



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN REPETIDA A GLIFOSATO SOBRE
LAS VÍAS DOPAMINÉRGICAS DE LA RATA ALBINA**

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

PRESENTA:
M. en C. ISELA HERNÁNDEZ PLATA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. VERÓNICA MIREYA RODRÍGUEZ CÓRDOVA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA - UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA – UNAM

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA - UNAM

MÉXICO, SEPTIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

El glifosato (Glif) es el ingrediente activo de un conjunto de herbicidas ampliamente usados. A pesar de que se considera que el glifosato no representa riesgos para la salud de los humanos, en los últimos años se han registrado casos de humanos expuestos a herbicidas con glifosato y estudios en modelos murinos que sugieren que el glifosato podría ser neurotóxico. Sin embargo, no hay estudios que evalúen los efectos del glifosato sobre el sistema nervioso. Por ello, en el presente trabajo fueron evaluados los cambios conductuales, neuroquímicos y estructurales de regiones dopaminérgicas en ratas sujetas a una exposición repetida de glifosato. Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague – Dawley, las cuales recibieron 6 inyecciones intraperitoneales de solución salina (vehículo), 50, 100 ó 150 mg Glif/kg por 2 semanas (3 inyecciones por semana). La actividad locomotora fue registrada durante el tratamiento, y en los días 2 y 16 post-tratamiento. Los animales fueron sacrificados los días 2 y 16 post-tratamiento y fueron evaluados algunos marcadores dopaminérgicos. Se encontró que la exposición repetida a glifosato causa hipoactividad inmediatamente después de cada inyección, y que esta hipoactividad es evidente aún en el día 2 post-tratamiento en los animales que recibieron el tratamiento de 150 mg Glif/kg. El contenido de monoaminas, niveles de tirosina hidroxilasa (TH) en estriado y núcleo accumbens y el número de células positivas a TH en el mesencéfalo no mostraron cambios en el día 2 ó 16 post-tratamiento. Sin embargo, la unión específica del antagonista SCH23390 a los receptores de dopamina D1 en núcleo accumbens disminuyó en los grupos tratados con alguna de las tres dosis de glifosato. Esta disminución mostró una correlación positiva con la distancia total y la actividad vertical de los animales registrada inmediatamente después de cada inyección. Por otro lado, el estudio de microdiálisis reveló que el glifosato tiene efectos agudos en el estriado sobre los niveles de dopamina extracelular y la liberación de dopamina inducida por alto potasio. Estos resultados muestran que el glifosato tiene efectos sobre la actividad locomotora y sobre sitios específicos en la neurotransmisión dopaminérgica de la rata.

SUMMARY

Glyphosate (Glyph) is the active ingredient of several herbicide formulations. Glyph and its herbicide formulations are considered safe for the human health. However, some current reports in humans and in rodent models suggest possible neurotoxic effects of Glyph. Nevertheless, there are no studies that assess the effects of Glyph on the nervous system. So that, the purpose of this thesis was to assess the behavioral, neurochemical and structural changes in dopaminergic brain areas of rats repeatedly exposed to Glyph. Male Sprague - Dawley rats were given 6 intraperitoneal injections of 50, 100, or 150 mg Glyph/kg of body weight over 2 weeks (3 injections/week). Locomotor activity was recorded during the treatment, and at the 2nd and 16th day post-treatment. Animals were sacrificed at these times and some dopaminergic markers were assessed. Repeated exposure to Glyph caused hypoactivity immediately after each injection, which was apparent 2 days after the last injection in rats exposed to the highest dose. Glyph did not modify monoamines or tyrosine hydroxylase (TH) content, nor mesencephalic TH+ cells when evaluated at 2 or 16 days post-treatment. In contrast, the specific binding of dopamine receptor D1 in nucleus accumbens decreased in the animals treated with three doses of Glyph when measured 2 days after the last Glyph injection. Microdialysis experiments unveiled that a systemic injection of 150 mg Glyph/kg body weight has acute effects on basal extracellular DA levels and high-potassium-induced DA release in the striatum. Glyph did not affect the extracellular concentrations of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid or homovanillic acid. These results show that Glyph has effects on the locomotor activity and on specific targets of dopaminergic system of the rat.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova, Dra. Magdalena Giordano, Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray y al Dr. Mauricio Díaz Muñoz, por ser figuras importantes que moldearon mi vida académica y porque en retrospectiva hicieron que mi estancia doctoral valiera la pena.

A la Dra. Verónica Rodríguez *por ayudarme a recuperar lo perdido y hacer posible lo que algún día soñé*. Gracias por esta gran oportunidad, por la confianza y el apoyo incondicional mostrado en todo este tiempo.

A la Dra. Magdalena Giordano por sus comentarios y sugerencias para realizar mi tesis doctoral. Principalmente por mostrar *interés en el proyecto* ya que eso llevó a realizar los experimentos de condicionamiento de aversión al sabor y condicionamiento de preferencia de lugar. Mi agradecimiento personal y admiración por lo justa que puede ser y por la disciplina mostrada en todo lo que hace.

A mi comité tutor: Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray y al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por su asesoría durante el proyecto doctoral. Gracias a la Dra. Elizabeth porque aprendí de su *“personalidad crítica”* y gracias al Dr. Mauricio porque me enseñó sin proponérselo *“a ver el orden en el caos”*.

A mi jurado de examen: Dra. María Isabel Miranda Saucedo, Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova, Dr. Alfonso Cárabez Trejo, Dra. Lourdes Massieu Trigo y a la Dra. Leticia Yáñez Estrada, por sus comentarios y sugerencias para mejorar el presente escrito.

A la Biól. Soledad Mendoza por la ayuda técnica para realizar este proyecto doctoral. Te agradezco el apoyo brindado en todo este tiempo.

Al Dr. Jorge Limón Pacheco por su asesoría en la técnica de Western Blot y por su asesoría ante cualquier inconveniente experimental.

A los compañeros y amigos del laboratorio D12: Abraham Márquez, Jana Toiber, Ulises Pacheco, Claudia Moreno, Mariana Ramos, Miriam Cruz, Ariadna Ríos, Marcela Sánchez, Gema Huichapa, Jocelyn Moreno, Isabel Hernández y a Dulce Reyes gracias por la convivencia, por sus comentarios y sugerencias durante los seminarios de laboratorio. Todos han contribuido a mi vida académica y personal.

A la Dra. Teresa Morales Guzmán, Dra. María Isabel Miranda, Dra. Wendy Portillo Martínez, Dra. Olivia Vázquez-Martínez, Nut. Fernando López-Barrera, MVZ. Francisco Camacho Barrios, Biol. María Eugenia Ramos Aguilar y a Miguel Ángel Cortés, por su apoyo técnico en este proyecto doctoral.

A Ma. de Lourdes Lara Ayala por su apoyo y *amabilidad* en la organización de las videoconferencias.

A Leonor Casanova Rico por su apoyo, *amabilidad y eficiencia* en la resolución de dudas y trámites de posgrado. “Gracias Leo”.

A Flor Bernardino Peláez, Claudia González Flores y a Raúl Calderón Aguilera por su apoyo en el laboratorio y/o en el *cuidado y mantenimiento de los animales. Los personajes principales de este estudio.*

En la biblioteca quiero agradecer a Teresita de Jesús Pérez Cruz, por su amabilidad y eficiencia en conseguir los artículos científicos.

A Ramón Olvera Martínez y a Sandra Hernández García de la unidad de computo por su disponibilidad ante cualquier inconveniente “computacional”.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Mexicano de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mi estancia en el doctorado 164300. Esta tesis fue realizada con el apoyo de los proyectos: 60662 y 152842 de V.M.R y 103907 de M.G. También se contó con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) [214608-19 y 202013 de V.M.R.].

DEDICATORIA

....Por guiar nuestro camino

A mi mamá porque en vez de cortarme las alas me impulsó a seguir volando.

A Germán por compartir *su tiempo* con mi otro amor que es la Ciencia.

A mi padre y a mis hermanos por su presencia y/o ausencia en mi vida.

ÍNDICE

	<u>Pág.</u>
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Sistema dopaminérgico.....	3
2.1.1 Síntesis y degradación de dopamina.....	4
2.1.2 Receptores dopaminérgicos.....	6
2.2 Efecto de los plaguicidas en el sistema dopaminérgico.....	10
2.3 El herbicida glifosato.....	12
2.3.1 Mecanismo de acción en las plantas.....	12
2.3.2 Propiedades fisicoquímicas del glifosato.....	13
2.3.3 Toxicocinética: absorción, distribución y eliminación del glifosato.....	13
2.3.4 Fuentes de exposición al glifosato.....	14
2.4 Efectos tóxicos del herbicida glifosato.....	15
2.5 Efectos neurotóxicos del herbicida glifosato.....	16
2.6 Mecanismo de acción de glifosato en animales.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	26
5.1 Objetivo general.....	26
5.2 Objetivos particulares.....	26

6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
6.1 Animales.....	27
6.2 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre la actividad locomotora y algunos marcadores dopaminérgicos.....	28
6.3 Efectos de la exposición aguda a glifosato sobre la liberación de dopamina en STR y NAcc.....	30
7. METODOLOGÍA.....	32
7.1 Registro de la actividad locomotora.....	32
7.2 Determinación de la concentración de monoaminas.....	33
7.3 Determinación de los niveles de la proteína tirosina hidroxilasa.....	34
7.4 Cuantificación de las concentraciones de proteínas.....	35
7.5 Ensayo de radioligando en STR y NAcc.....	36
7.5.1 Extracción de membranas celulares de STR y NAcc.....	36
7.5.2 Ensayo de radioligando para los receptores de dopamina tipo D1 y D2.....	37
7.6 Número de células positivas a tirosina hidroxilasa en el mesencéfalo.....	39
7.7 Evaluación de marcadores bioquímicos de daño sistémico.....	40
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44
9. RESULTADOS.....	45
9.1 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre la actividad locomotora y marcadores dopaminérgicos.....	45
9.1.1 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre la actividad locomotora.....	45

9.1.2 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre la actividad locomotora registrada 16 días post-tratamiento.....	48
9.1.3 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre el peso corporal y los marcadores bioquímicos de daño sistémico (LDH, AST y γ -GT).....	48
9.1.4 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre el contenido de monoaminas y los niveles de la enzima TH en STR o NAcc.....	48
9.1.5 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre la unión específica de los antagonistas [³ H] SCH23390 y [³ H] Spiperona a los receptores de dopamina tipo D1 y D2.....	53
9.1.6 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre el número de células positivas a TH en la sustancia nigra y el área ventral tegmental.....	57
9.2 Efectos de la exposición aguda a glifosato sobre la liberación de dopamina en STR y NAcc.....	58
10. DISCUSIÓN.....	61
11. CONCLUSIONES.....	68
12. PERSPECTIVAS.....	69
13. REFERENCIAS.....	70
APÉNDICE.....	80
Experimento A: Efectos del glifosato y del pH sobre la actividad locomotora.....	80
Experimento B: Condicionamiento de aversión al sabor.....	84
Experimento C: Condicionamiento de preferencia de lugar.....	87
Sección de tablas.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
Figura 1. Vías dopaminérgicas mesolímbica y nigroestriatal en la rata.....	4
Figura 2. Síntesis y degradación de dopamina.....	6
Figura 3. Estructura general de los receptores dopaminérgicos tipo D1 y las vías de señalización de los receptores D1 y D2.....	9
Figura 4. Estructura química del glifosato y su principal metabolito, el ácido aminometilfosfónico (AMPA).....	13
Figura 5. Diseño experimental de la exposición repetida y aguda a glifosato....	29
Figura 6. Sistema de registro para evaluar la actividad locomotora.....	33
Figura 7. Microfotografías (4X) de cortes coronales de las áreas dopaminérgicas analizadas en el conteo de células positivas a tirosina hidroxilasa (TH).....	43
Figura 8. Actividad locomotora registrada 15 min (A, B y C) antes y durante 3 h (a, b y c) inmediatamente después de la administración i.p de solución salina (vehículo), 50, 100 ó 150 mg Glif/kg.....	47
Figura 9. Actividad locomotora registrada 15 min antes de la inyección i.p de solución salina (A, B y C) y durante 24 h del ciclo luz/oscuridad inmediatamente después de la inyección i.p de solución salina (a, b y c) en el día 16 post-tratamiento, de la última inyección de solución salina (vehículo), 50, 100 ó 150 mg Glif/kg.....	49
Figura 10. Niveles de tirosina hidroxilasa (TH) en STR y NAcc evaluados a los 2 y 16 días post-tratamiento expresados como porcentaje del grupo control (vehículo).....	52
Figura 11. Unión específica de los antagonistas [³ H] SCH23390 y [³ H] Spiperona a los receptores de dopamina tipo D1 y D2 en STR y NAcc, evaluada en el día 2 post-tratamiento con glifosato.....	54

Figura 12. Unión específica de los antagonistas [³ H] SCH23390 y [³ H] Spiperona a los receptores de DA tipo D1 y D2 en STR y NAcc evaluada en el día 16 post-tratamiento con glifosato.....	55
Figura 13. Correlación entre la unión específica del antagonista [³ H] SCH23390 a los receptores de DA tipo D1 en NAcc evaluado a los 2 días post-tratamiento y la actividad locomotora promedio de las 3 h posteriores al tratamiento (7 administraciones de glifosato ó vehículo).....	56
Figura 14. Efecto agudo de Glif sobre la liberación de DA y sus metabolitos en STR de ratas anestesiadas.....	59
Figura 15. Efecto agudo de Glif sobre la liberación de DA y sus metabolitos en NAcc de ratas anestesiadas.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

	<u>Pág.</u>
Tabla 1. Casos de neurotoxicidad humana por exposición a herbicidas que contienen glifosato.....	19
Tabla 2. Modelos murinos de neurotoxicidad utilizando herbicidas que contienen glifosato.....	20
Table 3. Peso corporal de los animales tratados con glifosato.....	50
Tabla 4. Actividad enzimática de lactato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa y gamma-glutamyl transferasa, 2 y 16 días post-tratamiento...	50
Tabla 5. Contenido de monoaminas en el estriado y núcleo accumbens de ratas tratadas con glifosato, evaluadas 2 y 16 días post-tratamiento.....	51
Tabla 6. Número de células positivas a TH en la sustancia nigra y en el área ventral tegmental de ratas tratadas con glifosato a los 2 y 16 días post-tratamiento.....	57

1. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son sustancias químicas vertidas intencionalmente al medio ambiente para controlar plagas. La industrialización de estos compuestos en los años 30's llevó al surgimiento de una gran variedad de agroquímicos que pueden ser clasificados con base al organismo que eliminan o controlan, estructura química, modo de acción, etcétera. En la década de los años 80's se encontró que la exposición a MTTP (1-metil, 4-fenil, 1,2,3,6-tetrahidropiridina, contaminante presente en una heroína sintética) jugaba un papel importante en la etiología de la enfermedad de Parkinson. La semejanza entre la estructura química del MTTP y el herbicida paraquat llevó a realizar estudios en modelos animales, en los cuales se encontró que el paraquat alteraba el control motor y el sistema nervioso, principalmente el sistema dopaminérgico (Brooks y cols., 1999; Kang y cols., 2009). Con estos hallazgos surgió la posibilidad de que contaminantes ambientales como los plaguicidas podrían estar asociados con la incidencia a desarrollar enfermedades neurológicas (Hatcher y cols., 2008). Desde entonces diversos estudios epidemiológicos evidencian una asociación entre la exposición a plaguicidas y el desarrollo de enfermedades o disfunciones neurológicas como la enfermedad de Parkinson (Kamel y Hoppin 2004; Brown y cols., 2006). Sin embargo, no es posible establecer una relación causal con alguna sustancia en particular, puesto que los seres humanos estamos expuestos a mezclas de compuestos como son los plaguicidas, solventes y metales pesados, entre otros. Así, en un intento por dilucidar si los plaguicidas son capaces de alterar al sistema nervioso se han expuesto modelos animales como la rata o el ratón a diferentes tipos de agroquímicos. En el caso de los herbicidas se ha encontrado que el paraquat (Thiruchelvam y cols., 2000) y la atrazina (Coban y Filipov, 2007; Bardullas y cols., 2011; Rodríguez y cols., 2013) pueden causar cambios conductuales y alteraciones en el sistema nervioso, principalmente en los sistemas dopaminérgicos. En la actualidad, los herbicidas que contienen glifosato son comercializados a nivel mundial. A pesar de que se considera que estos herbicidas son ligeramente tóxicos para los animales, hay evidencia que sugiere que podrían ser neurotóxicos. Sin embargo, no existe un estudio sistemático que analice los

posibles efectos del glifosato sobre el sistema nervioso de los mamíferos. Por ello, utilizando a la rata albina como modelo, el propósito del presente trabajo fue determinar si el glifosato tiene efectos sobre el sistema nervioso, principalmente sobre las vías dopaminérgicas y sus posibles implicaciones en la actividad locomotora de los animales.

2. ANTECEDENTES

2. 1 Sistema dopaminérgico

El sistema dopaminérgico hace referencia a los grupos neuronales que sintetizan como neurotransmisor a la dopamina. En el cerebro medio, hay tres grupos principales de neuronas que sintetizan dopamina, las neuronas localizadas en la región A8 (área o campo retrorubral - RRF), A9 (substancia nigra *pars compacta* - SNpc) y A10 (área ventral tegmental - AVT) (Smith y Villalba 2008).

En el sistema nervioso central existen tres vías dopaminérgicas principales: las vías nigroestriatal, mesolímbica y mesocortical (Figura 1). La vía dopaminérgica nigroestriatal contempla a las neuronas localizadas en la región A9 o SNpc y a sus proyecciones hacia el núcleo caudado-putamen o cuerpo estriado. Esta vía juega un papel importante en el control del movimiento voluntario. En la vía dopaminérgica mesolímbica se consideran las neuronas localizadas en la región A10 o AVT cuyas proyecciones se dirigen hacia el núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, septum, amígdala e hipocampo (Lindvall y Björklund, 1978). La vía dopaminérgica mesocortical está formada por las neuronas localizadas en el área medial de AVT que proyectan a la corteza prefrontal, a la corteza del cíngulo y a la corteza perririnal. Ahora bien, debido al traslape de las neuronas que originan la vía mesocortical y mesolímbica en AVT, las dos vías son frecuentemente denominadas vía mesocorticolímbica (Chinta y Andersen, 2005). Estas dos vías dopaminérgicas juegan un papel importante en la conducta materna, en la conducta sexual, formación de pareja, en la conducta de juego, en conductas agresivas y abuso de drogas (Young y cols., 2011).

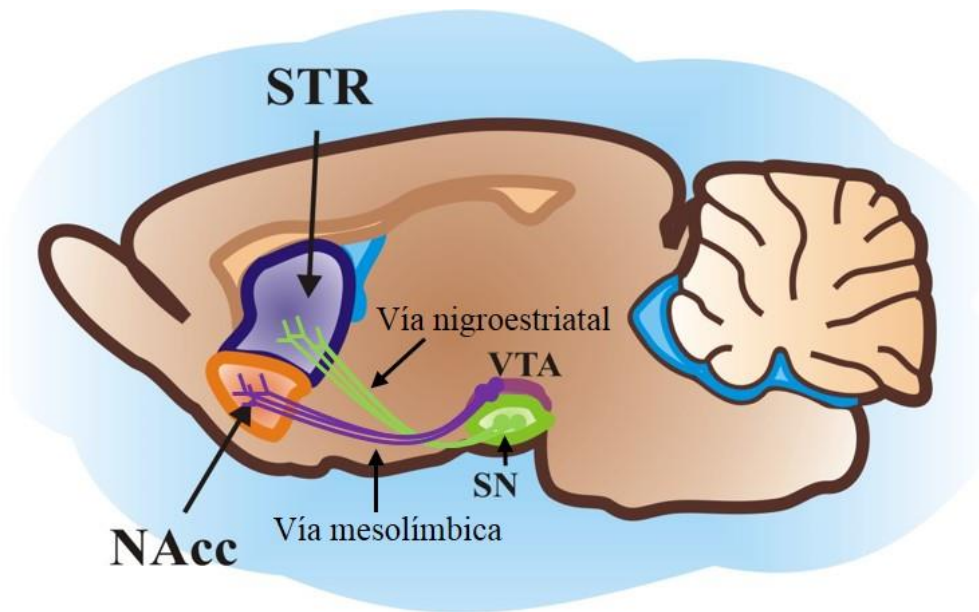


Figura 1. Vías dopaminérgicas mesolímbica y nigroestriatal en la rata. STR= estriado, NAcc= Nucléo accumbens, SN= sustancia nigra, VTA= área ventral tegmental. Nota: No se muestran todas las estructuras cerebrales involucradas en la vía mesolímbica. (Modificada de Paxinos y Watson 2005).

2.1.1 Síntesis y degradación de dopamina

La dopamina (DA), neurotransmisor de las vías dopaminérgicas, es sintetizado por enzimas localizadas en las neuronas presinápticas y degradado por enzimas presentes tanto en las neuronas presinápticas como postsinápticas (Figura 2).

La dopamina es una catecolamina, cuya estructura básica es un núcleo catecol (un anillo bencénico 3, 4 dihidroxilado) y un grupo amino. Se sintetiza a partir del aminoácido tirosina, el cual se adquiere a través de la dieta, éste es capturado por la neurona dopaminérgica y convertido a L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Esta enzima requiere del cofactor tetrahydropteridina (BH₄), de oxígeno molecular, de hierro (Fe²⁺) y de agua para cumplir su función. Posterior a la síntesis de L-DOPA, ésta es descarboxilada por la enzima descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos (AAAD), produciendo dopamina y dióxido de carbono. La enzima AAAD requiere como cofactor al fosfato piridoxal (vitamina B6)

(Kandel y cols., 2001; Webster, 2001; Kuhar y cols., 2006). Tanto la enzima TH como AAAD están localizadas en las neuronas presinápticas.

Un factor limitante en la síntesis de dopamina es la actividad de la enzima TH, la cual puede ser controlada por retroalimentación negativa, por modulación alostérica, por fosforilación y desfosforilación postraduccional, alterando la estabilidad de la enzima y la transcripción del gen de TH (Kumer y Vrana, 1996).

Una vez que la dopamina ha sido sintetizada, es almacenada en vesículas sinápticas en las terminales neuronales. Los transportadores vesiculares de las monoaminas (VMAT), principalmente el VMAT2, se encargan de transportar a la dopamina desde el citoplasma hacia el interior de las vesículas sinápticas. Mientras que los transportadores de dopamina (DAT) se encargan de transportar a la dopamina desde el exterior hacia el interior celular (Hoffman y cols., 1998). La dopamina que no es almacenada en vesículas en las terminales presinápticas, es degradada por la enzima monoamino oxidasa (MAO). La MAO se encuentra en la membrana externa de las mitocondrias de las neuronas presinápticas, desamina a la dopamina intracelular transformándola a ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC), el cual difunde hacia el espacio sináptico. El metabolito DOPAC o la dopamina extracelular pueden ser inactivados por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT), localizada en la membrana extracelular de las neuronas postsinápticas. La enzima COMT es una enzima extracelular que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenil metilmetionina, al grupo 3-meta hidroxil del núcleo catecol de la dopamina o del DOPAC. La metilación de la dopamina produce 3-metoxitiramina (3-MTT), mientras que la metilación de DOPAC produce ácido homovanílico (HVA). Las moléculas de 3-MTT pueden ingresar a la neurona presináptica y sufrir una desaminación por la enzima MAO, lo cual también lleva a la producción de HVA (Figura 2) (Webster, 2001).

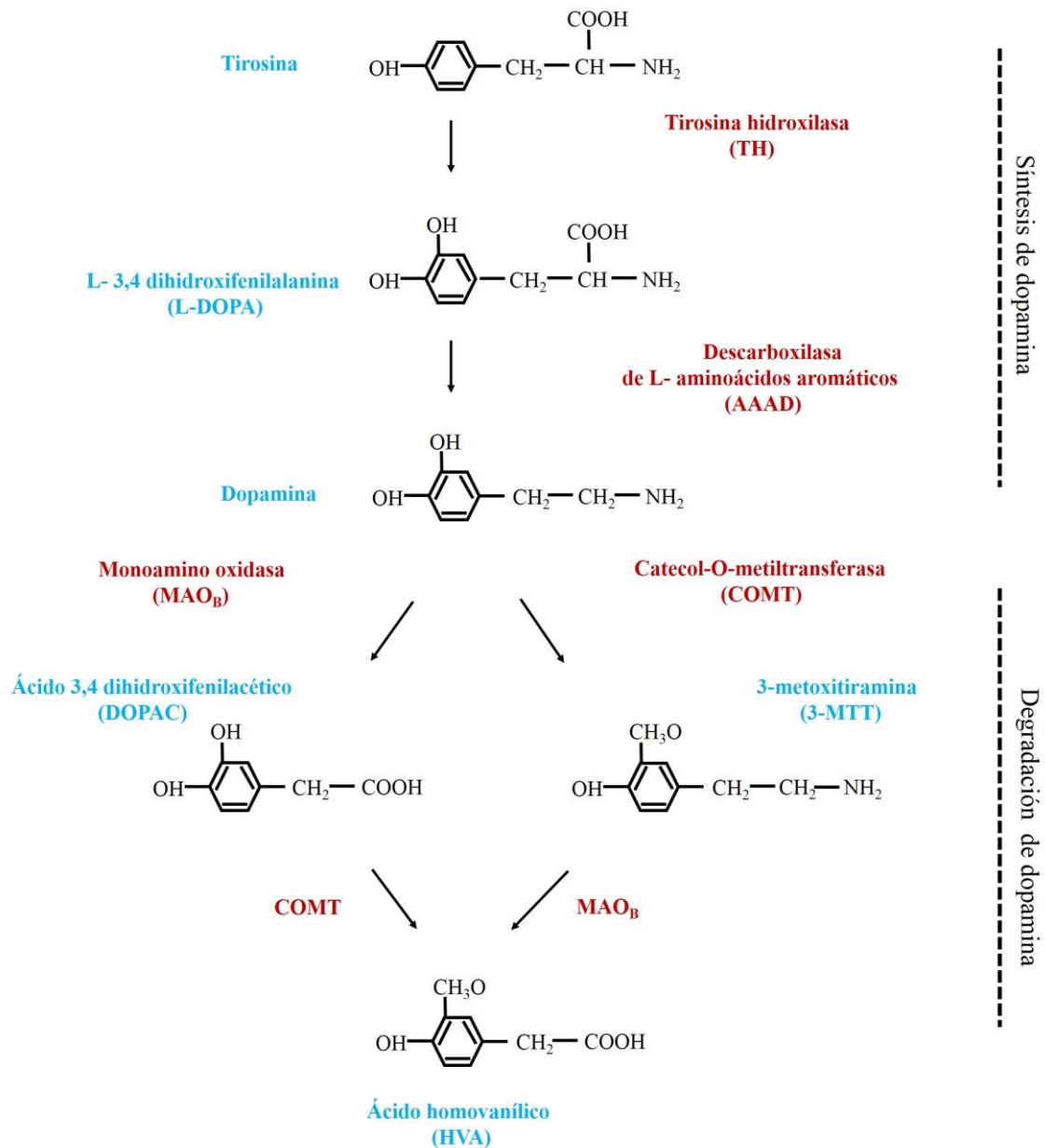


Figura 2. Síntesis y degradación de dopamina (Modificado de Webster, 2001).

2.1.2 Receptores dopaminérgicos

La DA liberada en la hendidura sináptica, antes de ser degradada, actúa en los receptores dopaminérgicos localizados en las neuronas presinápticas y/o postsinápticas. En general, se conocen cinco tipos de receptores dopaminérgicos llamados D1, D2, D3, D4 y D5. De acuerdo a las características estructurales, farmacológicas y bioquímicas, los receptores dopaminérgicos D1 y D5 son clasificados como receptores tipo D1. Mientras que los receptores dopaminérgicos D2, D3 y D4 son clasificados como

receptores dopaminérgicos tipo D2 (Missale y cols., 1998; Beaulieu y Gainetdinov 2011).

En general, los receptores de DA pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G y presentan siete pasos transmembranales (Figura 3. A). Los receptores de dopamina tipo D1 (receptores D1 y D5) activan a la familia de proteínas G llamada $G_{\alpha s/olf}$ y estimulan la producción de AMPc (monofosfato de adenosin cíclico), a través de la activación de la enzima adenilato ciclasa. Mientras que los receptores de dopamina tipo D2 (D2, D3 y D4) están acoplados a la familia de proteínas G llamadas $G_{\alpha i/o}$ y causan la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (Beaulieu y Gainetdinov 2011) (Figura 3. B).

Los receptores dopaminérgicos tipo D1 y D2 tienen diferente localización sináptica. Los primeros se localizan principalmente en las neuronas postsinápticas. Mientras que los receptores dopaminérgicos tipo D2 se localizan en las neuronas pre y postsinápticas (Beaulieu y Gainetdinov 2011).

En cuanto a la localización en las regiones cerebrales, se ha encontrado que la expresión de los receptores de DA D1 es alta en áreas nigroestriatales, mesolímbicas y mesocorticales, como el estriado (STR), núcleo accumbens (NAcc), sustancia nigra (SN), bulbo olfatorio, amígdala y corteza frontal. Bajos niveles de expresión de los receptores de DA D1 se han detectado en el hipocampo, cerebelo, áreas talámicas e hipotalámicas (Beaulieu y Gainetdinov 2011). De manera particular, en el STR, el 5.5 % (± 0.9) de los receptores de DA D1 se localizan en la presinapsis y el 91.7 % (± 0.7) en la postsinapsis. En cambio, en la región core y shell del NAcc el 21.5 % (± 1.7) y 25 % (± 1.4) se localizan en la presinapsis y el 74.5 % (± 2.4) y 70.2 % (± 1.2) en la postsinapsis, respectivamente (Dumartin y cols., 2007). En el NAcc se ha encontrado que la densidad de los receptores de DA D1 es simétrica dorso-ventralmente. Sin embargo, la distribución de estos receptores va en aumento en dirección rostrocaudal, es decir hay menor densidad en la región rostral y mayor en la región caudal (Allin y cols., 1989).

En estudios de inmunoreactividad se ha encontrado que los receptores de DA D5 se localizan en la sustancia nigra *pars compacta*, sustancia nigra *pars reticulata*, núcleos hipotalámicos (arcuato, supraóptico y mamilar) y tálamo. En

la rata, también se localizan en las neuronas medianas espinosas y en las neuronas colinérgicas del estriado y en las células piramidales del hipocampo. Asimismo dichos receptores son localizados en áreas corticales frontales y límbicas (Khan y cols., 2000).

Con respecto a los receptores de DA D2, los niveles más altos de expresión se encuentran en STR, en NAcc y en el tubérculo olfatorio, estos receptores también son expresados en la SN, área ventral tegmental, hipotálamo, áreas corticales, septum, amígdala e hipocampo (Beaulieu y Gainetdinov 2011). Específicamente en el STR la densidad relativa de los receptores D2 es densa, mientras que en NAcc es moderada (Brock y cols., 1992). En el NAcc, la distribución de los receptores D2 es homogénea y menos densa en dirección rostro caudal y dorso-ventral (Allin y cols., 1989).

En cuanto a los receptores de DA D3, estudios en el cerebro de la rata han encontrado grandes densidades de RNAm para dichos receptores en áreas límbicas como NAcc (polo rostral y partes de la sección shell), islas de Calleja y el tubérculo olfatorio. Algunas otras regiones que también contienen dicho RNAm son el núcleo geniculado lateral ventral, sustancia nigra pars compacta lateral, amígdala, tálamo y núcleos hipotalámicos, entre otros (Heidbreder y cols., 2005). Por otra parte, estudios de inmunoreactividad en rata han encontrado que los receptores de DA D4 se localizan en la corteza frontal medial, hipocampo (giro dentado y algunas células de CA1, CA2 y CA3), corteza entorrinal, amígdala, tubérculo olfatorio, NAcc, STR y globo pálido (Defagot y cols., 1997).

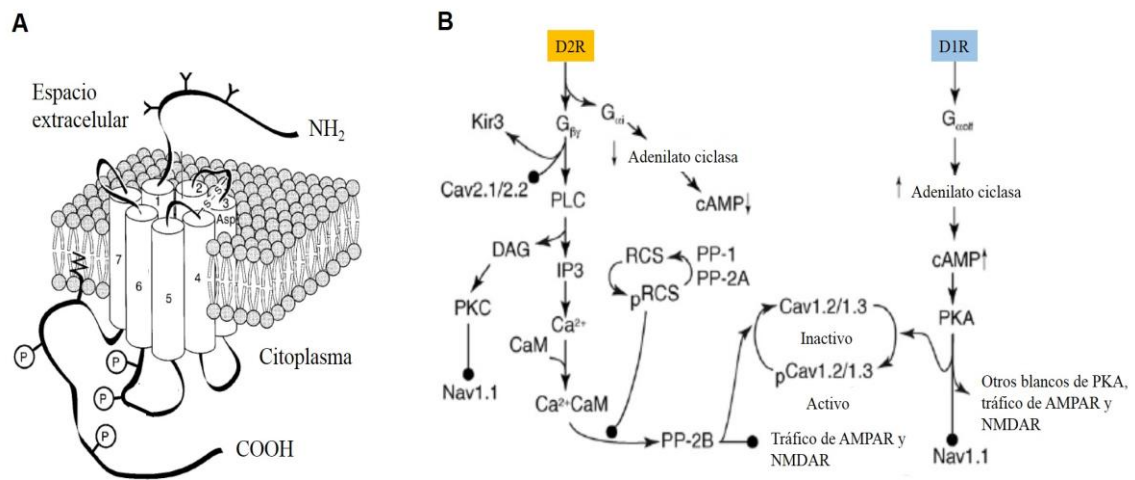


Figura 3. Estructura general de los receptores dopaminérgicos tipo D1 (A) y las vías de señalización de los receptores D1 y D2 (B) (Modificada de Missale y cols., 1998; Surmeier y cols., 2007). En A se muestra el extremo amino (NH₂) y carboxilo (COOH) del receptor. 1-7 indica el número de pases transmembranales. (P) Indica los sitios de fosforilación del receptor. D1R = receptor de DA D1, D2R = receptor de DA D2, G = proteína G, DAG = 1,2 diacilglicerol, IP3 = 1,4,5 inositol trifosfato, PKA = proteína cinasa A, PKC = proteína cinasa C, PLC = fosfolipasa C, PP-2B = proteína fosfatasa 2B, RCS = regulador de la señalización de calmodulina, Nav = canales de Na⁺ dependientes de voltaje, Cav = canales de Ca²⁺, Kir3 = canal de K⁺, CAM = proteína moduladora de Ca²⁺, AMPAR = receptor AMPA de glutamato, NMDAR = receptor NMDA de glutamato.

Los receptores de DA al igual que otros marcadores dopaminérgicos tales como los niveles de TH, la concentración de DA y sus metabolitos y el número de células TH⁺ en AVT y/o SN, han mostrado ser alterados por la exposición a plaguicidas, principalmente herbicidas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4-D; Bortolozzi y cols., 2002), paraquat (Brooks y cols., 1999; Kang y cols., 2009) y atrazina (Coban y Filipov, 2007; Bardullas y cols., 2011; Rodríguez y cols., 2013). Mostrando que la exposición a plaguicidas podría ser un factor de riesgo para la salud de los individuos.

2.2 Efecto de los plaguicidas en el sistema dopaminérgico

Los plaguicidas de acuerdo al organismo que controlan o eliminan se clasifican en insecticidas, herbicidas, fungicidas y acaricidas, entre otros (Costa, 2008).

