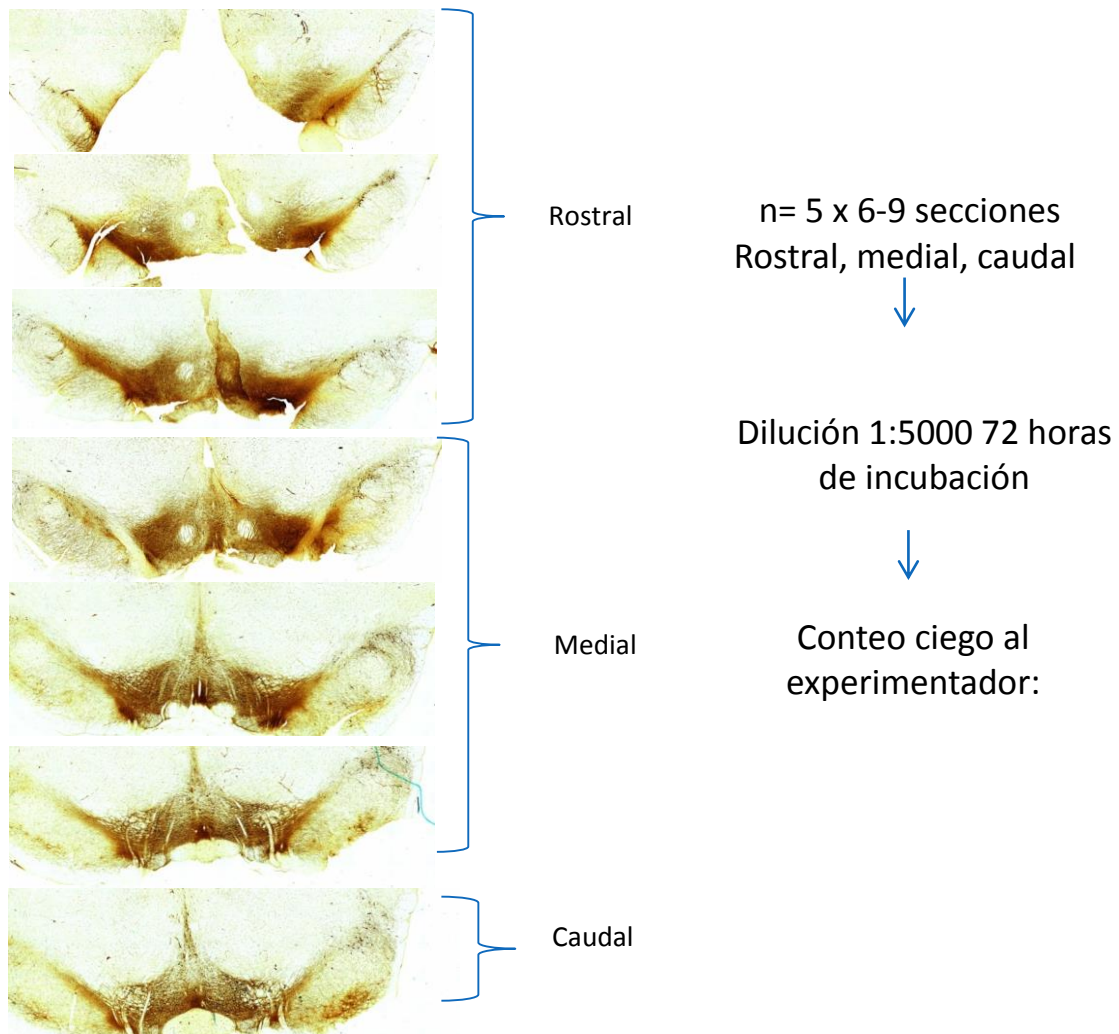


Figura 10. Para la cuantificación de células TH+ se tomaron cortes de la SNpc a diferentes niveles.

6.11 Determinación de transportadores de DA por western blot

El cuerpo estriado congelado se homogeneizó en un Buffer (320 mM de sacarosa, 5 mM de HEPES, pH= 7.4) durante 3 segundos en hielo. Las concentraciones de proteína se determinaron utilizando el kit de proteínas DC de Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). Los homogeneizados fueron solubilizados en buffer de Laemmli 2X con DTT. Se utilizaron 5 ug de proteínas separadas en un gel al 10% de tris-bis utilizando corriente constante (100 V). Las proteínas separadas se transfirieron electroforéticamente a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) durante 1 h con el sistema de transferencia semiseco de (Bio-Rad). Las membranas de PVDF se incubaron durante 1 hora con buffer de fosfato que contiene 1 % de TBS-Tween y Blotto al 7.5 %, posteriormente la membrana fue incubada durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo de transportador de DA anti-DAT (1:1000, Chemicon, Temecula, CA, EUA) y anti-tubulina (1:3000, DSHB Universidad de Iowa, Iowa City, EE.UU.) Las membranas se lavaron con TBS-Tween tres veces durante 15 min a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano en 1% TBS-Tween y Blotto al 5% durante 2 h. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron por autorradiografía quimioluminiscente (kit ECL, Amersham, Buckinghamshir, Reino Unido), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las membranas se visualizaron con Molecular Dynamics STORM 860 escáner (General Electric, Sunnyvale, CA, EUA).

6.12 Análisis estadístico

La comparación estadística de los valores concernientes al peso, parámetros bioquímicos (glucosa AST, LDH y CK), 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 prueba de aprendizaje de respuesta y lugar se utilizaron tablas de contingencia y se aplicó prueba de chi-cuadrada.

7. RESULTADOS

7.1 PESO CORPORAL

El registro del peso corporal de las ratas durante los 12 meses de exposición no mostró diferencias significativas en cuanto a la ganancia de peso en los grupos tratados con respecto al grupo control, solo se observó un efecto significativo de tiempo [F(13,546) = 1090, $p < 0.0001$] indicando que los animales incrementaron su peso con el tiempo. Es necesario considerar que los grupos de roedores una vez que alcanzaron los 300 g se mantuvieron en este peso mediante la restricción alimenticia durante la duración de este experimento.

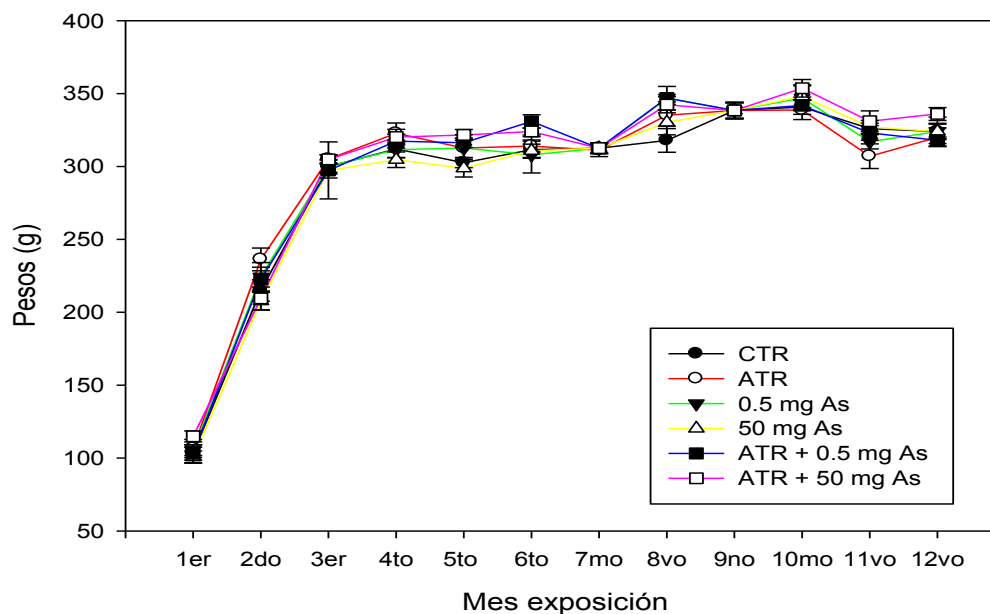


Figura 11. Peso corporal del primer al doceavo mes de exposición registrados en los animales tratados de manera individual con 10 mg ATR/kg, 0.5 mg As/L, 50 mg As/L y las respectivas combinaciones.

7.2 CONSUMO DE AGUA

El consumo de agua entre todos los grupos se evaluó en los meses diez y doce de exposición. Se descartó el onceavo mes dado que los animales estuvieron en diferentes condiciones experimentales. El análisis estadístico mostró un efecto de grupo [F (5,39) = 12.2, $p < 0.001$], el análisis LSD de Fisher mostró que los grupos tratados con la dosis individual de 50 mg As/L y ATR+ 50 mg As/L consumieron aproximadamente la mitad de agua respecto al control, por el contrario los grupos tratado con la dosis baja de As 0.5 mg As/L ATR+ 0.5 mg As/L tuvieron un mayor consumo de agua.

Tabla 6. Consumo diario de agua mes 10 y 12 de exposición.

Consumo diario de agua (mL)	10vo	12vo
Control	42 ± 2.0	55 ± 4.5
10 mg ATR/kg	51 ± 2.2*	52 ± 2.3
0.5 mg As/L	56 ± 1*	72 ± 6.2*
50 mg As/L	35 ± 3.1*	40 ± 4.4*
ATR + 0.5 mg As/L	57 ± 3.0*	62 ± 5.2*
ATR + 50 mg As/L	33 ± 1.8*	38 ± 2.5*
Los valores son medias ± EEM (n=8)		

7.3 MARCADORES BIOQUÍMICOS Y DE DAÑO MUSCULAR

El análisis ANDEVA reveló un efecto significativo de grupo [F (5,50) = 2.76, $p < 0.05$] sobre los niveles de glucosa. El análisis LSD de Fisher mostró una reducción de los niveles de glucosa plasmática en los grupos ATR + 0.5 As y ATR + 50 As. Para los marcadores de daño muscular se observó un efecto significativo de grupo sobre la LDH [F (5,42) = 2.65, $p < 0.05$], el análisis posthoc reveló una disminución en la concentración plasmática de la LDH para los grupos ATR, 0.5 As, ATR + 0.5 As, ATR + 50 As. Mientras

que los tratamientos no generaron efectos significativos con respecto al grupo control [$F(5,47) = 0.980 - 0.885, p > 0.05$] para las concentraciones de CK y AST.

Tabla 7. Marcadores bioquímicos y de daño muscular.

	CK	AST	LDH	Glucosa
Control	336 ± 77	154 ± 24	727 ± 116	95 ± 4
10 mg ATR/kg	239 ± 71	125 ± 20	419 ± 90*	90 ± 2
0.5 mg As/L	181 ± 40*	131 ± 13	441 ± 61*	92 ± 3
50 mg As/L	242 ± 56	128 ± 15	572 ± 95	96 ± 2
ATR + 0.5 mg As/L	321 ± 39	122 ± 6	432 ± 55*	87 ± 2*
ATR + 50 mg As/L	305 ± 71	108 ± 14	302 ± 112*	86 ± 2*

Los valores son medias ± EEM. (n=8) valores arbitrarios. Abrev. CK, Creatina cinasa; AST, Aspartato transaminasa; LDH, lactato deshidrogenasa.

7.4 ACTIVIDAD LOCOMOTORA ESPONTÁNEA

La actividad locomotora espontánea fue evaluada mensualmente a través de 12 meses de exposición. De los múltiples parámetros que proporciona el sistema automatizado se seleccionó a la distancia total (DT) y la actividad vertical (AV) como los parámetros que mejor representan la actividad locomotora en general. Es importante mencionar que cada prueba se realizó registrando la actividad de todos los individuos durante las 24 horas del ciclo luz-obscuridad. Sin embargo el efecto fue observado únicamente en la fase de obscuridad, por lo que solo se incluyó esta fase para el análisis estadístico, las 12 horas del ciclo a través de los últimos 6 meses de exposición.

Para el parámetro DT se observó un efecto significativo de grupo [$F(5,33) = 3.85, p < 0.05$]. Posterior a ello se realizó un ANDEVA por cada mes de exposición seguido de un análisis poshoc LSD de Fisher, este análisis reveló que en el mes 6, 8 y 10 el grupo de 50 mg As/L muestra una disminución en la actividad locomotora [$F(5,33) = 3.45 - 3.83, p < 0.05$]. Finalmente para la variable **AV**, se observó un efecto de grupo del mes 6 al 10 de exposición [$F(5,34) = 2.96, p < 0.05$].