Estudios epidemiológicos han asociado la exposición a plaguicidas con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo con la enfermedad de Parkinson (Ritz y Yu 2000; Priyadarchi y cols., 2001). En modelos animales se ha encontrado que algunos insecticidas, herbicidas y fungicidas pueden ser neurotóxicos (Franco y cols., 2010), causando alteraciones anatómicas y/o funcionales en el sistema dopaminérgico. Por ejemplo, modelos animales expuestos al insecticida rotenona desarrollan características similares a la enfermedad de Parkinson. Ratas Lewis macho expuestas subcutáneamente a este insecticida (2-3 mg/kg/día), presentaron en el día 33 de exposición, agregados citoplasmáticos de la proteína α -sinucleína (agregados similares a los cuerpos de Lewy) en las neuronas de la sustancia nigra, una característica patológica de la enfermedad de Parkinson (Sherer y cols., 2003). Betarbet y cols. (2000) encontraron que los animales expuestos subcutáneamente a 2.5 mg/kg/día de rotenona muestran actividad conductual reducida, postura encorvada, agitación de una o más patas y en algunos casos rigidez severa, todas estas alteraciones motoras semejantes a las de la enfermedad de Parkinson. Además de dichas alteraciones, tanto Betarbet y cols. (2000) como Sherer y cols. (2003) describen en los animales expuestos a dicho insecticida, disminución en la inmunoreactividad a la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en el estriado y en la sustancia nigra, dos regiones dopaminérgicas involucradas en el control motor.

En el caso de modelos animales expuestos al herbicida paraquat, se han detectado cambios conductuales, alteraciones en la concentración de dopamina y en el número de neuronas de la sustancia nigra. Ratones macho C57BL/6J expuestos intraperitonealmente (i.p) a 10 mg/kg de paraquat (una inyección por semana por 3 semanas), muestran actividad ambulatoria reducida (Brooks y cols., 1999). Similarmente, ratas macho Wistar expuestas a 5, 10 ó 20 mg/kg de paraquat (dosis única subcutánea) redujeron su distancia recorrida y sus movimientos estereotipados en la prueba de campo abierto. Además de ello, en las dosis de 10 y 20 mg/kg de paraquat, la concentración

de dopamina y su metabolito el ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) se redujeron entre el 74 y 82 % y el 75 y 76 %, respectivamente (Chanyachukul y cols., 2004). También se ha encontrado que ratones macho C57BL/6J tratados vía i.p (una vez por semana por 3 semanas) con 1, 5 ó 10 mg/kg de paraquat (sacrificados 7 días después de la última semana), pierden el 10, 18 y 28% de neuronas positivas a TH en la sustancia nigra *pars compacta*, respectivamente (McCormack y cols., 2002).

La exposición simultánea del herbicida paraquat (10 mg/kg) y el fungicida maneb (30 mg/kg) en ratones macho C57BL/6J (vía i.p, 2 inyecciones por semana por 12 semanas), reduce la actividad ambulatoria de los animales y el número de neuronas positivas a TH en la sustancia nigra (Thiruchelvam y cols., 2000).

Otro herbicida llamado atrazina también genera cambios conductuales, en la concentración de dopamina y en el número de células positivas a TH. Ratones macho C57BL/6J tratados con 125 y 250 mg de atrazina (vía intragástrica por 10 días), presentaron a partir del día 4 de exposición, menor distancia recorrida en la prueba de campo abierto y menor número de cruzamientos y movimientos verticales. Al final del tratamiento, los animales mostraron niveles reducidos de dopamina estriatal y de su metabolito ácido homovanílico (Lin y Filipov 2013). En grupos de ratones machos C57BL/6J expuestos vía intragástrica a 5, 25, 125 ó 250 mg/kg de atrazina por 14 días, se detectó que las tres concentraciones más altas reducen el número de células positivas a TH en la sustancia nigra *pars compacta* a partir del día 22 post-tratamiento. Aunado a lo anterior, se detectó que independientemente de la dosis administrada se redujó el número de células en el área ventral tegmental a partir del día 64 post-tratamiento (Coban y Filipov 2007). Resultados similares se han encontrado en ratas macho Sprague-Dawley expuestas crónicamente a atrazina a través del alimento (10 mg ATR/kg durante 10 meses), los animales mostraron una reducción en la coordinación motora, en los niveles de dopamina y en el número de células positivas a TH en sustancia nigra *pars compacta* (Bardullas y cols., 2013).

De acuerdo a lo anterior, el sistema nervioso, principalmente el sistema dopaminérgico, muestra vulnerabilidad a la exposición de agroquímicos. Afortunadamente, el empleo de atrazina y otros herbicidas como cianazina,

acetoclor, alaclor y metolaclor ha disminuido (Battaglin y cols., 2005). Sin embargo, debido al desarrollo y a la distribución de plantas resistentes a agroquímicos, se ha generado la comercialización masiva de herbicidas que contienen como ingrediente activo al glifosato (Battaglin y cols., 2005; Costa, 2008), cuyos efectos neurotóxicos no son claros.

2.3 El herbicida glifosato

En México, particularmente en Sinaloa y Guerrero, las mezclas que contienen glifosato son utilizados para eliminar malas hierbas de los cultivos de cereales, frutas y legumbres (Gónzales Farías y cols., 2002; Leyva Morales y cols., 2014). Las mezclas comerciales contienen desde 120 hasta 480 g de glifosato/L. Estos herbicidas son de amplio espectro y de aplicación post-emergente (aplicación después de la germinación del cultivo).

2.3.1 Mecanismo de acción en las plantas

En las plantas, el glifosato es capturado relativamente rápido por las hojas y tallos y es transportado a través del floema al resto de la planta (Duke 1990), donde inhibe a la enzima 5-enolpiruvil-shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS por sus siglas en inglés) de la vía shikimato. Esta vía sólo está presente en las plantas y su función es sintetizar aminoácidos aromáticos como el triptófano, fenilalanina y tirosina. Se asume, que la producción insuficiente de aminoácidos aromáticos para mantener la síntesis de proteínas, es el primer efecto del glifosato sobre las plantas (Ducke y Powles 2008).

2.3.2 Propiedades fisicoquímicas del glifosato

El glifosato (N-fosfometilglicina) está compuesto de dos moléculas, una de glicina y otra de fosfometil (Figura 4), su peso molecular es de 169.1, su punto de fusión es de 185 °C, su coeficiente de partición octanol - agua es de -2.8 y la solubilidad en el agua es de 10.1 g/L a 20°C (Organización Mundial de la Salud, 2004). El glifosato está clasificado en los compuestos del Grupo E de la Agencia para la Protección del Medio Ambiente de los EUA (USEPA por sus siglas en inglés, 2009), grupo en el cual se encuentran los compuestos no carcinogénicos para los humanos (Costa, 2008).

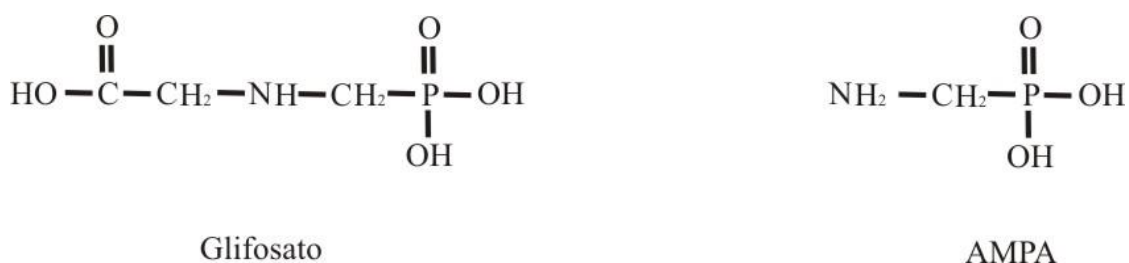


Figura 4. Estructura química del glifosato y su principal metabolito, el ácido aminometilfosfónico (AMPA) (Modificado de Williams y cols., 2000; Costa, 2008).

2.3.3 Toxicocinética: absorción, distribución y eliminación del glifosato

La administración aguda por vía oral de una dosis de 10 mg de [¹⁴C] y [¹²C] glifosato/kg de peso a ratas macho, mostró que a las 2 h post-administración, el 51% del glifosato se localiza en el contenido gástrico y el 39% en tejidos, principalmente en el intestino delgado. A las 28 h, aproximadamente el 76% del compuesto es eliminado por heces y orina, mientras que el 7% del compuesto se localiza en el contenido gástrico y el 4% en los tejidos. Al cabo de 7 días el 86% de la dosis administrada fue eliminada en la orina y heces y aproximadamente el 1 % fue detectado en tejidos. También se calculó que la vida media del glifosato en el organismo es de 2 días (Brewster y cols., 1991).

El glifosato prácticamente no sufre biotransformación en el organismo, el 95.71% (± 2.63) del compuesto original fue detectado a los 7 días posteriores a la administración. Menos del 0.1% de la dosis fue transformada a ácido

aminometilfosfónico (AMPA), el principal metabolito del glifosato (Brewster cols., 1991).

Se desconocen los mecanismos de desintoxicación del glifosato. Sin embargo, estudios *in vitro* muestran que éste interactúa con tres isoformas murinas de la familia de los citocromos P450, en particular con las isoformas Cyp2b20, Cyp2c29 y Cyp2d22 (McLaughlin y cols., 2008). La familia de los citocromos P450, es una familia de monooxigenasas que contienen grupos hemo y que participan en las vías metabólicas endógenas de esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, etc. Asimismo participan en la biotransformación de xenobióticos (compuestos químicos extraños al cuerpo) (McLaughlin y cols., 2008, Dutheil y cols., 2008).

2.3.4 Fuentes de exposición al glifosato

El glifosato puede ser encontrado en el suelo, agua y alimentos debido a su amplio uso para eliminar malas hierbas en cosechas, fuentes y jardines. Este herbicida es rápidamente adsorbido y fijado por las partículas minerales que componen los diferentes tipos de suelos, esta adsorción se asocia con los sitios disponibles de su grupo fosfato, de manera que el glifosato se une a las partículas del suelo, donde es degradado principalmente por los microorganismos que lo utilizan como una fuente de carbono y fósforo. Las plantas no son susceptibles al glifosato que está adherido al suelo, en tanto sus tejidos verdes no entren en contacto con el glifosato (Organización Mundial de la Salud 2004; Plan de manejo ambiental: erradicación de cultivos ilícitos, 2000).

El glifosato es químicamente estable en el agua y no sufre de fotodegradación. Debido a la adsorción del glifosato al suelo, se limita la posibilidad de que éste pueda ser transportado por lixiviación o escorrentía, por lo que se considera que tiene un bajo potencial para la contaminación de mantos acuíferos (Organización Mundial de la Salud, 2004). Sin embargo, estudios recientes han propuesto a este compuesto como un riesgo potencial para los cuerpos de agua superficiales (Kjaer y cols., 2005). Esto debido a que los muestreos realizados en campos tratados con herbicidas en Dinamarca, mostraron niveles de 0.54 µg/L de glifosato en el agua superficial, siendo que el nivel permitido es

de 0.1 µg/L (Kjaer y cols., 2005). Por otro lado, un estudio en diferentes cuerpos de agua de Estados Unidos de Norteamérica, registró en al menos uno de los puntos de muestreo, concentraciones de glifosato de 328 µg/L, siendo que los niveles permitidos de éste en el agua dulce, son de 65 µg/L (Battaglin y cols., 2009). Otro estudio realizado en Canadá, encontró residuos de glifosato de hasta 5153 µg/L en lagos y ríos, después de la aplicación aérea de dicho herbicida. Tales concentraciones disminuyeron o no fueron detectables horas o días después de la aplicación aérea (Organización Mundial de la Salud, 2004).

Registros de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2004), muestran que las concentraciones en aire durante una aplicación por aspersión de herbicidas que contienen glifosato están por debajo de 1.3 µg/m³, sin embargo también se han detectado concentraciones máximas de hasta 15.7 µg/m³. La OMS estimó que una persona de 60 kg de peso con 8 h de trabajo, absorbe (vía dérmica o por inhalación) 40 µg de glifosato/kg de peso por día.

El glifosato no se bioacumula debido a su alta solubilidad en el agua. Sin embargo, residuos de éste fueron encontrados en peces, crustáceos y moluscos después de su exposición a agua que contenía glifosato. Los residuos de este compuesto disminuyeron del 50 al 90 % cuando los organismos fueron expuestos a agua libre del herbicida, por 14 a 28 días (FAO/WHO 1986, citado en Organización Mundial de la Salud, 2004).

2.4 Efectos tóxicos del herbicida glifosato

Los síntomas por la intoxicación a glifosato dependen de la vía de exposición. Personas que han ingerido accidental o intencionalmente dicho compuesto, desarrollan en primer lugar acidosis metabólica. En las primeras 24 h posteriores a la exposición, se presenta daño respiratorio, hipotensión, daño agudo en riñones e hipercalemia (Moon y Chun 2010). Días después de la exposición, se presenta pancreatitis aguda (Hsiao y cols., 2008; Moon y Chun 2010). En cuanto a las exposiciones dérmicas se pueden desarrollar lesiones y necrosis cutánea (Amerio y cols., 2004). Por otro lado, existe el registro de una exposición intramuscular, un individuo desarrolló rabdomiolisis (necrosis de las fibras musculares causando la liberación del contenido intracelular al torrente

sanguíneo) al inyectarse un herbicida que contenía glifosato (Weng y cols., 2008). La exposición a plaguicidas incluyendo el glifosato por riesgo ocupacional, fue asociado con el desarrollo o el aumento en los episodios de rinitis (Slager y cols., 2010). También se han descrito otros síntomas como náusea, vómito, diarrea y dolor abdominal (Roberts y cols., 2010).

En modelos animales, la exposición a herbicidas que contienen glifosato causan daños hepáticos, alteraciones en el desarrollo del sistema óseo y en los órganos reproductores masculinos (Dallegrave y cols., 2003; Benedetti, 2004; Dallegrave y cols., 2007). Benedetti (2004) administró por vía oral a ratas macho de la cepa Wistar, tres dosis de una mezcla comercial que contenía glifosato (4.87, 48.7 ó 487 mg Glif/kg de peso). La administración fue cada 48 h durante 75 días, reportando principalmente daño hepático en todas las dosis evaluadas. Ahora bien, Dallegrave y cols. (2003) utilizaron grupos de hembras gestantes a las cuales les administró por vía oral un herbicida que contenía glifosato. Las dosis utilizadas fueron 500, 750 ó 1000 mg Glif/kg de peso en los días del 6 al 15 de gestación, encontrando malformaciones en el sistema óseo de los fetos en todas las dosis utilizadas. Dallegrave y cols. (2007), trataron grupos de ratas gestantes por vía oral con 50, 150 ó 450 mg Glif/kg de peso en los días 21 al 23 de gestación y una vez nacidas las crías, la administración continuó a través de la madre durante el periodo de lactancia (21 días). Las crías fueron evaluadas en el día 65 postnatal, en los animales que recibieron la dosis más alta, disminuyeron los niveles de testosterona. Mientras que en el día 140 postnatal, las ratas que recibieron 50 ó 450 mg Glif/kg de peso, mostraron disminución en la producción diaria espermática y en el número de espermatozoides.

2.5 Efectos neurotóxicos del herbicida glifosato

En la presente tesis la palabra “glifosato” hace referencia sólo al ingrediente activo de los herbicidas y “mezclas comerciales sencillas” hace referencia a los agroquímicos que contienen glifosato e ingredientes inertes. Mientras que “mezclas comerciales complejas” hace referencia a los agroquímicos que contienen glifosato y otros herbicidas y/o insecticidas.

Se considera que tanto las mezclas comerciales sencillas como el glifosato no representan un riesgo para la salud de los humanos (Williams y cols., 2000), sin embargo, existen algunos reportes que sugieren que éstos podría ser neurotóxicos (Tabla 1 y 2). En 1991 se registró el caso de la ingesta intencional de aproximadamente 200 a 250 mL del herbicida Roundup (mezcla comercial sencilla), dicho volumen contenía aproximadamente 72 a 91 g de glifosato. En este mismo estudio, utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) se detectaron concentraciones de glifosato de 100 ppm en el cerebro, 550 ppm en sangre, 600 ppm en hígado y 3650 ppm en riñón (Menkes y cols., 1991). En otro reporte de exposición accidental con mezclas sencillas, se reportó que tiempo después de la exposición, el paciente desarrolló un síndrome tipo parkinsoniano simétrico. El estudio de resonancia magnética reveló daño bilateral en el globo pálido, sustancia nigra y en la sustancia gris periacueductal (Barbosa y cols., 2001). Recientemente se registraron tres nuevos casos de posible neurotoxicidad de glifosato. En el primero, un individuo ingirió una mezcla comercial sencilla y desarrolló una encefalopatía reversible. El registro electroencefalográfico (EEG) en el día 8 post-ingesta, mostró actividad de ondas lentas con elementos anormales, principalmente ondas agudas trifásicas características de epilepsia. Dichos elementos estuvieron ausentes en el EEG en el día 16 post-ingesta (Malhotra y cols., 2010). El segundo caso es el primer registro de una exposición crónica a glifosato. Un sujeto estuvo expuesto ocupacionalmente durante tres años a estos agroquímicos, el individuo desarrolló un síndrome tipo parkinsoniano, temblor en reposo de las extremidades, acinesia global y rigidez, pero sin inestabilidad postural. El estudio de resonancia magnética mostró lesiones bilaterales hipointensas asociado con depósitos de hierro en el globo pálido, sustancia nigra y en el pedúnculo cerebral. El individuo respondió favorablemente al tratamiento con L-DOPA (Wang y cols., 2011). Finalmente, en el tercer caso, un individuo desarrolló meningitis aséptica tras una ingesta intencional de una mezcla comercial sencilla. El análisis del líquido cerebroespinal fue negativo para virus y bacterias, pero positivo para interleucinas y glifosato. Los niveles de interleucina 6 (IL-6) disminuyeron de 394 pg/mL en el día 1 hasta 115 pg/mL en el día 18 postingesta. Los niveles de glifosato también disminuyeron de 122.5 µg/mL en el día 1 hasta 1.6 µg/mL en

el día 18 postingesta (Sato y cols., 2011). Los autores sugieren que la irritación directa de las meninges por el glifosato causó la meningitis aséptica. Cabe resaltar que los casos registrados por Menkes y cols. (1991) y Sato y cols. (2011) muestran que el glifosato es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, aunque el mecanismo es desconocido.

En modelos animales son escasos los reportes que evalúen de manera sistemática el efecto del glifosato sobre el sistema nervioso (Tabla 2). Por ejemplo, ratas macho tratadas oralmente por cinco días con glifosato (75, 150 ó 800 mg Glif/kg) mostraron una disminución dosis dependiente en serotonina y dopamina en la corteza frontal, en el cerebro medio y en el estriado (Anadon y cols., 2008). En otro estudio, se trataron ratas hembra gestantes durante el periodo de gestación con dos dosis de una mezcla comercial sencilla (0.2 ó 0.4 mg Glif/mL de agua de bebida), mostrándose un aumento en la actividad cerebral de la enzima isocitrato deshidrogenasa (enzima involucrada en la formación de NADH) con respecto al control (Darwich y cols., 2001). Dado que estos trabajos carecen de evaluaciones conductuales, se desconoce si los efectos neuroquímicos causados por la exposición a glifosato se relacionan con este tipo de alteraciones. Por otra parte, en un estudio subcrónico, ratas macho recibieron por vía intraperitoneal 3 inyecciones por semana durante 5 semanas de una mezcla de zineb (15 mg/kg de peso, fungicida), glifosato (10 mg/kg de peso, herbicida) y dimetoato (15 mg/kg de peso, insecticida). Las ratas tratadas con esta mezcla comercial compleja mostraron bajas concentraciones de glutatión en la corteza prefrontal, sustancia nigra y en el hígado, además en estos mismos tejidos hubo un aumento de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS- aldehídos producto de la peroxidación de lípidos) (Astiz y cols., 2009). Desafortunadamente, la mezcla de plaguicidas no permite conocer el aporte de cada compuesto a dicho estrés oxidante.

Estos estudios subcrónicos sugieren que el glifosato podría ser neurotóxico. Sin embargo, falta establecer una relación entre las posibles alteraciones neuroquímicas y los cambios conductuales después de la exposición a este herbicida.

Tabla 1. Casos de neurotoxicidad humana por exposición a herbicidas que contienen glifosato

Compuesto	Dosis	Exposición	Tejidos y órganos afectados	Observaciones	Autor
Mezcla comercial	200-250 mL (72-91 g Glif)	Intencional	Cerebro: 100 ppm de Glif Sangre: 550 ppm de Glif Hígado: 600 ppm de Glif Riñón: 3650 ppm de Glif	Deterioro mental progresivo-coma. Necrosis de los túbulos renales. Ulceración orofaríngea. Edema pulmonar agudo	Menkes y cols., 1991
Mezcla comercial		Accidental	Globo pálido Substancia nigra	Desarrollo de un síndrome tipo parkinsoniano. Déficit de memoria, atención y cálculo	Barbosa y cols., 2001
Mezcla comercial		Intencional		Encefalopatía en el día 8 post-exposición y mejoría en el día 16 post-exposición.	Malhotra y cols., 2010
Mezcla comercial		Ocupacional	Globo pálido, substancia nigra y pedúnculo cerebral	Desarrollo de un síndrome tipo parkinsoniano.	Wang y cols., 2011
Mezcla comercial	150 mL	Intencional	122.5, 7.8 y 1.6 µg de Glif/mL de LCE en el día 1, 7 y 18 post-ingesta, respectivamente.	Desarrollo de meningitis aséptica	Sato y cols., 2011

Glif = glifosato, ppm = partes por millón, LCE = Líquido cerebroespinal

Tabla 2. Modelos murinos de neurotoxicidad utilizando herbicidas que contienen glifosato

Compuesto	Dosis	Exposición	Área cerebral	Observaciones	Autor
Mezcla comercial	0.2 y 0.4 mL Glif/mL de agua	v.o - 21 días	Cerebro	Cerebro de madres: La dosis alta aumenta ICD Cerebro de fetos: La dosis baja aumenta ICD, la dosis alta aumenta G6PD y MD	Daruich y cols., 2001
Glifosato	75,150 ó 800 mg/kg de peso/día	v.o – 5 días	Corteza frontal, mesencéfalo y estriado.	A la dosis más alta disminuye dopamina y serotonina y sus respectivos metabolitos aumentan.	Anadón y cols., 2008
Mezcla de insecticida, herbicida y fungicida.	10 mg/kg de peso de Glif	i.p (3 x sem) 5 semanas	Substancia nigra y corteza cerebral	Aumento en los niveles de TBARS en substancia nigra, corteza cerebral e hígado.	Astiz y cols., 2009
Mezcla comercial	1%	v.o (día 5 de gestación hasta día 15 de lactancia)	Hipocampo	Disminución en la recaptura de glutamato	Cattani y cols., 2014

Glif = glifosato, ICD = isocitrato deshidrogenasa, G6PD = glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, MD = malato deshidrogenasa

v.o = vía oral, i.p = vía intraperitoneal

2.6 Mecanismos de acción de glifosato en animales

Los mecanismos de acción por los cuales el glifosato ejerce su acción no son claros. Se ha propuesto que los herbicidas que contienen glifosato podrían causar 1) excitotoxicidad, 2) generar estrés oxidante 3) interaccionar con cationes divalentes y 4) alterar la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa.

En cuanto al primer posible mecanismo de acción, Barbosa y cols. (2001) sugieren que dada la similitud estructural entre la glicina y el glifosato, éste podría tener un efecto tóxico a través de un mecanismo de excitotoxicidad. La glicina es un neurotransmisor inhibitorio liberado en algunas regiones cerebrales (núcleo talámico ventroposterior, capa molecular de cerebelo, etc), en el tallo cerebral (formación reticular pontina, núcleo motor trigémino, etc) y en la médula espinal (asta dorsal y ventral) (Araki y cols., 1988). La glicina inhibe el disparo neuronal, ya que activa receptores ionotrópicos unidos a canales de cloro. Asimismo, la glicina actúa como un cofactor en la activación de receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA), los cuales tienen un efecto excitatorio, puesto que su activación causa un flujo de calcio hacia el interior de la neurona (Kandel y cols., 2001; Hassel y Dingledine 2006). En condiciones normales, el receptor de NMDA tiene un papel importante en la neurotransmisión, sin embargo, la hiperactivación de los NMDA produce un efecto neurotóxico, llamado excitotoxicidad. La actividad excesiva de los receptores de NMDA aumenta los niveles de calcio intracelular, lo que genera una cascada de reacciones celulares dirigidas a la muerte celular, en las que participan proteínas dependientes de calcio, como la calpaina (Kandel y cols., 2001). Un estudio realizado *in vitro* con células de hipocampo mostró que altas concentraciones de glicina (10 μM), causan hiperexcitabilidad y neurotoxicidad de las células, dicho efecto puede ser antagonizado por bloqueadores de receptores de NMDA (Newell y cols., 1997). Barbosa y cols. (2001) sugieren que el glifosato podría tener un efecto de hiperactividad y excitotoxicidad similar al de glicina. Recientemente, Cattani y cols. (2014) encontraron en rebanadas de hipocampo de crías tratadas con 1% de Roundup durante la gestación y lactancia una disminución en la recaptura de glutamato. De

igual forma, estos autores encontraron en rebanadas de hipocampo (de ratas de 15 días de edad) tratadas *in vitro* con 0.01% de Roundup (mezcla comercial sencilla) un aumento en la liberación de glutamato y una disminución en la recaptura de glutamato, sugiriendo que dicho agroquímico puede provocar niveles de glutamato extracelular excesivos y consecuentemente generar excitotoxicidad glutamatérgica en el hipocampo.

La segunda propuesta de que tanto la mezcla comercial sencilla como el glifosato podrían generar estrés oxidante está basada en los hallazgos de Astiz y cols. (2009) y de El- Shenawy (2009). Los primeros autores encontraron en ratas tratadas con una mezcla comercial compleja (glifosato, dimetoato y zineb) bajas concentraciones de glutathion y un aumento en los niveles de TBARS en la corteza prefrontal, en la sustancia nigra y en el hígado. Mientras que, El- Shenawy (2009) administró en ratas 134.95 mg/kg de glifosato intraperitonealmente por dos semanas y encontró en el hígado de los roedores niveles bajos de glutathion reducido (GSH) y altos niveles de TBARS, los cuales fueron dependientes del tiempo. Dichos hallazgos sugieren que probablemente ambas formulaciones son capaces de generar especies reactivas que interaccionan con los lípidos de las membranas, explicando los niveles altos de TBARS. Además de que la disminución en el contenido de GSH puede deberse a su utilización para neutralizar dichas especies reactivas. Recientemente, Cattani y cols. (2014) encontraron en rebanadas de hipocampo de ratas de 15 días de edad incubadas con 0.01% de Roundup (mezcla comercial sencilla), un aumento en los niveles de TBARS. Lo cual sugiere que este producto comercial, puede generar estrés oxidante en el hipocampo de ratas.

El tercer mecanismo de acción sugiere que el glifosato puede interactuar con cationes divalentes como el calcio (Ca^{2+}), alterando las funciones en las que participa éste. Hedberg y Wallin (2010) estudiaron *in vitro* los melanóforos de *Xenopus* (células de la piel de dicho anfibio) y proponen que dependiendo del pH del medio se puede favorecer la lipofilicidad de las células al glifosato. Dichos autores encontraron que a un pH fisiológico el glifosato (1.75 mM) no tuvo efectos sobre el transporte de melanosomas (vesículas que almacenan polímeros de

melanina) ni en la organización de los microtúbulos. En cambio, a pH ácido, entre 5.5 y 6.5, el glifosato 1.75 mM, inhibe la agregación de melanosomas y se observa un desarreglo en los microtúbulos. Los autores sugieren que el glifosato en pH ácido puede adquirir un protón, reduciendo la carga neta de la molécula haciéndolo más lipofílico, permitiéndole la entrada a la célula. Una vez en el interior del citoplasma, puede interactuar con cationes divalentes como el calcio, provocando cambios en los procesos dependientes de éste como la organización del citoesqueleto y la adhesión celular.

La cuarta propuesta sugiere que el glifosato podría alterar la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. Bababunmi y cols. (1979) aislaron mitocondrias hepáticas de ratas para posteriormente ser expuestas *in vitro* a diversas concentraciones de glifosato (sal de isopropilamina de glifosato; 3.95×10^{-5} M a 10×10^{-3} M). Los autores encontraron que el glifosato puede desacoplar la cadena respiratoria, ya que detectaron que todas las dosis utilizadas disminuyen la tasa de respiración mitocondrial. Asimismo encontraron que el glifosato estimula la actividad de la ATPasa, la estimulación máxima de dicha enzima fue obtenida en la concentración de 6.25×10^{-4} M. Sin embargo, resultados de Peixoto (2005) muestran que el glifosato no tiene efectos sobre el consumo de oxígeno mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial o en la actividad de la ATPasa. En otro estudio Olorunsogo (1990) encontró que este herbicida puede ser un quelante de calcio y que modifica la permeabilidad de la membrana interna de las mitocondrias a los protones, aumentando el influjo de éstos hacia la matriz mitocondrial. Olorunsogo (1990) sugiere que dadas las propiedades quelantes del ácido fosfónico, el glifosato podría unirse de manera inespecífica a ciertos componentes de la membrana permitiendo la entrada de protones a la matriz. En otro estudio, Olorunsogo (1982 a) encontró que el glifosato disminuye la actividad de la enzima nicotinamida dinucleótido transhidrogenasa, una enzima que se encuentra en la membrana mitocondrial interna y que participa en la reacción reversible de $\text{NADPH} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{NADP}^+ + \text{NADH}$. A ratas se les administró por vía intraperitoneal 30, 60, 120 ó 240 mg de Glif/kg de peso. Posteriormente se hizo la extracción de mitocondrias hepáticas y se encontró que el glifosato no tuvo efecto

sobre la actividad de la enzima en dosis por debajo de 30 mg. En cambio, en las mitocondrias de ratas tratadas con 120 y 240 mg de Glif/kg de peso, disminuyeron los niveles de NADPH formado 17.6 y 33.4%, respectivamente. En otro estudio, Olorunsogo (1982 b) aisló mitocondrias de tejido hepático de rata y las expuso *in vitro* a dosis de 1.50×10^{-4} M, 3.12×10^{-4} M y 1.25×10^{-3} M de glifosato, encontrando que la inhibición de la enzima nicotinamida dinucleótido transhidrogenasa disminuyó 28 y 46 % con las dosis de 3.12×10^{-4} M y 1.25×10^{-3} M, respectivamente (Olorunsogo 1982 b). Olorunsogo (1982 a y b) propone que el efecto tóxico primario del glifosato podría ser desacoplar la cadena respiratoria y después podría interactuar con otras reacciones que requieren energía.

Hasta el momento no se ha demostrado que el glifosato interaccione con los receptores o transportadores de glicina. Tampoco se ha explicado cómo el glifosato podría entrar a las células y sí difunde cómo podría generar estrés oxidante. Algunos herbicidas, como el paraquat genera radicales hidroxilo (OH^\bullet) por reacciones de óxido reducción (Winterbourn, 1981) y algunos insecticidas como la rotenona, inhiben el complejo mitocondrial I (Betarbet y cols., 2000). Por lo que realizar estudios sobre los mecanismos de acción del glifosato es fundamental para conocer cómo estas sustancias pueden afectar la salud de los individuos.

3. JUSTIFICACIÓN

No obstante que la síntesis y comercialización de los herbicidas con glifosato iniciaron hace 40 años, los posibles riesgos a la salud por la exposición a este tipo de compuestos no son claros. Algunos reportes en humanos y estudios en modelos animales sugieren que los herbicidas con glifosato podrían tener efectos negativos en el sistema nervioso. Por ejemplo, en el caso de los humanos se ha registrado el desarrollo de síndromes tipo parkinsonianos, sin embargo, son escasos los estudios que analicen los posibles efectos neurotóxicos de este herbicida. Por ello, utilizando a la rata albina como modelo, el propósito del presente trabajo fue determinar si el glifosato tiene efectos sobre el sistema nervioso, principalmente sobre las vías dopaminérgicas nigroestriatal y mesolímbica y sus posibles implicaciones en la actividad locomotora.

4. HIPÓTESIS

La exposición repetida a glifosato causará alteraciones en la actividad locomotora de la rata albina.

La exposición repetida y aguda a glifosato modificará algunos marcadores de la neurotransmisión dopaminérgica en el estriado y en el núcleo accumbens de la rata albina.

La exposición repetida a glifosato modificará el número de células positivas a TH en la sustancia nigra y en el área ventral tegmental de la rata albina.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad locomotora y algunos marcadores de la neurotransmisión dopaminérgica en ratas macho expuestas repetida y agudamente a glifosato.

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la actividad locomotora de la rata albina expuesta repetidamente a glifosato.
2. Evaluar la concentración de dopamina y sus metabolitos, los niveles de la enzima tirosina hidroxilasa y la unión específica de los receptores de dopamina en el estriado y núcleo accumbens de ratas expuestas repetidamente a glifosato.
3. Evaluar la concentración de dopamina y sus metabolitos en el estriado y núcleo accumbens de ratas expuestas agudamente a glifosato.
4. Cuantificar el número de células positivas a tirosina hidroxilasa en la sustancia nigra y en el área ventral tegmental de ratas expuestas repetidamente a glifosato.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos anteriores, se planteó el siguiente diseño experimental.

6.1 Animales

Se utilizaron ratas macho de dos meses de edad de la cepa Sprague–Dawley adquiridos en la compañía Harlan de México. Las ratas estuvieron en un ciclo invertido de luz-oscuridad 10:00- 22:00 h, con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Los cuidados de los animales y su manipulación fueron de acuerdo a la norma oficial mexicana del cuidado de los animales NOM-062-ZOO-1999.

Previo a determinar los efectos de glifosato sobre el sistema dopaminérgico, fue importante determinar si éste causaba malestar general en los animales, esto debido a que el glifosato tiene la característica de ser una molécula ácida. Por ello, se diseñaron tres experimentos en los que se evaluó: efecto del pH ácido, condicionamiento de aversión al sabor y condicionamiento de preferencia de lugar de los animales expuestos a glifosato. Los materiales, métodos y resultados de estos experimentos se muestran en el Apéndice como experimentos A, B y C, respectivamente. En general, los resultados mostraron que el pH ácido por si mismo no causa cambios en la actividad locomotora de los animales. De acuerdo a los experimentos de aversión al sabor y al condicionamiento de preferencia de lugar, la exposición a glifosato no causa malestar visceral en los animales. Sin embargo, en el experimento A (efectos del pH sobre la actividad locomotora), se encontró que el glifosato causa hipoactividad en los animales. De manera que descartando que la hipoactividad se debiera a malestar general de los animales, se prosiguió a evaluar si dicha hipoactividad era debida a efectos neurotóxicos. Para ello, se estableció el siguiente diseño experimental.

6.2 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre la actividad locomotora y algunos marcadores dopaminérgicos

Para conocer los efectos de la exposición repetida de glifosato sobre la actividad locomotora y algunos marcadores del sistema dopaminérgico, se planteó el siguiente experimento: Se establecieron tres dosis de glifosato (50, 100 ó 150 mg Glif/kg de peso) con base a la dosis letal 50 (DL₅₀) registrada en ratas por vía intraperitoneal (i.p, 238 mg Glif/kg de peso). Cada animal recibió durante dos semanas 6 inyecciones por vía i.p (tres inyecciones por semana, una cada tercer día) de solución salina (0.9% NaCl, vehículo) o una de las tres dosis de glifosato (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). La actividad locomotora fue registrada 15 min previos y durante 3 h inmediatamente después de cada administración. En el 2^{do} y 16^{vo} día post-tratamiento, la actividad locomotora fue registrada 15 min previos a una administración i.p de solución salina y 3 ó 24 h inmediatamente después de esta inyección (Figura 5). Después del registro de actividad locomotora, los animales fueron decapitados, el cerebro fue removido y se obtuvieron muestras de sangre del tronco. Del cerebro se extrajo el estriado (STR), el núcleo accumbens (NAcc) y el mesencéfalo. El STR y NAcc fueron congelados a -70°C para su conservación y posteriormente se evaluaron los niveles de monoaminas (n = 10), niveles de TH (n = 10) y la unión específica de los receptores de dopamina 1 y 2 (D1 y D2) (n = 6). El mesencéfalo fue fijado en 4% de paraformaldehído para cuantificar el número de células positivas a tirosina hidroxilasa (TH) (n = 5 ó 7). El suero fue extraído de las muestras sanguíneas y almacenado a 4°C para evaluar el daño sistémico a través de la actividad enzimática de aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa y gamma-glutamyltransferasa.