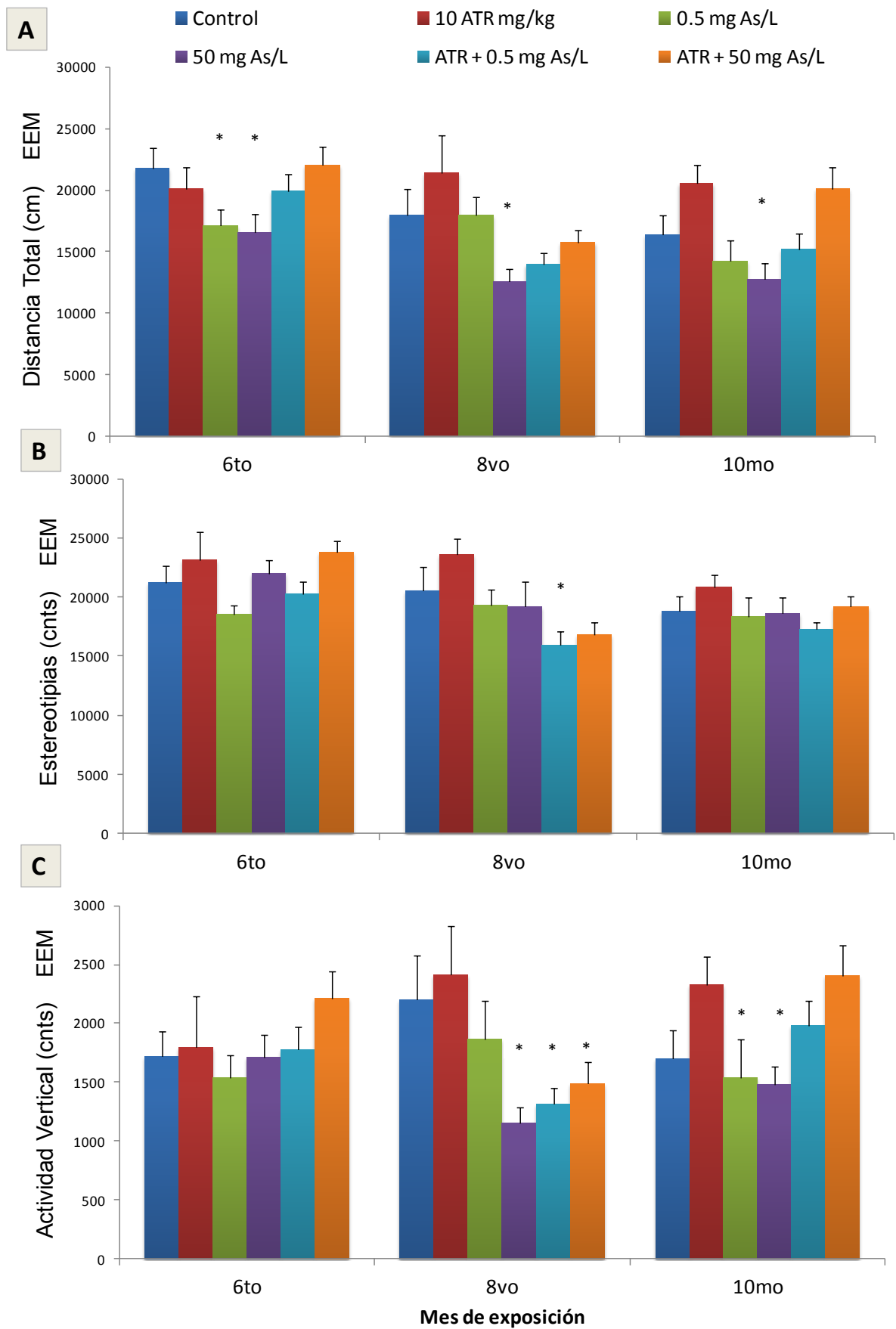


Figura 12. Actividad locomotora espontánea del sexto al décimo mes de exposición registrado durante las 12 horas de la fase de oscuridad entre los diferentes grupos. A distancia total. B Estereotipias. C Actividad vertical

7.5 COORDINACIÓN MOTORA

En la evaluación de la coordinación motora registrada a los 10 meses de exposición en un paradigma de aceleración, se encontró que todos los tratamientos tanto de manera individual como la coexposición a ATR y a As de manera individual y simultánea tuvieron una latencia de caída significativamente menor con respecto al grupo control [$F(5,43) = 5.19, p < 0.001$] a lo largo de 5 sesiones vespertinas. Un análisis post hoc con LSD de Fisher reveló un efecto significativo a partir del tercer ensayo.

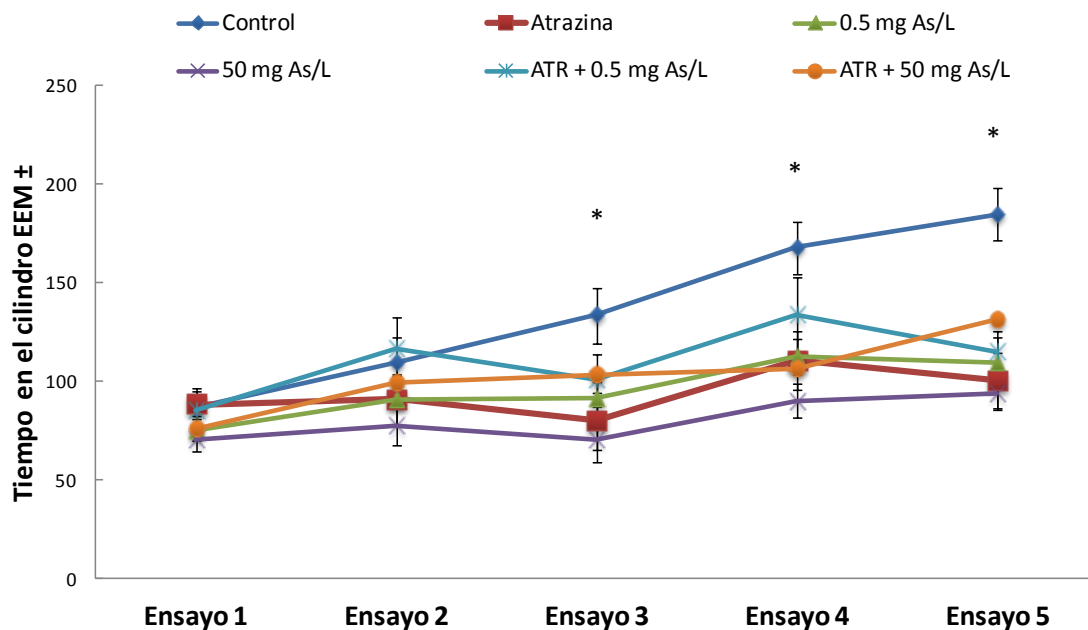


Figura 13. Tiempo de permanencia en el cilindro en 5 ensayos consecutivos en el décimo mes de exposición. La exposición al As y ATR de manera individual o simultánea disminuyó el tiempo en el cilindro respecto al control a partir del 3 ensayo. Cada símbolo representa el promedio de latencia. * Diferente del control $p < 0.001$.

7.6 TAREA DE APRENDIZAJE Y MEMORIA

La tarea de aprendizaje de lugar o de respuesta utilizada para evaluar la integridad de la vía nigroestriatal en tareas de aprendizaje y memoria se llevó a cabo en dos fases durante 16 días consecutivos, en el día 8, 12 y 16 se realizaron las pruebas correspondientes para evaluar la tarea, el resto de los días se denominan fase de entrenamiento, la cual está encaminada a mejorar el porcentaje de aciertos de los grupos evaluados.

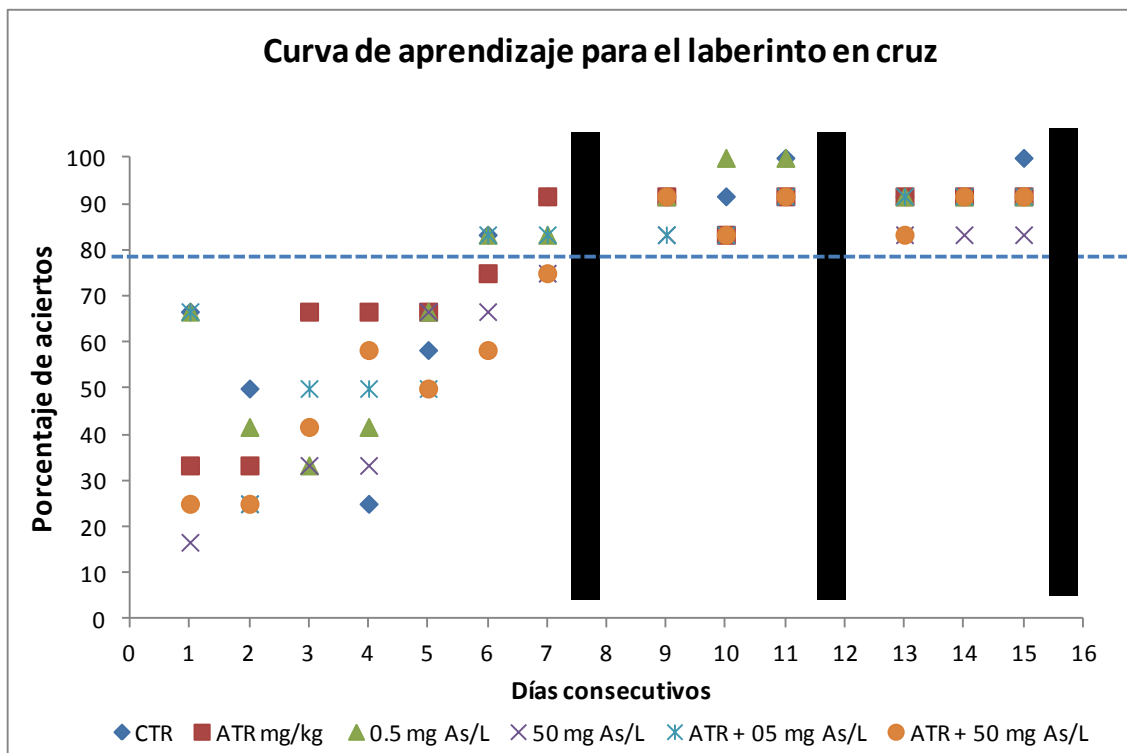


Figura 14. Curva de aprendizaje para el laberinto en cruz, en esta gráfica se muestra como la mayoría de los grupos alcanzaron el criterio mínimo de aciertos (80%) antes del primer día de prueba, ya en el segundo periodo de entrenamiento a partir del día 9 todos los grupos alcanzaron el criterio mínimo de aciertos. Los individuos que no alcanzaron el criterio mínimo, fueron descartados para la tarea (n=6).

La fase de prueba no mostró resultados significativos utilizando una chi-cuadrada a través de las tres pruebas $X^2 = 1.14$ o entre cada prueba $X^2 = 0 - 2.17$. En los grupos tratados individualmente y coexpuestos a ATR+As

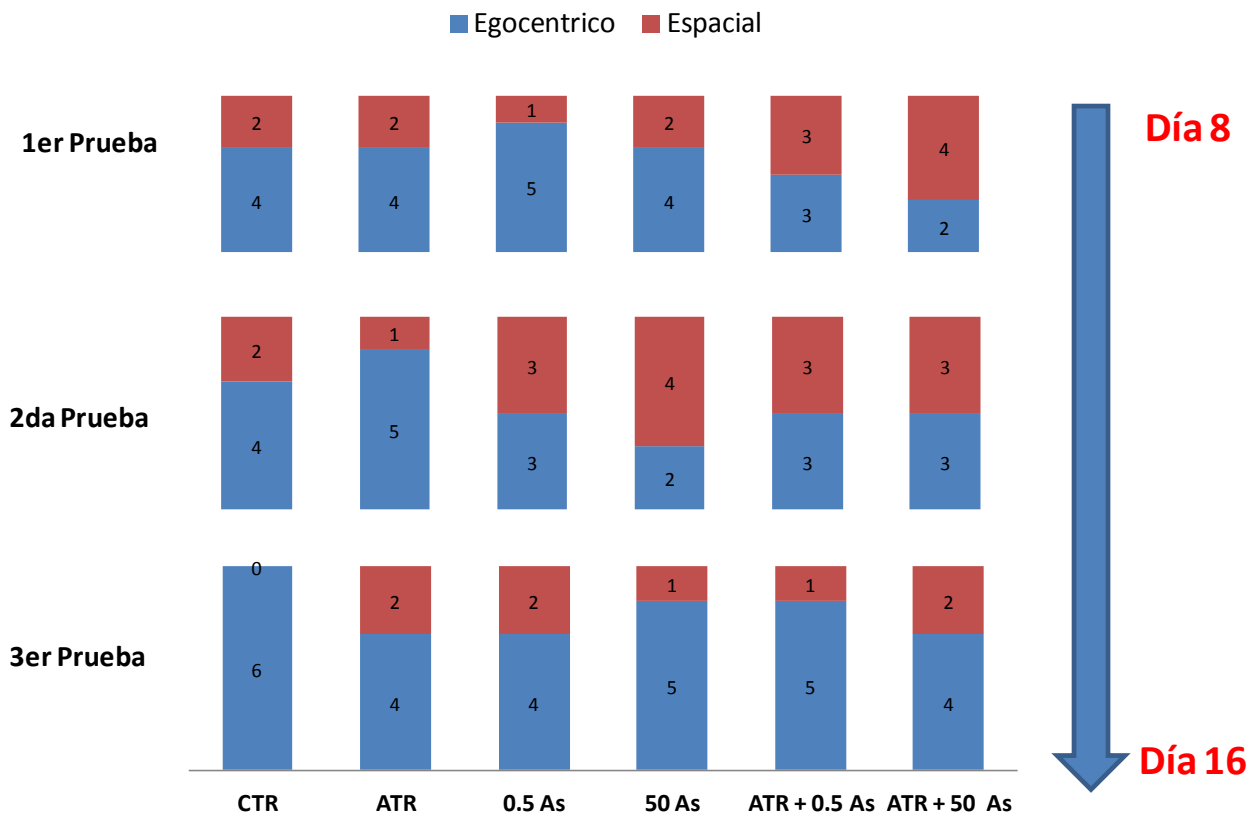


Figura 15. Número de animales por cada grupo que respondieron al aprendizaje egocéntrico o espacial en las tres pruebas en los días 8, 12 y 16 respectivamente.

7.7. DETERMINACIÓN DE DOPAMINA Y DOPAC

Al concluir los 12 meses de exposición se determinó la concentración de DA y su metabolito DOPAC en estriado con el fin relacionar los cambios conductuales observados con posibles alteraciones neuroquímicas. Se observó una disminución significativa en el contenido de DA con respecto al control para los grupos: ATR, 0.5 mg As/L, ATR + 0.5 mg As/L y ATR + 50 mg As/L [$F(5, 45) = 4.49$, $p < 0.01$], mientras que para DOPAC y el recambio DOPAC/DA no se

observaron alteraciones en los grupos tratados con respecto al control [F (5,46) = 0.509, $p > 0.05$] y [F (5,46) = 0.195, $p > 0.05$], respectivamente.

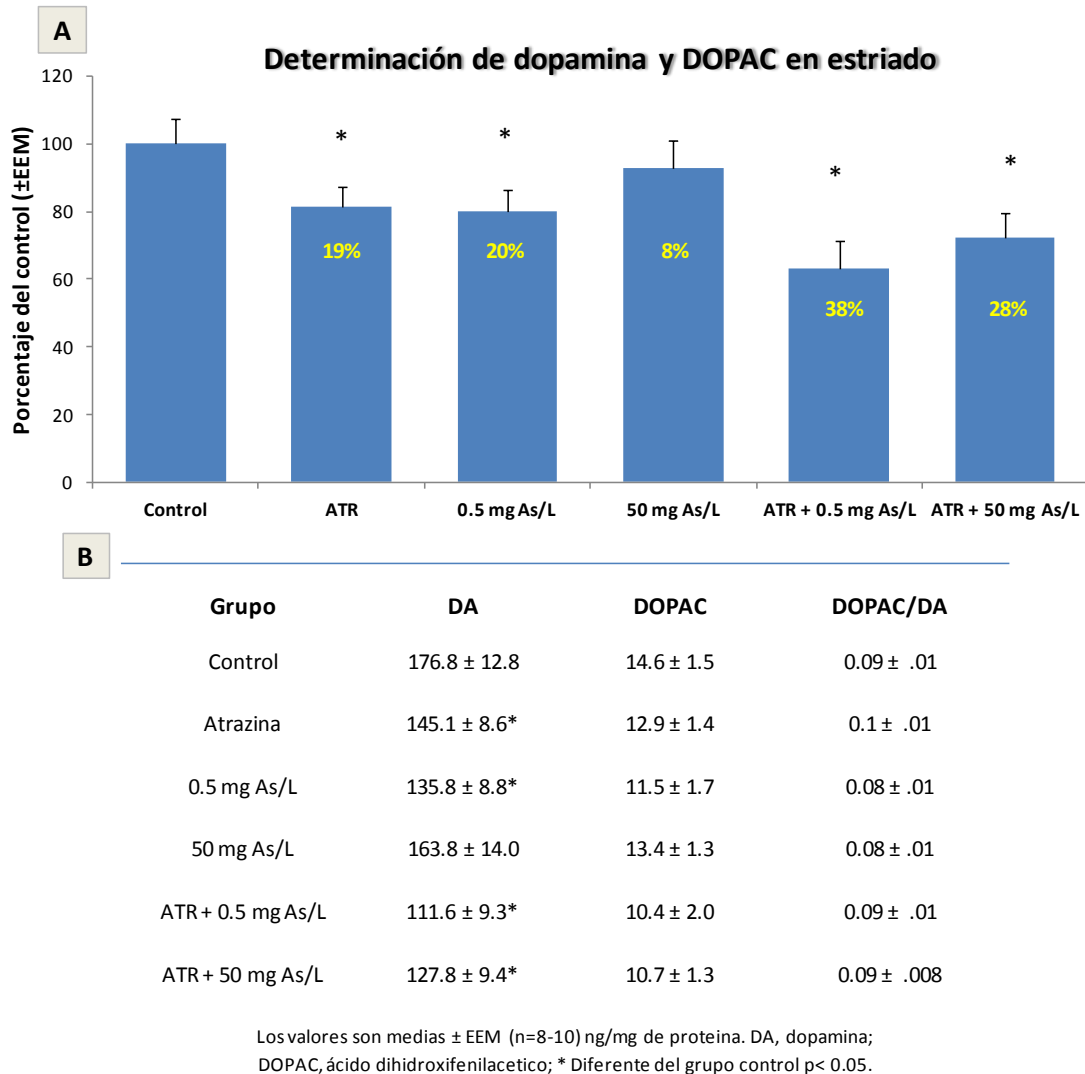


Figura 16. A: La gráfica muestra la disminución en porcentaje de dopamina con respecto al control. **B:** La tabla representa los valores crudos de concentración de dopamina (ng/mg proteína) en el estriado de ratas expuestas a los tratamientos individuales con ATR y As y la coexposición (As + ATR) durante 12 meses.

7.8 REACTIVIDAD DE CITOCROMO OXIDASA (CO)

La evaluación estrés celular en la SNpc se midió a través de la técnica histoquímica de la citocromo oxidasa. El análisis se realizó mediante un análisis densitométrico en la región de la sustancia negra, los resultados mostraron un efecto significativo de grupo [$F(5,18) = 4.7, p < 0.01$] (figura 17). Un análisis posthoc LSD Fisher reveló que en todos los grupos excepto el tratado de manera individual con 0.5 mg As/L hubo una disminución de la reactividad de la citocromo oxidasa.

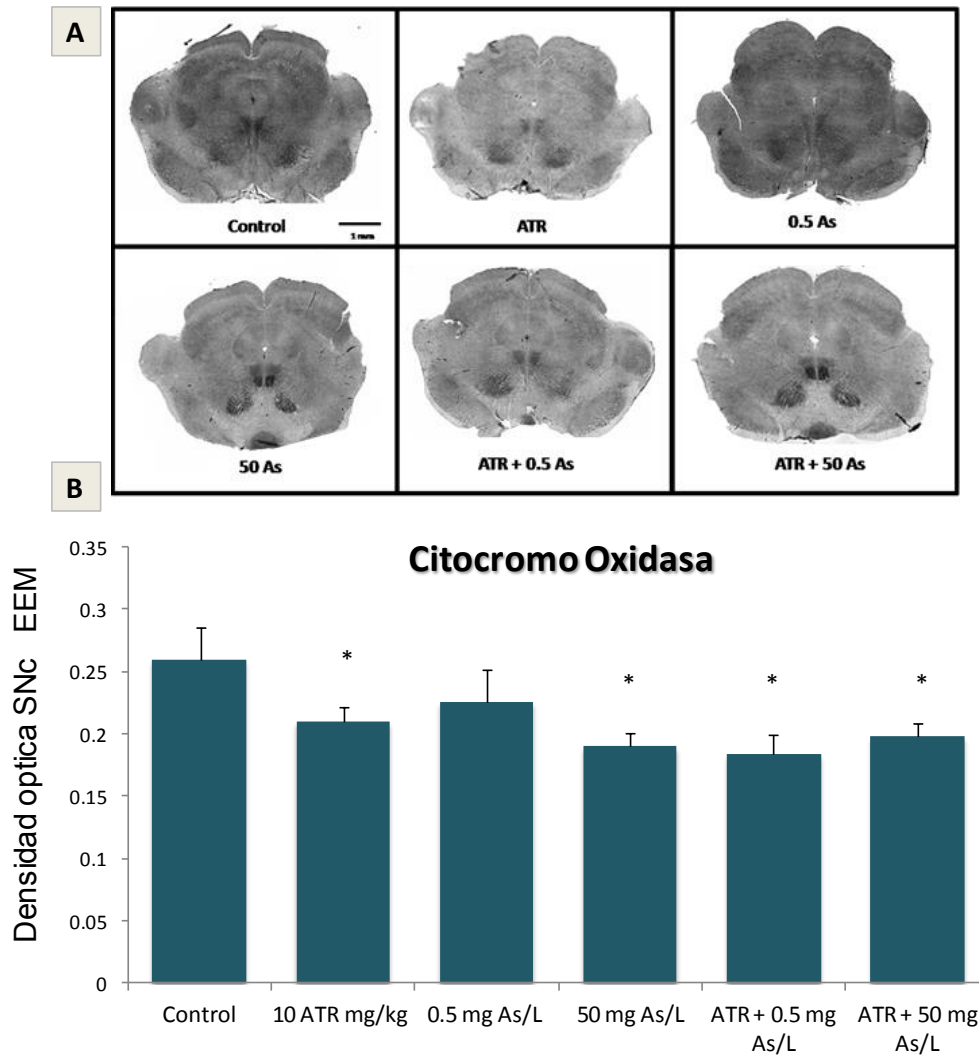


Figura 17. Reactividad a la citocromo oxidasa como un marcador de estrés celular. La exposición al As y a ATR de manera individual o simultánea disminuyó la reactividad a COX en todos los grupos excepto el tratado con 0.5 mg As/L. La densidad se expresa en unidades arbitrarias * Diferente del control $p < 0.01$.

7.9 INMUNOHISTOQUÍMICA DE CÉLULAS TH+

La valoración del efecto sobre el número de neuronas TH+ por la exposición crónica y simultánea al As y ATR sobre el sistema nigrostriatal se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica para la enzima TH en la región de la SNpc del mesencéfalo, seguido de un conteo neuronal para dicha región. El análisis estadístico confirma un efecto significativo de grupo, $[F(5,15) = 12.3, p < 0.001]$, un análisis posterior reveló que el número de neuronas TH+ disminuyó significativamente en los grupos tratados individualmente con ATR $[t(6) = 9.3, p < 0.001]$ y con la coexposición a ATR y 0.5 mg de As $[t(5) = 3.9, p < 0.1]$.

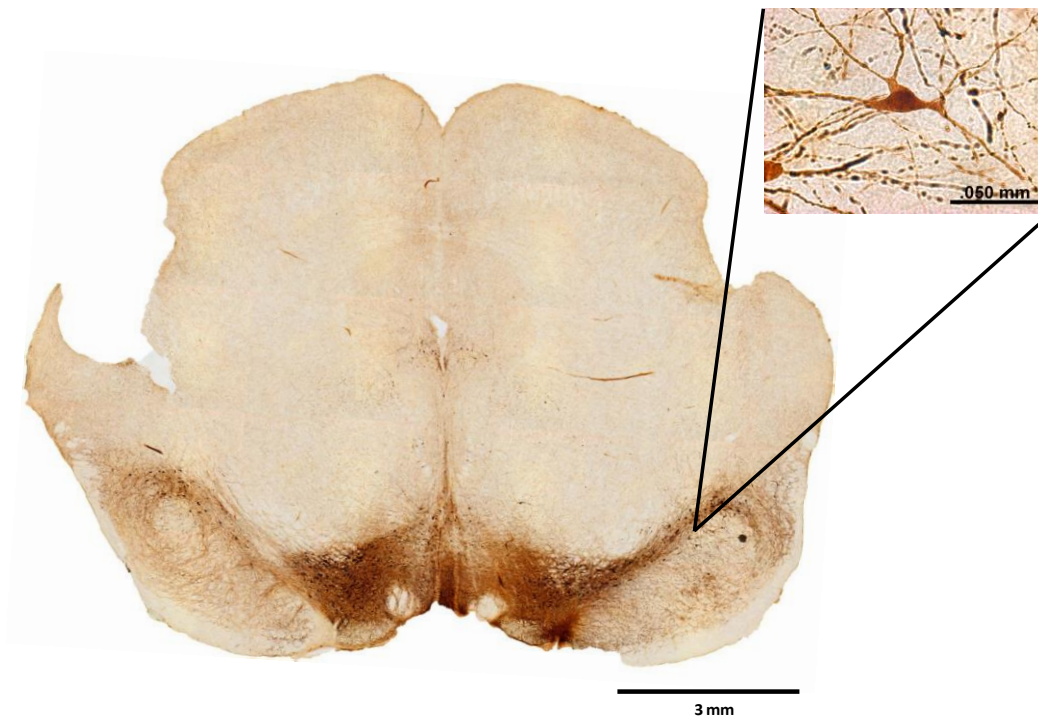


Figura 18. Microfotografía de la inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa en el mesencéfalo de la rata. En la imagen se muestra una ampliación de una célula reactiva a tirosina hidroxilasa.

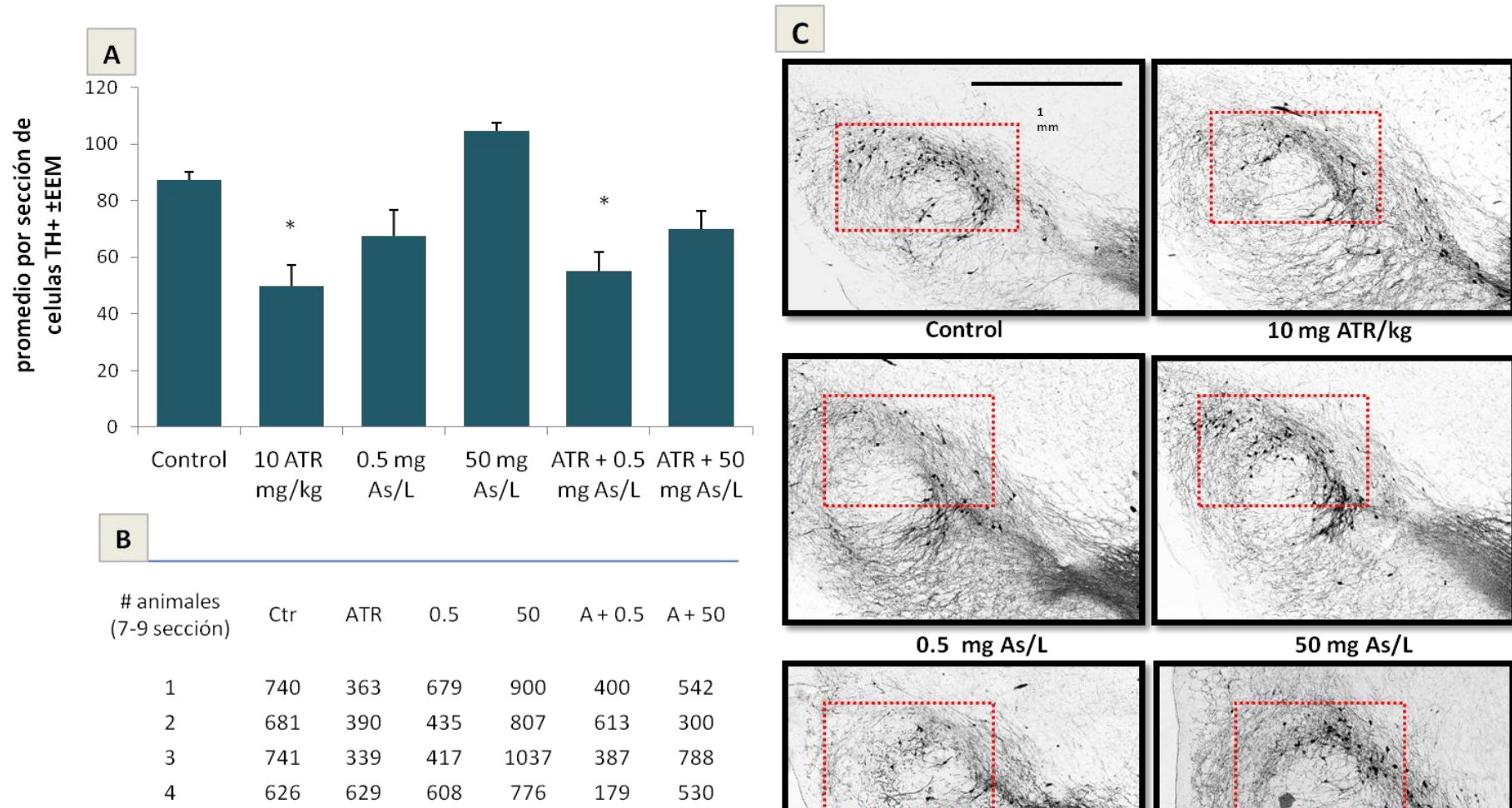


Figura 19. Conteo de neuronas reactivas a tirosina hidroxilasa en la sustancia nigra compacta en ratas expuestas a los tratamientos individuales con ATR y AS y la coexposición (As + ATR) durante 12 meses. Las fotografías muestran secciones mediales representativas de la SNpc, aproximadamente en el nivel de bregma -5,52 a 5,72 mm.