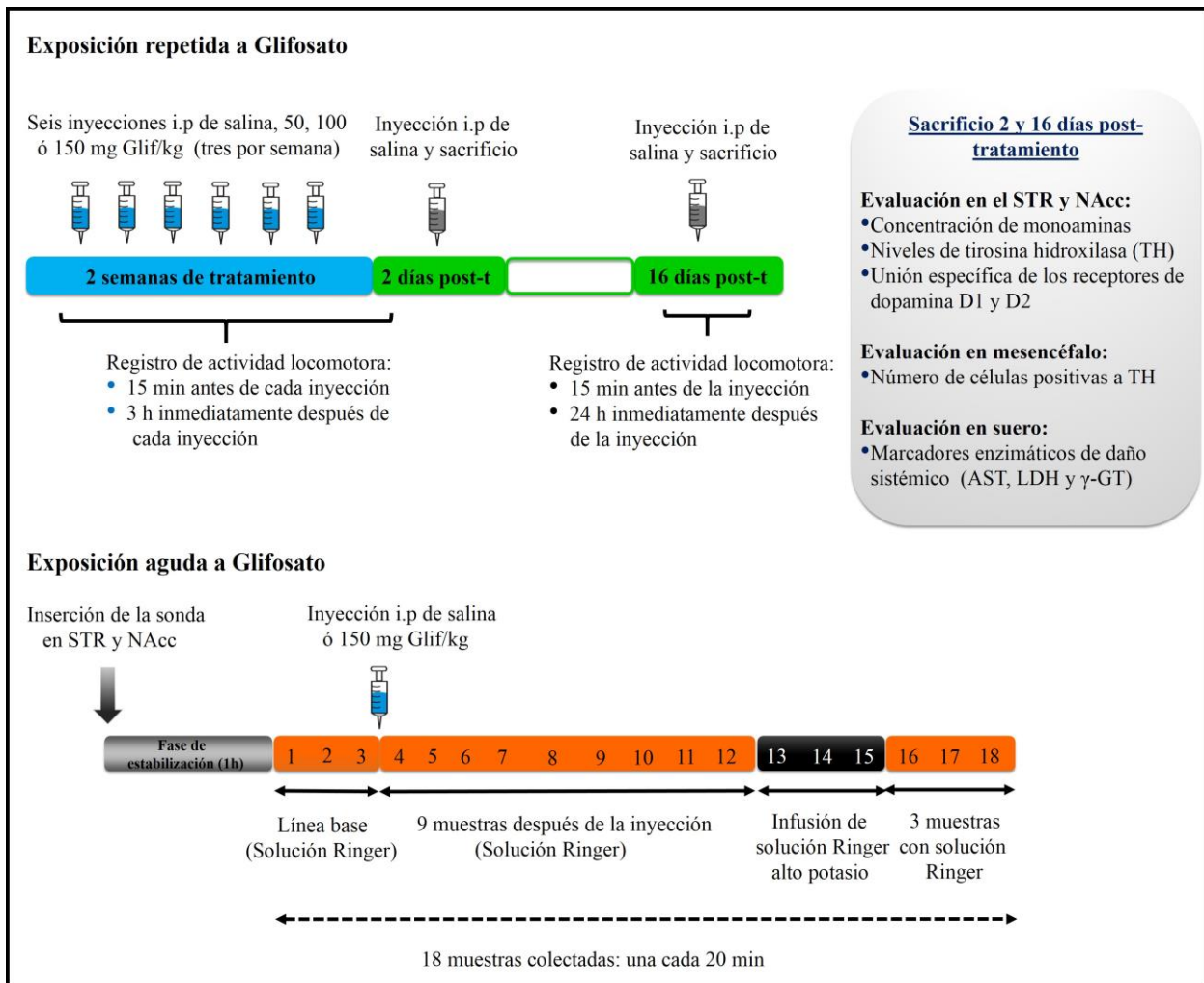


Figura 5. Diseño experimental de la exposición repetida y aguda a glifosato. i.p= intraperitoneal, AST= aspartato aminotransferasa, LDH= lactato deshidrogenasa, γ -GT= gamma-glutamilttransferasa, STR= estriado y NAcc= núcleo accumbens.

6.3 Efectos de la exposición aguda a glifosato sobre la liberación de dopamina en STR y NAcc

Para conocer los efectos agudos de la exposición de glifosato sobre la liberación de dopamina en STR y NAcc se empleó la técnica de microdialisis. Para ello, los animales ($n = 5$ ó 6) fueron anestesiados con isoflurano (PiSA, México), la presión del aire comprimido fue mantenida a 70 psi, el fluxómetro en 1.5 – 2 y el vaporizador en 1.8 - 2 L/min durante todo el experimento. Los animales fueron mantenidos sobre una placa térmica para regular su temperatura a 37°C. Posteriormente, fueron colocados en un estereotáxico (KOPF, Tujunga, CA, USA) y la piel y el músculo fueron removidos para identificar Bregma (punto de referencia craneal localizado rostralmente en la intersección de las fisuras craneales coronal y sagital). Las coordenadas para el estriado (AP: +1 mm, ML: +2.5 mm, DV: -6 mm) y el núcleo accumbens (AP: +1.2 mm, ML: +2.2 mm, DV: -7.6 mm) fueron establecidas utilizando el atlas de Paxinos y Watson (2007). Ambas regiones fueron registradas simultáneamente. Se utilizaron sondas (CMA/11, CMA/ Microdialysis, Solna, Stockholm, Sweden) con un diámetro de 0.38 mm, un largo de 14 mm y con un volumen interno de 1 μ L. La membrana tenía un diámetro de 0.24 mm y de largo 1 mm para el caso de NAcc y de 2 mm para el caso del estriado. Se utilizó solución Ringer (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) y el flujo se mantuvo a 2.5 μ L/min. Una vez introducida la sonda, está se dejó una hora para su estabilización. Posteriormente, se colectaron 18 muestras, en intervalos de 20 min cada una (Figura 5). Todas las muestras fueron colectadas en viales que contenían 4 μ L de ácido perclórico 0.1 N. Las tres primeras muestras fueron consideradas como línea base. Terminando la colecta del tercer dializado, los animales recibieron una inyección i.p de solución salina o de glifosato 150 mg/kg de peso. Posterior a la administración, se colectaron las otras nueve muestras. Después se infundió solución Ringer alto potasio (91 mM NaCl, 60 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) y se colectaron 3 muestras. Posterior a ello, se infundió nuevamente solución Ringer y se colectaron las últimas 3 muestras. Al finalizar, los animales fueron sacrificados y el cerebro fue

conservado en paraformaldehído al 4%. Una vez fijados, los cerebros fueron congelados y cortados en microtomo (Leica SM 2000R, Wetzlar, Hesse, Alemania) para verificar la lesión (Figura 8 del apéndice). Los dializados fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución con detector electroquímico (HPLC-DE).

7. METODOLOGÍA

7.1 Registro de la actividad locomotora

Los efectos de la exposición repetida del glifosato sobre la actividad locomotora de los animales fueron evaluados a través de un sistema de registro llamado Digiscan Animal Activity Monitors (Accuscan Inc, Columbus, OH, USA). Este sistema cuenta con sensores verticales y horizontales (Figura 6). Los animales fueron colocados en las cajas de acrílico (40 x 40 x 40 cm), de tal manera que la interrupción de los sensores fue registrada por una interfase que envía la información a un programa computacional, donde se generan y cuantifican las diferentes variables. Cabe mencionar que los registros de 3 h fueron divididos en segmentos de 15 min y los de 24 h fueron divididos en segmentos de 1 h. Las variables registradas fueron las siguientes:

Distancia total: La distancia (cm) recorrida por el animal durante un periodo de tiempo determinado.

Actividad vertical: El número total de interrupciones del sensor vertical durante un tiempo determinado.

Cuentas estereotipadas: El número de interrupciones repetidas del mismo sensor durante un tiempo dado.

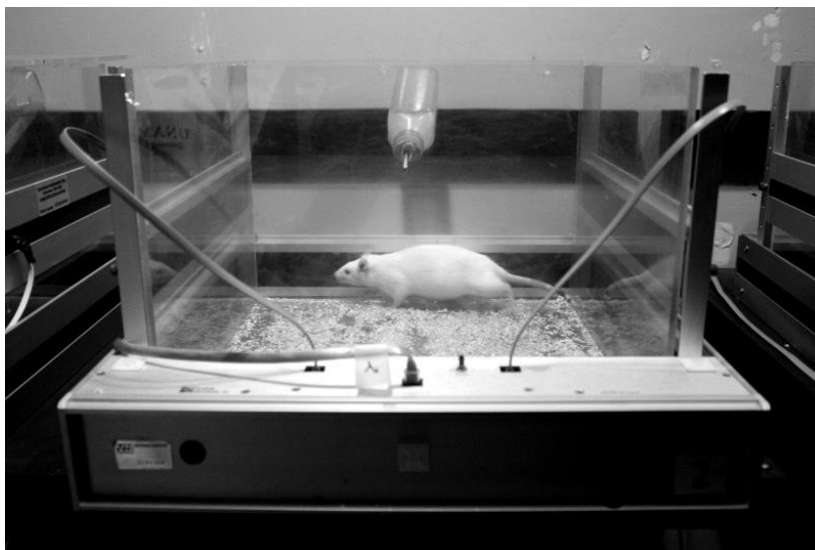


Figura 6. Sistema de registro para evaluar la actividad locomotora (Digiscan Animal Activity Monitors)

7.2 Determinación de la concentración de monoaminas

Para evaluar los efectos de la exposición de Glifosato sobre el contenido total de monoaminas, se siguió el protocolo de Rodríguez y cols. (2013). Para ello, el STR y el NAcc fueron homogenizados en un sonicador (Sonifier Branson mod. 250, Danbury, CT, USA) con ácido perclórico 0.1 N (Sigma-Aldrich). Posteriormente, fueron centrifugados por 40 min a 10,000 rpm a una temperatura de 4°C. Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos limpios y almacenados a -70°C hasta la determinación de monoaminas por HPLC-DE. El pellet fue resuspendido en NaOH 0.5 M y se utilizó para cuantificar la concentración de proteínas usando el método de Lowry.

La determinación de monoaminas se realizó en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica, el cual consiste de una bomba (Perkin-Elmer serie 200, Waltham, MA, USA) acoplada a una columna recubierta con un absorbente de catecolaminas (3 μm de tamaño de partícula, longitud 100 x 4.6 mm, Grace Davison Discovery Sciences, Deerfield, IL, USA) y un detector electroquímico Bionalytical System, LC-4C (West Lafayette, IN, USA). El potencial amperométrico se mantuvo a 850 mV en relación con un electrodo de plata/cloruro de plata y la sensibilidad del detector fue de 10 nA para las muestras de tejido y de

2 nA para las muestras de microdiálisis. Tanto para el análisis de las muestras de tejido como para para las de microdiálisis, la composición de la fase móvil fue de 0.1 M fosfato de sodio monobásico, 13-15% (v/v) de metanol, 0.03 mM de ácido etildiaminotetraacético (EDTA) y 0.5 mM de octil sulfato de sodio. Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa Total Chrom Navigator versión 6.3.1.0504. Los niveles de catecolaminas fueron cuantificados a partir de curvas de calibración de 0.81 a 60 ng/mL para dopamina y sus metabolitos y el ácido 5-HIAA y de 1.62 a 120 ng/mL para serotonina. Mientras que las curvas de calibración para el análisis de las muestras de microdiálisis fueron de 0.06 hasta 15 ng/mL. Los resultados de monoaminas de las muestras de tejido y microdializados se expresan en ng/mg de proteína y ng/mL de microdializado, respectivamente.

7.3 Determinación de los niveles de la proteína tirosina hidroxilasa

Para evaluar los efectos de glifosato sobre la enzima tirosina hidroxilasa, se evaluaron los niveles de esta enzima utilizando la técnica de Western blot. El STR y el NAcc fueron homogenizados utilizando un sonicador (Sonifier Branson Mod. 250, Danbury, CT, USA), en volúmenes de 1:10 con la solución amortiguadora para la extracción de tirosina hidroxilasa modificado por Pan y cols. (2009). Dicha solución estaba compuesta por 50 mM de Tris-HCl, 50 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 1 mM EGTA, 1% de Triton X-100, 0.1% de SDS, 10 % de glicerol, 0.1% de cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich) a pH 7.5. La concentración de proteínas se determinó utilizando el ensayo DC Lowry (BioRad, Hercules, CA, USA).

Las proteínas fueron separadas por electroforesis utilizando geles al 12% de poliacrilamida. En el primer carril de cada gel se colocó el marcador de peso molecular para proteínas (BioRad). En cada uno de los carriles restantes se colocó 2.5 (16 días post-tratamiento) ó 5 µg (2 días post-tratamiento) de proteína para STR y 5 (2 días post-tratamiento) ó 10 µg (16 días post-tratamiento) de proteína para NAcc de cada una de las muestras más buffer de carga en relación 1:1, el

cual estaba compuesto por 1 M de Tris HCl pH = 6.8, 10 % de SDS, 50 % de glicerol, 25 % de β -mercaptoetanol y 0.05 % azul de bromofenol. La separación de proteínas se realizó a un voltaje constante de 100 V durante 2 h. Posteriormente, éstas fueron transferidas a membranas de polivinildifluoruro (PVDF) por 1 h, a un voltaje constante de 10 V. Las membranas fueron bloqueadas por 3 h a temperatura ambiente con una solución amortiguadora de bloqueo, leche en polvo sin grasa al 5% (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) en TBS 1X (Tris Base 100 mM, NaCl 150 mM). Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario para tirosina hidroxilasa (anticuerpo policlonal en conejo 1:5000, Millipore, Temecula CA, USA), durante toda la noche a 4°C con agitación continua. Consecutivamente las membranas se lavaron y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo primario de β -tubulina (12G10 en ratón, 1:2000, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, IA, USA). Posteriormente, las membranas fueron lavadas e incubadas con los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón, acoplados a peroxidasa de rábano (ambos 1:5000, Millipore, Temecula CA, USA) durante 1 h cada uno. En cada cambio de anticuerpo, las membranas fueron lavadas tres veces por 10 min con TBS T- 1X (Tris base 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 0.1%).

Finalmente, las proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia (Sistema de detección por quimioluminiscencia ECL-Plus. GE, Buckinghamshire, UK), usando el sistema Storm Molecular Dynamics 860 scanner (Amersham, Sunnyvale, CA, USA). El análisis densitométrico de las bandas se hizo utilizando un sistema de análisis de imágenes llamado Image J versión 5.0 (NIH, Maryland, BA, USA). Los valores obtenidos de TH fueron normalizados con los valores de β -tubulina. Cada muestra fue procesada y cuantificada por duplicado.

7.4 Cuantificación de la concentración de proteínas

La cuantificación de la concentración de proteínas de las muestras de STR y NAcc tanto para ser analizadas por HPLC-DE, Western blot y radioligando fue determinada utilizando el método de Lowry. Éste es un método colorimétrico, en el

cual las uniones peptídicas de las proteínas reaccionan con el sulfato cúprico bajo condiciones alcalinas, produciendo cobre. Las proteínas tratadas con el sulfato cúprico reducen el agente de Folin produciendo heteropolimolibdenum azul. El desarrollo del color se debe principalmente a los aminoácidos de tirosina y triptófano y en segundo lugar a la cistina, cisteína e histidina.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo en microplacas. En cada pozo de la microplaca se colocaron 5 μ L de muestra o de albumina que sirvió como estándar, 25 μ L de la mezcla de los agentes A y B y 200 μ L del agente de Folin. Posteriormente, la placa fue agitada durante 15 min para que ocurriera la reacción. Las muestras se analizaron utilizando un espectrofotómetro (Microplate reader Mod. 680, BioRad) a una longitud de onda de 655 nm. Las absorbancias de las muestras fueron extrapoladas en una curva de calibración de 0.25 hasta 3.8 mg/mL de albumina de suero de bovino.

7.5 Ensayo de radioligando en STR y NAcc

7.5.1 Extracción de membranas celulares de STR y NAcc

Con la finalidad de conocer los efectos del glifosato sobre los receptores dopaminérgicos tipo D1 y tipo D2, se realizaron ensayos de radioligando en el STR y en el NAcc. Con el fin de obtener tejido suficiente para este experimento, se utilizaron grupos de animales adicionales, tratados de acuerdo al protocolo llamado exposición repetida a glifosato (Figura 5, n = 6 por grupo experimental). Ambos tejidos fueron procesados de acuerdo a Levant (2007). Brevemente, el STR y el NAcc de ambos hemisferios fueron pesados y homogenizados de forma individual en solución amortiguadora para la extracción de membranas, en volúmenes 1:20 (Tris-HCl 50 mM, pH ajustado a 7.4, a temperatura ambiente y almacenado a -20°C, adicionado con 0.1% de cocktail de inhibidor de proteasas y fosfatasas [Sigma-Aldrich]). Posteriormente, cada homogenado fue dividido en dos alícuotas, una designada para evaluar la unión específica de los receptores tipo D1 y otra para los receptores tipo D2. Ambos homogenados fueron centrifugados

por 20 min a 42,000 g a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue resuspendido con la misma solución de homogenización y nuevamente fue centrifugado por 20 min a 42,000 g a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue resuspendido en un volumen de 3 mL/80 mg de peso inicial, ya sea en solución de ensayo para SCH23390 (Tris-HCl 50 mM, Tris base 50 mM, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, pH ajustado a 7.4 a 23°C con 1 M HCl o con 1 M KOH y almacenado a -20°C) o en solución de ensayo para Spiperona (Tris-HCl 50 mM, Tris base 50 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, pH ajustado a 7.4 a 23°C con 1 M HCl o con 1 M KOH y almacenado a -4 °C). Se realizaron alícuotas de cada muestra y fueron almacenadas a -70 °C para su posterior análisis. Las alícuotas para cuantificar proteínas fueron almacenadas a -20 °C y se utilizó el método de Lowry para analizarlas.

7.5.2 Ensayo de radioligando para los receptores de dopamina tipo D1 y D2

Para evaluar la unión específica de los receptores de dopamina tipo D1 se utilizó como ligando específico, el antagonista [³H] SCH23390 (82.9 Ci/mmol, Perkin Elmer, K_d 0.1 a 0.5 nM en ensayos de membranas estriatales). Minutos antes del ensayo se preparó una solución de trabajo de 1.5 nM de [³H] SCH23390 para alcanzar una concentración final de 0.3 nM en cada reacción. También se preparó, una solución 5 µM de (+)- butaclamol (antagonista de los receptores de dopamina, bloquea la unión del ligando específico al competir por el sitio de unión) en solución amortiguadora para SCH23390, para tener una concentración final de 1 µM en cada reacción. Tanto en el STR como en el NAcc se utilizaron 35 µg de proteína en cada reacción. Con cada muestra se prepararon 2 reacciones, cada una por triplicado, para medir la unión total y la unión no específica. La unión total contenía: 100 µL de [³H] SCH23390 1.5 nM, para una concentración final de 0.3 nM y 35 µg de proteína por muestra. La reacción de unión no específica contenía: 100 µL de 1.5 nM de [³H] SCH23390, 100 µL de (+) - butaclamol 5 µM, para una concentración final de 1 µM y 35 µg de proteína por muestra. El volumen final de reacción fue ajustado a 500 µL con solución amortiguadora de SCH23390.

Para evaluar la unión específica de los receptores de dopamina tipo D2 se utilizó como ligando específico, el antagonista [H^3] Spiperona (83.7 Ci/mmol, Perkin Elmer, K_d de 0.05 a 0.3 nM en membranas estriatales). Minutos previos al ensayo se preparó una solución de trabajo de 6 nM de [H^3] Spiperona para alcanzar una concentración final de 0.1 nM en cada reacción. También se preparó una solución 5 μ M de (+)- butaclamol en solución amortiguadora para Spiperona, para tener una concentración final de 1 μ M en cada reacción. Tanto en el STR como en el NAcc se utilizaron 35 μ g de proteína en cada tubo de ensayo. Con cada muestra se prepararon 2 reacciones, cada una por triplicado, para medir la unión total y la unión no específica. La unión total contenía: 8.33 μ L de 6 nM de [H^3] spiperona para una concentración final de 0.1 nM y 35 μ g de proteína por muestra. La reacción de unión no específica contenía: 8.33 μ L de 6 nM de [H^3] Spiperona, 100 μ L de (+) - butaclamol 5 μ M para una concentración final de 1 μ M y 35 μ g de proteína por muestra. El volumen final de reacción fue ajustado a 500 μ L con solución amortiguadora de ensayo de SCH23390.

Después, todas las reacciones fueron agitadas e incubadas por 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las reacciones fueron filtradas en papel Whatman tipo C (Whatman, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Se hicieron 5 lavados con 3 mL de solución de lavado (Tris-HCl 50 mM, Tris base 50 mM, pH ajustado a 7.4 a 23 °C con 1M HCl o con 1 M KOH y almacenado a -20°C). Los filtros fueron colocados en viales de centelleo y se dejaron secar por 1 hora a temperatura ambiente para eliminar la humedad de los filtros y permitir la reacción entre los compuestos orgánicos presentes en el filtro y el tritazol (compuesto orgánico). Posteriormente, a cada vial de centelleo se le agregó 5 mL de tritazol (13.55 mM 2,5-difeniloxazol, 25.7% Triton TM X-100, 3.7% etilenglicol, 10.6% etanol y 60% de xileno) y se dejó estabilizando la reacción toda la noche. Finalmente los viales fueron llevados al contador de centelleo (LS 6500, Beckman-Coulter, USA). La unión de los receptores D1 y D2 fue calculada como la unión total menos la unión no específica. Los resultados son expresados como nmol/mg proteína.

7.6 Número de células positivas a tirosina hidroxilasa en el mesencéfalo

Con el propósito de determinar si el tratamiento con glifosato modificaba el número de células dopaminérgicas, se cuantificó el número de células positivas a TH en la SN (substancia nigra *pars compacta*-SNpc, substancia nigra *pars lateralis*-SNpl, substancia nigra *pars reticulata*-SNpr) y en AVT (área ventral tegmental-AVT, núcleo parabraquial pigmentoso-PBP, núcleo paranigral-PN, núcleo de la línea rostral de rafe-RLi) de ratas sacrificadas en el 2^{do} y 16^{vo} día post-tratamiento (Figura 7). El protocolo de inmunohistoquímica y el conteo celular fue basado en los métodos de Hoffman y cols. (2008) y Bardullas y cols. (2013).

Brevemente, el mesencéfalo fue fijado en 4% de paraformaldehído y posteriormente fue inmerso en 30 % de sacarosa (Sigma-Aldrich) a 4°C. Los cerebros fueron cortados en plano coronal en tres series de 30 µm con un microtomo (Leica SM 2000R, Wetzlar, Alemania). Los cortes cerebrales fueron colectados en anticongelante (1% polivinilpirrolidona, 30% sacarosa, 30% etilenglicol, 50 % de amortiguador Tris- Salina 0.05 M) a -20 °C hasta iniciar la técnica de inmunohistoquímica para TH. Para ello, los cortes cerebrales fueron lavados 6 veces con 0.05 M de KPBS (por sus siglas en inglés, potassium phosphate buffer saline) por 10 min. Inmediatamente después, los cortes fueron incubados en peróxido de hidrógeno al 1 % en KPBS 0.05 M, por 20 min y posteriormente fueron lavados tres veces con KPBS 0.05 M por 10 min. Después de ello, los cortes fueron incubados durante 72 h a 4 °C con el anticuerpo anti- TH (1:5000, Millipore) en KPBS 0.05 M que contenía 0.4% de Triton X-100 y 3% de suero de caballo (Gibco®, Carlsbad CA, USA). Después de transcurrido el tiempo, las secciones fueron lavadas 6 veces con KPBS 0.05 M por 10 min e incubadas durante 1 h a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario biotinilado anti conejo (1:800, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA). Las proteínas fueron visualizadas usando el método ABC (Vector Laboratories) por 1 h. Después, los cortes fueron lavados con KPBS 0.05 M y con acetato de sodio 0.175 M, 3 veces por 5 min con cada una de las soluciones mencionadas.

Posteriormente, los cortes fueron incubados con una solución cromógena de diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) por 20 min y lavados con acetato de sodio 0.175 M y con KPBS 0.05 M, 3 veces por 5 min con cada una de las soluciones mencionadas. Finalmente las secciones fueron colocadas en portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente por al menos 5 días. Las preparaciones fueron deshidratadas y cubiertas con Permont® (Fisher Scientific, Fair Lawn NJ, USA) y cubreobjetos.

Para el análisis, los cortes fueron observados usando el objetivo 20X de un microscopio óptico (Leica Microsystems). En ambos hemisferios fueron cuantificados el número de células positivas a TH en 7 regiones dopaminérgicas: sustancia nigra *pars compacta* (SNpc), sustancia nigra *pars reticulata* (SNpr), sustancia nigra *pars lateral* (SNpl), área ventral tegmental (AVT), núcleo parabraquial pigmentoso (PBP), núcleo paranigral (PN) y línea rostral del núcleo del rafe (RLi) (Figura 7). La cuantificación de las células fue realizada por dos observadores que desconocían los tratamientos, tomando como referencia los campos de Bregma -4.80 a -6.30 de acuerdo a Paxinos y Watson (2005).

7.7 Evaluación de marcadores bioquímicos de daño sistémico

Para evaluar las posibles alteraciones sistémicas inducidas por el glifosato, se evaluó la actividad de tres marcadores enzimáticos: de daño hepático, renal y cardíaco en el suero, lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST) y gamma-glutamil transferasa (γ -GT). LDH es una enzima citoplasmática y se localiza en diversos tejidos. En pacientes con necrosis hepática se registra aumento en suero de la actividad de dicha enzima. La enzima AST se localiza en el citoplasma y en la mitocondria de las células. La alteración en el hígado o en el corazón produce un aumento en los niveles de AST circulante. La enzima γ -GT es una enzima localizada en la membrana celular, ampliamente distribuida en el organismo. Se localiza principalmente en riñón, vesículas seminales, páncreas, hígado, bazo y cerebro. Se considera que el análisis de γ -GT, transaminasas y de

bilirrubina ayudan en diagnóstico de las enfermedades hepáticas (Wiener Lab Provides, Rosario, Argentina).

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 15 min a 4°C. Posteriormente, el suero fue recuperado y almacenado a -20°C hasta su análisis, de acuerdo a las instrucciones de la compañía comercial (Wiener Lab Provides, Rosario, Argentina). Brevemente, las muestras fueron diluidas con solución salina (1:15). En la evaluación de la actividad de LDH, 20 µL de la muestra fueron adicionados a 1 mL de sustrato a 37°C. La absorbancia fue detectada a 340 nm y registrada a 0, 30, 90, 150 y 210 segundos. En el caso de la AST y α -GT, fueron añadidos 100 µL de la muestra a 1 mL de sustrato a 37°C y la absorbancia fue leída a 340 nm y 405 nm, respectivamente. La densidad óptica fue registrada a 0, 90, 150, 210 y 270 segundos para AST y 0, 60, 120 y 180 segundos para α -GT. En las tres enzimas fue determinado el promedio de cambio en la absorbancia por min, es decir, se restó cada lectura de la anterior y después se obtuvo un promedio. Se usaron los siguientes factores de cálculo 8095, 1746 y 1158 para LDH, AST y α -GT, respectivamente. Finalmente, los resultados fueron multiplicados por la dilución usada. Se muestran las fórmulas para determinar la actividad de las enzimas:

$$\text{LDH (U/l)} = \Delta A/\text{min} \times \text{Factor (8095)}$$

$$\text{AST (U/l)} = \Delta A/\text{min} \times \text{Factor (1746)}$$

$$\alpha\text{-GT (U/l)} = \Delta A/\text{min} \times \text{Factor (1158)}$$

Donde:

$\Delta A/\text{min}$ = diferencia promedio de absorbancia. La cual se obtiene restando cada lectura de la anterior y promediando los valores.

Factor de cálculo para LDH = calculado de acuerdo a la temperatura de reacción seleccionada (30-37°C), a la longitud de onda seleccionada (340 nm) y a la técnica empleada (reactivo único).

Factor de cálculo para AST = calculado de acuerdo a la temperatura de reacción seleccionada (30-37°C).

Factor de cálculo para α -GT = calculado a partir de la temperatura utilizada (37 °C) y a la longitud de onda seleccionada (405 nm)

En los tres casos, el factor de cálculo se deduce a partir de la fórmula:

$$\frac{(V_t \times 10^6)}{(\epsilon \times l \times V_s)}$$

Donde:

V_t = volumen total de reacción

ϵ = coeficiente de absorción molar de NADH a 340 nm (para LDH o AST) o de 3-carboxi-4-nitroanilina a 405 nm (para α -GT).

V_s = volumen de la muestra

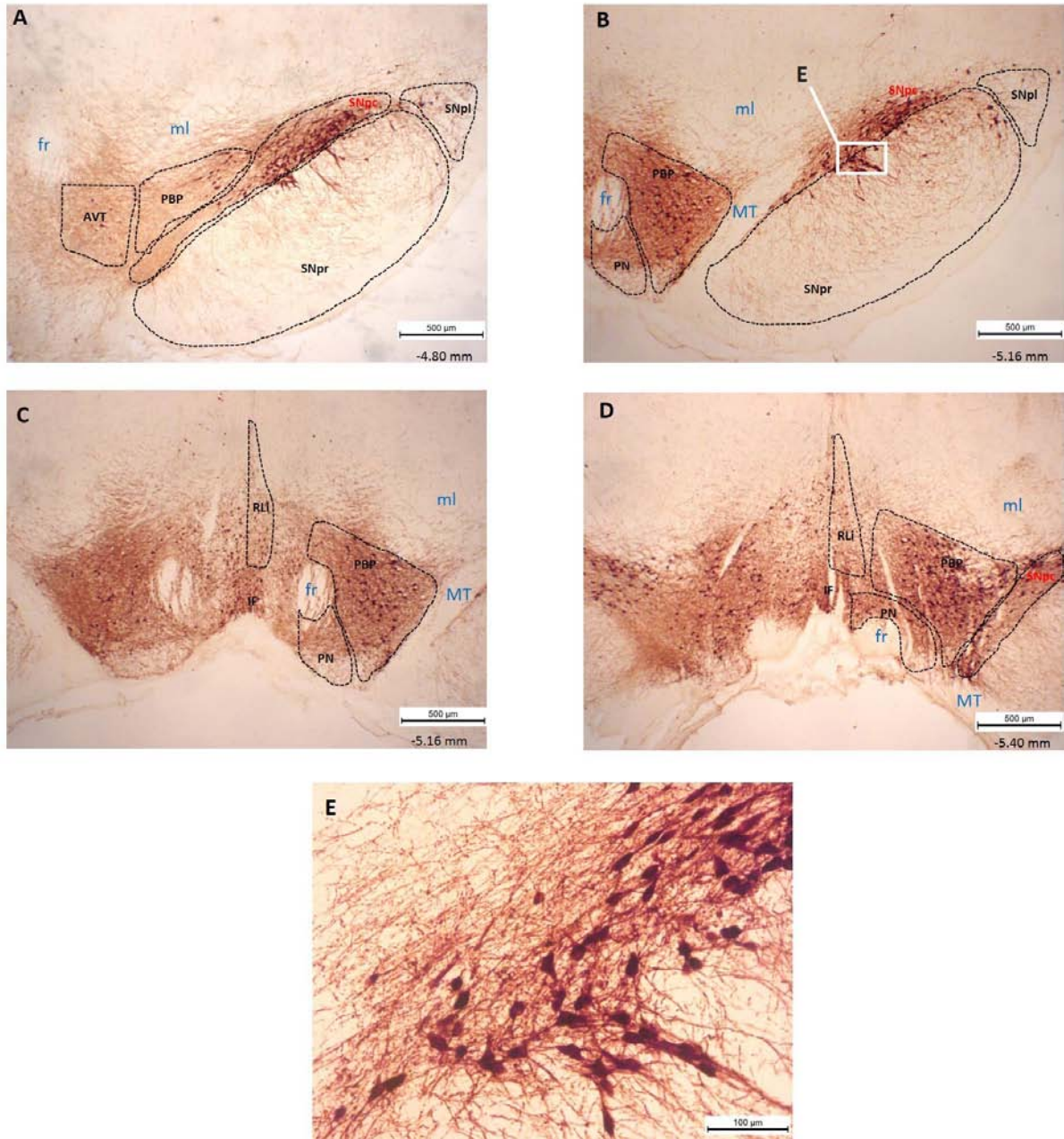


Figura 7. Microfotografías (4X) de cortes coronales de las áreas dopaminérgicas analizadas en el conteo de células positivas a tirosina hidroxilasa (TH). SNpc= substancia nigra pars compacta, SNpr= substancia nigra pars reticulata, SNpl= substancia nigra pars lateral, AVT= área ventral tegmental, PBP= núcleo parabraquial pigmentoso, PN= núcleo paranigral, Rli= línea rostral del núcleo del rafe, IF= núcleo interfascicular, fr= fascículo retroflexus, ml= lemnisco medio, MT= tracto óptico accesorio del núcleo terminal medial. Las coordenadas están indicadas en la región inferior derecha (Paxinos y Watson 2007). A, B-C y D, representan cortes anterior, medial y posterior, respectivamente. En B fue tomada una microfotografía 20X de la SNpc y SNpr, la cual es mostrada en E. En E se muestran las células positivas a TH.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de la actividad locomotora fueron evaluados utilizando análisis de varianza de medidas repetidas para determinar el efecto del tratamiento, tiempo de muestreo y la interacción (tratamiento X tiempo de muestreo). En cada inyección, se utilizó un análisis de varianza de una vía para comparar el grupo control con los grupos tratados y se utilizó LSD de Fisher como prueba pos hoc.

La concentración de las monoaminas y sus metabolitos, los niveles de la enzima TH, la unión específica de los receptores de dopamina tipo D1 y D2, fueron analizados utilizando un análisis de varianza de una vía para comparar el grupo control con los grupos tratados y la prueba de LSD de Fisher como prueba post hoc. El número de células positivas a TH fue analizado utilizando una prueba de Kruskal Wallis. Finalmente, los resultados de la liberación de dopamina y sus metabolitos, fueron analizados con un análisis de varianza de medidas repetidas, debido a que en ésta se encontró efecto de grupo, se comparó control y tratado en cada muestra con una prueba t-student para muestras independientes. La normalidad y la homogeneidad de varianza fueron verificadas en todos los datos. En todos los análisis se utilizó el programa estadístico StatView versión 5.0 y se consideró una significancia de $p < 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre la actividad locomotora y marcadores dopaminérgicos

9.1.1 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre la actividad locomotora

La actividad exploratoria de los animales, previa a recibir la inyección 1, fue similar entre los grupos que recibieron solución salina y los tratados con glifosato. Esta actividad disminuyó a partir de que los animales recibieron la inyección 2 de glifosato, principalmente en los grupos tratados con 100 ó 150 mg Glif/kg (Figura 8). Esta hipoactividad se observó a lo largo del experimento, como se aprecia en la figura 8. A y B. En contraste, en la variable cuentas estereotipadas no se observa este efecto (Figura 8. C). La distancia total y la actividad vertical tuvieron efecto de tratamiento ($F_{(3,61)} = 5.49 - 7.46, p < 0.05$), del número de inyección ($F_{(6, 366)} = 7.522 - 45.77, p < 0.05$) e interacción (tratamiento x número de inyección) ($F_{(18, 366)} = 2.231 - 1.723, p < 0.05$). Mientras que en la variable de cuentas estereotipadas solo hubo efecto de tiempo ($F_{(6, 366)} = 57.29, p < 0.0001$). En el caso de distancia total y actividad vertical, el análisis pos hoc mostró disminuciones estadísticamente significativas a partir de que los animales recibieron la segunda inyección. Los resultados estadísticos para cada inyección de las tres variables analizadas se muestran en la Tabla 3 del apéndice.