7.10 INMUNOHISTOQUÍMICA DE MALONDIALDEHIDO

Por otro lado, no se observaron diferencias con respecto al tratamiento en el análisis de los cortes histológicos entre el grupo control y los grupos tratados para el número de células reactivas a MDA (figura 20). En las imágenes analizadas, todos los grupos presentaron alta reactividad al anticuerpo contra MDA, lo que sugiere la ubicuidad y poca selectividad de este marcador de estrés oxidante.

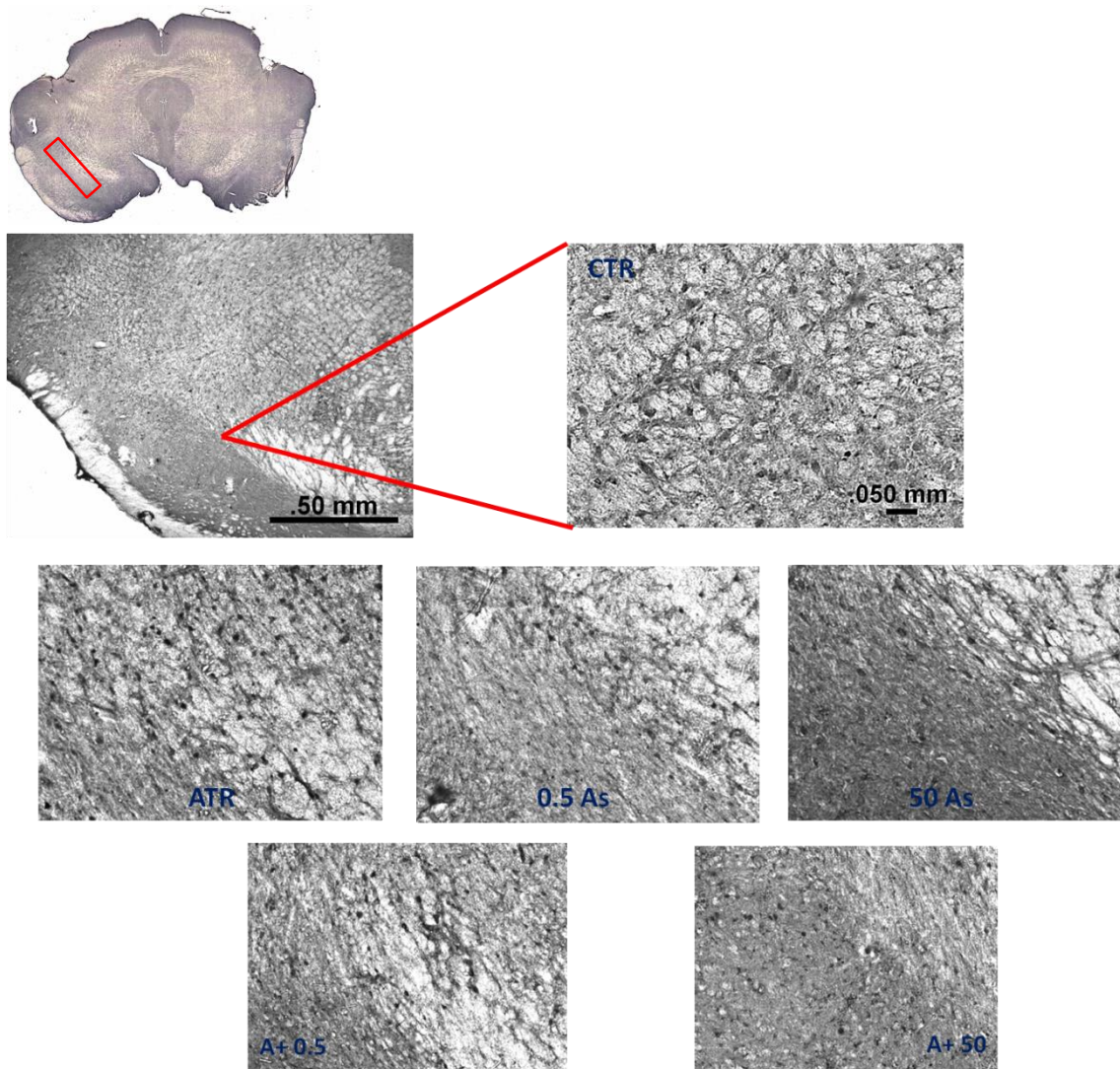


Figura 20. Inmunohistoquímica de malondehaldeido en la SNpc. No se observaron diferencias en los grupos tratados respecto al control. Las imágenes representan una ampliación de la zona de la SNpc como se muestra un corte del mesencéfalo (recuadro en rojo).

7.11 DETERMINACIÓN DE TRANSPORTADORES DE DOPAMINA

Se determinó los niveles de proteína del transportador de DA en el estriado, los datos muestran un efecto significativo de grupo [$F(5,25) = 3.17, p < 0.023$]. Las pruebas post hoc arrojaron que los niveles de DAT son menores solo el grupo tratado con ATR respecto al control como se muestra en la figura 21. Para mayoría de los tratamientos se aprecia una tendencia a disminuir la cantidad de DAT, con la excepción del grupo tratado con 0.5 mgAs/L en donde no se observan cambios con respecto al control

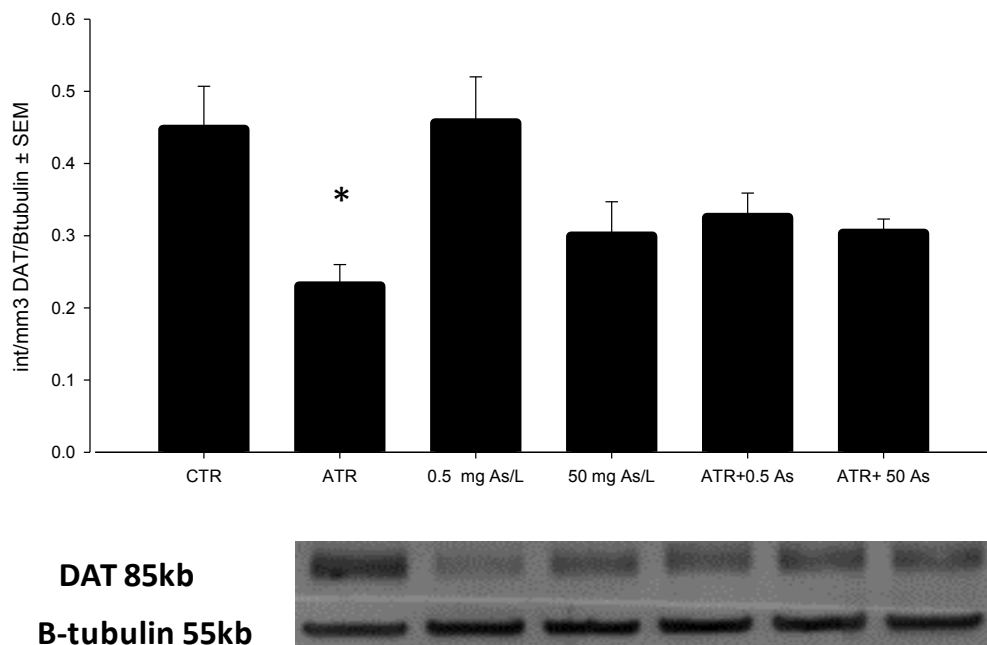


Figura 1. Niveles de proteína del transportador de dopamina en el estriado en ratas expuestas individualmente al As, ATR, o la combinación ATR+As por 12 meses. Cada barra representa la media \pm EEM ($n = 5-6$ ratas). *Diferente del control $p < 0.01$.

8. DISCUSIÓN

Durante este trabajo hemos investigado si la exposición crónica y simultánea a la mezcla de ATR+As genera mayor toxicidad sobre el sistema nigrostriatal, respecto a las dosis individuales de As y ATR. De los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones. 1) Contrario a nuestra hipótesis de trabajo, la coexposición a la mezcla de As+ATR no incrementa los efectos tóxicos sobre el sistema dopaminérgico nigrostriatal cuando se compara con las exposiciones individuales. 2) La exposición individual al As tanto para la dosis de 0.05 mg As/L y 50 mg As/L produjo resultados inconsistentes, mientras que algunos parámetros evaluados resultaron afectados otros permanecieron intactos, incluso respecto a lo reportado por la literatura. 3) Los efectos tóxicos producidos por la exposición individual a la ATR fueron consistentes a través de los parámetros evaluados, sugiriendo que la ATR es el principal responsable de la toxicidad producida en el sistema nigrostriatal por la exposición crónica y simultánea a As+ATR en la rata albina. A continuación se realiza un análisis detallado de los resultados obtenidos los cuales sustentan tales conclusiones, el resumen de los resultados se muestra en la tabla 8.

No se observaron diferencias en la ganancia de peso y en el aspecto general de los roedores, lo que sugiere la posibilidad que la exposición crónica al As y ATR de manera individual y simultánea no produjo intoxicación severa sobre los grupos tratados.

Tabla 8. Resumen de los efectos de la exposición crónica a la ATR, As, y la combinación ATR+As con respecto al grupo control.

Grupo	Actividad locomotora	Coordinación motora	Prueba de memoria	Niveles de dopamina	Número de células TH+	Reactividad de COX	Inmuno MDA	Niveles de DAT
Atrazina	-	↓	-	↓	↓	↓	-	↓
0.5 mg _i As/L	-	↓	-	↓	-	-	-	-
50 mg _i As/L	↓	↓	-	-	-	↓	-	-
ATR + 0.5 mg _i As/L	-	↓	-	↓	↓	↓	-	-
ATR + 50 mg _i As/L	-	↓	-	↓	-	↓	-	-

De manera notable la dosis de 0.5 mg As/L produce un mayor consumo de agua respecto al grupo control, mientras que la dosis de 50 mg As/L la reduce, este efecto es similar a lo reportado por Rodríguez et al. (2010) quienes sugieren que el consumo diferencial podría deberse a un cambio en las condiciones organolépticas del agua y por lo tanto un decremento o incremento en su consumo. En adición a esto, Garcia-Moltalvo et al. 2011 reportan un aumento en el consumo de agua en roedores tratados con 3-10 mg As/kg/día durante 9 días. En este trabajo se menciona que la exposición crónica al As puede inhibir al factor regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística o por sus siglas en inglés CFRT (Maitra & Hamilton 2005), la principal función del CFRT consiste en facilitar el transporte activo de aniones hacia el exterior de la célula participando en la regulación del equilibrio osmótico celular, lo que sugiere que una alteración en el balance de electrolitos pudiese modificar la ingesta de agua.

Es importante notar que a pesar de que los grupos tratados con 50 mg As/L de forma individual o en combinación consumen significativamente menos agua, su consumo diario de As es considerablemente mayor según lo reportado en el estudio de Rodríguez y colaboradores, con un consumo diario de 0.077 mg As/kg para el grupo tratado con 0.5 mg As/L respecto a un consumo diario de 2.83 mg As/kg para el grupo con la dosis alta de 50 mg As/L, lo que indica que a pesar de la reducción en el consumo de agua en los animales tratados con la dosis alta de As existe una mayor cantidad de As disponible en el organismo.

La actividad motora es un paradigma conductual al que se recurre frecuentemente en los estudios neurotoxicológicos ya que proporciona una referencia *in vivo* sobre el estado general del organismo durante el periodo de exposición, además de no requerir un aprendizaje y condicionamiento intensivo respecto a otras pruebas conductuales. Asimismo, la conducta motora es especialmente sensible y reproducible a los insultos sobre el sistema nigrostriatal, debido a su papel modulador de la actividad del estriado dorsomedial, una estructura crítica en el control y la modulación de la locomoción y la coordinación motora en los organismos (Monville et al., 2006). En este estudio los resultados muestran que al décimo mes de exposición la ATR no generó cambios significativos sobre la actividad

locomotora, aunque existe una tendencia a incrementar la actividad. En contraste, la exposición individual a la dosis alta de As disminuyó la actividad locomotora. Esto es consistente con resultados previos de la actividad motora en animales expuestos al ATR (Bardullas et al., 2011; Belloni et al., 2011) o As (Bardullas et al., 2009; Rodriguez et al., 2010). Con respecto a esto, estudios previos muestran que las alteraciones en la actividad motora por exposición a la ATR se presentan después de los 8 meses de exposición (Bardullas et al., 2010). Una situación similar se ha observado con la exposición a la dosis 50 mg As/L en donde las alteraciones en la actividad locomotora se presentaron hasta después de un año de tratamiento con As (Rodriguez et al., 2010). Notablemente en el presente estudio la disminución en la actividad locomotora, se registró con mayor anticipación (sexto mes de exposición) en el grupo tratado con las dosis alta de arsénico lo que sugiere que factores que diferencian a ambos estudios como la alimentación restringida pudieron haber influenciado el inicio de las alteraciones motoras.

De manera inesperada la coexposición al ATR+As no generó déficits significativos en la locomoción. Como se muestra en los resultados, el As y la ATR producen efectos contrarios sobre la actividad locomotora. Por un lado el As disminuye la actividad locomotora mientras que la ATR tiende a aumentarla de manera no significativa, esta dicotomía es notable, ya que los grupos con doble tratamiento no muestran alteraciones, sugiriendo una atenuación de los efectos en la actividad motora. A este fenómeno se le ha denominado "*antagonismo conductual*" y fue observado en estudios utilizando una combinación de sustancias que producen efectos contrarios sobre la conducta motora. Respecto a ello, el grupo de Nation et al. (1990) reportó que ratas expuestas a 500 ppm de plomo y 100 ppm de cadmio por 60 días muestran hiperactividad e hipoactividad, respectivamente, sin embargo, la combinación atenúa los efectos sobre la actividad motora (Nation et al., 1990). Aunque el mecanismo neurofisiológico involucrado en esta forma de atenuación de la actividad motora es desconocido, una explicación propone que dos sustancias tóxicas administradas de manera simultánea pueden tener efectos opuestos en la propagación de

los impulsos nerviosos y liberación diferencial del neurotransmisor, lo cual podría verse reflejado en una aparente atenuación de los efectos en la locomoción (Atchison 1988).

Asimismo, con el objetivo de fortalecer los resultados anteriores que nos sugerían que ambos compuestos producen toxicidad y alteraciones sobre la locomoción de los roedores, utilizamos la prueba del cilindro giratorio (*rotorod*) (Romano & Landauer 1986), debido a que esta tarea implica procesos cognitivos complejos que involucra la interacción de diversas estructuras cerebrales como el cerebelo, ganglios basales, corteza, tálamo, entre otras. Por lo que alteraciones sutiles en dichas estructuras producto del insulto a sustancias tóxicas puede manifestarse en acciones motoras descoordinadas o deficientes. Los resultados muestran que ambos grupos, tanto los tratados con ATR y As de manera individual y simultánea tienen una menor capacidad para mantenerse en el cilindro respecto al grupo control. De manera notable, en los resultados se observa como los dos grupos iniciaron con un desempeño similar; sin embargo en ensayos posteriores, el grupo control aumentó considerablemente su desempeño con respecto a los grupos tratados. Este resultado va de acorde con lo publicado previamente por nuestro grupo (Bardullas et al., 2011) en el que observamos que la exposición individual a 10 mg ATR/kg disminuía el tiempo que los roedores se mantenían en el cilindro. Para el caso de la exposición individual con As, la dosis relevante al medio ambiente de As (0.5 mg As/L) produce una disminución equiparable con la dosis alta de As (50 mg As/L) y con la misma ATR. Cabe señalar que la exposición simultánea no generó una mayor alteración ya que los valores son similares a los encontrados en los grupos con exposición individual.

Como se observa en los resultados existen una amplia diferencia en el grado de afectación entre la coordinación y la actividad motora para los grupos coexpuestos, lo que podría reflejar la heterogeneidad del sistema nervioso y la posibilidad que otras estructuras y sistemas de neurotransmisión del cerebro no analizadas en este estudio se encuentren afectadas por la exposición. Sin embargo el hecho de que no se hayan encontrado diferencias significativas entre los marcadores de daño hepático y muscular como AST y CK sugiere fuertemente que las dosis utilizadas en nuestro estudio no generaron alteraciones

sistémicas severas en el hígado o músculo esquelético, por lo que las alteraciones motoras podrían ser atribuidas a los efectos de la exposición crónica a la ATR o al As en el sistema nervioso central o periférico. Por ejemplo se ha reportado que la exposición al As puede producir neuropatía periférica, y es capaz de alterar la mielina y disminuir el diámetro del axón del nervio sural generando una disminución en la velocidad de conducción (García-Chavez et al., 2007). Del mismo modo la ATR puede inducir cambios en las fibras mielinizadas y no mielinizadas del nervio ciático de ratas tratadas con 40 mg de ATR/kg administrados por vía ip (Castano et al., 1982). Estos hallazgos nos sugieren que la posibilidad de anormalidades en el sistema nervioso periférico producto de la exposición al As y ATR pueda contribuir en las alteraciones en la coordinación y actividad motora observadas en nuestro estudio.

Por otro lado, es importante resaltar que en este estudio la exposición al As y ATR se administró desde etapas tempranas (21 días de edad en la rata) con lo cual las implicaciones a la salud en la etapa adulta podrían ser mayores. Por ejemplo, en experimentos previos se observó que la exposición en ratas en periodos tempranos en el desarrollo (15 días de gestación) resultaba en hiperactividad en etapas adultas (Rodríguez et al., 2002). Por el contrario, la exposición en periodos tardíos del desarrollo (8 semanas de edad), resultaba en hipoactividad motora. Recientemente se evaluó la toxicidad a la ATR en ratones CD1 expuestos a dosis bajas de 1 ó 100 µg/kg en etapas tempranas (gestacional 14) hasta el destete (postnatal 21) encontrando que en etapas adultas los animales desarrollaban hiperactividad (Belloni et al., 2011). Estos hallazgos refuerzan nuestros resultados, además de sugerir que la exposición a la ATR en etapas tempranas podría incrementar los efectos tóxicos en los adultos. A este respecto, otros estudios realizados con plaguicidas han reportado que la intensidad de los efectos tóxicos en etapas adultas está influenciada fuertemente con la exposición en etapas tempranas (Sheets 2000; Sheets et al., 1994), esto se ha atribuido a la inmadurez de la barrera hematoencefálica la cual podría ser más permeable a moléculas tóxicas, aunado a un incipiente desarrollo de los sistemas de biotransformación de tóxicos. En conjunto, estos hallazgos cobran relevancia si

consideramos que los niños son una población altamente susceptible a la exposición por plaguicidas cuando su familia está relacionada con la agricultura o habitan un sitio cercano con actividad agrícola (Arcury et al., 2007; Curwin et al., 2007; Curwin et al., 2007).

Posterior a las pruebas motoras se realizó una tarea cognitiva con el objetivo de conocer si el efecto de las mezcla a ATR+As o las dosis individuales podría generar déficits en el aprendizaje y memoria. Un reto importante fue encontrar una tarea que involucrase estrechamente la regulación de la vía nigroestriatal, esto debido a que dichos procesos cognitivos involucran la participación de numerosos sistemas además que la vía nigroestriatal no ha sido tradicionalmente asociada a las actividades de aprendizaje y memoria a diferencia del hipocampo. Sin embargo, de acuerdo con los primeros estudios de lesiones cerebrales en ratas, la infusión de lidocaína inactiva selectivamente el núcleo caudado, lo cual elimina la posibilidad de que durante la solución de un laberinto espacial se seleccione una estrategia egocéntrica (respuesta) (Packard & McGaugh 1996). Nuestros resultados muestran que ninguno de los grupos tratados con As o ATR o la combinación ATR + As mostró alteraciones en la tarea de lugar o respuesta. Una posibilidad a la falta de resultados significativos es que las alteraciones en los niveles de DA no rebaso un umbral crítico lo suficiente para afectar el aprendizaje. En apoyo a este argumento, estudios recientes reportaron que la DA es crítica para el uso de un estrategia espacial (lugar) a través de modular la actividad del cuerpo estriado dorsomedial (DMS por sus siglas en inglés) durante el aprendizaje de respuesta y lugar. Sin embargo este efecto fue observado disminuyendo con 6-OHDA casi la totalidad de la entrada dopaminérgica al DMS (Lex et al., 2011), al contrario en nuestro estudio el contenido de DA estriatal disminuyo sólo en un 20% en el grupo ATR por lo que es probable que no sea suficiente para eliminar la selección de una estrategia para la resolución del laberinto.

Con el objetivo de correlacionar que los hallazgos encontrados sobre el déficit motor descrito con anterioridad, estén en relación con alteraciones en el sistema de neurotransmisión que participa en la vía nigroestriatal, analizamos el contenido de dopamina estriatal. La determinación de DA en estriado muestra una disminución significativa en el

contenido DA para los grupos coexpuestos entre el 27 al 38% respecto al control, mientras que para los grupos tratados con ATR o 0.5 mg As/L se observó una disminución del 17% y 23% respectivamente. Sin embargo el análisis estadístico no nos permite concluir que en los grupos coexpuestos con ATR+As exista una mayor disminución en el contenido DA cuando se compara con los grupos tratados individualmente con ATR o As. Por lo que en concordancia con los resultados en la conducta, el estudio neuroquímico indica que la coexposición no exagera los efectos tóxicos respecto a las sustancias individuales. En relación con la ATR, encontramos una disminución significativa en el contenido de DA. Estos resultados confirman que la exposición crónica y subcrónica a ATR disminuye el contenido de DA estriatal en roedores (Bardullas et al., 2011; Coban & Filipov 2007; Rodriguez et al., 2013).

Contrario a lo esperado, la dosis de 0.5 mg As/L produjo una disminución significativa sobre el contenido de DA mientras que en la dosis mayor de 50 mg As/L se mantuvo igual al control. Esto es contrario a lo reportado por Rodriguez et al. (2010) quienes observaron un aumento en el contenido de DA para el grupo de 50 mg As/L utilizando la misma concentración, ruta y tiempo de exposición, sin embargo, una diferencia notable entre aquel estudio y el presente es el régimen alimenticio. Mientras que en nuestro trabajo las ratas fueron sometidas a un consumo controlado, en el estudio de Rodriguez et al. los animales se encontraban bajo alimentación ad libitum. Es conocido que la restricción de alimento puede promover beneficios fisiológicos en los organismos como el aumento de la producción de las proteínas de choque térmico, BDNF, y las proteínas desacoplantes mitocondriales además de la disminución de daño por estrés oxidativo (Lee et al., 2002; Liu et al., 2006). Esto genera un cuestionamiento interesante respecto al papel de la restricción calórica ante la exposición a contaminantes del ambiente (Hart et al., 1992). Finalmente, las discrepancias en las alteraciones entre la conducta motora y el contenido de DA para los grupos tratados con As sugieren que otros sistemas de neurotransmisión podrían estar involucrados, un ejemplo es glutamatérgico, también implicado en la conducta motora el cual

es susceptible a la alteración por exposición al As (Castro-Coronel et al., 2011) (David et al., 2005)

Posterior a estos hallazgos era importante explorar las causas por las que se estaba produciendo una disminución en la dopamina estriatal para los grupos tratados con ATR y As y la mezcla ATR+As, hallazgos que eran reforzados por estudios anteriores de nuestro grupo para las dosis individuales. Una de las posibilidades para esta disminución era la muerte de las neuronas secretoras de dopamina en la sustancia nigra (células TH+), para lo cual realizamos un conteo detallado de las neuronas TH+ a diferentes niveles anatómicos de la sustancia nigra, con la finalidad de detectar la disminución de estas células en los grupos expuestos a los xenobióticos de manera individual o en la mezcla. A priori nuestras hipótesis de trabajo planteaba que la coexposición a la ATR+As exacerbaría la citotoxicidad sobre la células TH+ disminuyendo la población en la SNpc. De manera inesperada los resultados mostraron que los grupos tratados con ATR y ATR+As disminuyeron el número de células TH+ en la SNpc, sin embargo contrario a nuestra hipótesis, la coexposición no exacerbó la pérdida de las células TH+. De manera notable, como se muestra en la figura 19, la exposición a ATR fue el factor determinante para producir una disminución significativa en la reactividad a TH+, tanto para la dosis individual como para el doble tratamiento. Este hallazgo replica lo observado por Coban et al. (2007), quienes reportaron que en ratones C57BL/6 expuestos por 14 días a dosis de 25 a 250 ATR/kg/día generó una discreta disminución de neuronas TH+. En el presente trabajo la exposición crónica a 0.5 y 50 mg As/L no redujo el número de células TH+, sin embargo los resultados muestran una reducción en el contenido de DA estriatal para el grupo de 0.5 mg As/L, lo que sugiere que están involucrados otros factores adicionales a la disminución de las células TH+. En relación a esto, recientemente se reportó una disminución en la expresión de las enzimas implicadas en la biosíntesis de DA en ratones expuestos por 60 días a 1-4 mg As₂O₃/L (Zhang et al., 2013).

Nuestros resultados no nos permiten diferenciar si la disminución en el número de células TH+ en el grupo expuesto a la ATR es producto de la muerte de las neuronas

dopaminérgicas o la pérdida del fenotipo a TH+. Sin embargo resultados previos muestran que la enzima TH no resulta afectada con la exposición a la ATR tanto a niveles de proteína como de mRNA, por lo que nuestros resultados apoyan que la reducción en el número de células TH en la SNpc es producto de la muerte neuronal.

Por otro lado, con los cortes histológicos que se obtuvieron de la SNpc (figura 9) se buscó correlacionar la pérdida de las células TH+ con el aumento de estrés celular en esa región para la cual se utilizaron marcadores generales, por ejemplo, diversos estudios histológicos correlacionan positivamente la reactividad de la citocromo oxidasa (COX) con la actividad funcional neuronal tanto en condiciones normales (Weiss-Wunder & Chesselet 1990) como patológicas (Bezard et al., 2000; Dhar et al., 2005), en adición a esto, la reactividad de COX también ha sido utilizada como marcador de estrés celular, producto de la alteración mitocondrial (Binukumar et al., 2010). De igual forma, la utilización del MDA un subproducto de la lipoperoxidación en las membranas celulares ha sido tradicionalmente utilizado como marcador de estrés celular (Shuhua et al., 2012; Wang et al., 2012). En este sentido los resultados en los marcadores de estrés celular muestran una disminución en la reactividad a COX en todos los grupos tratados, excepto para el grupo 0.5 mg As/L (Tabla 8). Lo que sugiere que tanto la exposición a As, ATR individual y la coexposición, pueden inducir daño celular y el déficit en el metabolismo de la energía debido a la pérdida mitocondrial en el SNC. De manera inesperada no se observaron diferencias significativas respecto al control en el marcador de lipoperoxidación como se observa en la figura 20, ya que todos los grupos muestran reactividad semejante al MDA. Una posible explicación para este resultado podría radicar en la inespecificidad del MDA como marcador de estrés celular en ratas adultas, ya que la lipoperoxidación endógena aumenta con el envejecimiento (Del Rio et al., 2005) lo que explicaría la presencia de reactividad a MDA en los grupos controles.

Recientemente un estudio realizado por nuestro grupo, reportó que la exposición repetida (6 inyecciones) de 100 mg/kg por vía intraperitoneal en ratas, disminuye la expresión de mRNA del transportador de DA (DAT) en el mesencéfalo (Rodríguez et al., 2013). Por primera vez demostramos que la administración crónica a la ATR es capaz de

disminuir de manera significativa los niveles de proteína DAT (figura 21), lo que refuerza nuestra hipótesis que la ATR individual genera mayor toxicidad sobre el sistema nigrostriatal en comparación con el As y que está involucrada en la disminución en las células TH+ y el desarrollo de las alteraciones neuroquímicas y motoras reportadas en este estudio.