La distancia total, la actividad vertical y las cuentas estereotipadas disminuyeron inmediatamente después de cada administración de glifosato (Figura 8. a, b y c). Es importante mencionar que la reducción en la distancia total y en la actividad vertical fue observada incluso cuando los animales tratados con glifosato (150 mg/kg) recibieron solución salina en el día 2 post-tratamiento. La distancia total, la actividad vertical y las cuentas estereotipadas mostraron efecto de tratamiento, ($F_{(3, 60)} = 22.23 - 36.14, p < 0.0001$) y número de inyección ($F_{(6, 360)} = 15.56 - 20.54,$

$p < 0.0001$). Solamente las cuentas estereotipadas mostraron efectos de interacción (tratamiento x número de inyección) ($F_{(18, 360)} = 2.401, p = 0.0012$).

El análisis pos hoc mostró que las tres dosis de glifosato disminuyen significativamente la actividad locomotora de los animales. Los resultados estadísticos para cada inyección de las tres variables analizadas se muestran en la Tabla 4 del apéndice.

Por otra parte, para entender los efectos agudos de la administración de glifosato sobre la actividad locomotora, se analizó exhaustivamente la variable distancia total inmediatamente después de la primera inyección de 150 mg Glif/kg y la de solución salina (Figura 7. B del apéndice). La distancia total tuvo efecto de tratamiento y de tiempo ($F_{(1, 31)} = 10.63, p = 0.002$; $F_{(11, 341)} = 13.6, p < 0.0001$, respectivamente). La distancia total disminuyó aproximadamente el 50% inmediatamente después de la administración del herbicida (muestra 1: $t_{(31)} = 3.07, p = 0.004$). Esta hipoactividad también fue observada en las muestras 5, 6 y 9 ($t_{(31)} = 2.05, 2.44, 2.32, p < 0.05$, respectivamente). Las muestras 11 y 12 solo mostraron una tendencia a disminuir ($t_{(31)} = 1.72, 1.87, p < 0.1$, respectivamente).

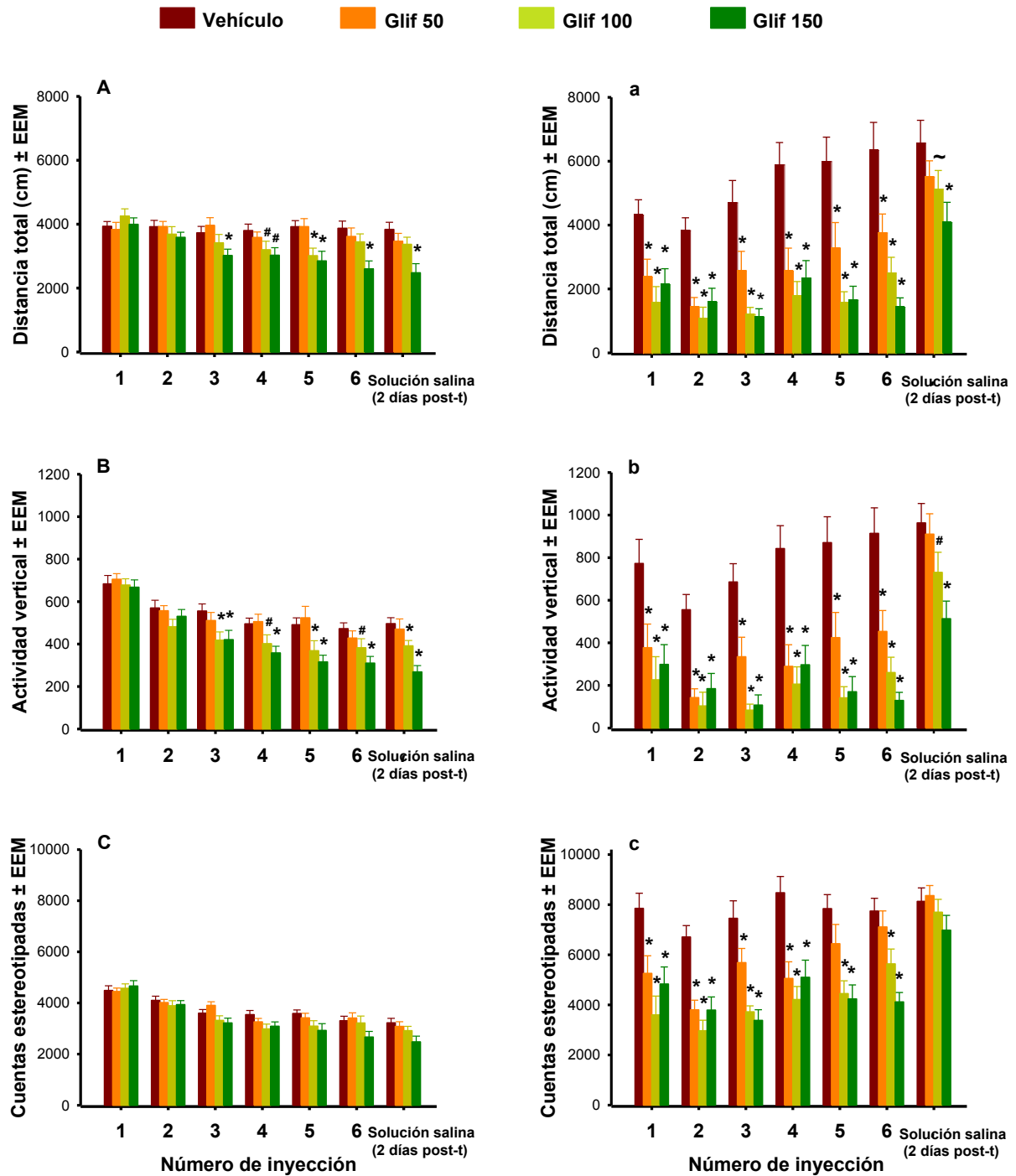


Figura 8. Actividad locomotora registrada 15 min (A, B y C) antes y durante 3 h (a, b y c) inmediatamente después de la administración i.p de solución salina (vehículo), 50, 100 ó 150 mg Glif/kg. El tratamiento consistió en la administración de 3 inyecciones/semana durante 2 semanas y una inyección de solución salina 2 días post-tratamiento (n= 16 ó 17). a, b y c representan la suma promedio de las 3 h de registro. (*) Indica diferencias estadísticas con respecto al grupo vehículo, $p < 0.05$; (#) $p = 0.05 - 0.07$; (~) $p < 0.1$.

9.1.2 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre la actividad locomotora registrada 16 días post-tratamiento

La actividad locomotora registrada 15 min antes de la inyección de solución salina en el día 16 post-tratamiento, fue similar en todos los grupos experimentales (Figura 9. A, B y C). De igual forma, en la actividad locomotora registrada durante 24 h en el ciclo luz/oscuridad después de la inyección de solución salina, no se observaron cambios entre los grupos experimentales (Figura 9. a, b y c).

9.1.3 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre el peso corporal y los marcadores bioquímicos de daño sistémico (LDH, AST y γ -GT)

Al terminar el tratamiento y a los 16 días post-tratamiento, el peso corporal de los animales fue similar entre los grupos tratados con Glif y el grupo control (Tabla 3). Del mismo modo, a los 2 y 16 días post-tratamiento, en los 3 marcadores enzimáticos de daño sistémico no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con Glif y el grupo control (Tabla 4).

9.1.4 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre el contenido de monoaminas y los niveles de la enzima TH en STR o NAcc

No se observaron diferencias estadísticas en la concentración de dopamina, serotonina y de sus metabolitos en el estriado ni en el núcleo accumbens, al comparar el grupo control con los grupos tratados con glifosato (Tabla 5). Del mismo modo, los niveles de TH (tirosina hidroxilasa) no mostraron cambios en el STR ni en el NAcc a los 2 y 16 días post-tratamiento (Figura 10).

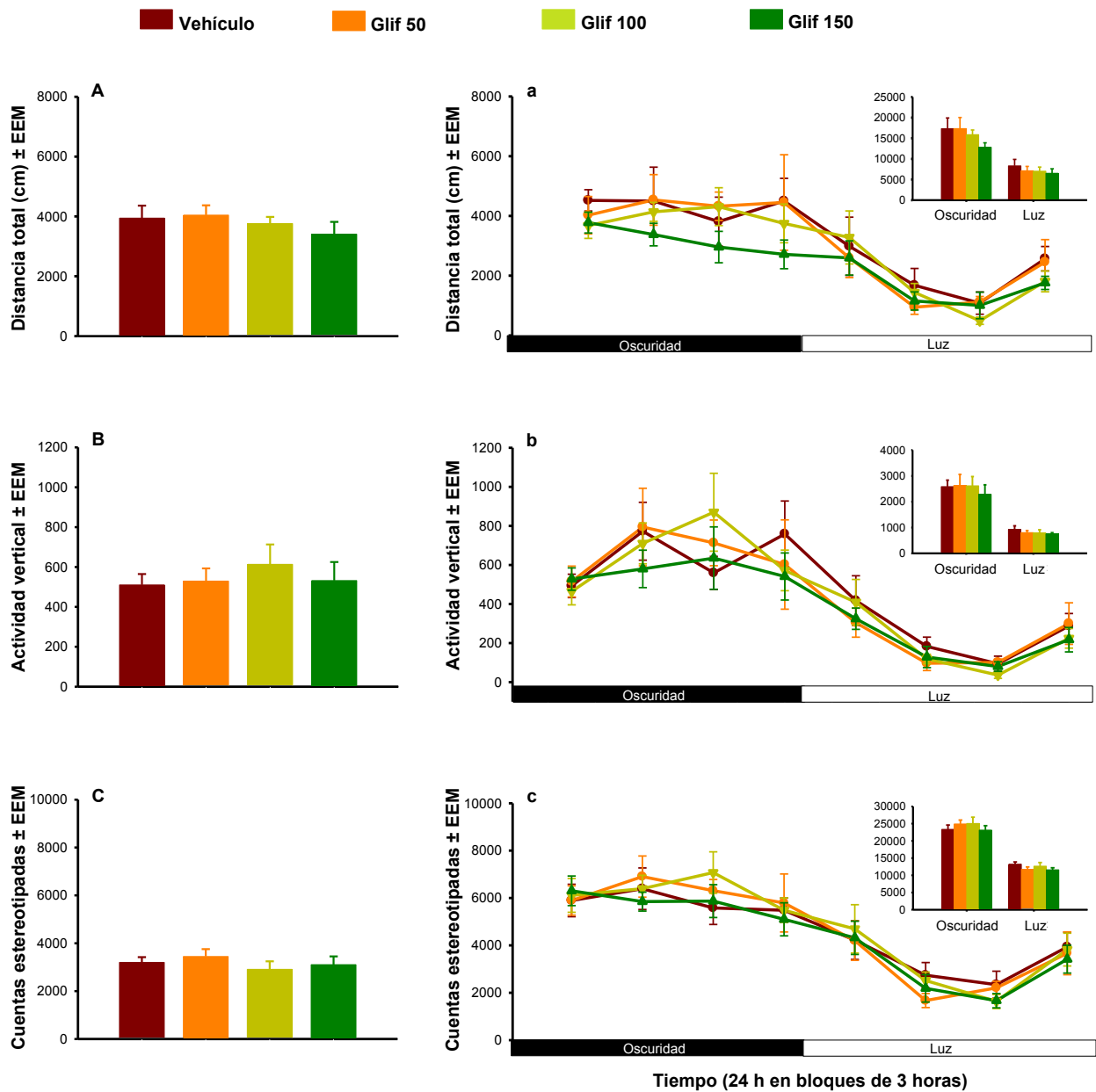


Figura 9. Actividad locomotora registrada 15 min antes de la inyección i.p de solución salina (A, B y C) y durante 24 h del ciclo luz/oscuridad inmediatamente después de la inyección i.p de solución salina (a, b y c) en el día 16 post-tratamiento, de la última inyección de solución salina (vehículo), 50, 100 ó 150 mg Glif/kg. La gráfica superior derecha muestra la suma promedio de la fase de oscuridad y luz (n= 6 ó 7).

Table 3. Peso corporal de los animales tratados con glifosato

Grupo	2 días post-tratamiento	16 días post-tratamiento
Vehículo	316 ± 7	377 ± 17
Glif 50	314 ± 7	374 ± 14
Glif 100	305 ± 6	365 ± 11
Glif 150	310 ± 5	376 ± 10

Valor promedio (g) ± EEM. n = 10 y n = 6 ó 7 para 2 y 16 días post-tratamiento, respectivamente. Glif = glifosato.

Tabla 4. Actividad enzimática de lactato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa y gamma-glutamyl transferasa, 2 y 16 días post-tratamiento.

Grupo	2 días post-tratamiento			16 días post-tratamiento		
	LDH	AST	γ-GT	LDH	AST	γ-GT
Vehículo	2137 ± 435	419 ± 77	131 ± 17	3589 ± 345	249 ± 29	136 ± 26
Glif 50	3359 ± 1004	453 ± 68	110 ± 17	3407 ± 626	322 ± 37	208 ± 45
Glif 100	4176 ± 733	454 ± 77	172 ± 37	4830 ± 446	371 ± 60	171 ± 27
Glif 150	3238 ± 733	361 ± 36	101 ± 19	5093 ± 891	396 ± 41	158 ± 65

Valores promedio (IU/L) ± EEM. n= 6 en ambos experimentos. LDH= Lactato deshidrogenasa, AST= Aspartato aminotransferasa y γ-GT= Gamma-glutamyltransferasa. Glif = glifosato.

Tabla 5. Contenido de monoaminas en el estriado y núcleo accumbens de ratas tratadas con glifosato, evaluadas 2 y 16 días post-tratamiento.

Grupo	DA	DOPAC	DOPAC/DA	5-HIAA	5-HT
2 días post-tratamiento					
<i>Estriado (STR)</i>					
Vehículo	100 ± 10	100 ± 13	100 ± 18	100 ± 8	100 ± 8
Glif 50	109 ± 13	103 ± 19	93 ± 20	108 ± 9	105 ± 7
Glif 100	121 ± 16	117 ± 17	102 ± 19	110 ± 12	94 ± 12
Glif 150	118 ± 14	111 ± 23	95 ± 19	108 ± 8	109 ± 6
<i>Núcleo accumbens (NAcc)</i>					
Vehículo	100 ± 19	100 ± 20	100 ± 21	100 ± 14	100 ± 9
Glif 50	132 ± 13	92 ± 14	58 ± 7	110 ± 12	111 ± 6
Glif 100	86 ± 17	80 ± 17	92 ± 19	90 ± 17	112 ± 12
Glif 150	119 ± 18	90 ± 16	74 ± 15	97 ± 13	121 ± 7
16 días post-tratamiento					
<i>Estriado</i>					
Vehículo	100 ± 5	100 ± 7	100 ± 9	100 ± 13	100 ± 10
Glif 50	105 ± 11	116 ± 16	110 ± 12	125 ± 24	121 ± 16
Glif 100	103 ± 15	110 ± 17	114 ± 17	133 ± 30	138 ± 28
Glif 150	111 ± 12	115 ± 6	113 ± 15	136 ± 20	176 ± 42
<i>Núcleo accumbens</i>					
Vehículo	100 ± 19	100 ± 23	100 ± 17	100 ± 13	100 ± 8
Glif 50	81 ± 10	79 ± 17	101 ± 17	86 ± 10	88 ± 9
Glif 100	111 ± 27	102 ± 17	133 ± 22	90 ± 15	92 ± 15
Glif 150	94 ± 9	105 ± 15	126 ± 20	85 ± 8	81 ± 7

Datos expresados en porcentaje del grupo control ± EEM. n= 9 ó 10 en ambos grupos experimentales. DA= dopamina, DOPAC= ácido dihidroxifenilacético, 5-HT= serotonina, 5-HIAA= ácido 5-hidroxiindolacético. Valores absolutos (ng/mg proteína ± EEM) para grupo vehículo: 2 días post-tratamiento STR: DA= 84 ± 8, DOPAC= 6 ± 1, 5-HT= 6 ± 0.5, 5-HIAA= 4 ± 0.3, DOPAC/DA= 0.08 ± 0.01. NAcc: DA= 42 ± 8, DOPAC= 8 ± 2, 5-HT= 13 ± 1, 5-HIAA= 4 ± 0.9, DOPAC/DA= 0.2 ± 0.04. 16 días post-tratamiento STR: DA= 263 ± 14, DOPAC= 19 ± 1, 5-HT= 16 ± 2, 5-HIAA= 13 ± 2, DOPAC/DA= 0.07 ± 0.007. NAcc: DA= 123 ± 24, DOPAC= 8 ± 2, 5-HT= 26 ± 2, 5-HIAA= 14 ± 2, DOPAC/DA= 0.06 ± 0.01. Glif = glifosato.

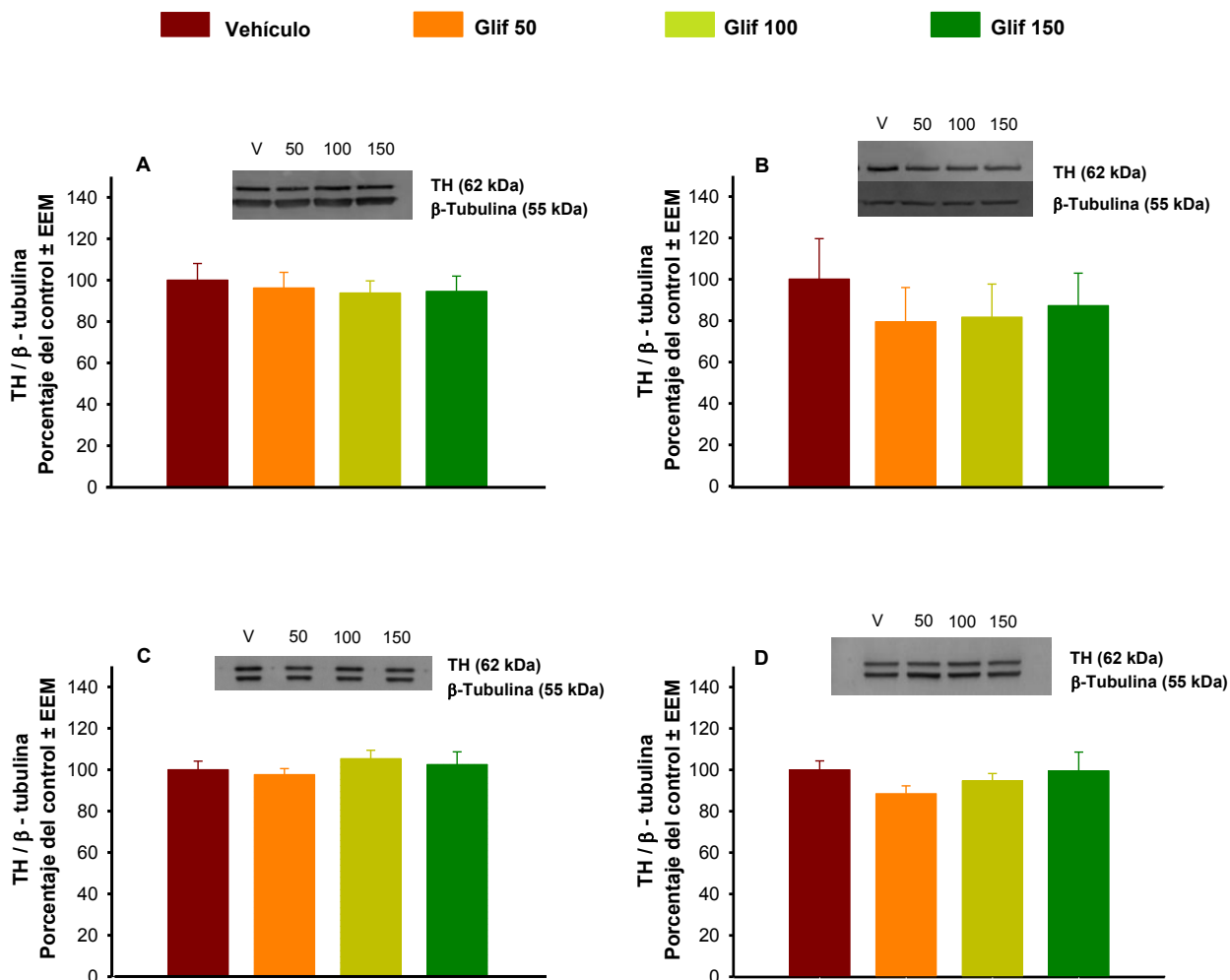


Figura 10. Niveles de tirosina hidroxilasa (TH) en STR y NAcc evaluados a los 2 y 16 días post-tratamiento expresados como porcentaje del grupo control (vehículo). Los niveles de TH en STR (A) y NAcc (B) a los 2 días post-tratamiento. Niveles de TH en STR (C) y NAcc (D) a los 16 días post-tratamiento. $n = 10$, V= Vehículo. Valores absolutos de TH/ β -tubulina del grupo vehículo en el día 2 post-tratamiento: STR= 0.90 ± 0.07 , NAcc= 3.45 ± 0.7 , y del grupo vehículo en el día 16 post-tratamiento: STR= 1.11 ± 0.05 , NAcc= 0.85 ± 0.04 .

9.1.5 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre la unión específica de los antagonistas [³H] SCH23390 y [³H] Spiperona a los receptores de dopamina tipo D1 y D2

A los 2 días post-tratamiento, la unión específica de [³H] SCH23390 a los receptores de DA tipo D1 en NAcc disminuyó en los animales tratados con 50, 100 y 150 mg Glif/kg (18, 30 y 40%, respectivamente) ($F_{(3, 20)} = 8.71$, $p = 0.0007$; Figura 11. C). En contraste, la unión específica de [³H] Spiperona a los receptores de DA tipo D2 fue similar en todos los grupos (Figura 11. D). En el STR, la exposición a glifosato no causó diferencias estadísticas en la unión específica de [³H] SCH23390 o [³H] Spiperona a los receptores de DA tipo D1 o tipo D2 (Figuras 11, A y B, respectivamente). De manera importante hubo correlación positiva entre la unión específica de [³H] SCH23390 a los receptores de DA tipo D1 en el NAcc y el promedio total de la distancia recorrida. También hubo correlación positiva entre la unión específica de [³H] SCH23390 a los receptores de DA tipo D1 en el NAcc y el promedio de la actividad vertical ($r = 0.62$, 0.68 , $p < 0.01$, respectivamente, Figura 13). La correlación entre la unión específica de [³H] SCH23390 a los receptores de DA tipo D1 en NAcc y las cuentas estereotipadas no fue significativa ($r = 0.37$, $p = 0.06$).

A los 16 días post-tratamiento, no se observaron diferencias estadísticas entre el grupo control y los grupos experimentales en la unión específica de los receptores de DA tipos D1 y D2 en STR o NAcc (Figura 12).

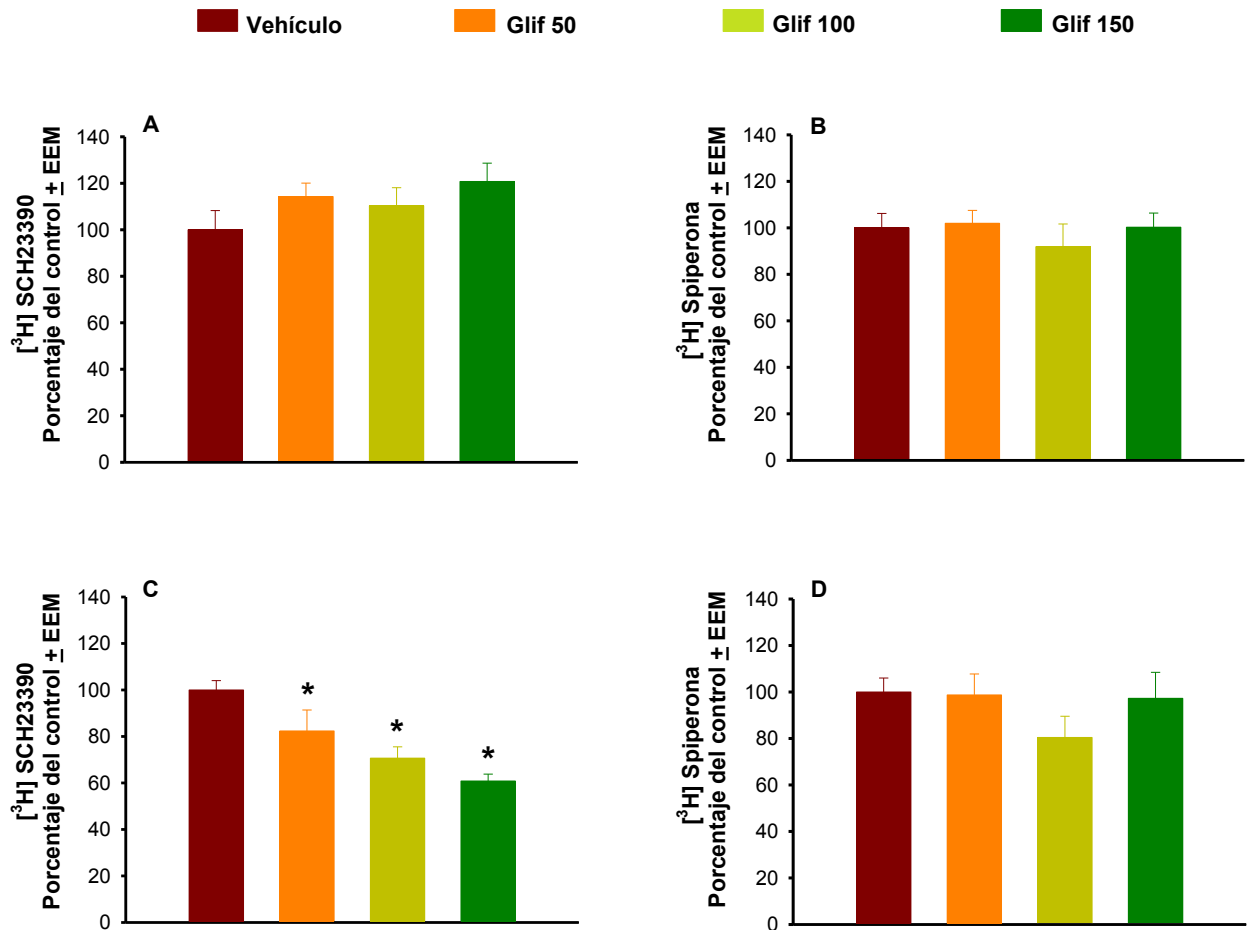


Figura 11. Unión específica de los antagonistas $[^3\text{H}]$ SCH23390 y $[^3\text{H}]$ Spiperona a los receptores de dopamina tipo D1 y D2 en STR y NAcc, evaluada en el día 2 post-tratamiento con glifosato. Unión específica a los receptores de DA tipo D1 en STR (A) y NAcc (C) y para los receptores de DA tipo D2 en STR (B) y NAcc y (D). Valores absolutos (nmol/mg proteína \pm EEM) para los grupos vehículos: A) 592.36 ± 48.93 , B) 225.78 ± 13.96 . C) 817.13 ± 32.70 , D) 150.54 ± 9.02 . $n = 6$. (*) Indica diferencias estadísticas con respecto al grupo vehículo, $p < 0.05$. STR= estriado, NAcc= núcleo accumbens.

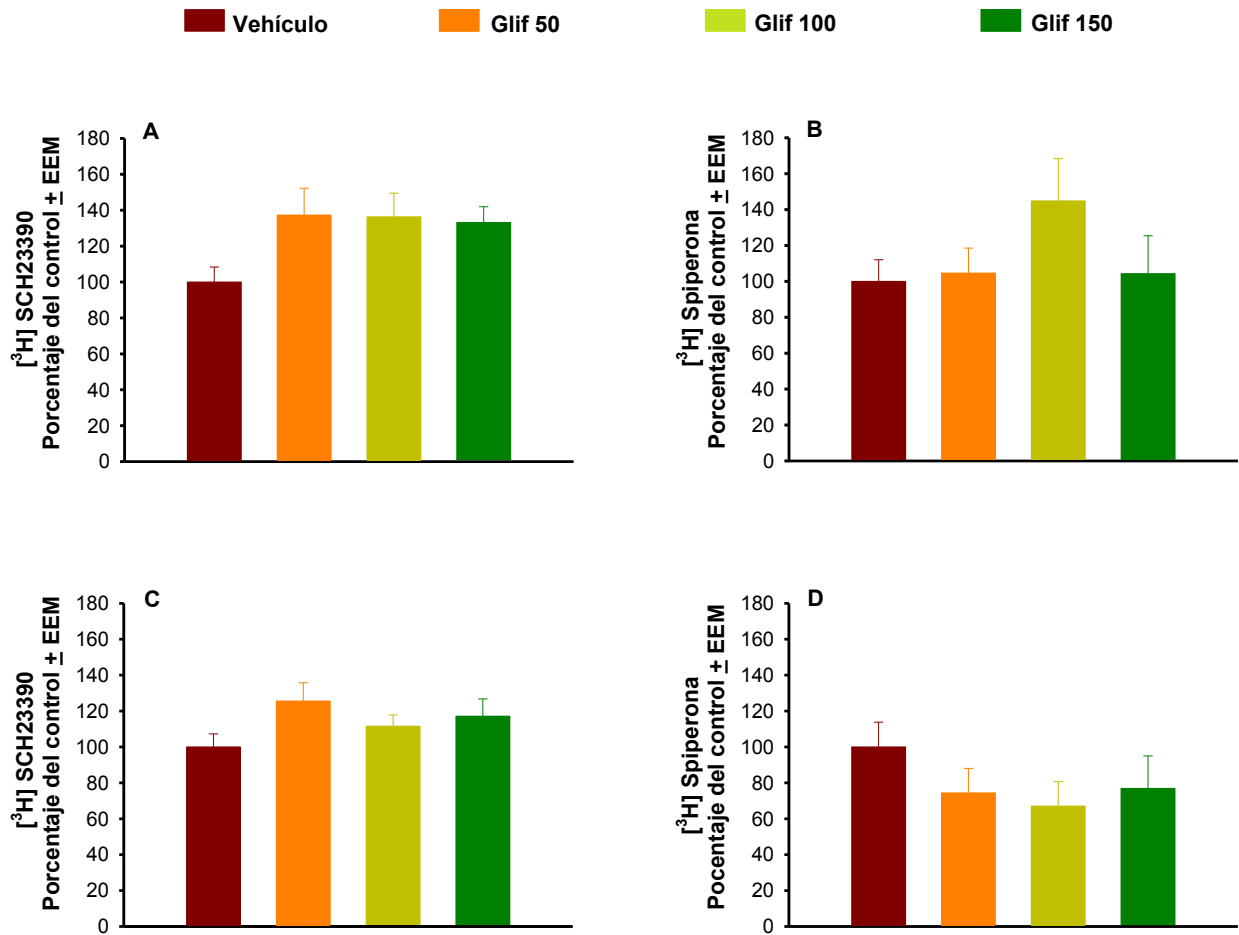


Figura 12. Unión específica de los antagonistas $[^3\text{H}]$ SCH23390 y $[^3\text{H}]$ Spiperona a los receptores de DA tipo D1 y D2 en STR y NAcc evaluada en el día 16 post-tratamiento con glifosato. Unión específica a los receptores de DA tipo D1 en STR (A) y NAcc (C) y para los receptores de DA tipo D2 en STR (B) y NAcc y (D). Valores absolutos (nmol/mg proteína \pm EEM) para los grupos vehículos: A) 259.38 ± 21.66 , B) 138.03 ± 16.61 , C) 333.06 ± 24.20 , D) 62.71 ± 8.64 . DA= dopamina, STR= estriado, NAcc= núcleo accumbens. n= 6.

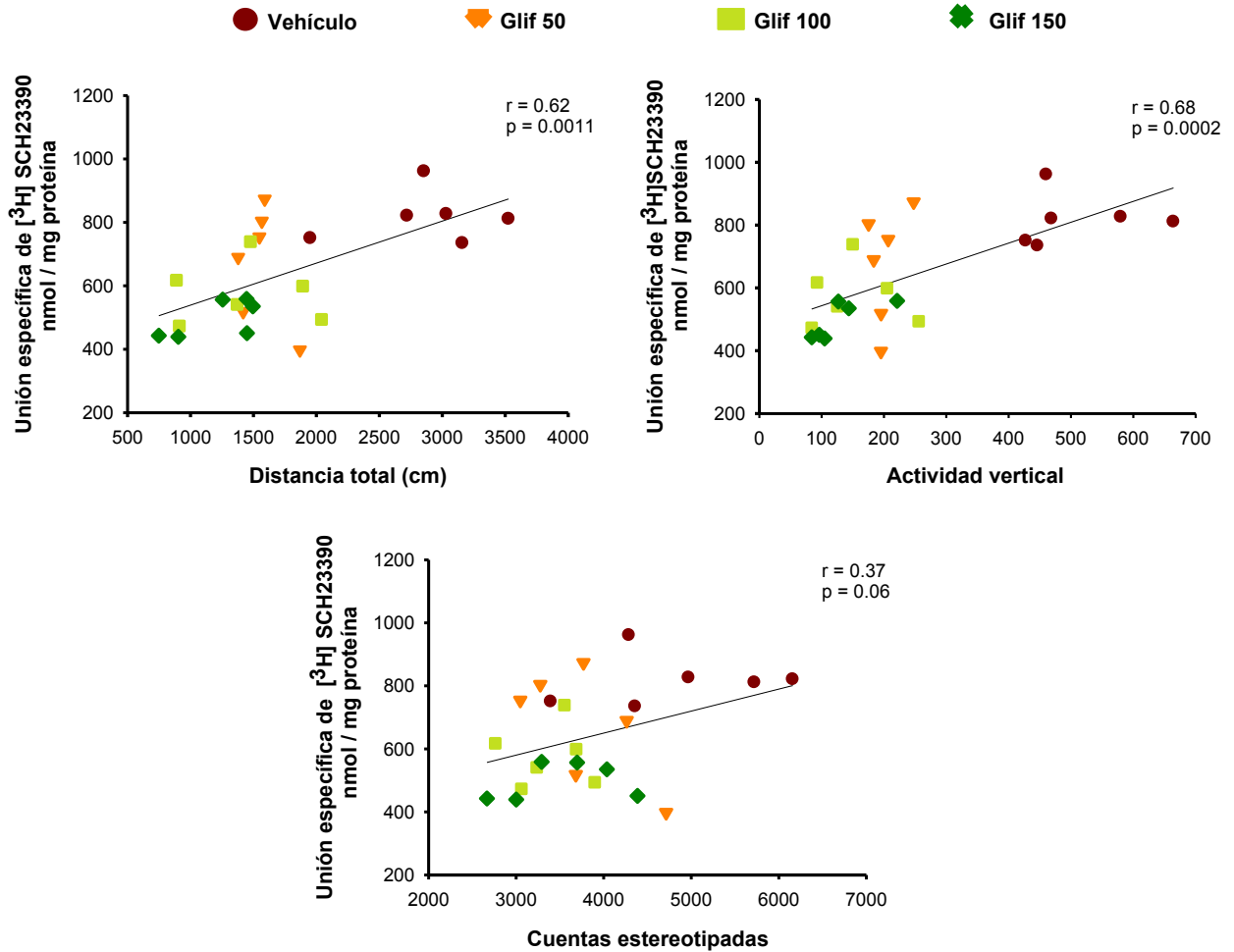


Figura 13. Correlación entre la unión específica del antagonista [³H] SCH23390 a los receptores de DA tipo D1 en NAcc evaluado a los 2 días post-tratamiento y la actividad locomotora promedio de las 3 h posteriores al tratamiento (7 administraciones de glifosato ó vehículo). Los coeficientes de correlación y el nivel de significancia son mostrados en el lado superior derecho de cada gráfica. Las correlaciones hacen referencia a los resultados obtenidos del grupo adicional tratado específicamente para la evaluación de receptores dopaminérgicos de acuerdo al diseño experimental mostrado en la figura 5.