Una limitante a lo largo de nuestro estudio fue la dificultad para contrastar nuestros resultados con la literatura; los modelos toxicológicos sobre la exposición crónica a dos o más sustancias en un modelo *in vivo* son muy escasos, evidentemente trabajos sobre coexposición a la ATR+As son casi nulos. Sin embargo, un reciente estudio inmunotoxicológico utilizando progenitores mieloides (CFU-GM) extraídos de los ratones machos expuestos crónicamente a 1 mg ATR/L y 1 mg As/L mostró que sólo el grupo tratado con ATR individual disminuía el número de células mientras que la coexposición con ATR+As disminuía la citotoxicidad hasta niveles control. El análisis genético arrojó que la exposición crónica a ATR+As tuvo la capacidad de inducir genes relacionados con la proliferación celular y la sobrevivencia, lo que podría explicar la disminución en la citotoxicidad en el grupo coexpuesto (Cimino-Reale et al., 2008). A pesar de las diferencias entre nuestro modelo y el propuesto por el grupo de Cimino-Reale et al. es plausible proponer en nuestro modelo, la posibilidad de que la exposición prolongada al As haya sido capaz de inducir factores moleculares que disminuyeran la toxicidad de la ATR y colateralmente permitiesen la sobrevivencia de las neuronas, respecto a ello, otro estudio que apoya este argumento proviene de un trabajo *in vitro* utilizando células de carcinoma de hígado humano coexpuestas a 0.3-5.0 $\mu\text{g As}_2\text{O}_3/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g ATR}/\text{mL}$ (Tchounwou et al., 2001). Los autores encontraron que la coexposición a ATR+As era capaz de potenciar la inducción de factores como GADD153, GADD45, GRP78, ampliamente expresados en respuesta al estrés fisiológico y la disrupción en la homeostasis del retículo endoplásmico (Stokes et al., 2002), así como la sobre regulación de los genes XRE, GSTYa, importantes promotores involucrados en la inducción de vías de biotransformación de fase II en el hígado.

Estos hallazgos en conjunto sugieren que la sobreexpresión de estos factores inducidos por el As y potenciados durante la coexposición con ATR, podría ayudar a explicar en nuestro estudio, la disminución en la toxicidad observada en los grupos tratados con ATR+As_i. Otra posible aunque limitada explicación proviene de un único reporte en donde se observó que la administración de 50-300 mg/kg de atrazina en microsomas hepáticos de ratas Fischer incrementa la concentración de la glicoproteína-P hasta dos veces más con la dosis más baja (Islam et al., 2002). La P-glicoproteína está implicada, al menos en parte, en el flujo de salida de las células de arsénico en mamíferos (Leslie 2012; Maitra & Hamilton 2005). Lo que sugiere la posibilidad que la coadministración con ATR+As_i haya modificado la biodisponibilidad del arsénico en el interior de la célula y atenuado los efectos tóxicos.

9. CONCLUSIONES GENERALES

- Este estudio demuestra que contrario a lo esperado la coexposición ATR+As no incrementa los efectos deletéreos sobre el sistema nigrostriatal.
- La exposición al As dio resultados inconsistentes, algunos parámetros se vieron afectados mientras que otros no, lo que sugiere que As tiene un papel menor en los efectos tóxicos causados por coexposición a ATR+As.
- Los efectos deletéreos por la exposición individual a la ATR fueron consistentes a través de los resultados lo que apoya la idea que el sistema dopaminérgico es más sensible a la exposición por ATR.

10. REFLEXIONES FINALES.

Neurotoxicidad de la mezcla ATR+As

Al inicio de este trabajo señalamos que aunque no se conocen reportes oficiales sobre la frecuencia de uso del herbicida atrazina, la tesis desarrollada por Villada-Canela 2006, estima que el uso de la ATR en México supera el 60% de las tierras cultivables con base en un análisis de los distritos de riego. Interesantemente algunos distritos de riego se localizan en zonas de la república con elevadas concentraciones de arsénico. Aunque no existen ningún reporte que lo demuestre y plausible suponer, que en el ambiente exista presencia simultánea de ambos contaminantes. Para Estados Unidos, algunos reportes así lo demuestran. Esto no lleva a predecir que potencialmente ciertos sectores de la población están en riesgo de exposición a ambos tóxicos. Ahora bien, se ha acumulado una cantidad importante de evidencia por parte de nuestro laboratorio y otros grupos, que demuestra que la exposición individual a ATR o As produce neurotoxicidad sobre el sistema nigrostriatal, una estructura cerebral íntimamente ligada al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson. Con estos antecedentes, el objetivo medular de este trabajo fue probar si la coexposición ATR+As exacerbaba la toxicidad en esta estructura, lo que podía constituir un factor de riesgo mayor para la población expuesta a ambos tóxicos. Para este trabajo seleccionamos en la medida de lo posible variables importantes de las exposiciones ambientales: exposición crónica (12 meses), concentraciones bajas y en el caso del As relevante al medio ambiente y vía de exposición oral. Inesperadamente los resultados arrojados por este trabajo, no indican que la coexposición ATR+As exacerbe los efectos deletéreos sobre el sistema nigrostriatal, lo que sugiere que la coexposición no parece constituir un factor de riesgo mayor para el desarrollo de alteraciones en el sistema nigrostriatal en la población cuando se compara con la exposición individual al As o ATR, sin embargo nuestro trabajo no nos permite generalizar esta conclusión a otras estructuras anatómicas debido a que el análisis se centró sobre una región anatómica puntual. Sin

embargo un aspecto inesperado de nuestros resultados, fue demostrar, que la exposición al herbicida, de manera individual o a través de la coexposición, es en parte el causante de la mayor parte de los efectos deletéreos observados, por lo que refuerza la hipótesis sobre el riesgo de exposición a este xenobiótico.

Reflexiones sobre neurotoxicidad de la atrazina

Al día de hoy, el herbicida ATR sigue siendo uno de los plaguicidas de mayor uso, con una importante presencia en países en vías de desarrollo, por lo que es necesaria una evaluación sobre sus riesgos a la salud humana a la luz de la evidencia científica acumulada en lo largo de 30 años de investigación.

Desde las primeras evidencias aisladas en los 80's sobre la posible neurotoxicidad del herbicida ATR (Castano et al., 1982) , se ha acumulado una importante cantidad información sobre sus efectos como disruptor endócrino (Hayes et al., 2002), alteraciones en el eje reproductivo (Cooper et al., 2007) e inmunosupresor (Karrow et al., 2005). Aunado a ello, los estudios realizados por unos pocos grupos de investigación en los que se incluye el nuestro, ha sido consistente en demostrar el potencial neurotóxico de este herbicida. La fortaleza de estos hallazgos se basa en dos aspectos, 1) reproducibilidad, los resultados entre los diferentes reportes han mostrado reiteradamente la alteraciones en la conducta motora, contenido de DA, disminución en el número de neuronas TH+ y en general la fisiología del sistema dopaminérgico, asimismo estos hallazgos se han demostrado con la utilización de diversos rangos de dosis. 2) Variabilidad en los modelos, la toxicidad sobre el sistema dopaminérgico ha sido demostrado en tanto en modelos murinos (rata y ratón) como diversos modelos in vitro (PC12, células dopaminérgicas N27). A la luz de estos hallazgos es válido proponer a la ATR como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, a futuro, los estudios sobre la toxicidad de la ATR deberán de soslayar la falta de información existente sobre los mecanismos de toxicidad general,

además aumentar el número de estudios utilizando dosis relevantes al medio ambiente que permitan predecir exposiciones de la vida real.

El futuro de los estudios sobre toxicología de mezclas químicas

El filósofo David Chalmers definió al estudio de la conciencia como el “problema duro” (hard problem of consciousness) de las neurociencias, aludiendo a la dificultad en su estudio, incluso en su definición. El “problema duro” de la toxicología, bien podría equivaler al estudio de las mezclas químicas. Sin embargo, la dificultad no estriba tanto en la definición en sí tanto como en los mecanismos. Por un lado los mecanismos de toxicidad a nivel molecular parecen ser extraordinariamente complejos, sin embargo el problema radica en la dificultad para diseñar el experimento adecuado que permita predecir los efectos de la coexposición a largo plazo. Por ejemplo, los modelos actuales que evalúan los efectos tóxicos a múltiples sustancias como el “*full factorial design, ray design*” utilizan una combinación de modelos estadísticos alimentados con datos experimentales de estudios agudos a diferentes dosis para predecir si dos o más sustancias administradas en combinación se desviarán de la aditividad. Estos métodos de aproximación al problema de la exposición múltiple, permite evaluar de forma rápida, eficiente y con un costo relativamente bajo la gran diversidad de sustancias que pululan en el ambiente, sin embargo por su naturaleza, no son capaces de predecir los efectos de la toxicidad crónica a múltiples sustancias, donde la gran cantidad de eventos celulares aunado a la gran plasticidad que tienen los sistemas biológicos en autoregularse disminuyen la predictibilidad. Esto constituye una razón por la que el uso de modelos toxicológicos *in vivo* sigue siendo necesario.

Sin embargo los modelos crónicos, particularmente como el utilizado por este estudio a largo plazo, aunque son una fuente valiosa y escasa de información, son inviables por su costo y duración a la luz de las múltiples combinaciones de sustancias ambientales potencialmente tóxicas, por lo que la mejor manera de afrontar el reto de la toxicología a

mezclas químicas sigue siendo la sinergia entre los diversos modelos de estudio. Finalmente, es evidente que los sistemas de evaluación de riesgos a la salud por exposición tóxica en humanos debe de incluir el concepto de exposición múltiple crónica por lo que los estudios sobre mezclas químicas a largo plazo son un gran reto para el futuro de la toxicología.

BIBLIOGRAFIA

- K. Abass, V. Lamsa, P. Reponen, J. Kublbeck, P. Honkakoski, S. Mattila, O. Pelkonen, J. Hakkola, Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides, *Toxicology* 294 (2012) 17-26.
- F. Ackerman, The economics of atrazine, *Int J Occup Environ Health* 13 (2007) 437-45.
- J.L. Adgate, D.B. Barr, C.A. Clayton, L.E. Eberly, N.C. Freeman, P.J. Liroy, L.L. Needham, E.D. Pellizzari, J.J. Quackenboss, A. Roy and others, Measurement of children's exposure to pesticides: analysis of urinary metabolite levels in a probability-based sample, *Environ Health Perspect* 109 (2001) 583-90.
- J.L. Adgate, C.A. Clayton, J.J. Quackenboss, K.W. Thomas, R.W. Whitmore, E.D. Pellizzari, P.J. Liroy, P. Shubat, C. Stroebel, N.C. Freeman and others, Measurement of multi-pollutant and multi-pathway exposures in a probability-based sample of children: practical strategies for effective field studies, *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology* 10 (2000) 650-61.
- S. Ahmad, K.T. Kitchin, W.R. Cullen, Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen, *Archives of biochemistry and biophysics* 382 (2000) 195-202.
- M.C. Alavanja, G. Akland, D. Baird, A. Blair, A. Bond, M. Dosemeci, F. Kamel, R. Lewis, J. Lubin, C. Lynch and others, Cancer and noncancer risk to women in agriculture and pest control: the Agricultural Health Study, *J Occup Med* 36 (1994) 1247-50.
- T.A. Arcury, J.G. Grzywacz, D.B. Barr, J. Tapia, H. Chen, S.A. Quandt, Pesticide urinary metabolite levels of children in eastern North Carolina farmworker households, *Environ Health Perspect* 115 (2007) 1254-60.
- W.D. Atchison, Effects of neurotoxicants on synaptic transmission: lessons learned from electrophysiological studies, *Neurotoxicol Teratol* 10 (1988) 393-416.
- Z.C. Baquet, D. Williams, J. Brody, R.J. Smeyne, A comparison of model-based (2D) and design-based (3D) stereological methods for estimating cell number in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of the C57BL/6J mouse, *Neuroscience* 161 (2009) 1082-90.
- J.E. Barbash, G.P. Thelin, D.W. Kolpin, R.J. Gilliom, Major herbicides in ground water: results from the National Water-Quality Assessment, *Journal of environmental quality* 30 (2001) 831-45.
- U. Bardullas, M. Giordano, V.M. Rodriguez, Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat, *Neurotoxicol Teratol* 33 (2011) 263-72.
- U. Bardullas, J.H. Limon-Pacheco, M. Giordano, L. Carrizales, M.S. Mendoza-Trejo, V.M. Rodriguez, Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice, *Toxicology and applied pharmacology* 239 (2009) 169-77.
- D.B. Barr, P. Panuwet, J.V. Nguyen, S. Udunka, L.L. Needham, Assessing exposure to atrazine and its metabolites using biomonitoring, *Environ Health Perspect* 115 (2007) 1474-8.
- V. Belloni, F. Dessi-Fulgheri, M. Zaccaroni, E. Di Consiglio, G. De Angelis, E. Testai, M. Santochirico, E. Alleva, D. Santucci, Early exposure to low doses