9.1.6 Efectos de la exposición repetida a glifosato sobre el número de células positivas a TH en la sustancia nigra y el área ventral tegmental

A los 2 ó 16 días post-tratamiento, el número de células positivas a TH en las 3 subregiones de la sustancia nigra (SNpc, SNpl y SNpr) o en las 4 regiones de AVT (AVT, PBP, PN y RLi) fueron similares en todos los grupos experimentales (Tabla 6).

Tabla 6. Número de células positivas a TH en la sustancia nigra y en el área ventral tegmental de ratas tratadas con glifosato a los 2 y 16 días post-tratamiento

	Región Cerebral			
	SNpc	SNpl	SNpr	AVT
2 días post-tratamiento				
Vehículo	102 ± 22	24 ± 6	26 ± 5	149 ± 39
Glif 50	97 ± 25	19 ± 2	27 ± 5	116 ± 28
Glif 100	143 ± 28	22 ± 3	33 ± 6	164 ± 31
Glif 150	137 ± 39	22 ± 3	30 ± 6	147 ± 34
16 días post-tratamiento				
Vehículo	131 ± 11	21 ± 2	32 ± 2	169 ± 18
Glif 50	173 ± 29	25 ± 3	41 ± 3	212 ± 33
Glif 100	125 ± 15	21 ± 3	28 ± 3	165 ± 17
Glif 150	125 ± 17	21 ± 3	31 ± 3	155 ± 17

Valores promedio ± EEM. n= 5 ó 7. SNpc= Sustancia nigra *pars compacta*, SNpl= Sustancia nigra *pars lateralis*, SNpr= Sustancia nigra *pars reticulata*, AVT= Área ventral tegmental. Glif = glifosato.

9.2 Efectos de la exposición aguda a glifosato sobre la liberación de dopamina en STR y NAcc

Como se muestra en la Figura 14, la administración aguda (i.p) de 150 mg Glif/kg no solo disminuyó los niveles de DA extracelular estriatales, sino también redujo la liberación de DA estriatal inducida por la infusión de la solución Ringer alto potasio (60 mM). Los niveles de DA estriatal mostraron efecto de grupo, tiempo e interacción (tratamiento X tiempo) ($F_{(1, 9)} = 5.35, p = 0.04$; $F_{(14, 126)} = 40.32, p < 0.0001$; $F_{(14, 126)} = 4.96, p < 0.0001$, respectivamente), mientras que los niveles de DOPAC y HVA solamente mostraron efectos de tiempo ($F_{(14, 126)} = 10.42 - 15.82, p < 0.0001$). Lo cual puede observarse en las figuras 14. B y C, en donde se observa que los niveles de DOPAC y HVA son semejantes entre el grupo vehículo y el tratado. En cambio, los niveles de DA extracelular estriatal disminuyeron a los 20 min y a las 2 h después de la administración de Glif (muestra 4: $t_{(9)} = 2.76, p = 0.02$; muestra 9: $t_{(9)} = 2.561, p = 0.03$), los niveles de DA en las muestras 5 y 6 mostraron una tendencia a disminuir ($t_{(9)} = 2.05, 1.93, p < 0.1$, respectivamente) (Figura 14. A). La liberación de DA estriatal inducida por la infusión de solución Ringer alto potasio disminuyó en las muestras 13 y 15 en el grupo que recibió 150 mg Glif/kg ($t_{(9)} = 2.35, 2.40, p < 0.05$, respectivamente). Después del reto con alto potasio, en la muestra 18, los niveles de DA extracelular estriatal fueron más bajos en el grupo tratado ($t_{(9)} = 3.13, p = 0.01$).

A diferencia de los resultados en STR, los niveles de DA, DOPAC y HVA en NAcc fueron similares en ambos grupos, incluso con la infusión de solución Ringer alto potasio (60 nM) (Figura 15). Solamente se observaron efectos de tiempo para los niveles de DA, DOPAC y HVA ($F_{(14, 140)} = 15.89 - 30.36, p < 0.0001$) en NAcc.

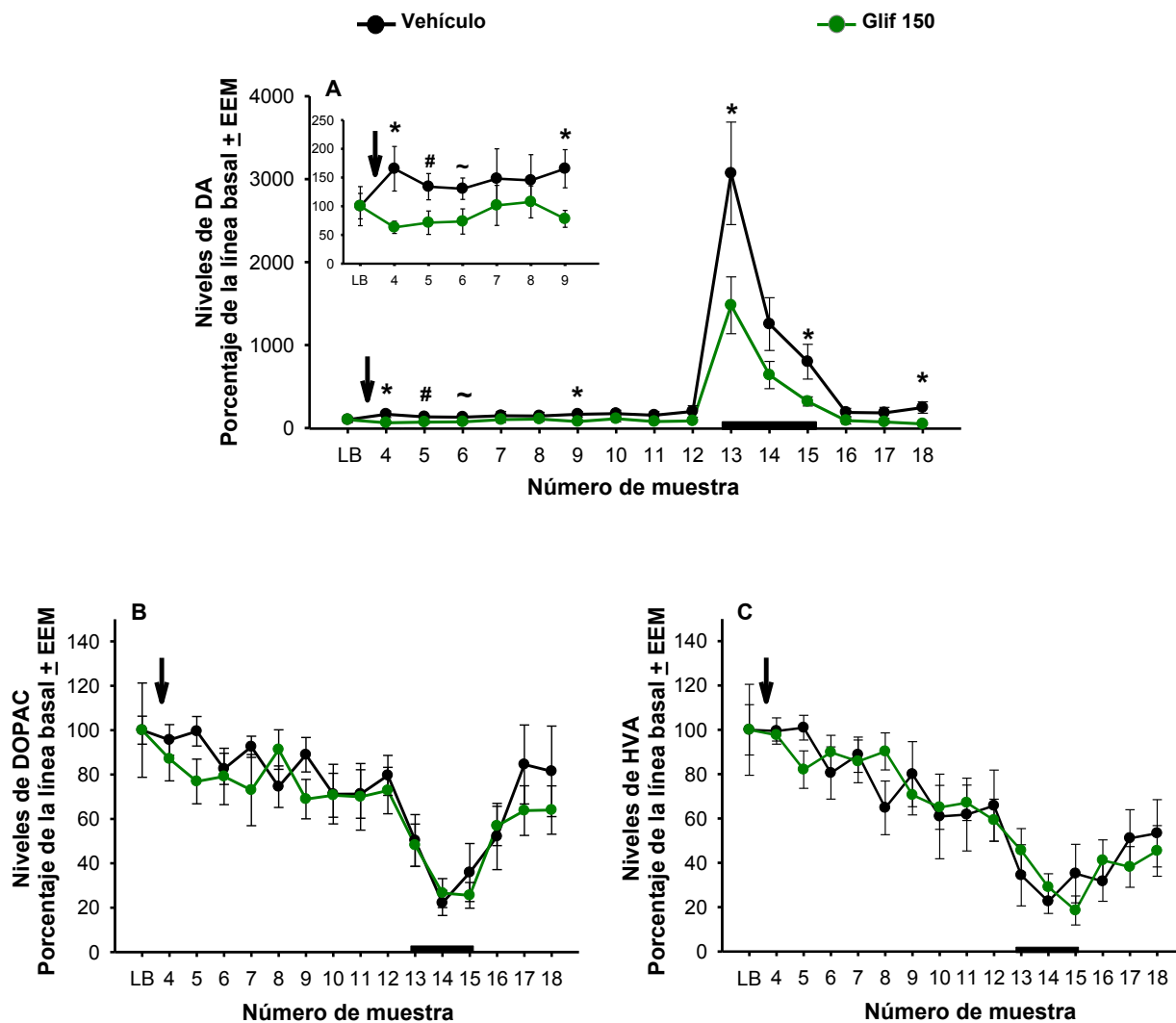


Figura 14. Efecto agudo de Glif sobre la liberación de DA y sus metabolitos en STR de ratas anestesiadas. Niveles extracelulares de DA (A), DOPAC (B) y HVA (C). Las flechas indican la administración de vehículo o 150 mg Glif/kg. Las barras oscuras indican el tiempo de infusión de la solución Ringer alto potasio (60 nM). n= 5 ó 6. En el lado superior izquierdo de A se muestran los resultados desde la línea base hasta la muestra 9. El número de muestra corresponde a cada una de las 18 colectadas cada 20 min, las tres primeras fueron consideradas como línea base. Valores absolutos de la línea base (ng/mL \pm EEM) para los grupos vehículo: DA= 0.2 ± 0.04 , DOPAC= 67 ± 4 , HVA= 71 ± 8 y para los grupos tratados: DA= 0.3 ± 0.1 , DOPAC= 44 ± 9 , HVA= 53 ± 10 . HVA= ácido homovanílico y DOPAC = ácido 3,4 dihidroxifenilacético, (*) Indica diferencias estadísticas con respecto al grupo vehículo, $p < 0.05$; (#) $p = 0.05 - 0.07$; (~) $p < 0.1$.

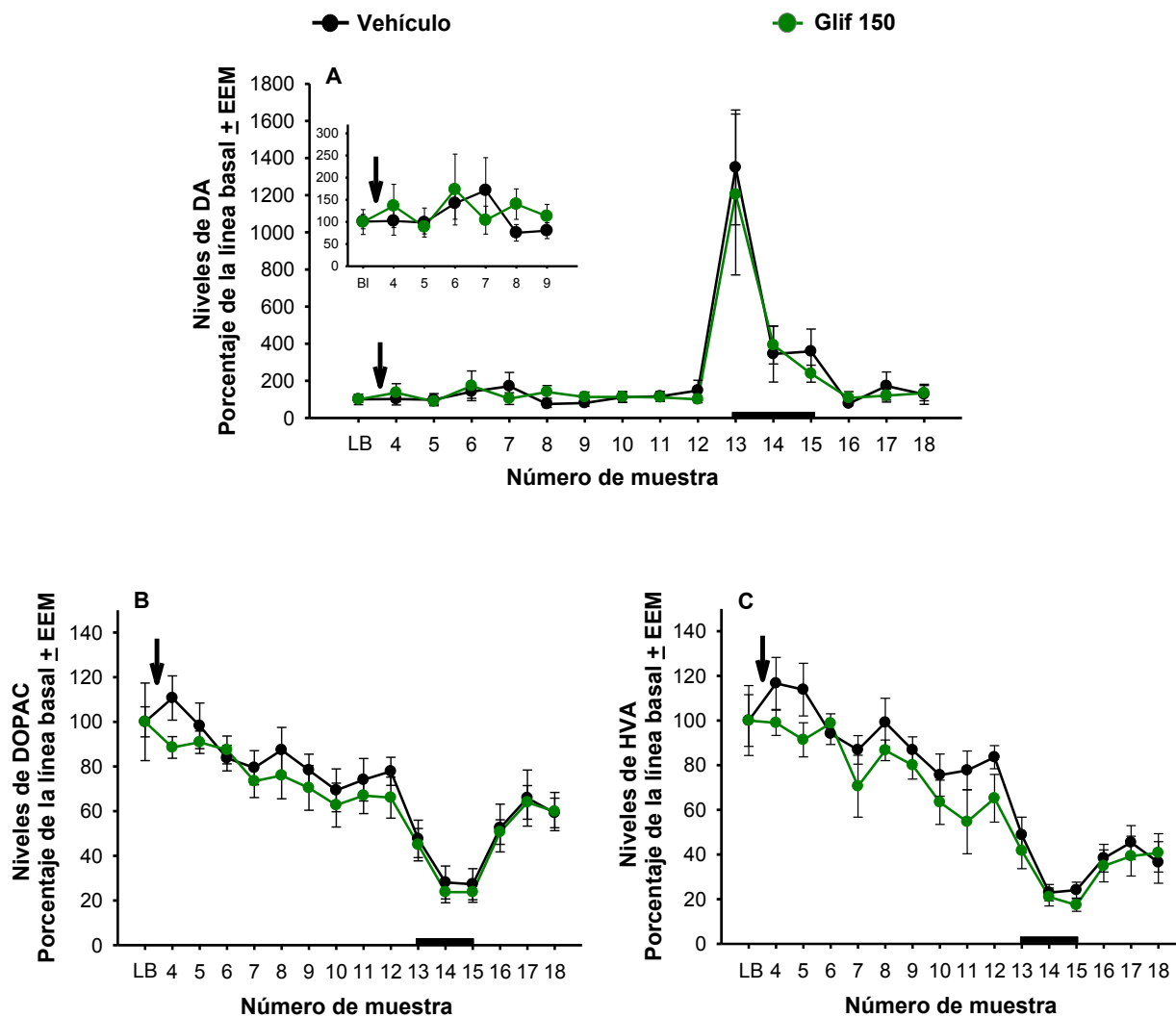


Figura 15. Efecto agudo de Glif sobre la liberación de DA y sus metabolitos en NAcc de ratas anestesiadas. Niveles extracelulares de DA (A), DOPAC (B) y HVA (C). Las flechas indican la administración de vehículo o 150 mg Glif/kg. Las barras oscuras indican el tiempo de infusión de solución Ringer alto potasio (60 nM). n = 5 ó 6. En el lado superior izquierdo de A se muestran los resultados desde la línea base hasta la muestra 9. El número de muestra corresponde a cada una de las 18 colectadas cada 20 min, las tres primeras fueron consideradas como línea base. Valores absolutos de la línea base (ng/mL ± EEM) para los grupos vehículo: DA= 0.06 ± 0.01, DOPAC= 30 ± 5, HVA= 43 ± 7 y para los grupo tratados: DA= 0.08 ± 0.02, DOPAC= 32 ± 2, HVA= 46 ± 5. HVA= ácido homovanílico y DOPAC= ácido 3,4 dihidroxifenilacético.

10. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se demostró que la exposición a glifosato causa hipoactividad en ratas y que dicha hipoactividad no es el resultado del malestar general de los animales, ya que los animales expuestos a este herbicida no mostraron aversión al sabor o cambios en el lugar preferido después de recibir el tratamiento (Experimentos B y C del apéndice). Además de ello, el peso corporal no mostró diferencias entre los grupos experimentales a los 2 ó 16 días post-tratamiento. También se encontró que la actividad de los 3 marcadores enzimáticos de daño hepático, renal y cardíaco no cambia después del tratamiento con glifosato. En apoyo a lo anterior, dado que este compuesto tiene la característica química de ser un ácido, se realizó el experimento A del apéndice y se encontró que esta característica, por si misma tampoco es la causa de la hipoactividad en los animales. Así, en el presente trabajo se enfocó a evaluar los efectos neurotóxicos del glifosato a través de algunos marcadores dopaminérgicos y su relación con la actividad espontánea en ratas macho expuestas repetidamente ó agudamente a este herbicida.

Interesantemente, a pesar de que el glifosato fue diseñado para eliminar o controlar malas hierbas, este compuesto también afecta a humanos y ratas. En humanos, la exposición a la mezcla comercial con glifosato conlleva al desarrollo de síndromes tipo parkinsonianos (Barbosa y cols., 2001; Wang y cols., 2011). En el caso de la rata, se encontró que la exposición repetida al ingrediente activo glifosato causó hipoactividad en dichos roedores, un efecto que no había sido reportado en modelos animales. Cabe resaltar que estos resultados muestran que el ingrediente activo por si mismo causa alteraciones en la actividad locomotora, siendo evidente inmediatamente después de la administración de las 3 dosis de glifosato (50, 100 ó 150 mg/kg). Notablemente, en los animales que recibieron las dosis más altas, la hipoactividad en la distancia total y en la actividad vertical estuvo presente después de 48 h, e incluso cuando los animales recibieron una administración de solución salina (2 días post-tratamiento).

Otros estudios también han descrito que la exposición a herbicidas, tales como el paraquat, la atrazina y el ácido 2, 4-diclofenoxiacético (2, 4-D) causan hipoactividad en modelos animales (Schulze y Dougherty 1988; Brooks y cols., 1999; Lin y cols., 2013). En el caso de paraquat, ratones a los que se les administró por vía i.p este compuesto (10 mg/kg, 3 inyecciones i.p, una por semana), muestran baja actividad ambulatoria 48 h después de la última administración (Brooks y cols., 1999). Ratones expuestos a 125 ó 250 mg/kg/día de atrazina por vía intragástrica por 10 días muestran disminución en la distancia recorrida, número de cruzamientos y actividad vertical en el cuarto día de tratamiento (Lin y cols., 2013). Ratas macho a las que se les administró por vía subcutánea dosis 150, 175, 200 ó 250 mg/kg del herbicida 2,4-D durante 14 días, muestran disminución en la actividad locomotora a lo largo del tratamiento (Schulze y Dougherty 1988).

Otro hallazgo importante del presente estudio fue que la exposición repetida a glifosato disminuye la unión específica del antagonista a los receptores DA tipo D1 en NAcc. Notablemente esta reducción mostró una correlación positiva con la disminución en la actividad ambulatoria registrada inmediatamente después de la administración de glifosato. Nuestros hallazgos son consistentes con estudios que muestran que tanto el NAcc como los receptores DA D1 están involucrados en el control motor. Se ha encontrado que la administración intracerebral de 1 ó 2 µg/hemisferio del antagonista SCH23390 en la región shell o core del NAcc disminuye el número de cruzamientos que realizan los animales en el campo abierto (Baldo y cols., 2002). También se ha encontrado que la administración subcutánea aguda o crónica (21 días) de SCH23390 (0.5 mg/kg) en ratas macho causa catalepsia (Hess y cols., 1988).

En el presente trabajo también se encontró que los niveles de DA extracelular estriatal disminuyen aproximadamente 50% en la primera muestra de microdiálisis (20 min), obtenida después de la administración de 150 mg de glifosato. Esta disminución coincide con el 50% de reducción en la distancia total registrada durante los primeros 15 min después de la administración de 150 mg del herbicida en los experimentos de actividad locomotora. Tal que, la disminución en los

niveles de DA extracelular estriatal después de la administración aguda de Glif podrían, en un principio, explicar la hipoactividad conductual (Figura 7 del apéndice).

Por otra parte, los efectos de la exposición a glifosato sobre la actividad locomotora y los marcadores de DA fueron evidentes 2 días después de terminado el tratamiento, pero no después de 16 días. Estos hallazgos sugieren que dichas alteraciones toman lugar mientras una concentración “crítica” de glifosato está presente en el sistema. Con respecto a la eliminación de este compuesto en el organismo, en ratas machos expuestas oralmente a 10 mg de [¹⁴C] y [¹²C] Glif/kg, aproximadamente el 76% de éste es eliminado a través de la orina y heces en las primeras 28 h después de la exposición y aproximadamente el 1% de glifosato permanece en el animal 7 días después de la exposición (Brewster y cols., 1991). Los efectos sobre la unión específica del antagonista [³H] SCH23390 a los receptores de DA tipo D1 en NAcc fueron solamente detectados a los 2 y no a los 16 días post-tratamiento, esto podría deberse a que la exposición repetida a glifosato tiene efectos a corto plazo sobre los mecanismos que regulan, ya sea la densidad o la afinidad de los receptores de DA tipo D1 en NAcc. Mecanismos directos podrían involucrar modificaciones desde la transcripción hasta la translocación de los receptores en la membrana extracelular o cambios estructurales del receptor. Un estudio realizado en ratas crónicamente expuestas al herbicida 2,4-D (70 mg/kg) retadas con anfetamina (10 mg/kg, i.p), reveló que la exposición a este herbicida genera internalización de los receptores de DA tipo D2 causando cambios en la densidad de los receptores en estriado, corteza prefrontal, hipocampo y cerebelo (Bortolozzi y cols., 2002). Un mecanismo indirecto podría involucrar alteraciones temporales de las características de membrana causando efectos sobre las propiedades de los receptores. Cattani y cols. (2014) detectaron aumentos en los niveles de TBARS, un marcador de lipoperoxidación, en rebanadas hipocampales tratadas con 0.01% de Roundup, un herbicida el cual contiene glifosato. Similarmente, ratas macho expuestas a glifosato muestran disminución en los niveles de cardiolipina (glicerolípido de membrana), en la fracción mitocondrial de la sustancia nigra y corteza cerebral

(Astiz y cols., 2009). Astiz y cols. (2009) encontraron que el glifosato (10 mg/kg) mezclado con dimetoato (insecticida, 15 mg/kg) y zineb (fungicida, 15 mg/kg) aumenta los niveles de TBARS en la fracción mitocondrial de la sustancia nigra y corteza cerebral, sugiriendo que el glifosato podría modificar la fluidez de membrana. En el presente estudio no se evaluó si el glifosato afecta la densidad o la afinidad de los receptores de DA, ya que usó una concentración del antagonista cerca de la constante de disociación (Kd).

Cabe resaltar que la exposición repetida a glifosato no modificó otros marcadores dopaminérgicos tales como contenido total de DA o sus metabolitos, niveles de TH en STR o NAcc o el número de células de TH+ en SN o AVT. Este último marcador sugiere que la exposición repetida a este herbicida no causa muerte de las células dopaminérgicas en SN o AVT. A diferencia del glifosato, otros herbicidas tales como paraquat (Brooks y cols., 1999; McCormack y cols., 2002; Kang y cols., 2009) y atrazina (Coban y Filipov 2007; Bardullas y cols., 2013; Rodriguez y cols., 2013) causan en roedores alteraciones en uno o varios marcadores dopaminérgicos, tales como contenido de DA y sus metabolitos en STR, niveles de TH en STR y número de células TH+ en SNpc y/o AVT.

Los resultados del experimento de microdiálisis muestran que la administración aguda a glifosato disminuye los niveles estriatales de DA extracelular y la liberación de DA inducida con alto potasio. Aunque los mecanismos para explicar este efecto no son claros, nosotros proponemos lo siguiente, 1) el glifosato podría acelerar la recaptura de DA a través de una sobreactividad del transportador de DA, 2) el glifosato modifica la movilización de las vesículas que contienen DA hacia la membrana extracelular y/o la vesiculación generando una disminución de DA, 3) el glifosato podría afectar la síntesis de DA, ya que esta disminución está presente 3 h después de la administración del herbicida, o 4) el glifosato podría interferir con los sitios de fosforilación de TH, principalmente Ser 40 ó 19, ya que la activación de TH por fosforilación es un mecanismo primario a corto plazo para mantener los niveles de catecolaminas (Dunkley y cols., 2004). Los mismos mecanismos pueden ser responsables para disminuir la liberación de DA inducida por solución Ringer alto potasio.

Es importante mencionar que la exposición aguda de glifosato causó la disminución de DA extracelular y la liberación de DA inducida por alto potasio. Mientras que, la exposición repetida a glifosato, no alteró el contenido de DA o los niveles de TH, a los 2 ó 16 días después de recibir las seis administraciones del herbicida. Estos hallazgos sugieren que el glifosato tiene efectos agudos y transitorios sobre el metabolismo de DA.

En la administración aguda de glifosato, los niveles de DOPAC y HVA no fueron modificados antes o después del reto con alto potasio. Efectos similares han sido detectados en ratas macho expuestas a otros tipos de plaguicidas tales como Alettrina (20 ó 60 mg/kg i.p) y Cialotrina (20 ó 60 mg/kg i.p). Experimentos de microdiálisis mostraron que ambas dosis de estos compuestos disminuyen la liberación de DA pero no de DOPAC o HVA. No obstante, los niveles de 3-metoxitiramina (3-MTT), otro metabolito de DA, aumentan a los 60 min post-tratamiento. Estos hallazgos sugieren que la disminución en los niveles de DA pueden resultar del aumento del metabolismo de DA a 3-MTT (Mubarak Hossain y cols., 2006). En el presente estudio no se puede determinar si éste sea el caso para glifosato, ya que solamente se evaluó DOPAC y HVA.

Aunque la hipoactividad causada por la administración aguda de glifosato es similar a lo que se observa después de la administración de antagonistas dopaminérgicos, este herbicida podría afectar otros sistemas de neurotransmisión involucrados en el control motor. Recientemente, fue reportado que en rebanadas hipocampales de ratas de 15 días de edad incubadas con 0.01% de Roundup, disminuye la recaptura de [³H]-glutamato y aumenta la liberación de glutamato (Cattani y cols., 2014), sugiriendo que glifosato genera excitotoxicidad hipocampal por glutamato. En roedores se ha mostrado que algunos herbicidas como el 2,4-D (Bortolozzi y cols., 2003), ATR (Lin y cols., 2013) y paraquat (Kuter y cols., 2007), modifican varios sistemas de neurotransmisión en diferentes áreas cerebrales. Por ejemplo, en ratas macho expuestas crónicamente al herbicida 2,4-D (70 mg/kg, desde el día 16 de gestación hasta el día 90 postnatal), disminuyen los niveles de DA en cerebelo y aumentan los niveles de serotonina en corteza prefrontal, estriado, mesencéfalo, sustancia nigra y cerebelo (Bortolozzi y cols., 2003).

Mientras que, en ratones macho expuestos a atrazina (125 ó 250 mg/kg) por 10 días, se aumentan los niveles de HVA, DOPAC, 5-HIAA (ácido 5-hidroxiindolacético, metabolito de serotonina) y NE (noradrenalina) en la corteza prefrontal (Lin y cols., 2013). Otro ejemplo, es el caso de ratas macho expuestas a paraquat (10 mg/kg, 5 administraciones una por día) en donde aumentan los niveles de serotonina en la sustancia nigra a los 3 días post-tratamiento y aumentan los niveles de NE en estriado a los 2 y 3 días post-tratamiento (Kuter y cols., 2007). En el presente estudio se encontró que los niveles de serotonina (5-HT) y su metabolito 5-HIAA no fueron afectados por la administración de glifosato en STR o NAcc (Tabla 5).

Finalmente, este trabajo de investigación mostró que el STR y el NAcc fueron diferencialmente vulnerables a la exposición de glifosato. Esto puede ser debido a las propiedades anatómicas y fisiológicas particulares de las vías nigroestriatal y mesolímbica, tales como conectividad cerebral (Gerfen 2004; Humphries y Prescott 2010), propiedades de membrana, excitabilidad celular, niveles de lipoperoxidación y actividad enzimática de catalasa y glutatión peroxidasa (Hung y Lee, 1998; Ma y cols., 2012), entre otros. En el presente estudio, la distancia total y la actividad vertical fueron correlacionadas con la unión específica de los receptores de DA tipo D1 en NAcc, pero no en STR. Por otro lado, las estereotipias, las cuales están reguladas por el STR (Canales y Graybiel 2000; Presti y cols., 2003), no fueron afectadas, ni correlacionan con la unión de los receptores de DA. Estos hallazgos sugieren una sensibilidad diferencial de dichas áreas cerebrales a glifosato. Esta vulnerabilidad diferencial entre las vías nigroestriatal y mesolímbica, ha sido observada en otros trabajos de exposición a plaguicidas y neurotoxinas. Ratas macho expuestas a 100 mg/kg del herbicida atrazina (6 administraciones durante 2 semanas) muestran disminución en el contenido de DA, DOPAC, HVA y 5-HIAA en el STR pero no en NAcc. Mientras que en el NAcc solamente disminuyó la expresión del ARNm de tioredoxina citosólica (Trx-1) (Rodríguez y cols., 2013). Por otro lado, ratones macho expuestos a 10 mg/kg del herbicida paraquat y 30 mg/kg del fungicida Maneb, muestran disminución en los niveles de TH y en el transportador de DA en STR

pero no en NAcc. De igual forma, el número de células positivas a TH disminuyen solamente en SNpc pero no en AVT (Thiruchelvam y cols., 2000). En el caso de la neurotoxina MPTP, ratones Balb/c tratados i.p por 7 días con 30 mg/kg/día muestran mayor actividad de las 2 isoenzimas de la superóxido dismutasa (CuZn SOD y MnSOD) en área ventral tegmental. Mientras que en la sustancia nigra solo aumenta la actividad de la isoenzima MnSOD (Hung y Lee 1998). En primates no humanos, (mono verde, *Chlorocebus sabaues*), también se ha encontrado que la sustancia nigra, el área ventral tegmental y el área retrorubral son vulnerables diferencialmente ante la exposición de la toxina MPTP (0.4 mg/kg/día por 5 días), mostrando menor concentración de dopamina en la sustancia nigra (Elsworth y cols., 1990).

11. CONCLUSIONES

Uno de los hallazgos importantes del presente proyecto fue que la exposición repetida a glifosato causó alteraciones en la actividad locomotora de la rata albina. Notablemente se observó un efecto hipoactivo, siendo evidente inmediatamente después de la administración de glifosato.

Contrario a lo esperado, la exposición repetida a glifosato no modificó los niveles de dopamina ni de sus metabolitos en el STR o en el NAcc. De igual forma, los niveles de la enzima tirosina hidroxilasa no fueron modificados en ninguna de las regiones antes mencionadas. Sin embargo, la unión específica a los receptores DA tipo D1 solamente disminuyó en NAcc en el día 2 y no en día 16 post-tratamiento, sugiriendo que los cambios provocados por el herbicida en la fisiología de los receptores son reversibles.

La exposición aguda a glifosato reveló que éste tiene efectos transitorios y específicos sobre la neuroquímica dopaminérgica, ya que los niveles de dopamina extracelular y la liberación de dopamina disminuyeron en el STR, pero no en el NAcc.

Como en la mayoría de los marcadores dopaminérgicos evaluados, la exposición repetida a glifosato no modificó el número de células positivas a TH en la sustancia nigra ni en el área ventral tegmental, mostrando que el glifosato no causa muerte celular de las neuronas dopaminérgicas de dichas áreas.

12. PERSPECTIVAS

Experimentos adicionales son necesarios para revelar los blancos específicos de glifosato sobre los sistemas dopaminérgicos y si dicho ingrediente activo podría estar modificando otros sistemas de neurotransmisión involucrados en el control motor.

Se sugiere utilizar una batería de marcadores de estrés oxidativo, para dilucidar el posible papel pro-oxidante del glifosato y conocer los mecanismos por los cuales este herbicida ejerce su efecto sobre el sistema nervioso.

Los efectos reportados en el presente estudio se obtuvieron utilizando el ingrediente activo glifosato. Sin embargo, en el medio ambiente los organismos están expuestos a la mezcla comercial, por lo que es relevante conocer si este herbicida cuando está presente en la mezcla comercial, tiene el mismo efecto que cuando se encuentra sólo. Por ello, en trabajos posteriores se podrían considerar protocolos de exposición con la mezcla comercial y/o alguno de sus otros ingredientes, por ejemplo POEA (alquilamina de polioxietileno). El cual, en estudios *in vitro*, ha mostrado ser más tóxico que el ingrediente activo glifosato (Benachour y Séralini 2009).

Finalmente, es importante resaltar que la información sobre los efectos neurotóxicos del glifosato es escasa, por lo que el efecto de éste sobre otras características como sexo, edad, tiempo de exposición, dosis, vía de administración y modelo animal deben considerarse en futuros protocolos de investigación. Lo cual es relevante, para conocer el impacto del glifosato sobre el sistema nervioso de mamíferos y redefinir los posibles riesgos a la salud. Así en un futuro participar en la toma de decisiones en cuanto a su utilización y distribución comercial como herbicida.

13. REFERENCIAS

- Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (2009) USEPA Disponible en: <http://www.epa.gov/NCEA/iris/subst/0057.htm#carc>. Revisado en Junio 2009.
- Allin R, Russell V, Lamm M, Taljaard J (1989) Regional distribution of dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens of the rat. *Brain Res* 501: 389-391.
- Amerio P, Motta A, Toto P, Pour SM, Pajand R, Feliciani C, Tulli A (2004) Skin toxicity from glyphosate-surfactant formulation. *J Toxicol Clin Toxicol* 42: 317-319.
- Anadon A, de Pino J, Aranzazu M, Caballero V, Ares I, Nieto I, Martínez-Larrañaga MR (2008) Neurotoxicological effects of the herbicide glyphosate. *Abstracts/ Toxicol Letters* 1805: S32-S246.
- Araki T, Yamano M, Murakami T, Wanaka A, Betz W, Tohyama M (1988) Localization of glycine receptors in the rat central nervous system: an immunocytochemical analysis using monoclonal antibody. *Neuroscience* 25: 613-624.
- Astiz M, de Alaniz MJ, Marra CA (2009) Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 2025-32.
- Bababunmi EA, Olorunsogo OO, Bassir O (1979) The uncoupling effect of N-(phosphonomethyl) glycine on isolated rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol* 28: 925-927.
- Baldo BA, Sadeghian K, Basso AM, Kelley AE (2002) Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. *Behav Brain Res* 137: 165-77.
- Barbosa E, Leiros da Costa M, Bacheschi L, Scaff M, Leite CC (2001) Parkinsonism after glycine-derivate exposure. *Mov Disord* 16: 565-568.
- Bardo MT, Bevins RA (2000) Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology* 153: 31-43.
- Bardullas U, Giordano M, Rodríguez VM (2011) Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal

- dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicol Teratol* 33: 263-72.
- Bardullas U, Giordano M, Rodríguez VM (2013) Atrazine is primarily responsible for the toxicity of long-term exposure to a combination of atrazine and inorganic arsenic in the nigrostriatal system of the albino rat. *Neurotoxicol Teratol* 40: 59-66.
- Battaglin W, Kolpin D, Scribner E, Kuivila K, Sandstrom W (2005) Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, 2002. *JAWRA* 41: 323-332.
- Battaglin W, Rice K, Focazio M, Salmons S, Barry R (2009) The occurrence of glyphosate, atrazine, and other pesticides in vernal pools and adjacent streams in Washington, DC, Maryland, Iowa and Wyoming, 2005-2006. *Environ Monit Assess* 155: 281-307.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63:182-217.
- Benachour N, Séralini GE (2009) Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic and placental cells. *Chem Res Toxicol* 22: 97-105.
- Benedetti A, Vituri C, Gonálves A, Custódio MA, Alvarez-Silva M (2004) The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide glyphosate-Biocarb. *Toxicol Lett* 153: 227-232.
- Betarbet R, Sherer T, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov A, Greenamyre T (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3: 1301-1306.
- Bortolozzi A, Duffard R, de Duffard AM (2003) Asymmetrical development of the monoamine systems in 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid treated rats. *Neurotoxicology* 24: 149-57.
- Bortolozzi A, Duffard R, Antonelli M, Evangelista de Duffard AM (2002) Increased sensitivity in dopamine D(2)-like brain receptors from 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)-exposed and amphetamine-challenged rats. *Ann N Y Acad Sci* 965: 314-23.
- Brewster D, Warren J, Hopkins W (1991) Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose. *Fundam Appl Toxicol* 17: 43-51.