- of atrazine affects behavior in juvenile and adult CD1 mice, *Toxicology* 279 (2011) 19-26.
- M. Bentivoglio, M. Morreli, The organization and circuit of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. , in: S.B. Dunnett, M. Bentivoglio, A. Bjorklund, T. Hokfelt (Eds.), *Handbook Of Chemical Neuroanatomy*, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- M.C. Berenbaum, What is synergy?, *Pharmacol Rev* 41 (1989) 93-141.
- E. Bezard, M. Jaber, F. Gonon, A. Boireau, B. Bloch, C.E. Gross, Adaptive changes in the nigrostriatal pathway in response to increased 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration in the mouse, *Eur J Neurosci* 12 (2000) 2892-900.
- B.K. Binukumar, A. Bal, R. Kandimalla, A. Sunkaria, K.D. Gill, Mitochondrial energy metabolism impairment and liver dysfunction following chronic exposure to dichlorvos, *Toxicology* 270 (2010) 77-84.
- J. Calderon, M.E. Navarro, M.E. Jimenez-Capdeville, M.A. Santos-Diaz, A. Golden, I. Rodriguez-Leyva, V. Borja-Aburto, F. Diaz-Barriga, Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children, *Environmental research* 85 (2001) 69-76.
- S.J. Carpenter, Developmental analysis of cephalic axial dysraphic disorders in arsenic-treated hamster embryos, *Anatomy and embryology* 176 (1987) 345-65.
- P. Castano, V.F. Ferrario, L. Vizzotto, Sciatic nerve fibres in albino rats after atrazine treatment: a morpho-quantitative study, *International journal of tissue reactions* 4 (1982) 269-75.
- Y. Castro-Coronel, L.M. Del Razo, M. Huerta, A. Hernandez-Lopez, A. Ortega, E. Lopez-Bayghen, Arsenite exposure downregulates EAAT1/GLAST transporter expression in glial cells, *Toxicol Sci* 122 (2011) 539-50.
- G. Catenacci, M. Maroni, D. Cottica, L. Pozzoli, Assessment of human exposure to atrazine through the determination of free atrazine in urine, *Bull Environ Contam Toxicol* 44 (1990) 1-7.
- M.E. Cebrian, A. Albores, M. Aguilar, E. Blakely, Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico, *Human toxicology* 2 (1983) 121-33.
- Ciba-Geigy, Disposition of atrazine in rat (general metabolism), 1987).
- G. Cimino-Reale, D. Ferrario, B. Casati, R. Brustio, C. Diodovich, A. Collotta, M. Vahter, L. Gribaldo, 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 (2008) 59-66.
- A. Coban, N.M. Filipov, Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice, *J Neurochem* 100 (2007) 1177-87.
- G. Concha, B. Nermell, M.V. Vahter, Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina, *Environ Health Perspect* 106 (1998) 355-9.
- R.L. Cooper, S.C. Laws, P.C. Das, M.G. Narotsky, J.M. Goldman, E. Lee Tyrey, T.E. Stoker, Atrazine and reproductive function: mode and mechanism of action studies, *Birth defects research* 80 (2007) 98-112.
- E. Corsini, L. Asti, B. Viviani, M. Marinovich, C.L. Galli, Sodium arsenate induces overproduction of interleukin-1alpha in murine keratinocytes: role of mitochondria, *The Journal of investigative dermatology* 113 (1999) 760-5.
- S.J. Cragg, M.E. Rice, DANCing past the DAT at a DA synapse, *Trends Neurosci* 27 (2004) 270-7.

- B. Curwin, W. Sanderson, S. Reynolds, M. Hein, M. Alavanja, Pesticide use and practices in an Iowa farm family pesticide exposure study, *Journal of agricultural safety and health* 8 (2002) 423-33.
- B.D. Curwin, M.J. Hein, W.T. Sanderson, M.G. Nishioka, S.J. Reynolds, E.M. Ward, M.C. Alavanja, Pesticide contamination inside farm and nonfarm homes, *Journal of occupational and environmental hygiene* 2 (2005) 357-67.
- B.D. Curwin, M.J. Hein, W.T. Sanderson, C. Striley, D. Heederik, H. Kromhout, S.J. Reynolds, M.C. Alavanja, Pesticide dose estimates for children of Iowa farmers and non-farmers, *Environmental research* 105 (2007) 307-15.
- B.D. Curwin, M.J. Hein, W.T. Sanderson, C. Striley, D. Heederik, H. Kromhout, S.J. Reynolds, M.C. Alavanja, Urinary pesticide concentrations among children, mothers and fathers living in farm and non-farm households in Iowa, *The Annals of occupational hygiene* 51 (2007) 53-65.
- D. Chakraborti, M.K. Sengupta, M.M. Rahman, S. Ahamed, U.K. Chowdhury, M.A. Hossain, S.C. Mukherjee, S. Pati, K.C. Saha, R.N. Dutta and others, Groundwater arsenic contamination and its health effects in the Ganga-Meghna-Brahmaputra plain, *J Environ Monit* 6 (2004) 74N-83N.
- P.C. Das, W.K. McElroy, R.L. Cooper, Alteration of catecholamines in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro by the metabolites of chlorotriazine herbicide, *Toxicol Sci* 59 (2001) 127-37.
- P.C. Das, W.K. McElroy, R.L. Cooper, Differential modulation of catecholamines by chlorotriazine herbicides in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro, *Toxicol Sci* 56 (2000) 324-31.
- P.C. Das, W.K. McElroy, R.L. Cooper, Potential mechanisms responsible for chlorotriazine-induced alterations in catecholamines in pheochromocytoma (PC12) cells, *Life sciences* 73 (2003) 3123-38.
- H.N. David, M. Anseau, J.H. Abraini, Dopamine-glutamate reciprocal modulation of release and motor responses in the rat caudate-putamen and nucleus accumbens of "intact" animals, *Brain Res Brain Res Rev* 50 (2005) 336-60.
- C. de Burbure, J.P. Buchet, A. Leroyer, C. Nisse, J.M. Haguenoer, A. Mutti, Z. Smerhovsky, M. Cikrt, M. Trzcinka-Ochocka, G. Razniewska and others, Renal and neurologic effects of cadmium, lead, mercury, and arsenic in children: evidence of early effects and multiple interactions at environmental exposure levels, *Environ Health Perspect* 114 (2006) 584-90.
- L.M. Del Razo, M.A. Arellano, M.E. Cebrian, The oxidation states of arsenic in well-water from a chronic arsenicism area of northern Mexico, *Environ Pollut* 64 (1990) 143-53.
- L.M. Del Razo, G.G. Garcia-Vargas, H. Vargas, A. Albores, M.E. Gonsebatt, R. Montero, P. Ostrosky-Wegman, M. Kelsh, M.E. Cebrian, Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism. A pilot study, *Archives of toxicology* 71 (1997) 211-7.
- D. Del Rio, A.J. Stewart, N. Pellegrini, A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress, *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 15 (2005) 316-28.
- M. Delnomdedieu, M.M. Basti, M. Styblo, J.D. Otvos, D.J. Thomas, Complexation of arsenic species in rabbit erythrocytes, *Chemical research in toxicology* 7 (1994) 621-7.
- P. Dhar, M. Jaitley, M. Kalaivani, R.D. Mehra, Preliminary morphological and histochemical changes in rat spinal cord neurons following arsenic ingestion, *Neurotoxicology* 26 (2005) 309-20.

- Z. Diaz, M.I. Assaraf, W.H. Miller, Jr., H.M. Schipper, Astroglial cytoprotection by erythropoietin pre-conditioning: implications for ischemic and degenerative CNS disorders, *J Neurochem* 93 (2005) 392-402.
- G.P. Dooley, A.K. Ashley, M.E. Legare, R.J. Handa, W.H. Hanneman, Proteomic analysis of diaminochlorotriazine (DACT) adducts in three brain regions of Wistar rats, *Toxicol Lett* 199 (2010) 17-21.
- G.P. Dooley, J.E. Prenni, P.L. Prentiss, B.K. Cranmer, M.E. Andersen, J.D. Tessari, Identification of a novel hemoglobin adduct in Sprague Dawley rats exposed to atrazine, *Chemical research in toxicology* 19 (2006) 692-700.
- D.E. Edmondson, A. Mattevi, C. Binda, M. Li, F. Hubalek, Structure and mechanism of monoamine oxidase, *Curr Med Chem* 11 (2004) 1983-93.
- S.E. Edwards, K.E. Martz, A. Rogge, M. Heinrich, Edaphic and Phytochemical Factors as Predictors of Equine Grass Sickness Cases in the UK, *Frontiers in pharmacology* 1 (2010) 122.
- A. Fan, G. Alexeeff, Public Health Goal for Atrazine In Drinking Water, in: E.P. Agency (Ed.)1999.
- N.M. Filipov, M.A. Stewart, R.L. Carr, S.C. Sistrunk, Dopaminergic toxicity of the herbicide atrazine in rat striatal slices, *Toxicology* 232 (2007) 68-78.
- P.F. Fitzpatrick, Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases, *Annu Rev Biochem* 68 (1999) 355-81.
- A. Franzblau, R. Lilis, Acute arsenic intoxication from environmental arsenic exposure, *Archives of environmental health* 44 (1989) 385-90.
- D.W. Gammon, C.N. Aldous, W.C. Carr, Jr., J.R. Sanborn, K.F. Pfeifer, A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects, *Pest Manag Sci* 61 (2005) 331-55.
- E. Garcia-Chavez, B. Segura, H. Merchant, I. Jimenez, L.M. Del Razo, Functional and morphological effects of repeated sodium arsenite exposure on rat peripheral sensory nerves, *Journal of the neurological sciences* 258 (2007) 104-10.
- G.G. Garcia-Vargas, A. Garcia-Rangel, M. Aguilar-Romo, J. Garcia-Salcedo, L.M. del Razo, P. Ostrosky-Wegman, C. Cortinas de Nava, M.E. Cebrian, A pilot study on the urinary excretion of porphyrins in human populations chronically exposed to arsenic in Mexico, *Human & experimental toxicology* 10 (1991) 189-93.
- M.E. Gonsebatt, L. Vega, R. Montero, G. Garcia-Vargas, L.M. Del Razo, A. Albores, M.E. Cebrian, P. Ostrosky-Wegman, Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water, *Mutat Res* 313 (1994) 293-9.
- F. Gonzalez-Lima, M. Garrosa, Quantitative histochemistry of cytochrome oxidase in rat brain, *Neuroscience letters* 123 (1991) 251-3.
- E. Graf, J.R. Mahoney, R.G. Bryant, J.W. Eaton, Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site, *The Journal of biological chemistry* 259 (1984) 3620-4.
- D.M. Hafeman, H. Ahsan, E.D. Louis, A.B. Siddique, V. Slavkovich, Z. Cheng, A. van Geen, J.H. Graziano, Association between arsenic exposure and a measure of subclinical sensory neuropathy in Bangladesh, *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine* 47 (2005) 778-84.
- R.W. Hart, J.E. Leakey, M. Chou, P.H. Duffy, W.T. Allaben, R.J. Feuers, Modulation of chemical toxicity by modification of caloric intake, *Adv Exp Med Biol* 322 (1992) 73-81.

- T. Hayes, K. Haston, M. Tsui, A. Hoang, C. Haeffele, A. Vonk, Herbicides: feminization of male frogs in the wild, *Nature* 419 (2002) 895-6.
- G.E. Hoffman, W.W. Le, L.V. Sita, The importance of titrating antibodies for immunocytochemical methods, *Curr Protoc Neurosci Chapter 2* (2008) Unit 2 12.
- M.M. Hossain, N.M. Filipov, 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 (2008) 52-8.
- M.F. Hughes, Arsenic toxicity and potential mechanisms of action, *Toxicol Lett* 133 (2002) 1-16.
- M.O. Islam, M. Hara, J. Miyake, Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase and cytochrome P450 in rat liver by atrazine, *Environmental toxicology and pharmacology* 12 (2002) 1-6.
- T. Itoh, Y.F. Zhang, S. Murai, H. Saito, H. Nagahama, H. Miyate, Y. Saito, E. Abe, The effect of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice, *Toxicol Lett* 54 (1990) 345-53.
- N.D. Jablonowski, A. Schaffer, P. Burauel, Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine, *Environmental science and pollution research international* 18 (2011) 328-31.
- R. Jackson, J.W. Grainge, Arsenic and cancer, *Canadian Medical Association journal* 113 (1975) 396-401.
- N.A. Karrow, J.A. McCay, R.D. Brown, D.L. Musgrove, T.L. Guo, D.R. Germolec, K.L. White, Jr., Oral exposure to atrazine modulates cell-mediated immune function and decreases host resistance to the B16F10 tumor model in female B6C3F1 mice, *Toxicology* 209 (2005) 15-28.
- L.J. Kenney, J.H. Kaplan, Arsenate substitutes for phosphate in the human red cell sodium pump and anion exchanger, *The Journal of biological chemistry* 263 (1988) 7954-60.
- D.G. Kinniburgh, W. Kosmus, Arsenic contamination in groundwater: some analytical considerations, *Talanta* 58 (2002) 165-80.
- S. Korff, D.J. Stein, B.H. Harvey, Stereotypic behaviour in the deer mouse: pharmacological validation and relevance for obsessive compulsive disorder, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32 (2008) 348-55.
- J. Lee, K.B. Seroogy, M.P. Mattson, Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice, *J Neurochem* 80 (2002) 539-47.
- E.M. Leslie, Arsenic-glutathione conjugate transport by the human multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs), *Journal of inorganic biochemistry* 108 (2012) 141-9.
- B. Lex, S. Sommer, W. Hauber, The role of dopamine in the dorsomedial striatum in place and response learning, *Neuroscience* 172 (2011) 212-8.
- V.H. Liao, J.T. Liu, W.H. Li, C.W. Yu, Y.C. Hsieh, Caenorhabditis elegans bicarbonate transporter ABTS-1 is involved in arsenite toxicity and cholinergic signaling, *Chemical research in toxicology* 23 (2010) 926-32.
- Z. Lin, C.A. Dodd, N.M. Filipov, Short-term atrazine exposure causes behavioral deficits and disrupts monoaminergic systems in male C57BL/6 mice, *Neurotoxicol Teratol* 39 (2013) 26-35.
- P.J. Liroy, R.D. Edwards, N. Freeman, S. Gurunathan, E. Pellizzari, J.L. Adgate, J. Quackenboss, K. Sexton, House dust levels of selected insecticides and a herbicide measured by the EL and LWW samplers and comparisons to hand rinses and urine metabolites, *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology* 10 (2000) 327-40.