- Brock JW, Farooqui S, Ross K, Prasad C (1992) Localization of dopamine D2 receptor protein in rat brain using polyclonal antibody. *Brain Res* 578: 244-250.
- Brooks A, Chadwick C, Gelbard A, Cory-Slechta D, Federoff H (1999) Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res* 823: 1-10.
- Brown T, Rumsby P, Capleton A, Rushton L, Levy L (2006) Pesticides and Parkinson's disease-Is there a link? *Environ Health Perspect* 114: 156-164.
- Canales JJ, Graybiel AM (2000) A measure of striatal function predicts motor stereotypy. *Nat Neurosci* 3: 377-383.
- Cattani D, de Liz Oliveira Cavalli VL, Heinz Rieg CE, Domingues JT, Dal-Cim T, Tasca CI, Mena Barreto Silva FR, Zamoner S (2014) Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology* 320: 34-45.
- Chanyachukul T, Yoovathaworn K, Thongsaard W, Chongthammakun S, Navasumrit P, Satayavivad J (2004) Attenuation of paraquat-induced motor behavior and neurochemical disturbances by L-valine in vivo. *Toxicol Lett* 150: 259-269.
- Chinta S, Andersen J (2005) Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 942-946.
- Coban A, Filipov M (2007) Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. *J Neurochem* 100: 1177-1187.
- Costa L (2008) Toxic effects of pesticides. En: *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Klaassen DC (ed). Mc Graw Hill. 7^o ed. USA. 883-930 pp.
- Dallegrave E, Mantese FD, Coelho RS, Pereira JD, Dalsenter PR, Langeloh A (2003) The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. *Toxicol Lett* 142: 45-52.
- Dallegrave E, Mantese FD, Oliveira R, Andrade A, Dalsenter PR, Langeloh A (2007) Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol* 81: 665-673.
- Daruich J, Zirulnik F, Gímenez MS (2001) Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ Res* 85: 226-231.

- Defagot MC, Malchiodi EL, Villar M, Antonelli MC (1997) Distribution of D4 dopamine receptor in rat brain with sequence-specific antibodies. *Brain Res Mol Brain Res* 45: 1-12.
- Duke S (1990) Overview of herbicide mechanisms of action. *Environ Health Perspect* 87: 263-271.
- Duke SO, Powles SB (2008) Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci* 64: 319-325.
- Dumartin B, Doudnikoff E, Gonon F, Bloch B (2007) Differences in ultrastructural localization of dopaminergic D1 receptors between dorsal striatum and nucleus accumbens in the rat. *Neurosci Lett* 419: 273-277.
- Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, Von Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem* 91: 1025-43.
- Dutheil F, Beaune P, Lorient MA (2008) Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie* 90: 426-436.
- EI-Shenawy N (2009) Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol* 28: 379-385.
- Elsworth JD, Deutch AY, Redmond DE, Sladek JR, Roth RH (1990) MPTP-induced Parkinsonism: relative changes in dopamine concentration in subregions of substantia nigra, ventral tegmental area and retrorubral field of symptomatic and asymptomatic vervet monkeys. *Brain Res* 513: 320-324.
- Eisener-Dorman A, Grabowski-Boase L, Tarantino LM (2011) Cocaine locomotor activation, sensitization and place preference in six inbred strains of mice. *Behav Brain Funct* 7: 1-11.
- Franco R, Li S, Rodríguez-Rocha H, Burns M, Panayiotidis M (2010) Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chem Biol Interact* 188: 289-300.
- Gerfen C (2004) Basal Ganglia. In: Paxinos G, editor. *In the rat nervous system*. San Diego, Cal, USA: Elsevier Academic Press. 455-508 pp.
- González – Farías F, Cisneros Estrada X, Funes Ruiz C, Díaz González G, Botello A (2002) Pesticides distribution in sediments of a tropical coastal lagoon adjacent to an irrigation district in northwest Mexico. *Environ Technol* 23: 1247-1256.

- Hatcher J, Pennell K y Miller G (2008) Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends Pharmacol Sci* 29: 322-329.
- Hedberg D, Wallin M (2010) Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. *Toxicol In Vitro* 24: 795-802.
- Hess EJ, Norman AB, Creese I (1988) Chronic treatment with dopamine receptor antagonists: Behavioral and pharmacologic effects on D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurosci* 8: 2361-2370.
- Heidbreder C, Gardner E, Xi Z, Thanos PK, Mugnaini M, Hagan J, Ashby CR Jr (2005) The role of central dopamine D3 receptors in drug addiction: a review of pharmacological evidence. *Brain Res Brain Res Rev* 49: 77-105.
- Hoffman B, Hansson S, Mezey E, Palkovits M (1998) Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system. *Front Neuroendocrinol* 19: 187-231.
- Hoffman G, Le W, Sita L (2008) The importance of titrating antibodies for immunocytochemical methods. *Curr Protoc Neurosci*. 45: 1.12.1-1.12.26.
- Hsiao CT, Lin LJ, Hsiao KY, Chou MH, Hsiao SH (2008) Acute pancreatitis caused by severe glyphosate-surfactant oral intoxication. *Am J Emerg Med* 26: 384.e3-5.
- Humphries MD, Prescott T (2010) The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy and reward. *Prog Neurobiol* 90: 385-417.
- Hung HC, Lee EH (1998) MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Radic Biol Med* 24: 76-84.
- Kamel F y Hoppin J (2004) Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environ Health Perspect* 112: 950-958.
- Kandel R, Schwartz J, Jessell T (2001) *Principios de Neurociencia*. 4ed. Mc Graw-Hill. USA. 1400 pp.
- Kang MJ, Gil SJ, Koh CH (2009) Paraquat induces alternation of the dopamine catabolic pathways and glutathione levels in the substantia nigra of mice. *Toxicol Lett* 188: 148-152.

- Khan ZU, Gutiérrez A, Martin R, Peñafiel A, Rivera A, de la calle A (2000) Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience* 100: 689-699.
- KjaerJ, Olsen P, Ullum M, Grant R (2005) Leaching of glyphosate and aminomethylphosphonic acid from Danish agricultural field sites. *J Environ Qual* 34: 608-620.
- Kuhar M, Minneman K Christopher Muly E (2006) Catecholamines. En: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Siegel G, Wayne R, Brady S, Price D (eds). 7ed. American Press. Canada. 211-225 pp.
- Kumer S, Vrana K (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67: 443-462.
- Kuter K, Smialowska M, Wieronska J, Zieba B, Wardas J, Pietraszek M, Nowak P, Biedka I, Roczniak W, Konieczny J, Wolfarth S, Ossowska K (2007) Toxic influence of subchronic paraquat administration on dopaminergic neurons in rats. *Brain Res* 1155: 196-207.
- Leyva Morales JB, García de la Parra LM, Bastidas Bastidas PJ, Astorga Rodríguez JE, Bejarano Trujillo J, Cruz Hernández A, Martínez Rodríguez IE, Betancourt Lozano M (2014) Uso de plaguicidas en un valle agrícola tecnificado en el noroeste de México. *Rev Int Contam Ambient* 30: 247-261.
- Levant B (2007) Characterization of dopamine receptors. *Curr Protoc Pharmacol*. 36: 1.6.1-1.6.15.
- Lin Z, Dodd CA, Filipov NM (2013) Short-term atrazine exposure causes behavioral deficits and disrupt monoaminergic systems in male C57BL/6 mice. *Neurotoxicol Teratol* 39: 26-35.
- Lindvall O, Björklund A (1978) Anatomy of the dopaminergic neuron systems in the brain rat. *Adv in Biochem Psychopharmacol* 19:1-23.
- Ma YY, Cepeda C, Chatta P, Franklin L, Evans CJ, Levine MS (2012) Regional and cell-type-specific effects of DAMGO on striatal D1 and D2 dopamine receptor-expressing medium-sized spiny neurons. *ASN Neuro* 4: 59-70.
- Malhotra R, Ghia D, Cordato D, Beran R (2010) Glyphosate-surfactant herbicide-induced reversible encephalopathy. *J Clin Neurosci* 17: 1472-1473.
- McCormack A, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault, Langston JW, Cory-Slechta D, Di Monte D (2002) Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis* 10: 119-127.

- McLaughlin LA, Dickmann LJ, Wolf CR, Henderson CJ (2008) Functional expression and comparative characterization of nine murine cytochromes P450 by Fluorescent inhibition screening. *Drug Metab Dispos* 36: 1322-1331.
- Menkes DB, Temple WA, Edwards I (1991) Intentional self-poisoning with glyphosate-containing herbicides. *Hum Exp Toxicol* 10: 103-7.
- Michel A, Tambour S, Tirelli E (2003) The magnitude and the extinction duration of the cocaine-induced conditioned locomotion-activated response are related to the number of cocaine injections paired with the testing context in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 145: 113-123.
- Missale C, Nash R, Robinson SW, Jaber M, Caron M (1998) Dopamine receptors: From structure to function. *Physiol Rev* 78: 189-225.
- Moon J, Chun B (2010) Predicting acute complicated glyphosate intoxication in the emergency department. *Clin Toxicol* 48: 718-724.
- Mubarak Hossain M Suzuki T, Sato N, Sato I, Takewaki T, Suzuki K, Tachikawa E, Kobayashi H (2006) Differential effects of pyrethroid insecticides on extracellular dopamine in the striatum of freely moving rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 217: 25-34.
- Newell D, Barth A, Ricciardi T, Malouf A (1997) Glycine causes increased excitability and neurotoxicity by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Exp Neurol* 145: 235-244.
- Olorunsogo O (1982 a) Defective nicotinamide nucleotide transhydrogenase reaction in hepatic mitochondria of N-(phosphonomethyl)-glycine treated rats. *Biochem Pharmacol*. 31: 2191-2.
- Olorunsogo OO (1982 b) Inhibition of energy-dependent transhydrogenase reaction by N-phosphonomethyl glycine in isolated rat liver mitochondria. *Toxicol Lett* 10: 91-95.
- Olorunsogo OO (1990) Modification of the transport of protons and Ca²⁺ ions across mitochondrial coupling membrane by N-(phosphonomethyl) glycine. *Toxicology* 61: 205-209.
- Organización Mundial de la Salud (2004) Glyphosate and AMPA in Drinking-Water. Disponible en: <http://www.who.int>
- Pan Y, Berman Y, Haberny S, Meller E, Carr K (2006) Synthesis, protein levels, activity, and phosphorylation state of tyrosine hydroxylase in

- mesoaccumbens and nigrostriatal dopamine pathways of chronically food-restricted rats. *Brain Res.* 1122: 135-142.
- Panguluri SK, Kuwabara N, Kang Y, Cooper N, Lundy R (2012) Conditioned taste aversion dependent regulation of amygdala gene expression. *Physiol Behav* 105: 996-1006.
- Paxinos G, Watson C (2005) *The brain rat in stereotaxic coordinates.* 5th ed. San Diego, Cal. USA; Elsevier Academic Press.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The brain rat in stereotaxic coordinates.* 6th ed. Burlington, MA. USA; Elsevier Academic Press.
- Peixoto F (2005) Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61: 1115-1122.
- Plan de manejo ambiental: erradicación de cultivos ilícitos. 2000. Disponible en: www.dne.gov.co/recursos_user/documentos/Doc.../glifosato.pdf. Revisado en Junio 2010.
- Portillo W, Paredes R (2009) Conditioned place preference induced by morphine in non-copulating male rats. *Behav Brain Res* 203: 308-311.
- Presti M, Mikes HM, Lewis MH (2003) Selective blockade of spontaneous motor stereotypy via intrastriatal pharmacological manipulation. *Pharmacol Biochem Behav* 74: 833-839.
- Priyadarshi A, Khuder S, Schaub E, Priyadarshi S (2001) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res* 86: 122-127.
- Ritz B, Yu F (2000) Parkinson's disease mortality and pesticide exposure in California 1984-1994. *Int J Epidemiol* 29: 323-329.
- Roberts D, Buckley N, Mohamed F, Eddleston M, Goldstein D, Mehrsheikh A, Bleeke M, Dawson A (2010) A prospective observational study of the clinical toxicology of glyphosate-containing herbicides in adults with acute self-poisoning. *Clin Toxicol* 48: 129-136.
- Rodríguez VM, Limón-Pacheco J, Mendoza-Trejo MS, González-Gallardo A, Hernández-Plata I, Giordano M (2013) Repeated exposure to the herbicide atrazine alters locomotor activity and the nigrostriatal dopaminergic system of the albino rat. *Neurotoxicology* 34: 82-94.
- Sato C, Kamijo Y, Yoshinura K, Ide T (2011) Aseptic meningitis in association with glyphosate-surfactant herbicide poisoning. *Clin Toxicol* 49: 118-120.

- Schulze GE, Dougherty J (1988) Neurobehavioral toxicity and tolerance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-n-butyl ester (2,4-D Ester). *Fundam Appl Toxicol* 10: 413-424.
- Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT (2003) Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol* 179: 9-16.
- Hassel B, Dingledine R (2006) Glutamate. En: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Siegel G, Wayne R, Brady S, Price D (eds). 7ed. American Press. Canada. 267-290 pp.
- Slager R, Simpson S, Levan T, Poole J, Sandler D, Hoppin JA (2010) Rhinitis associated with pesticide use among private pesticide applicators in the agricultural health study. *J Toxicol Environ Health A* 73: 1382-1393.
- Smith Y, Villaba R (2008) Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Mov Disord* 23: Suppl 3: S534-S547.
- Surmeier J, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30: 228-235.
- Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA (2000) The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci* 20: 9207-9214.
- Tzschentke TM (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol* 12: 227-462.
- Wang G, Fan XN, Tan YY, Cheng Q, Chen SD (2011) Parkinsonism after chronic occupational exposure to glyphosate. *Parkinsonism Relat Disord* 17: 486-487.
- Webster RA (2001) Dopamine. En: *Neurotransmitters, drugs and brain function*. Webster R (eds). Wiley & Sons Ltd. USA. 137-161 pp.
- Weng S, Hung D, Hu S, Tsan Y, Wang L (2008) Rhabdomyolysis from an intramuscular injection of glyphosate-surfactant herbicide. *Clin Toxicol* 46: 890-891.

Williams G, Kroes R, Munro IC (2000) Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 31: 117-165.

Winterbourn C (1981) Production of hydroxyl radicals from paraquat radicals and H₂O₂. *FEBS Lett* 128: 339-342.

Young K, Gobrogge KL, Wang Z (2011) The role of mesocorticolimbic dopamine in regulating interactions between drugs of abuse and social behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 498-515.

APÉNDICE

Los siguientes tres experimentos fueron realizados con el fin de conocer si el glifosato causaba malestar general a los animales. Primero, se evaluaron los efectos del pH sobre la actividad locomotora (A). Esto debido a que la solución que contiene glifosato tiene pH ácido. En segundo lugar se evaluó si los animales expuestos al glifosato desarrollaban condicionamiento de aversión al sabor (B) y condicionamiento de preferencia de lugar (C). En resumen se encontró que el pH ácido no causa cambios en la actividad locomotora y que los animales expuestos al herbicida no muestran aversión al sabor o cambian su lugar preferido. Estos resultados indican que el tratamiento con Glif no produce malestar visceral en los animales y que la hipoactividad causada por la administración de éste no es causada por la propiedad ácida del compuesto.

Experimento A: Efectos del glifosato y del pH sobre la actividad locomotora

El glifosato es un compuesto que tiene la propiedad química de ser un ácido. Por tal motivo, el siguiente experimento se realizó con la finalidad de conocer si ésta propiedad causaba cambios en la actividad locomotora.

Materiales y Métodos

Utilizando solución salina como vehículo se prepararon seis soluciones: solución salina ajustada a pH 7 (n = 9), 150 mg glicina/kg ajustada a pH 7 (n = 7), glifosato 150 mg/kg ajustado a pH 7 (n = 7), salina ajustada a pH 2 con ácido fosfórico (n = 6), 150 mg glicina/kg ajustada a pH 2 (n = 5), glifosato 150 mg/kg sin ajustar el pH (n = 6), esta solución tiene pH 2. Al igual que en el protocolo del experimento 1 (Figura 5), cada animal recibió durante 2 semanas 6 inyecciones por vía i.p (tres inyecciones por semana) de alguna de las soluciones antes mencionadas y una

administración de solución salina en el día 2 post-tratamiento. La actividad locomotora fue registrada 15 min antes y 3 h inmediatamente después de cada administración. Las soluciones fueron preparadas diariamente. El pH 7 fue ajustado con hidróxido de sodio, mientras que el pH 2 de glicina fue ajustado con ácido clorhídrico y el pH 2 de la solución salina con ácido fosfórico.

Resultados

La actividad locomotora 15 minutos previos a cada administración

La actividad exploratoria de los animales, previa a recibir la inyección 1, fue similar entre los grupos experimentales. Sin embargo, la actividad exploratoria disminuyó a partir de que los animales recibieron la segunda administración de glicina pH 2 o de 150 mg Glif/kg pH 2 (Figura 1 del apéndice). Esta hipoactividad se observó a lo largo del tratamiento, principalmente en la distancia total de los animales tratados con 150 mg Glif/kg pH 2 y en la actividad vertical y en las cuentas estereotipadas en los animales que recibieron glicina pH 2 (Figura 1. A, B y C del apéndice). En las tres variables analizadas hubo efecto de tratamiento ($F'_{s(5,34)} = 5.11 - 6.95$, $p < 0.05$), número de inyección ($F_{(6, 204)} = 6.85 - 52.17$, $p < 0.0001$) e interacción (tratamiento x número de inyección) ($F_{(30, 204)} = 2.43 - 3.16$, $p < 0.05$). En las tres variables, el análisis pos hoc mostró disminuciones estadísticamente significativas a partir de que los animales recibieron la segunda administración de Glicina pH 2 o de 150 mg Glif/kg pH 2. Cabe destacar que el grupo que recibió solución salina pH 2 no fue diferente del grupo de solución salina pH 7. Los resultados estadísticos para cada administración de las tres variables analizadas se muestran en la Tabla 1 del apéndice.

La solución salina pH 2 no disminuye la actividad locomotora inmediatamente después de cada administración

La distancia total, la actividad vertical y las cuentas estereotipadas disminuyeron inmediatamente después de la administración de Glicina pH 2 o de 150 mg Glif/kg

pH 2 (Figuras 1. a, b y c del apéndice). Mientras que los animales que recibieron Glicina pH 7 mostraron hiperactividad. En general, hay que destacar que los animales que recibieron solución salina pH 2 no fueron diferentes a los que recibieron solución salina pH 7.

Es importante mencionar que la reducción en la distancia total, en la actividad vertical y en las cuentas esterotipadas fue observada incluso cuando los animales tratados con glicina pH 2 recibieron solución salina en el día 2 post-tratamiento. La distancia total, la actividad vertical y las cuentas estereotipadas mostraron efecto de tratamiento, ($F_{(5, 34)} = 12.15 - 21.97, p < 0.0001$). Mientras que la distancia total y las cuentas estereotipas solo mostraron efecto del número de inyección ($F_{(6, 204)} = 2.4 - 4.25, p < 0.05$) e interacción (tratamiento x número de inyección) ($F_{(30, 204)} = 1.4 - 2.2, p < 0.05$).

El análisis pos hoc mostró que en la mayoría de las inyecciones con Glicina pH 2 o con 150 mg Glif/kg pH 2 disminuye significativamente la actividad locomotora de los animales cuando se compara con el grupo de solución salina pH 2 y/o pH 7. Mientras que en algunas ocasiones la inyección con Glicina pH7 causa hiperactividad en los animales con respecto a los que reciben solución salina pH 2 y/o pH 7. Los resultados estadísticos para cada inyección de las tres variables analizadas se muestran en la Tabla 2 del apéndice.

En resumen, los animales que recibieron solución salina pH 2 o solución salina pH 7 tienen un comportamiento similar. Lo cual indica que el pH ácido por sí mismo no causa hipoactividad en los animales. Sin embargo, los animales que recibieron 150 mg Glif/kg pH 2 fueron hipoactivos pero no los que recibieron 150 mg Glif/kg pH 7. Lo que indica que posiblemente exista una interacción entre la estructura química del glifosato y el grado de acidez del medio, generando hipoactividad en los animales. En este experimento también se mostró que al igual el glifosato ajustado a pH = 2, la glicina a un pH ácido también genera hipoactividad en los animales. Este hallazgo sugiere que dentro de la molécula de glifosato, la glicina podría jugar un papel importante para generar la hipoactividad del compuesto. Cabe recordar que la estructura química del glifosato es glicina y la unión del ácido fosfónico (Figura 4).

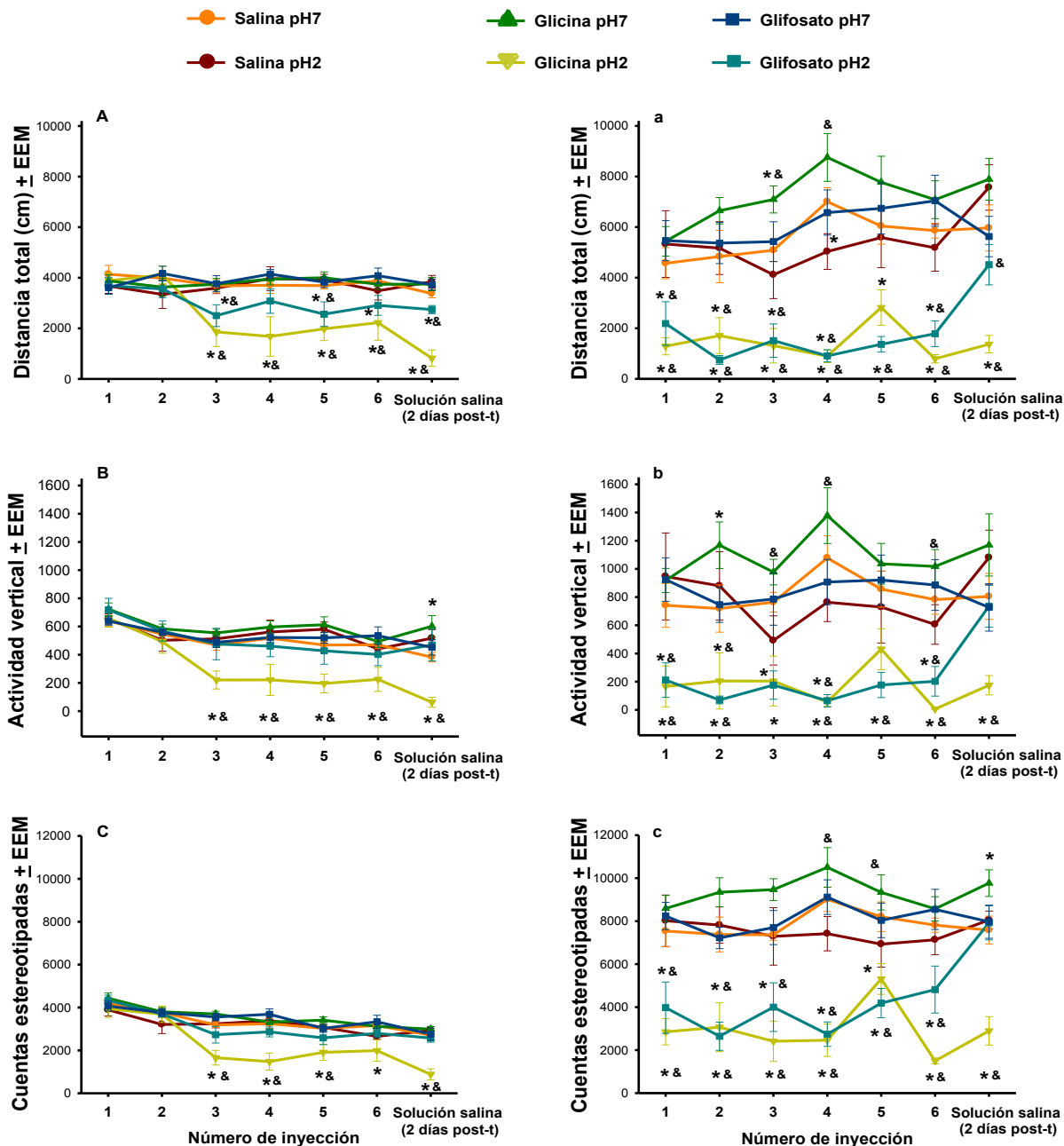


Figura 1. Actividad locomotora registrada 15 min (A, B y C) antes y durante 3 h (a, b y c) inmediatamente después de la administración i.p. de solución salina (Vehículo, pH 2 y pH 7), glicina (pH 2 y pH 7) y 150 mg Glif/kg (pH 2 y pH 7). El tratamiento fue de 3 administraciones/semana durante 2 semanas y una administración de solución salina 2 días post-tratamiento (n= 5 - 9). a, b y c representan la suma promedio de las 3 h de registro. (*) Indica diferencias estadísticas con respecto al grupo de solución salina pH 7. (&) Indica diferencias estadísticas con respecto al grupo de solución salina pH 2, en ambos casos p< 0.05.

Experimento B: Condicionamiento de aversión al sabor

La alimentación es una actividad importante para los animales porque les permite adquirir nutrientes para sobrevivir y reproducirse. De manera que el aprendizaje juega un papel importante en la conducta de alimentación, principalmente en el establecimiento de preferencias y de aversiones a los alimentos (Panguluri y cols., 2012). Esto es, cuando un animal se alimenta, asocia las señales o características de la comida (por ejemplo el sabor) con las señales viscerales post-ingestivas (nausea, enfermedad y vómito, entre otros). Bajo este contexto, la característica del sabor se convierte en una señal de aversión. Esta forma de memoria al sabor es llamada condicionamiento de aversión al sabor y desalienta el subsecuente consumo de ese o algún sabor similar. Experimentalmente, esta forma de aprendizaje es inducida por la ingesta de un estímulo saborizante y la administración de cloruro de litio (LiCl) (Panguluri y cols., 2012). El cloruro de litio es una sustancia que induce vómito en algunas especies como perros, gatos y hurones. En especies que no vomitan como ratas y ratones, el cloruro de litio produce algunos síntomas relacionados con el malestar visceral. Así, la administración del cloruro de litio induce condicionamiento de aversión al sabor, al ser presentado después del estímulo saborizante (Tenk y cols., 2005).

Materiales y Métodos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (250-300 g) bajo condiciones de bioterio estándar previamente mencionadas. Durante el experimento (7 días), los animales estuvieron privados de agua y permanecieron en sus cajas habituales. Para evaluar la cantidad de agua ingerida por los animales, se midió la ingesta diaria (durante 20 min) usando una probeta graduada, esta medición fue hecha siempre a la misma hora. El consumo de agua de los primeros tres días fue considerado como línea base. En el cuarto día, considerado como día de *adquisición*, las ratas recibieron agua endulzada con

sacarina (0.1%, como estímulo condicionado) y 30 min después se les administró por vía i.p solución salina (n = 6), cloruro de litio (0.4 M, 10 mL/kg de peso, n = 7) o glifosato (150 mg/kg de peso, n = 7) (estímulo no condicionado). En el quinto día, las ratas recibieron agua destilada. En el sexto día, considerado como día de *presentación del estímulo*, las ratas recibieron agua endulzada con sacarina (0.1%) sin la administración de algún compuesto. En el séptimo día, considerado como día de *extinción*, los animales nuevamente recibieron agua endulzada con sacarina (0.1%) (Figura 2 del apéndice). El condicionamiento de aversión al sabor es considerado como la disminución significativa en el consumo de agua endulzada después de la exposición a la sustancia aversiva. El consumo de agua fue analizado con pruebas de t-student para muestras dependientes.

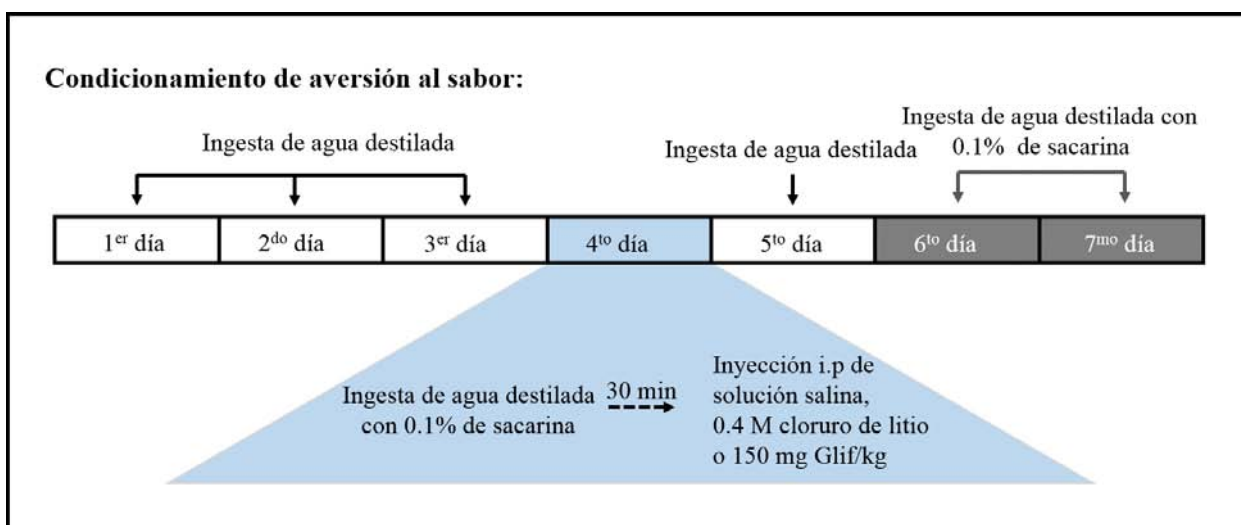


Figura 2. Diseño experimental del condicionamiento de aversión al sabor.

Resultados

La ingesta de agua en el día 4 (día de adquisición) y 6 (presentación del estímulo) no fue estadísticamente diferente entre los animales que recibieron solución salina y aquellos que recibieron glifosato (Figura 3 del apéndice). En contraste, la ingesta de agua disminuyó aproximadamente 50 % y 25 % en el 6to y 7mo día (extinción),

respectivamente, en los animales previamente tratados con cloruro de litio (0.4 M) ($t_{(6)} = 7.362$, $p = 0.0003$; $t_{(6)} = 3.987$ $p = 0.0072$, datos no mostrados). Estos resultados muestran que a diferencia del cloruro de litio, el glifosato no causa condicionamiento de aversión al sabor.

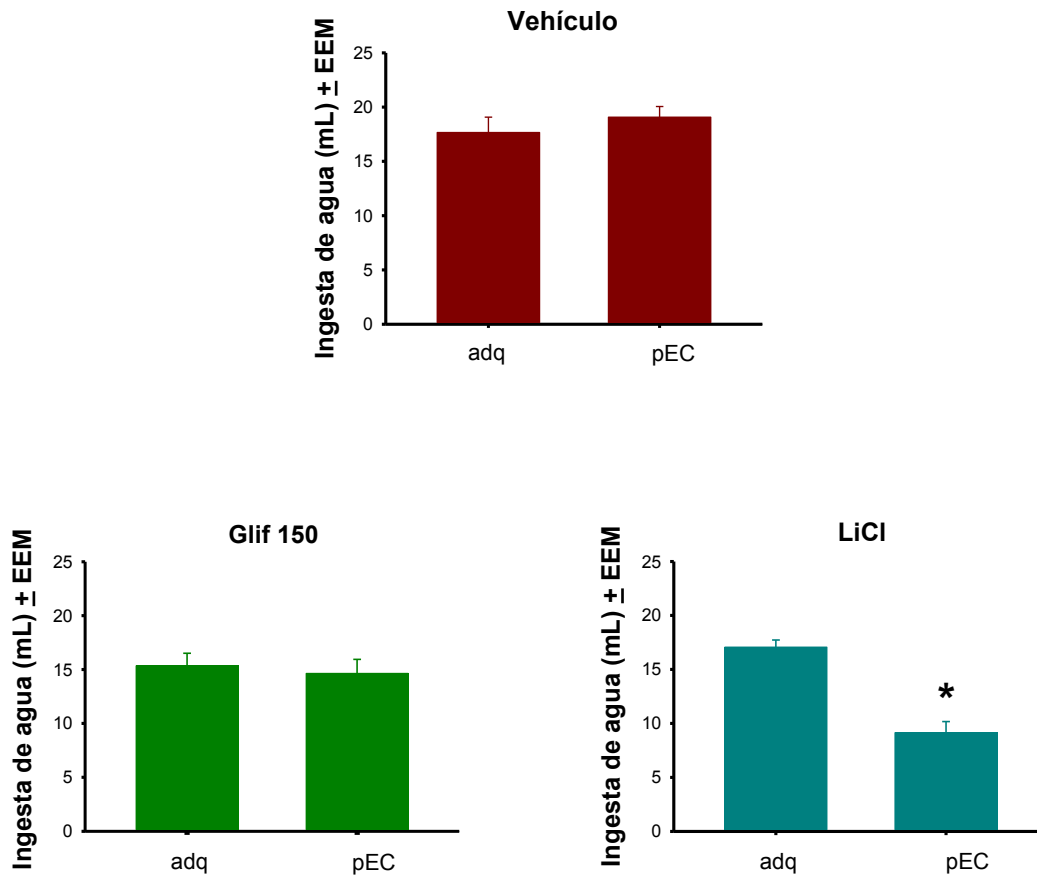


Figura 3. Consumo de agua durante el condicionamiento de aversión al sabor de ratas tratadas con solución salina (vehículo), 0.4 M LiCl ó 150 mg Glif/kg. $n = 6$ ó 7 . (*) Indica diferencias estadísticas con respecto al día de adquisición, $p < 0.05$. adq = día de adquisición (día 4), pEC = presentación del estímulo condicionado (agua con sacarina 0.1%, día 6).

Experimento C: Condicionamiento de preferencia de lugar

El condicionamiento de preferencia de lugar es un método usado para evaluar el estado afectivo y aspectos de recompensa y aversión en modelos animales. Los roedores aprenden a asociar un contexto o entorno específico con los efectos de una droga o estímulo (Eisener-Dorman y cols., 2011). La asociación se logra después de un cierto número de presentaciones entre el contexto y el estímulo, es entonces cuando el contexto adquiere la capacidad de producir una respuesta, la cual es una aproximación de la respuesta que produjo la droga en el animal (Michel y cols., 2003). El paradigma consiste en la modificación de una preferencia inicial del animal después de la exposición alternada a un estímulo control en una caja y otro estímulo de recompensa o aversión en otra caja (Portillo y Paredes 2009). Al final del entrenamiento los animales muestran una preferencia o rechazo por el compartimento asociado con dicho estímulo. En caso de que el estímulo sea una recompensa, los animales invierten más tiempo en ese compartimento, donde ellos son recompensados con drogas, hormonas o reforzadores naturales como agua o comida (Portillo y Paredes 2009). En el caso de que la propiedades motivacionales del tratamiento sean aversivas, el estímulo puede provocar rechazo (Tzschentke, 2007), por lo que los animales invierten menos tiempo en dicho compartimento. Algunos estimulantes como la anfetamina, metanfetamina, cocaína, cafeína y nicotina producen condicionamiento de preferencia de lugar, mientras que otras sustancias como la naloxona (antagonista de los receptores a opiodes) y la imipramina (antidepresivo de la familia de las diabezazepinas, inhibe la recaptura de noradrenalina y serotonina) producen aversión. En contraste, otros fármacos como la escopolamina y el haloperidol no producen cambios cuando se prueban en dicho paradigma (Bardo y Bevins, 2000).

Materiales y Métodos

El sistema de condicionamiento de preferencia de lugar consiste en tres compartimentos de acrílico (Figura 4 del apéndice). El compartimento intermedio (22 x 24 x 32 cm) es de color gris, que comunica a dos compartimentos laterales a través de dos compuertas (10 x 10 cm). Los compartimentos laterales ofrecen distintos estímulos de color y textura. Uno de los compartimentos es de color blanco con el piso de textura rugosa. Mientras que el otro es de color negro con el piso de textura lisa. Las cajas y las pruebas fueron realizadas en un cuarto iluminado con luz blanca.