- D. Liu, S.L. Chan, N.C. de Souza-Pinto, J.R. Slevin, R.P. Wersto, M. Zhan, K. Mustafa, R. de Cabo, M.P. Mattson, Mitochondrial UCP4 mediates an adaptive shift in energy metabolism and increases the resistance of neurons to metabolic and oxidative stress, *Neuromolecular medicine* 8 (2006) 389-414.
- S.X. Liu, M. Athar, I. Lippai, C. Waldren, T.K. Hei, Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 1643-8.
- Z. Liu, M.A. Sanchez, X. Jiang, E. Boles, S.M. Landfear, B.P. Rosen, Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid, *Biochem Biophys Res Commun* 351 (2006) 424-30.
- O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of biological chemistry* 193 (1951) 265-75.
- M. Lu, H. Wang, X.F. Li, X. Lu, W.R. Cullen, L.L. Arnold, S.M. Cohen, X.C. Le, Evidence of hemoglobin binding to arsenic as a basis for the accumulation of arsenic in rat blood, *Chemical research in toxicology* 17 (2004) 1733-42.
- D.L. MacIntosh, L.L. Needham, K.A. Hammerstrom, P.B. Ryan, A longitudinal investigation of selected pesticide metabolites in urine, *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology* 9 (1999) 494-501.
- R. Maitra, J.W. Hamilton, Arsenite regulates Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator and P-glycoprotein: evidence of pathway independence, *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 16 (2005) 109-18.
- W. Massrieh, A. Derjuga, V. Blank, Induction of endogenous Nrf2/small maf heterodimers by arsenic-mediated stress in placental choriocarcinoma cells, *Antioxidants & redox signaling* 8 (2006) 53-9.
- L.S. McCarty, C.J. Borgert, Review of the toxicity of chemical mixtures: Theory, policy, and regulatory practice, *Regul Toxicol Pharmacol* 45 (2006) 119-43.
- T.S. McMullin, J.M. Brzezicki, B.K. Cranmer, J.D. Tessari, M.E. Andersen, Pharmacokinetic modeling of disposition and time-course studies with [¹⁴C]atrazine, *J Toxicol Environ Health A* 66 (2003) 941-64.
- D.A. McRitchie, C.D. Hardman, G.M. Halliday, Cytoarchitectural distribution of calcium binding proteins in midbrain dopaminergic regions of rats and humans, *The Journal of comparative neurology* 364 (1996) 121-50.
- J.J. Mejia, F. Diaz-Barriga, J. Calderon, C. Rios, M.E. Jimenez-Capdeville, Effects of lead-arsenic combined exposure on central monoaminergic systems, *Neurotoxicol Teratol* 19 (1997) 489-97.
- M.E. Meyer, T.J. Potter, Biphasic effects of dopamine agonist N-0434 on locomotor behaviors in rats, *Pharmacol Biochem Behav* 44 (1993) 865-8.
- C. Monville, E.M. Torres, S.B. Dunnett, 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 (2006) 219-23.
- S.C. Mukherjee, K.C. Saha, S. Pati, R.N. Dutta, M.M. Rahman, M.K. Sengupta, S. Ahamed, D. Lodh, B. Das, M.A. Hossain and others, Murshidabad--one of the nine groundwater arsenic-affected districts of West Bengal, India. Part II: dermatological, neurological, and obstetric findings, *Clin Toxicol (Phila)* 43 (2005) 835-48.
- T.N. Nagaraja, T. Desiraju, Regional alterations in the levels of brain biogenic amines, glutamate, GABA, and GAD activity due to chronic consumption of

- inorganic arsenic in developing and adult rats, *Bull Environ Contam Toxicol* 50 (1993) 100-7.
- S.B. Narahariseti, M. Aggarwal, V. Ranganathan, S.N. Sarkar, M. Kataria, J.K. Malik, Effects of simultaneous repeated exposure at high levels of arsenic and malathion on hepatic drug-biotransforming enzymes in broiler chickens, *Environmental toxicology and pharmacology* 28 (2009) 213-8.
- S.B. Narahariseti, M. Aggarwal, S.N. Sarkar, J.K. Malik, Concurrent subacute exposure to arsenic through drinking water and malathion via diet in male rats: effects on hepatic drug-metabolizing enzymes, *Archives of toxicology* 82 (2008) 543-51.
- J.R. Nation, C.A. Grover, G.R. Bratton, J.A. Salinas, Behavioral antagonism between lead and cadmium, *Neurotoxicol Teratol* 12 (1990) 99-104.
- R. Neiger, N. Nelson, D. Miskimins, J. Caster, L. Caster, Bovine arsenic toxicosis, *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 16 (2004) 436-8.
- J. Newcomb, *A Plague of Frogs: What does the battle over atrazine mean for agriculture and agrochemicals?*, Bio Economic Research Associates, Cambridge, 2003.
- M.G. Packard, J.L. McGaugh, Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning, *Neurobiol Learn Mem* 65 (1996) 65-72.
- J.S. Petrick, B. Jagadish, E.A. Mash, H.V. Aposhian, Monomethylarsonous acid (MMA(III)) and arsenite: LD(50) in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase, *Chemical research in toxicology* 14 (2001) 651-6.
- B.D. Pimparkar, A. Bhave, Arsenicosis: review of recent advances, *The Journal of the Association of Physicians of India* 58 (2010) 617-24, 629.
- V.M. Rodriguez, L. Carrizales, M.E. Jimenez-Capdeville, L. Dufour, M. Giordano, The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat, *Brain Res Bull* 55 (2001) 301-8.
- V.M. Rodriguez, L. Carrizales, M.S. Mendoza, O.R. Fajardo, M. Giordano, Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat, *Neurotoxicol Teratol* 24 (2002) 743-50.
- V.M. Rodriguez, L.M. Del Razo, J.H. Limon-Pacheco, M. Giordano, L.C. Sanchez-Pena, E. Uribe-Querol, G. Gutierrez-Ospina, M.E. Gonshebbatt, Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver, *Toxicol Sci* 84 (2005) 157-66.
- V.M. Rodriguez, J.H. Limon-Pacheco, L. Carrizales, M.S. Mendoza-Trejo, M. Giordano, Chronic exposure to low levels of inorganic arsenic causes alterations in locomotor activity and in the expression of dopaminergic and antioxidant systems in the albino rat, *Neurotoxicol Teratol* 32 (2010) 640-7.
- V.M. Rodriguez, J.H. Limon-Pacheco, M.S. Mendoza-Trejo, A. Gonzalez-Gallardo, I. Hernandez-Plata, M. Giordano, Repeated exposure to the herbicide atrazine alters locomotor activity and the nigrostriatal dopaminergic system of the albino rat, *Neurotoxicology* 34 (2013) 82-94.
- J.A. Romano, Jr., M.R. Landauer, 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 (1986) 62-8.
- J.L. Rosado, D. Ronquillo, K. Kordas, O. Rojas, J. Alatorre, P. Lopez, G. Garcia-Vargas, M. Del Carmen Caamano, M.E. Cebrian, R.J. Stoltzfus, Arsenic

- exposure and cognitive performance in Mexican schoolchildren, *Environ Health Perspect* 115 (2007) 1371-5.
- M.K. Ross, T.L. Jones, N.M. Filipov, Disposition of the herbicide atrazine and its major metabolites in mice: An LC-MS analysis of urine, plasma, and tissue levels, *Drug Metab Dispos* 2008).
- N. Scott, K.M. Hatlelid, N.E. MacKenzie, D.E. Carter, Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione, *Chemical research in toxicology* 6 (1993) 102-6.
- L.P. Sheets, A consideration of age-dependent differences in susceptibility to organophosphorus and pyrethroid insecticides, *Neurotoxicology* 21 (2000) 57-63.
- L.P. Sheets, J.D. Doherty, M.W. Law, L.W. Reiter, K.M. Crofton, Age-dependent differences in the susceptibility of rats to deltamethrin, *Toxicology and applied pharmacology* 126 (1994) 186-90.
- S. Shila, V. Kokilavani, M. Subathra, C. Panneerselvam, Brain regional responses in antioxidant system to alpha-lipoic acid in arsenic intoxicated rat, *Toxicology* 210 (2005) 25-36.
- X. Shuhua, L. Ziyu, Y. Ling, W. Fei, G. Sun, A role of fluoride on free radical generation and oxidative stress in BV-2 microglia cells, *Mediators of inflammation* 2012 (2012) 102954.
- SIAMI, Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (SIAMI) . <http://www.economia-snci.gob.mx>, Secretaría de Economía, México, 2008.
- G. Siegel, W. Albers, S. Brady, , *Basic Neurochemistry.*, in: Elsevier (Ed.), Seventh Edition, San Diego California EUA., 2007, pp. 211-225
- W.J. Smeets, A. Gonzalez, Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach, *Brain Res Brain Res Rev* 33 (2000) 308-79.
- T.E. Stoker, R.L. Cooper, Distribution of ¹⁴C-atrazine following an acute lactational exposure in the Wistar rat, *Reproductive toxicology* (Elmsford, NY 23 (2007) 607-10.
- A.H. Stokes, W.M. Freeman, S.G. Mitchell, T.A. Burnette, G.M. Hellmann, K.E. Vrana, Induction of GADD45 and GADD153 in neuroblastoma cells by dopamine-induced toxicity, *Neurotoxicology* 23 (2002) 675-84.
- P.B. Tchounwou, B.A. Wilson, A.B. Ishaque, J. Schneider, Atrazine potentiation of arsenic trioxide-induced cytotoxicity and gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2), *Molecular and cellular biochemistry* 222 (2001) 49-59.
- M. Thiruchelvam, B.J. Brockel, E.K. Richfield, R.B. Baggs, D.A. Cory-Slechta, Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease?, *Brain Res* 873 (2000) 225-34.
- M. Thiruchelvam, E.K. Richfield, R.B. Baggs, A.W. Tank, D.A. Cory-Slechta, The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease, *J Neurosci* 20 (2000) 9207-14.
- S.Y. Tsai, H.Y. Chou, H.W. The, C.M. Chen, C.J. Chen, The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence, *Neurotoxicology* 24 (2003) 747-53.
- G. Ugazio, A. Bosio, C. Nebbia, M.G. Soffietti, Age- and sex-related effects on hepatic drug metabolism in rats chronically exposed to dietary atrazine,

- Research communications in chemical pathology and pharmacology 73 (1991) 231-43.
- M.E. Vahter, Interactions between arsenic-induced toxicity and nutrition in early life, *J Nutr* 137 (2007) 2798-804.
- J. Wang, W. Zhang, D. Sun, L. Song, Y. Li, C. Xu, Analysis of neuroglobin mRNA expression in rat brain due to arsenite-induced oxidative stress, *Environmental toxicology* 27 (2012) 503-9.
- T.S. Wang, C.F. Kuo, K.Y. Jan, H. Huang, Arsenite induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species, *Journal of cellular physiology* 169 (1996) 256-68.
- G.A. Wasserman, X. Liu, F. Parvez, H. Ahsan, P. Factor-Litvak, A. van Geen, V. Slavkovich, N.J. Lolocono, Z. Cheng, I. Hussain and others, Water arsenic exposure and children's intellectual function in Araihasar, Bangladesh, *Environ Health Perspect* 112 (2004) 1329-33.
- L.T. Weiss-Wunder, M.F. Chesselet, Heterogeneous distribution of cytochrome oxidase activity in the rat substantia nigra: correlation with tyrosine hydroxylase and dynorphin immunoreactivities, *Brain Res* 529 (1990) 269-76.
- S.L. Winski, D.E. Carter, Arsenate toxicity in human erythrocytes: characterization of morphologic changes and determination of the mechanism of damage, *J Toxicol Environ Health A* 53 (1998) 345-55.
- L.L. Xavier, G.G. Viola, A.C. Ferraz, C. Da Cunha, J.M. Deonizio, C.A. Netto, M. Achaval, A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area, *Brain research Brain research protocols* 16 (2005) 58-64.
- C.C. Yen, F.J. Lu, C.F. Huang, W.K. Chen, S.H. Liu, S.Y. Lin-Shiau, The diabetogenic effects of the combination of humic acid and arsenic: in vitro and in vivo studies, *Toxicol Lett* 172 (2007) 91-105.
- J. Zhang, X. Liu, L. Zhao, S. Hu, S. Li, F. Piao, Subchronic exposure to arsenic disturbed the biogenic amine neurotransmitter level and the mRNA expression of synthetase in mice brains, *Neuroscience* 2013).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía nigroestriatal.....	4
Figura 2. Fisiología del sistema dopaminérgico.....	7
Figura 3. Metabolismo de dopamina.....	8
Figura 4. Estructura molecular de la atrazina.....	11
Figura 5. Metabolitos de la atrazina en mamíferos.....	17
Figura 6. Modelos del metabolismo de As.	24
Figura 7. Diseño experimental general.....	36
Figura 8. Diseño de la tarea de aprendizaje de respuesta y lugar.....	40
Figura 9. Secciones coronales para técnicas histológicas.....	43
Figura 10. Cortes de las substancia nigra.....	45
Figura 11. Resultados en el peso corporal.....	48
Figura 12. Resultados en la actividad locomotora espontánea.....	52
Figura 13. Prueba de coordinación motora.....	53
Figura 14. Curva de aprendizaje para el laberinto en cruz.....	54
Figura 15. Resultados en la prueba de aprendizaje.....	55
Figura 16. Contenido de dopamina y DOPAC en estriado.....	56
Figura 17. Reactividad a la citocromo oxidasa.....	57
Figura 18. Inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa en SNc.....	58
Figura 19. Conteo de neuronas reactivas a tirosina hidroxilasa en SNpc.....	59

Figura 20. Inmunohistoquímica de malondehaldeído en SNpc.....60

Figura 21. Niveles de proteína del transportador de dopamina en estriado.....61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de la ATR marcada radioactivamente en distintas regiones del cerebro de ratas lactantes.....	15
Tabla 2. Distribución del As distintas regiones del cerebro de ratas expuestas a 100 mg As/L.....	23
Tabla 3. Alteraciones en el sistema nervioso central asociadas a la exposición con As en humanos.....	27
Tabla 4. Alteraciones conductuales asociadas a la exposición de As en modelos animales.....	29
Tabla 5. Alteraciones en la neuroquímica del sistema nervioso asociadas a la exposición de As en modelos animales.....	29
Tabla 6. Consumo diario de agua mes 10 y 12 de exposición.....	49
Tabla 7. Marcadores bioquímicos y de daño muscular.....	50
Tabla 8. Resumen de los efectos de la exposición crónica a la ATR, As y la combinación de ATR+As.....	63