El experimento tuvo tres fases: prueba *antes del condicionamiento*, seis pruebas de condicionamiento y una prueba *después del condicionamiento* (Figura 5 del apéndice). *En la prueba antes del condicionamiento*, los animales fueron colocados en el compartimento intermedio por 1 min. Después, las puertas corredizas fueron abiertas y los animales tuvieron acceso a los compartimentos laterales por 10 min. El compartimento en el cual los animales permanecieron más tiempo fue considerado como compartimento preferido. Posteriormente, *en cada una de las sesiones de condicionamiento* (una cada tercer día), todas las ratas recibieron 2 inyecciones i.p, la primera fue aplicada al medio día en el compartimento no preferido y la segunda fue aplicada en el compartimento preferido a las 16:00 h. Después de cada inyección, las ratas permanecieron en el compartimento por 30 min. El grupo control recibió solución salina (vehículo, n = 8) en ambas ocasiones. Mientras que el grupo tratado recibió solución salina en la primera y 100 mg Glif/kg de peso en la segunda administración (n = 8). Después de las 6 sesiones de condicionamiento, se realizó la llamada *prueba después del condicionamiento*, en la cual el lugar preferido de los animales fue evaluado como se describe en la *fase de antes del condicionamiento*. Se cuantificó el tiempo que los animales permanecían en cada compartimento. La conducta de los animales fue videograbada usando el programa Ethovision 3.0 (Noldus, Wageningen, Netherlands). El tiempo en el compartimento preferido antes y después del tratamiento fue analizado con pruebas de t-student para muestras dependientes.



Figura 4. Sistema de registro para el condicionamiento de preferencia de lugar.

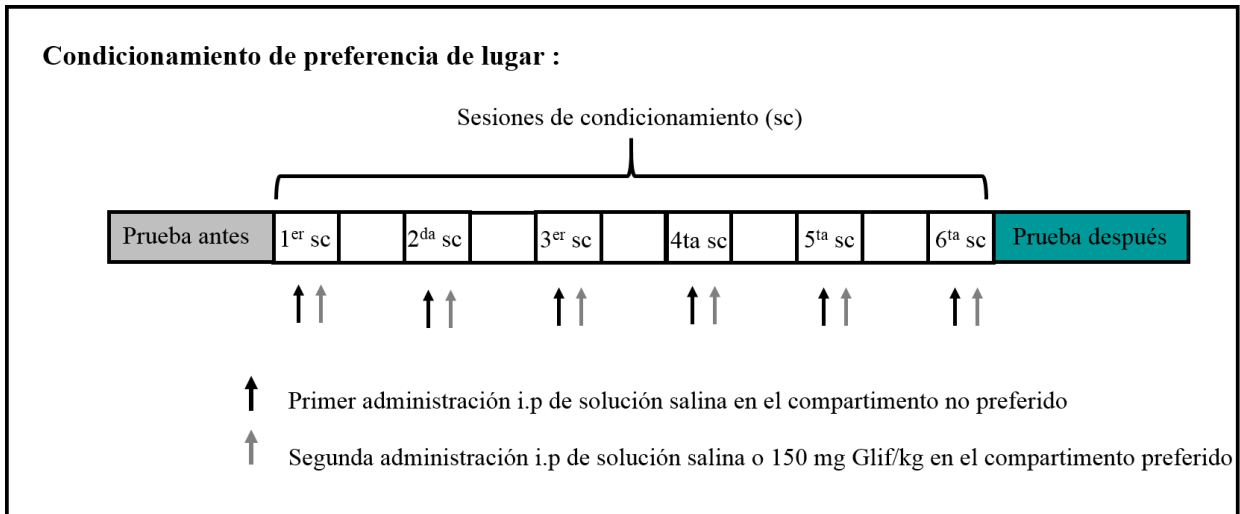


Figura 5. Diseño experimental del condicionamiento de preferencia de lugar.

Resultados

No hubo diferencias estadísticas en el lugar de preferencia antes o después de recibir solución salina o 100 mg Glif/kg (Figura 6 del apéndice).

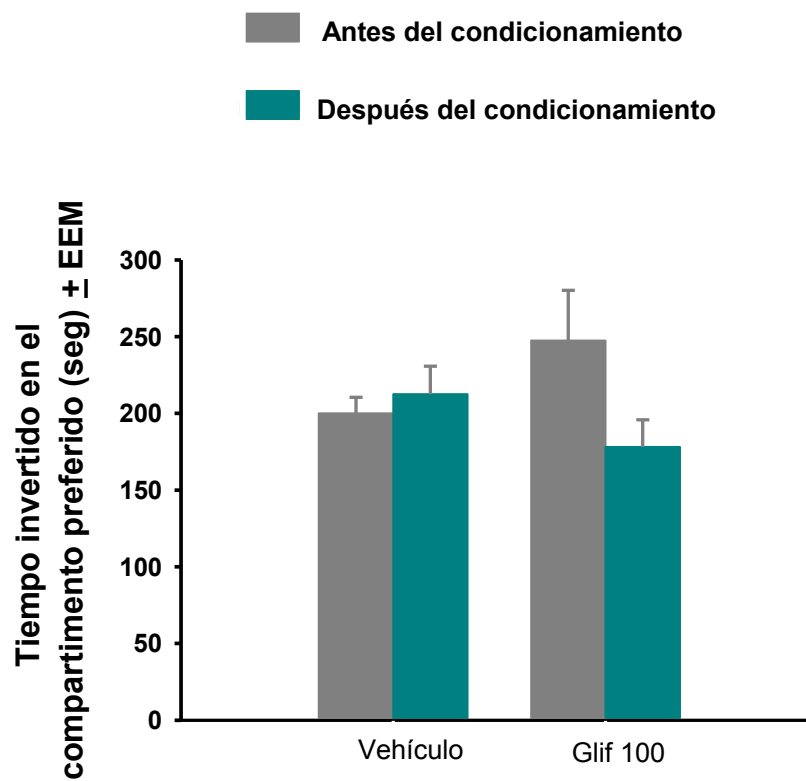


Figura 6. Condicionamiento de preferencia de lugar en ratas expuestas a solución salina o 100 mg Glif/kg por vía intraperitoneal. n = 8.

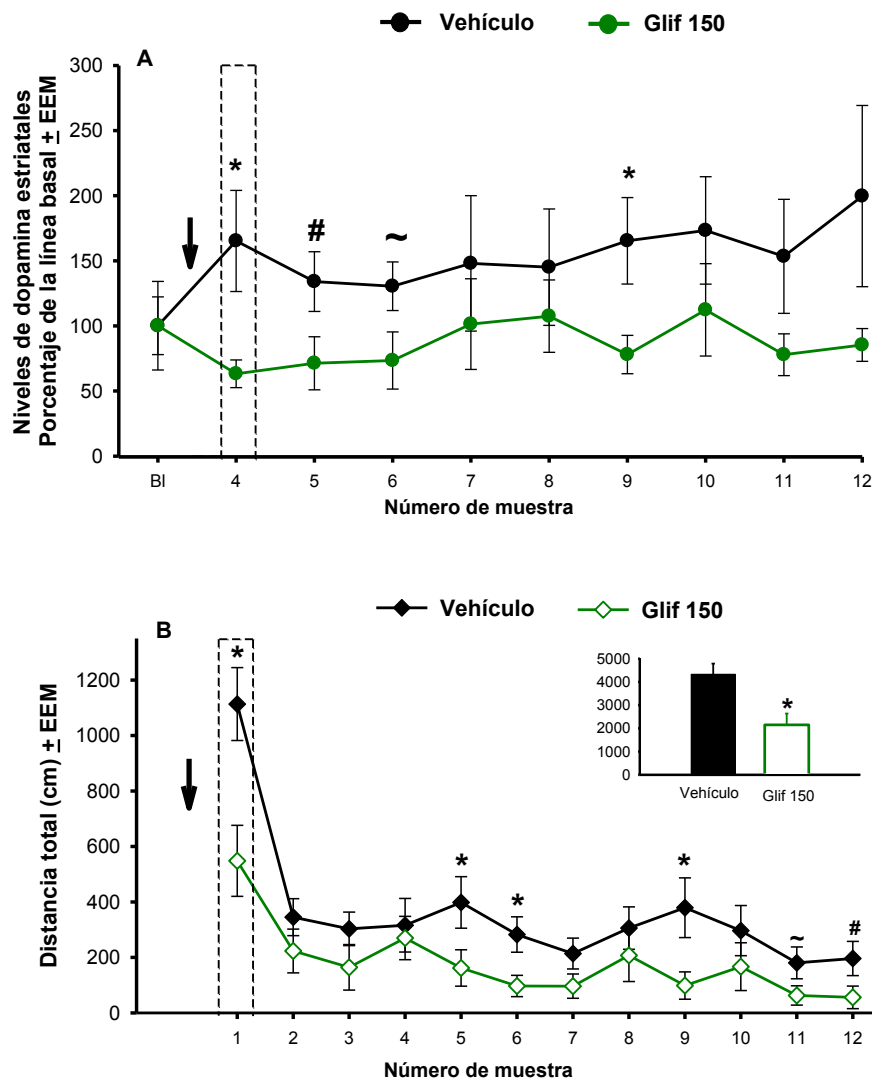


Figura 7. Efectos agudos de glifosato sobre la liberación de DA estriatal en ratas anestesiadas y sobre la actividad locomotora. Niveles extracelulares de DA estriatales (A) obtenidos del experimento de microdiálisis (Figura 14). Solo se representan 12 de las 18 muestras colectadas (cada 20 min); Las primeras 3 muestras son consideradas como línea basal. La distancia total (B) fue registrada inmediatamente después de la primera administración con 150 mg de Glif/kg o solución salina (Vehículo, Figura 8. a). La presente figura muestra el análisis detallado de la distancia total en segmentos de 15 min registrado inmediatamente después de la primera administración (150 mg de Glif/kg ó solución salina), lo cual se indica con la flecha. En B, la gráfica superior derecha muestra la suma de la distancia total en 3 h. La actividad locomotora y los resultados de microdiálisis corresponden a 2 diferentes grupos de animales como se describe en la figura 5. (*) Indica diferencias significativas con respecto al grupo vehículo, $p < 0.05$; (#) $0.05 - 0.07$; (~) < 0.1 .

Sección de tablas

Tabla 1. Valores de F y p para los tratamientos de la actividad locomotora registrada 15 minutos previos a cada administración de solución salina, glicina o glifosato con diferente pH.

Variable	Número de administración						Solución salina	
	1	2	3	4	5	6		
DT	<i>F</i>	0.48	0.85	5.03	4.351	7.8	3.60	21.53
	<i>p</i>	0.8	0.52	0.0015	0.0036	<0.0001	0.01 ^c	<0.0001
AV	<i>F</i>	0.605	0.436	3.5	4.0	6.16	3.316	6.76
	<i>p</i>	0.7	0.82	0.011	0.006	0.0004	0.015	0.0002
CE	<i>F</i>	0.662	0.67	9.31	7.27	5.24	3	11.50
	<i>p</i>	0.65	0.65	<0.0001	0.0001	0.001	0.024	<0.0001

DT = distancia total, AV = actividad vertical y CE = cuentas estereotipadas. En todos los casos $F_{(5,34)}$.

Tabla 2. Valores de F y p para los tratamientos de la actividad locomotora registrada durante 3 h inmediatamente después de la administración de solución salina, glicina o glifosato con diferente pH.

Variable	Número de administración						Solución salina	
	1	2	3	4	5	6		
DT	<i>F</i>	4.59	6.94	10.75	20.45	7.022	13.85	6.65
	<i>p</i>	0.0026	0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0001	<0.0001	0.0002
AV	<i>F</i>	3.92	5.633	5.82	12.03	3.78	8.866	3.34
	<i>p</i>	0.0065	0.0007	0.0005	<0.0001	0.008	<0.0001	0.015
CE	<i>F</i>	7.31	11.21	9.07	19.58	5.46	13.614	9.54
	<i>p</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0009	<0.0001	<0.0001

DT = distancia total, AV = actividad vertical y CE = cuentas estereotipadas. En todos los casos $F_{(5,34)}$.

Tabla 3. Valores de F y p para los tratamientos de la actividad locomotora registrada 15 minutos previos a cada administración con solución salina o con glifosato

Variable	Número de administración						Solución salina	
	1	2	3	4	5	6		
DT	<i>F</i>	0.77	0.78	3.16	2.53	5.44	4.85	5.45
	<i>p</i>	0.52	0.50	0.03	0.06	0.002	0.004 ^c	0.002
AV	<i>F</i>	0.22	1.42	3.09	4.38	5.43	4.09	8.93
	<i>p</i>	0.88	0.24	0.03	0.007	0.002	0.010	<0.0001
CE	<i>F</i>	0.28	0.32	3.4	2.20	2.20	2.23	2.89
	<i>p</i>	0.84	0.81	0.02	0.097	0.096	0.093	0.042

DT = distancia total, AV = actividad vertical y CE = cuentas estereotipadas. En todos los casos $F_{(3,61)}$. En las inyecciones 1-6 los animales recibieron solución salina (vehículo), 50, 100 ó 150 mg Glif/kg.

Tabla 4. Valores de F y p para los tratamientos de la actividad locomotora registrada durante 3 h inmediatamente después de la administración con solución salina o con glifosato.

Variable	Número de administración						Solución salina	
	1	2	3	4	5	6		
DT	<i>F</i>	6	12.50	12.24	9.93	11.93	12.82	2.97
	<i>p</i>	0.0012	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.04
AV	<i>F</i>	5.31	10.87	16.54	9.48	12.41	15.24	4.97
	<i>p</i>	0.002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0038
CE	<i>F</i>	6.97	13.73	13.5	9.08	8.1	9.03	1.36
	<i>p</i>	0.004	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.26

DT = distancia total, AV = actividad vertical y CE = cuentas estereotipadas. En todos los casos $F_{(3,61)}$, excepto en la administración 2 para las tres variables $F_{(3,60)}$. En las administraciones del 1 al 6, los animales recibieron solución salina (vehículo), 50, 100 ó 150 mg Glif/kg.



The herbicide glyphosate causes behavioral changes and alterations in dopaminergic markers in male Sprague-Dawley rat



Isela Hernández-Plata^a, Magda Giordano^a, Mauricio Díaz-Muñoz^b,
Verónica M. Rodríguez^{a,*}

^a Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro, Querétaro 76230, Mexico

^b Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro, Querétaro 76230, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2014

Accepted 5 December 2014

Available online 15 December 2014

Keywords:

Herbicides

Hypoactivity

Tyrosine hydroxylase

Dopamine receptors

ABSTRACT

Glyphosate (Glyph) is the active ingredient of several herbicide formulations. Reports of Glyph exposure in humans and animal models suggest that it may be neurotoxic. To evaluate the effects of Glyph on the nervous system, male Sprague-Dawley rats were given six intraperitoneal injections of 50, 100, or 150 mg Glyph/kg BW over 2 weeks (three injections/week). We assessed dopaminergic markers and their association with locomotor activity. Repeated exposure to Glyph caused hypoactivity immediately after each injection, and it was also apparent 2 days after the last injection in rats exposed to the highest dose. Glyph did not decrease monoamines, tyrosine hydroxylase (TH), or mesencephalic TH+ cells when measured 2 or 16 days after the last Glyph injection. In contrast, Glyph decreased specific binding to D1 dopamine (DA) receptors in the nucleus accumbens (NAcc) when measured 2 days after the last Glyph injection. Microdialysis experiments showed that a systemic injection of 150 mg Glyph/kg BW decreased basal extracellular DA levels and high-potassium-induced DA release in striatum. Glyph did not affect the extracellular concentrations of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid or homovanillic acid. These results indicate that repeated Glyph exposure results in hypoactivity accompanied by decreases in specific binding to D1-DA receptors in the NAcc, and that acute exposure to Glyph has evident effects on striatal DA levels. Additional experiments are necessary in order to unveil the specific targets of Glyph on dopaminergic system, and whether Glyph could be affecting other neurotransmitter systems involved in motor control.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Glyphosate (Glyph) is a phosphonomethyl amino acid derivative used as active ingredient in some herbicides. In recent years, the commercialization of glyphosate herbicides has increased due to development and sowing of glyphosate-resistant seeds, such as corn, soybeans, canola, and cotton (Dill et al., 2008). In plants, glyphosate inhibits the synthesis of aromatic amino acids, a metabolic pathway absent in mammals. Thus, it was considered that glyphosate herbicides were not a risk for the health of mammals including humans (Williams et al., 2000). However, in

recent years, reports of human exposure and animal models suggest that both the commercial mixture containing glyphosate and the active ingredient glyphosate could have neurotoxic effects. Regarding human studies, glyphosate has been detected in brain and cerebrospinal fluid after exposure to commercial mixtures, revealing that the active ingredient can cross the blood brain barrier (Menkes et al., 1991; Sato et al., 2011). In addition, structural MRI studies in a subject exposed to the commercial mixture of glyphosate showed modifications in the T2 signal in substantia nigra, periaqueductal gray and globus pallidus, revealing possible bilateral lesions (Barbosa et al., 2001). Abnormal EEG activity and a Parkinsonian syndrome characterized by limb tremor at rest, global akinesia and rigidity have been observed after occupational exposure and accidental ingestion of the commercial mixture of glyphosate (Barbosa et al., 2001; Malhotra et al., 2010; Wang et al., 2011).

* Corresponding author. Tel.: +52 442 238 1061; fax: +52 442 238 1046.

E-mail addresses: vermire@yahoo.com, vmrodriguez@comunidad.unam.mx (V.M. Rodríguez).

Studies in the rat have shown that oral exposure to the commercial mixture of glyphosate (1%, w/v) during pregnancy was associated with increased enzymatic activity of isocitrate dehydrogenase in the brain of pregnant dams, while the activities of isocitrate dehydrogenase, glucose 6 phosphate dehydrogenase and malate dehydrogenase were found to be increased in fetal brain (gestational day 21) (Darulich et al., 2001). In adult male rats, chronic exposure to 10 mg/kg BW glyphosate (three intraperitoneal [i.p.] injections per week for 5 weeks) was associated with decreased mitochondrial content of cardiolipin in the substantia nigra and cerebral cortex, while the exposure to a combination of glyphosate, dimethoate and zineb was associated with increased mitochondrial levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the same brain areas (Astiz et al., 2009). Recently, it was found that glyphosate causes cell death in the dopaminergic cell line PC12 through apoptotic and autophagic mechanisms (Gui et al., 2012). Taken together, these studies suggest that glyphosate exposure may affect the dopaminergic system of humans and rats, probably by oxidative stress. However, there have been no systematic studies evaluating the effects of the repeated and acute exposure to glyphosate on the dopaminergic systems in an *in vivo* model.

The dopaminergic nigrostriatal and mesolimbic systems are involved in the control of movement and motivated behaviors, and they have been shown to be vulnerable to herbicides such as paraquat and atrazine (ATR) (Thiruchelvam et al., 2000; Rodríguez et al., 2013). For instance, male mice treated with 10 mg/kg paraquat plus 30 mg/kg maneb (i.p. injection, twice per week for 3 weeks) showed reduced motor activity immediately after treatment. On the 5th day after treatment, the tyrosine hydroxylase (TH) levels were reduced in the striatum. Also, TH-positive cells decreased in the substantia nigra pars compacta (SNpc) (Thiruchelvam et al., 2000). Recently, Rodríguez et al. (2013) found that adult male Sprague-Dawley rats exposed to 100 mg ATR/kg BW (three i.p. injections per week for 2 weeks) developed hypoactivity that lasted up to 5 days after each injection. They also found reduced striatal DA, DOPAC and homovanillic acid (HVA) on the 6th day after treatment. In addition, ATR exposure reduced the expression of mRNA for cytosolic thioredoxin in NAcc, and for TH and the dopamine transporter in midbrain, and increased the expression of mRNA for the vesicular monoamine transporter in midbrain. These reports emphasize the vulnerability of the dopaminergic nigrostriatal and mesolimbic systems to herbicide exposure.

Therefore, in the present study, we evaluated the integrity of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic systems by assessing biochemical (monoamine content, TH levels and specific binding to D1 and D2-DA receptors) and histological (mesencephalic TH+ cells) dopaminergic markers and their relationship with spontaneous locomotor activity in male rats that were repeatedly or acutely exposed to Glyph.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Sprague-Dawley rats of 250–300 g were obtained from Harlan Laboratories Inc. (Mexico City, Mexico). They were housed in a room under constant temperature (23 °C), 12-h/12-h inverted light-dark cycle (lights on at 21:00 h) and water and food *ad libitum*. Animals were habituated to the vivarium for at least one week before beginning the experiments. Subjects were cared for and treated according to the Norma Oficial Mexicana (SAGARPA NOM-062-ZOO-1999), which complies with the guidelines in the Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook

(NIH Publication 80-23, Bethesda, MD, USA, 1996), and the protocol was approved by the local Committee on Bioethics.

2.2. Chemicals

Glyphosate and reagents for high performance liquid chromatography were acquired from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), and the reagents for western blot were obtained from BioRad (Hercules, CA, USA). [³H] SCH23390 and [³H] Spiperone were purchased from Perkin-Elmer (Boston, MA, USA).

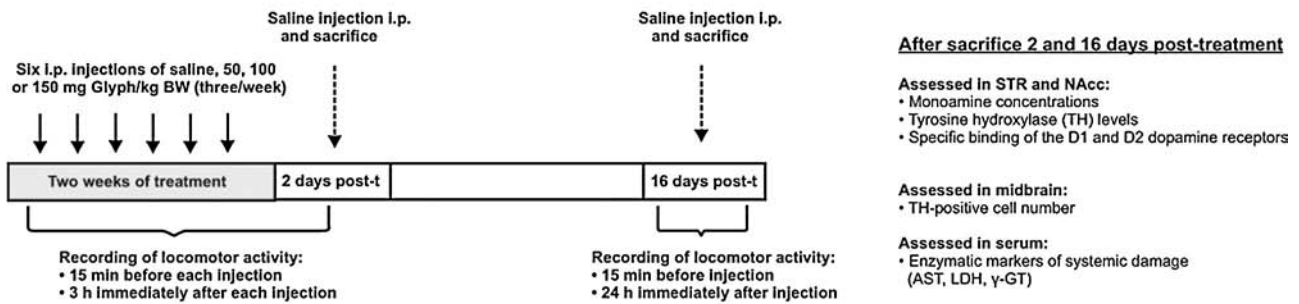
2.3. Experimental design

We chose three doses 50, 100 or 150 mg Glyph/BW based on the lethal dose 50 (LD₅₀) for rats (235 mg Glyph/kg BW, i.p.). Each animal received six injections over 2 weeks (three injections/week) of saline solution (vehicle) or Glyph (Experiment 1, Fig. 1). Locomotor activity was recorded during 15 min before, and for the 3 h immediately after saline or Glyph administration. On the 2nd and 16th day post-treatment, locomotor activity was recorded for 15 min before injection of normal saline solution (0.9% NaCl), and for 3 or 24-h after this injection. After the locomotor activity recording, rats were sacrificed by decapitation, and blood samples collected from trunk and brain regions (striatum – STR and nucleus accumbens – NAcc) were dissected and frozen at –70 °C for later evaluation of monoamine levels (*n* = 10), TH levels (*n* = 10), and specific binding to the dopamine receptors 1 and 2 (D1 and D2) (*n* = 6); the remaining tissue was fixed in 4% paraformaldehyde in order to quantify the number of mesencephalic tyrosine hydroxylase (TH) positive cells (*n* = 5–7). Serum was extracted from blood samples and stored at 4 °C in order to evaluate systemic damage through the enzymatic activity of aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase and gamma-glutamyltransferase. It is important to note that when it was necessary additional groups of rats were included, and treated as indicated in Fig. 1. The size of sample is indicated in each figure legend. Glyphosate doses, administration, and time post-treatment were established considering the requirements of the Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, United States Environmental Protection Agency (OPPTS 870.6200 Neurotoxicity Screening Battery available at the website <http://nepis.epa.gov>).

2.4. Evaluation of the effects of Glyph on DA release in STR and NAcc

We analyzed the acute effects of glyphosate on DA release through simultaneous microdialysis in the STR and NAcc (Experiment 2, Fig. 1). Five to six rats per group were anesthetized with isoflurane (PISA, Guadalajara, Jalisco, Mexico) using an anesthesia system (SBH Scientific Designs Inc., Windsor, ON, Canada). The flowmeter was adjusted to 2 L/min for 1.5–2% (v/v) anesthetic gas. The pressure was maintained at 70 psi, and the body temperature was kept at 37 °C. The animals were placed on a stereotaxic frame (Kopf, Tujunga, CA, USA), and the cranial skin and muscle were removed to identify Bregma. The coordinates for STR were: AP: 1, ML: 2.5, DV: –6, and for NAcc: AP: 1.2, ML: 2.2, DV: –7.6 according to the atlas of Paxinos and Watson (2005). Probes were inserted in trephine holes for STR or NAcc in the right or left hemispheres, in an alternating pattern. Microdialysis probes (CMA/11, CMA/Microdialysis, Solna, Stockholm, Sweden) were 0.38 mm in diameter, 14 mm in length, and had an internal volume of 1 μL. The membrane had a diameter of 0.24 mm and a length of 2 mm for STR or 1 mm for NAcc. After inserting the probes, a Ringer solution (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) was perfused at a flow of 2.5 μL/min. No dialysate was collected during the first hour. Then, we collected 18 samples at 20-min intervals in vials containing 4 μL 0.1 N perchloric acid. The first

Experiment 1: Repeated exposure to Glyph



Experiment 2: Acute exposure to Glyph

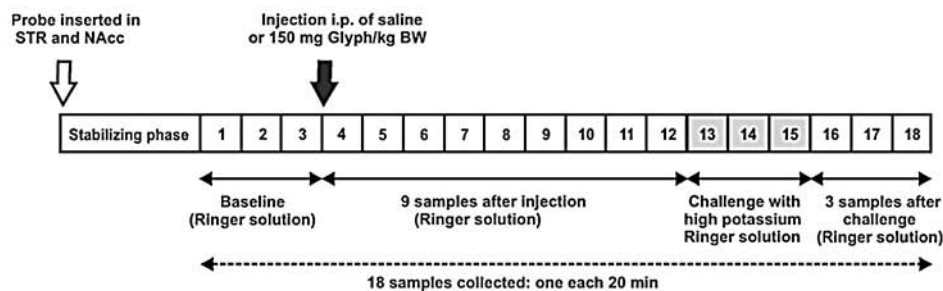


Fig. 1. Experimental design of the repeated and acute exposures to glyphosate (Glyph) in male rats.

three samples were considered as baseline. At the start of the fourth sample, rats received an i.p. injection of saline solution ($n = 6$) or 150 mg Glyph/kg BW ($n = 6$). Nine additional samples were then collected. From the 13th to 15th samples, a high-potassium Ringer solution (91 mM NaCl, 60 mM KCl, 1.2 mM CaCl_2 and 1 mM MgCl_2) was perfused through the probe. The last three samples (from 16th to 18th) were collected with Ringer solution. At the end of the microdialysis, the rats were decapitated, and the brain was removed and stored in 4% paraformaldehyde. Once fixed, the brain was frozen and sectioned in a freezing microtome (Leica SM 2000R, Wetzlar, Hesse, Germany) to verify the probe location in the STR and NAcc. Microdialysis samples were analyzed by high performance chromatography using an electrochemical detector (HPLC-DE, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA).

2.5. Locomotor activity

In order to assess the effects of glyphosate exposure on locomotor activity we used the protocol of Rodríguez et al. (2013). Briefly, this activity was evaluated using an automatic recording system (Digiscan Animal Activity Monitors – Accuscan Inc., Columbus, OH, USA). Animals were placed in acrylic chambers (40 cm × 40 cm × 40 cm) surrounded by horizontal and vertical infrared beams. During the course of the experiment, locomotor activity was recorded for 15 min before (exploratory activity) and for the 3-h period immediately after (spontaneous locomotor activity) the administration of Glyph (50, 100 or 150 mg Glyph/kg BW) or saline solution (vehicle). On the 2nd and 16th day post-Glyph treatment, all animals received a saline solution injection, and locomotor activity was evaluated for 15 min before and for 3-h on the 2nd day post-Glyph or for 24-h on the 16th day post-Glyph.

Food and water were available throughout the 24-h of recording. In the present study, we selected three variables that represent the exploratory and ambulatory movements of the animals: total distance (distance traveled [in cm] by the animal in a given period), vertical activity or rearing (total number of beam interruptions that occurred in the vertical sensor during a given period) and stereotypy counts (number of beam breaks that occurred during repetitive movements such as grooming). The 3-h recording was divided into 15-min segments, and the 24-h recording was divided into 1-h segments.

2.6. Determination of monoamines and their metabolites

We assessed the effects of Glyph exposure on the total content of monoamines in the STR and NAcc following the protocol by Rodríguez et al. (2013). The results were reported for tissue as ng/mg tissue protein and ng/mL for microdialysates.

2.7. Tyrosine hydroxylase levels

TH levels were evaluated by Western blot; briefly, a portion of STR or NAcc was weighed and sonicated individually (1:10) in lysis buffer according to Pan et al. (2006) with slight modifications (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10% glycerol and 1% of protease and phosphatase cocktail inhibitors [Sigma–Aldrich] at pH 7.5). Then, proteins were quantified using the Lowry DC assay (BioRad, Hercules, CA, USA). Each sample (5 μg of protein) was separated by electrophoresis on 12% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes using a semidry blotting apparatus (BioRad, Hercules, CA, USA). The membranes were blocked with 5% Blotto, non-fat dry milk (Santa

Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) in TBS (100 mM Tris Base, 150 mM NaCl). Membranes were then incubated with anti-TH antibody (1:5000, Millipore, Temecula CA, USA) overnight at 4 °C, followed by anti- β -tubulin antibody (12G10, 1:2000, Developmental

Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, IA, USA). Then, we added the anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (1:5000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Finally, detection was performed with ECL-Plus kit (GE,

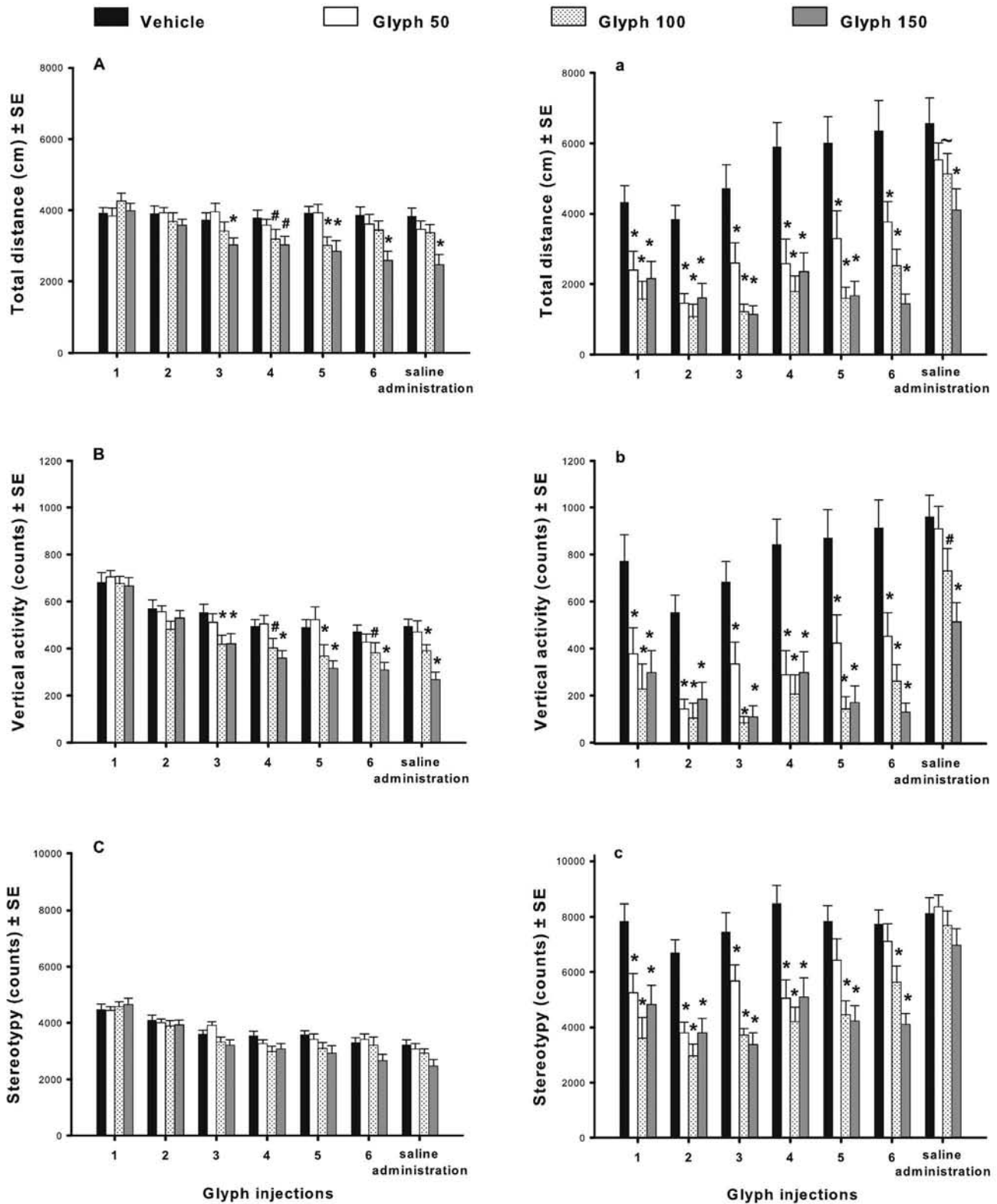


Fig. 2. Locomotor activity recorded for 15 min (A, B and C) before, and for the 3-h period immediately after (a, b and c) the i.p. injection of saline solution (vehicle), 50, 100 or 150 mg Glyph/kg BW. The exposure regime included three injections/week for 2 weeks and one saline injection 2 days after the last Glyph injection ($n = 16-17$). a, b and c represent the average sum of 3 h of recording. *Different from vehicle, $p < 0.05$; # $p = 0.05-0.07$; ~ $p < 0.1$.

Buckinghamshire, UK), and membranes were scanned using a STORM 860 (Amersham, Sunnyvale, CA, USA). Images were analyzed using Image J ver. 5.0 (NIH, Baltimore, MD, USA).

2.8. Binding assay for D1 and D2-DA receptors

Additional groups of rats were treated as shown before (Fig. 1, $n = 6$ per group). In these animals we recorded locomotor activity as described before, and collected tissue for the DA receptors

radioligand assay. After treatment, STR and NAcc were removed from both hemispheres, weighed and stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until they were individually processed according to Levant (2007) with some modifications. STR or NAcc from each animal was homogenized in ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer (1:20 w/v, pH 7.4) containing 1% protease and phosphatase cocktail inhibitors (Sigma-Aldrich). Thereafter, each homogenized sample was divided in half to assess either D1 or D2-DA receptors. All of the samples were centrifuged at $42,000 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min. Then, the supernatant was

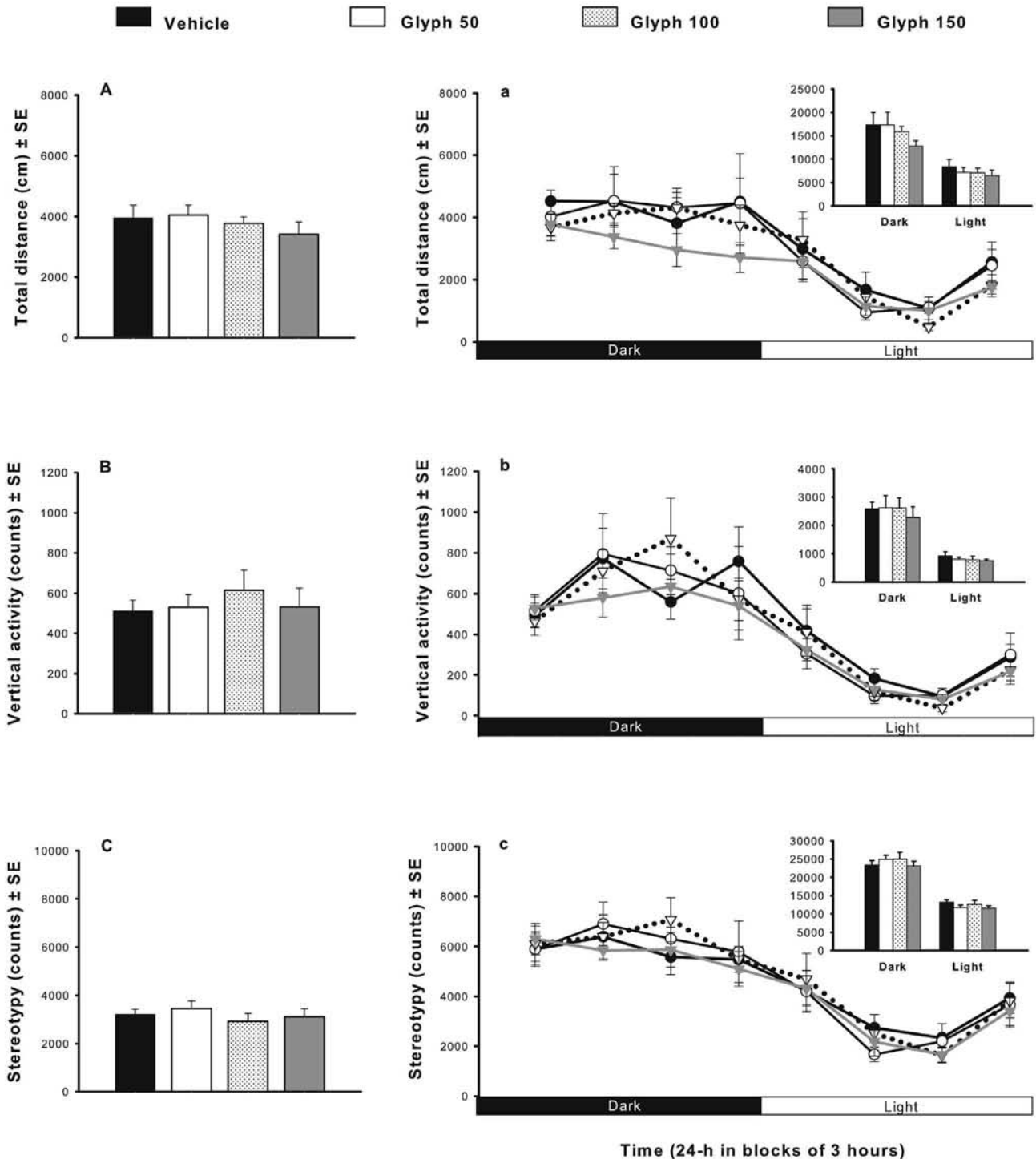


Fig. 3. Locomotor activity recorded 16 days after the last injection of vehicle, 50, 100 or 150 mg Glyph/kg BW. Exploratory activity was recorded 15 min before the i.p. saline injection (A, B and C) and for one 24-h light/dark cycle immediately after the i.p. saline injection (a, b and c). Insets show the average sum for dark and for light phase ($n = 6-7$).

Table 1
Body weight of animals treated with glyphosate.

Group	2 days post-treatment	16 days post-treatment
Vehicle	316 ± 7	377 ± 17
Glyph 50	314 ± 7	374 ± 14
Glyph 100	305 ± 6	365 ± 11
Glyph 150	310 ± 5	376 ± 10

Values are mean (g) ± SE. $n=10$ and $n=6-7$ for 2 and 16 days post-treatment, respectively.

discarded, and the pellet was resuspended using the same buffer and centrifugation conditions. Then, the supernatant was removed, and the pellet was resuspended in ice-cold assay buffer (3 mL/80 mg initial weight of tissue) for SCH23390 (50 mM Tris-HCl, 50 mM Tris base, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4) or for spiperone (50 mM Tris-HCl, 50 mM Tris base, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, pH 7.4) in order to assess D1 or D2-DA receptors, respectively. Finally, each sample was aliquoted and stored at -70 °C. Proteins were quantified by the Lowry DC assay (BioRad, Hercules, CA, USA).

To measure specific binding to D1-DA receptors in STR and NAcc, we used the specific ligand [³H] SCH23390 (82.9 Ci/mmol, PerkinElmer, Kd 0.1–0.5 nM for the striatal and accumbal membrane assay). With each sample we ran two reactions, each in triplicate, to measure total binding and unspecific binding. The assay buffer to measure total binding of SCH23390 included 100 µL of 1.5 nM [³H] SCH23390 for a final concentration of 0.3 nM, and 35 µg of tissue protein per sample. The unspecific binding assay buffer contained 100 µL of 1.5 nM of [³H] SCH23390, 100 µL of 5 µM (+)-butaclamol for a final concentration of 1 µM and 35 µg tissue protein per sample. The final reaction volume was adjusted to 500 µL with assay buffer for SCH23390.

In order to assess binding to the D2-DA receptors in STR and NAcc, we used the specific ligand [³H] spiperone (83.7 Ci/mmol, PerkinElmer, Kd 0.05–0.3 nM for the striatal and accumbal membrane assay). The procedure and preparation of the reactions were similar to that for D1-DA receptors except that we used 8.33 µL of 6 nM [³H] spiperone for a final concentration of 0.1 nM.

All reactions were agitated and incubated for 90 min at room temperature. The reactions were stopped by rapid filtration through Whatman type C glass fiber filters (Whatman, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), and the filters were then washed five times with 3 mL of ice-cold wash buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM Tris base, pH 7.4). Filters were allowed to dry in scintillation vials for 1 h and then incubated overnight in 5 mL of scintillation fluid (13.55 mM 2,5-diphenyloxazole, 25.7% Triton™ X-100, 3.7% ethyleneglycol, 10.6% ethanol and 60% xylene). Finally, the samples were counted using a liquid scintillation counter (LS 6500, Beckman-Coulter, USA). The D1 and D2 binding was calculated as total binding minus unspecific binding. The results are expressed in nmol/mg protein.

Table 2
Serum activities of lactate dehydrogenase, aspartate aminotransferase and gamma-glutamyltransferase, 2 and 16 days post-treatment.

Group	2 days post-treatment			16 days post-treatment		
	LDH	AST	γ-GT	LDH	AST	γ-GT
Vehicle	2137 ± 435	419 ± 77	131 ± 17	3589 ± 345	249 ± 29	136 ± 26
Glyph 50	3359 ± 1004	453 ± 68	110 ± 17	3407 ± 626	322 ± 37	208 ± 45
Glyph 100	4176 ± 733	454 ± 77	172 ± 37	4830 ± 446	371 ± 60	171 ± 27
Glyph 150	3238 ± 733	361 ± 36	101 ± 19	5093 ± 891	396 ± 41	158 ± 65

Values are mean (IU/L) ± SE. $n=6$ in both experiments. LDH, lactate dehydrogenase; AST, aspartate aminotransferase and γ-GT, gamma-glutamyltransferase.

Table 3
Content of monoamines in striatum and nucleus accumbens of glyphosate-treated rats measured 2 and 16 days post-treatment.

Group	DA	DOPAC	5-HT	5-HIAA	DOPAC/DA
2 days post-treatment					
<i>Striatum</i>					
Vehicle	100 ± 10	100 ± 13	100 ± 8	100 ± 8	100 ± 18
Glyph 50	109 ± 13	103 ± 19	105 ± 7	108 ± 9	93 ± 20
Glyph 100	121 ± 16	117 ± 17	94 ± 12	110 ± 12	102 ± 19
Glyph 150	118 ± 14	111 ± 23	109 ± 6	108 ± 8	95 ± 19
<i>Nucleus accumbens</i>					
Vehicle	100 ± 19	100 ± 20	100 ± 9	100 ± 14	100 ± 21
Glyph 50	132 ± 13	92 ± 14	111 ± 6	110 ± 12	58 ± 7
Glyph 100	86 ± 17	80 ± 17	112 ± 12	90 ± 17	92 ± 19
Glyph 150	119 ± 18	90 ± 16	121 ± 7	97 ± 13	74 ± 15
16 days post-treatment					
<i>Striatum</i>					
Vehicle	100 ± 5	100 ± 7	100 ± 10	100 ± 13	100 ± 9
Glyph 50	105 ± 11	116 ± 16	121 ± 16	125 ± 24	110 ± 12
Glyph 100	103 ± 15	110 ± 17	138 ± 28	133 ± 30	114 ± 17
Glyph 150	111 ± 12	115 ± 6	176 ± 42	136 ± 20	113 ± 15
<i>Nucleus accumbens</i>					
Vehicle	100 ± 19	100 ± 23	100 ± 8	100 ± 13	100 ± 17
Glyph 50	81 ± 10	79 ± 17	88 ± 9	86 ± 10	101 ± 17
Glyph 100	111 ± 27	102 ± 17	92 ± 15	90 ± 15	133 ± 22
Glyph 150	94 ± 9	105 ± 15	81 ± 7	85 ± 8	126 ± 20

Data expressed in percent of control ± SE. $n=9-10$ in both experiments. DA, dopamine; DOPAC, dihydroxyphenylacetic acid; HVA, homovanillic acid; 5-HT, serotonin; 5-HIAA, 5-hydroxyindolacetic acid. Absolute values (ng/mg protein ± SE) for vehicle groups: 2 days post-treatment STR: DA=84 ± 8, DOPAC=6 ± 1, 5-HT=6 ± 0.5, 5-HIAA=4 ± 0.3, DOPAC/DA=0.08 ± 0.01. NAcc: DA=42 ± 8, DOPAC=8 ± 2, 5-HT=13 ± 1, 5-HIAA=4 ± 0.9, DOPAC/DA=0.2 ± 0.04. 16 days post-treatment STR: DA=263 ± 14, DOPAC=19 ± 1, 5-HT=16 ± 2, 5-HIAA=13 ± 2, DOPAC/DA=0.07 ± 0.007. NAcc: DA=123 ± 24, DOPAC=8 ± 2, 5-HT=26 ± 2, 5-HIAA=14 ± 2, DOPAC/DA=0.06 ± 0.01.

2.9. Tyrosine hydroxylase-positive cell number in substantia nigra and ventral tegmental area

To test if Glyph exposure modified the number of dopaminergic cells, we quantified the TH-positive cell number in the SN (substantia nigra pars compacta – SNpc, substantia nigra pars lateralis – SNpl, substantia nigra pars reticulata – SNpr) and VTA (ventral tegmental area – VTA, parabrachial pigmented nucleus – PBP, paranigral nucleus – PN, rostral linear nucleus raphe – RLi) of rats from each Glyph group at 2 and 16 days post-treatment. The immunocytochemical and cell counts were based on the methods described by Hoffman et al. (2008) and Bardullas et al. (2013). Midbrains were sectioned in the coronal plane into three series of 30-µm sections with a microtome (Leica SM 2000R, Wetzlar, Germany). Sections were observed using a 20× objective of a Leica DMLB optic microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). For each animal, two observers blind to group assignment quantified TH-positive cells in all sections from Bregma -4.80 to -6.30 according to Paxinos and Watson (2005).

2.10. Evaluation of systemic biochemical markers of damage

In order to evaluate the possible systemic alterations induced by Glyph, we assessed, at 2 and 16 days post-treatment, the activity of three enzymatic markers of hepatic, kidney and heart damage in serum: aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) and gamma-glutamyltransferase (γ -GT) following the kit vendor's instructions (Wiener Lab Provides, Rosario, Argentina).

2.11. Statistical analysis

To evaluate the general effects of Glyph on locomotor activity, we used a repeated measure ANOVA (group \times injection number), followed by one-way ANOVA (group) and LSD-Fisher *post hoc* tests.

For concentration of monoamines, TH levels, binding assay and enzymatic activity we used one-way ANOVAs and the LSD-Fisher *post hoc* test. For TH-positive cell number we used the Kruskal Wallis test. Finally, repeated measure ANOVAs and unpaired Student's *t*-tests were used to evaluate the microdialysis samples. The software StatView ver 5.0 was used in all analyses. Normality and homogeneity of variances were verified in all data. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment 1. Effects of repeated exposure to Glyph 2 and 16 days post-treatment

3.1.1. Glyph exposure decreases exploratory behavior

Vehicle and Glyph groups displayed similar levels of exploratory activity before injections 1 and 2. However, exploratory activity was decreased in the animals treated either 100 or 150 mg Glyph/kg BW before rats received injection 3, and this hypoactivity lasted throughout most of the experiment, as shown in Fig. 2A and B. There were significant effects of treatment on total distance and vertical activity ($F_{(3,61)} = 5.49-7.46$, $p < 0.05$), injection number ($F_{(6,366)} = 7.522-45.77$, $p < 0.05$) and a significant interaction treatment \times injection number ($F_{(18,366)} = 2.231-1.723$, $p < 0.05$), whereas only injection number had a significant effect ($F_{(6,366)} = 57.29$, $p < 0.0001$) on stereotypy counts.

3.1.2. Glyph exposure decreases spontaneous locomotor activity

Total distance, vertical activity and stereotypy counts decreased immediately after each Glyph administration (Fig. 2a–c) and this reduction in total distance traveled and vertical activity was still observed after a saline injection in the animals that received 150 mg Glyph/kg BW. Total distance, vertical activity and stereotypy counts showed effects of

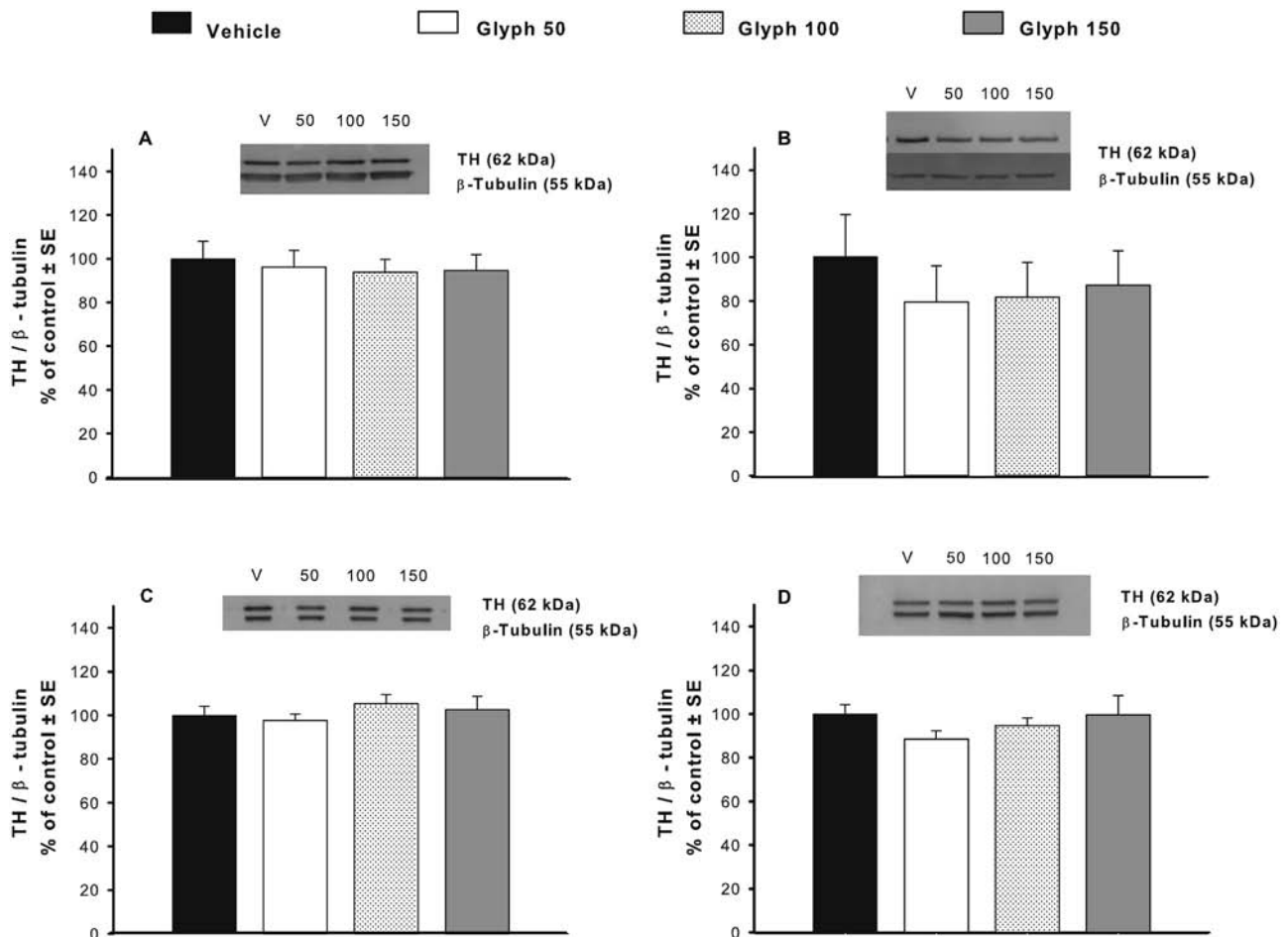


Fig. 4. Tyrosine hydroxylase (TH) levels in STR and NAcc of Glyph-treated rats 2 and 16 days after treatment ended expressed as percentage of the control group (vehicle). TH levels in STR (A) and NAcc (B) at 2 days post-treatment. TH levels in STR (C) and NAcc (D) at 16 days post-treatment $n = 10$. V, vehicle. Absolute values of TH/ β -tubulin for vehicle group at 2 days post-treatment: STR = 0.90 ± 0.07 , NAcc = 3.45 ± 0.7 , and vehicle group at 16 days post-treatment: STR = 1.11 ± 0.05 , NAcc = 0.85 ± 0.04 .

treatment ($F_{(3,60)} = 22.23\text{--}36.14$, $p < 0.0001$) and injection number ($F_{(6,360)} = 15.56\text{--}20.54$, $p < 0.0001$). Only stereotypy counts showed interaction effects (treatment \times injection number) ($F_{(18,360)} = 2.401$, $p = 0.0012$).

In order to understand the acute effects of Glyph administration on locomotor activity, we exhaustively analyzed total distance traveled immediately after of the first injection of 150 mg Glyph/kg BW and saline solution (Supplementary Fig. 1B). There were treatment and time effects on total distance ($F_{(1, 31)} = 10.63$, $p = 0.002$, $F_{(11,341)} = 13.6$, $p < 0.0001$, respectively), which decreased by approximately 50% immediately after the administration of 150 mg Glyph/kg BW (sample 1: $t_{(31)} = 3.07$, $p = 0.004$). Hypoactivity persisted, especially in samples 5, 6 and 9 ($t_{(31)} = 2.05$, 2.44, 2.32 $p < 0.05$, respectively). Samples 11 and 12 showed only a trend to decrease ($t_{(31)} = 1.72$, 1.87, $p < 0.1$, respectively).

3.1.3. Exploratory behavior and spontaneous locomotor activity did not show any change 16 days after Glyph exposure

Exploratory locomotor activity recorded 15 min before saline injection on the 16th day after Glyph treatment was similar in all experimental groups (Fig. 3A–C), just as was the spontaneous locomotor activity assessed during one 24-h dark/light cycle after saline injection (Fig. 3a–c).

3.1.4. Repeated Glyph exposure does not alter body weight or systemic biochemical markers of damage (LDH, AST and γ -GT)

Body weight, and the activity of LDH, AST and γ -GT were not affected by Glyph treatment (Tables 1 and 2).

3.1.5. Repeated Glyph exposure does not alter the content of monoamines or TH enzyme levels in STR and NAcc at 2 and 16 days post-treatment

Concentrations of DA, serotonin and their metabolites in STR or NAcc assessed 2 and 16 days post-treatment were similar in all groups (Table 3). The same result was observed with regard to TH levels in STR and NAcc (Fig. 4).

3.1.6. Repeated Glyph exposure decreases specific binding of the antagonist [3 H] SCH23390 to D1-DA receptors in NAcc 2 days post-treatment

The specific binding of [3 H] SCH23390 to D1-DA receptors in NAcc decreased in the animals exposed to 50, 100 and 150 mg Glyph/kg BW (decreases of 18%, 30% and 40%, respectively) measured 2 days post-treatment ($F_{(3,20)} = 8.71$, $p = 0.0007$; Fig. 5C). In contrast, the specific binding of [3 H] Spiperone to D2-DA receptors was similar in all groups (Fig. 5D). In the STR, Glyph exposure caused no differences in specific binding of [3 H] SCH23390 or [3 H] Spiperone (Fig. 5A and B, respectively). Importantly, there were significant correlations between specific binding to D1-DA receptors in the NAcc and mean total distance traveled, and between binding to D1-DA receptors and mean vertical activity ($r = 0.62$, 0.68, $p < 0.01$, respectively, Fig. 7). The correlation between specific binding to D1-DA receptors in the NAcc and stereotypy counts was not significant ($r = 0.37$, $p = 0.06$) (Fig. 7). Specific binding of [3 H] SCH23390 and [3 H] Spiperone in the STR or NAcc (Fig. 6) was similar in all groups when measured on the 16th day after treatment.

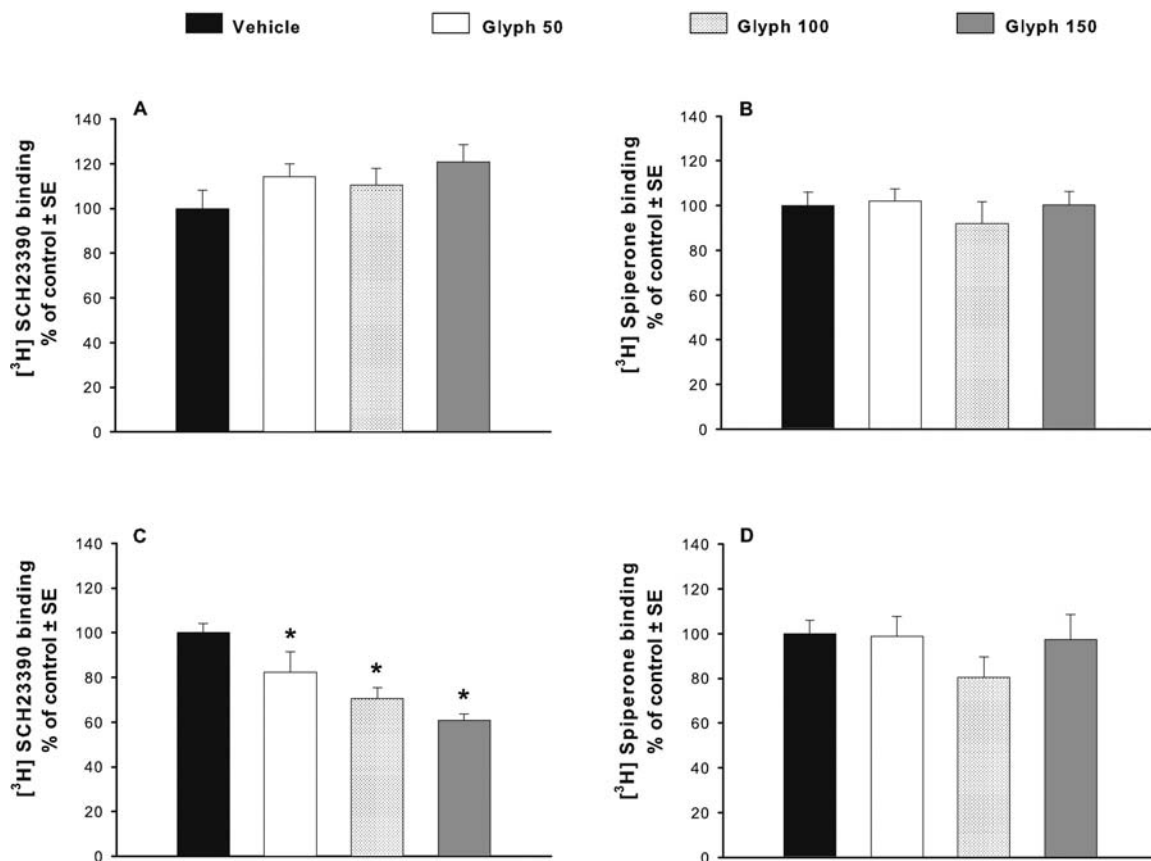


Fig. 5. Specific binding of the antagonists [3 H] SCH23390 and [3 H] Spiperone to D1- and D2-DA receptors, respectively, in the STR and NAcc of rats treated with Glyph, measured 2 days after treatment ended. Specific binding to the D1-DA receptor in STR (A) and NAcc (C), and to the D2-DA receptor in STR (B) and NAcc (D). Absolute values (nmol/mg protein \pm SE) for vehicle groups: (A) 592.36 \pm 48.93, (B) 225.78 \pm 13.96, (C) 817.13 \pm 32.70, (D) 150.54 \pm 9.02; $n = 6$. *Different from vehicle, $p < 0.05$.

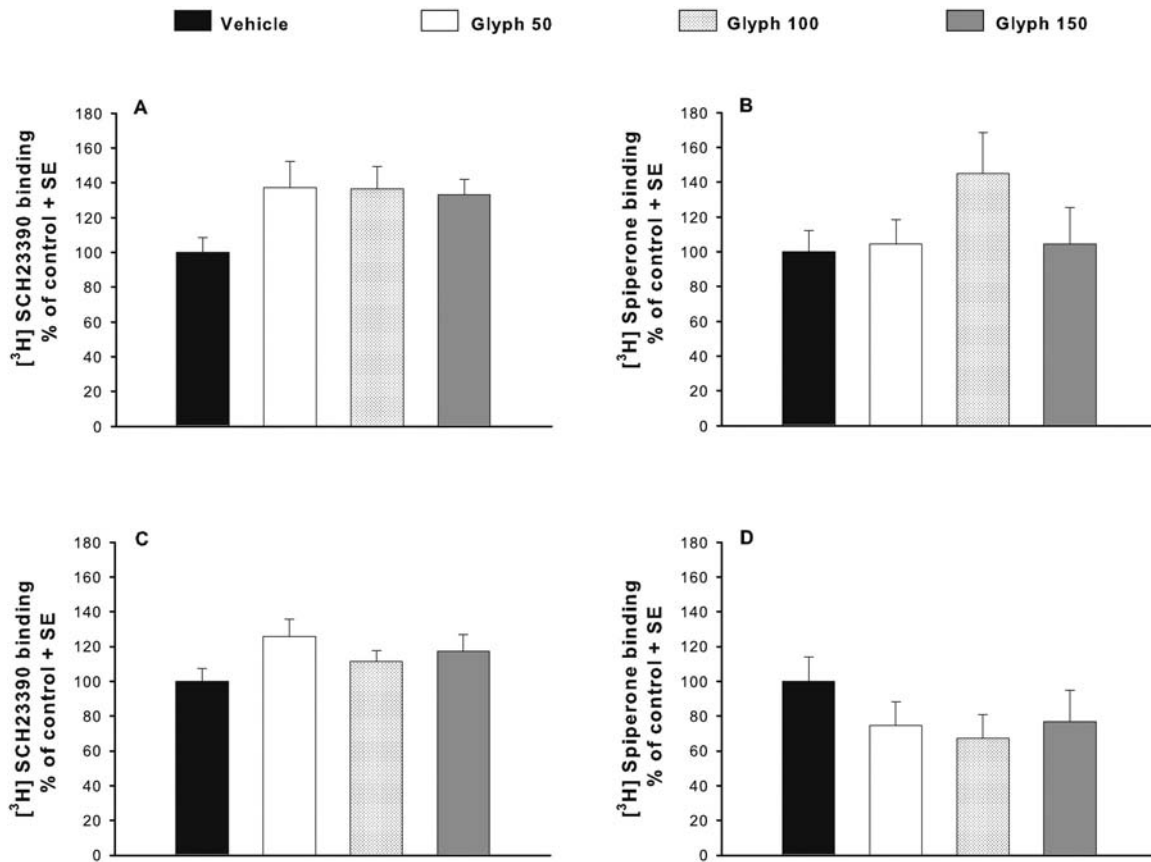


Fig. 6. Specific binding of the antagonists [³H] SCH23390 and [³H] Spiperone to D1- and D2-DA receptors, respectively, in STR and NAcc of rats treated with Glyph, measured 16 days after treatment ended. Specific binding to D1-DA receptors in STR (A) and NAcc (C), and to D2-DA receptors in STR (B) and NAcc (D). Absolute values (nmol/mg protein \pm SE) for vehicle groups: (A) 259.38 \pm 21.66, (B) 138.03 \pm 16.61, (C) 333.06 \pm 24.20, (D) 62.71 \pm 8.64. $n = 6$.

3.1.7. Repeated Glyph exposure does not alter the number of TH-positive cells in the substantia nigra or the ventral tegmental area 2 and 16 days post-treatment

When measured 2 and 16 days after treatment, the number of TH-positive cells in the three subregions of the substantia nigra (SNpc, SNpl and SNpr) or in the four regions of the VTA (VTA, PBP, PN and RLi) was similar in all groups (Table 4).

3.2. Experiment 2. Effects of acute exposure to Glyph (150 mg/kg BW) on DA release in the STR and NAcc

As shown in Fig. 8A, acute 150 mg Glyph/kg BW administration (i.p.) not only decreased striatal extracellular DA levels but also reduced striatal DA release induced by the perfusion of a high-potassium (60 mM) solution. Striatal DA release levels showed group, sample and interaction effects (treatment \times time) ($F_{(1,9)} = 5.35$, $p = 0.04$; $F_{(14,126)} = 40.32$, $p < 0.0001$; $F_{(14,126)} = 4.96$, $p < 0.0001$, respectively), while striatal DOPAC and HVA levels only showed significant sample effects ($F_{(14,126)} = 10.42$ – 15.82 , $p < 0.0001$). In particular, striatal extracellular DA levels were decreased when measured 20 min, and 2 h after Glyph injection (sample 4: $t_{(9)} = 2.76$, $p = 0.02$; sample 9: $t_{(9)} = 2.561$, $p = 0.03$), but DA levels in samples 5 and 6 decreased non-significantly ($t_{(9)} = 2.05$, 1.93 , $p < 0.1$, respectively) (Fig. 8). Striatal DA release induced by the infusion of a high-potassium solution decreased in samples 13 and 15 in the 150 mg Glyph group in comparison to the vehicle group ($t_{(9)} = 2.35$, 2.40 , $p < 0.05$, respectively). After the high-potassium challenge, in sample 18, striatal extracellular DA levels were lower in the Glyph 150 group ($t_{(9)} = 3.13$, $p = 0.01$).

In contrast to the results in STR, levels of DA, DOPAC and HVA in NAcc dialysates were similar in both groups, even during the challenge with high-potassium (60 mM) ringer (Fig. 9). Only significant sample effects for DA, DOPAC and HVA levels ($F_{(14,140)} = 15.89$ – 30.36 , $p < 0.0001$) were observed in NAcc.

4. Discussion

In the present study, we have shown that repeated Glyph exposure causes hypoactivity, which is not the result of discomfort or general malaise, since Glyph-exposed rats did not show taste aversion or changes in place preference (Supplementary Figs. 2–4). In addition, although each rat received a total of approximately 270 mg of Glyph at the end of treatment for the higher doses (45 mg Glyph in each injection for the doses of 150 mg/kg), there were no alterations in body weight or in enzymatic markers of hepatic, kidney or heart damage, and there was no mortality as a result of Glyph treatment.

Although the intended targets of Glyph are plants, exposure to this herbicide affects motor behavior and the dopaminergic system of rats and humans. Indeed, after exposure to commercial mixtures that contain Glyph, Parkinsonian-like symptoms in human subjects have been observed (Barbosa et al., 2001; Wang et al., 2011). In the present study the most severe effects of Glyph on locomotor activity were observed immediately after each administration. Hypoactivity also was observed in total distance and vertical activity 48 h after each Glyph injection and even when the animals received saline 2 days after treatment ended.

Similar short-term effects, for 5 days after the last administration, have been observed in male rats repeatedly exposed to ATR

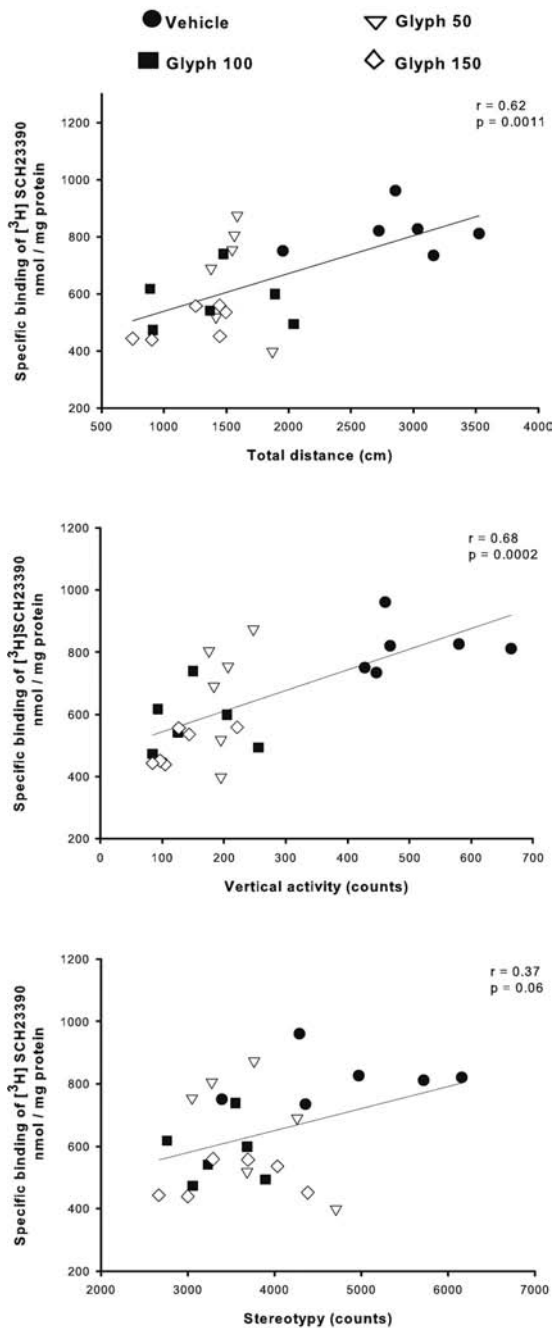


Fig. 7. Correlation between the specific binding to D1-DA receptor in NAcc measured 2 days after treatment ended, and the mean locomotor activity for the 3-h period following the seven injections (Glyph and vehicle). Correlation coefficients and significance level are shown at the upper right of each panel. The correlations refer to the results obtained from additional groups treated specifically for this purpose according to the experimental design shown in the upper panel of Fig. 1. The locomotor activity of these groups was similar to that of the other groups reported in this paper (data not shown).

(Rodríguez et al., 2013). Other herbicides, such as paraquat (Brooks et al., 1999) or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Schulze and Dougherty, 1988) have also been shown to affect the motor behavior in rodent models.

Importantly, in the present study we found that D1-DA receptor binding was reduced in the NAcc, and this reduction showed a positive correlation with the decrease observed in ambulatory activity recorded immediately after Glyph administration. Our findings are consistent with studies that have shown that both the

Table 4

Number of tyrosine hydroxylase-positive cells in substantia nigra and ventral tegmental area of glyphosate-treated rats measured 2 and 16 days post-treatment.

	Brain area			
	SNpc	SNpl	SNpr	VTA
<i>2 days post-treatment</i>				
Vehicle	102 ± 22	24 ± 6	26 ± 5	149 ± 39
Glyph 50	97 ± 25	19 ± 2	27 ± 5	116 ± 28
Glyph 100	143 ± 28	22 ± 3	33 ± 6	164 ± 31
Glyph 150	137 ± 39	22 ± 3	30 ± 6	147 ± 34
<i>16 days post-treatment</i>				
Vehicle	131 ± 11	21 ± 2	32 ± 2	169 ± 18
Glyph 50	173 ± 29	25 ± 3	41 ± 3	212 ± 33
Glyph 100	125 ± 15	21 ± 3	28 ± 3	165 ± 17
Glyph 150	125 ± 17	21 ± 3	31 ± 3	155 ± 17

Values are mean ± SE. $n = 5-7$. SNpc, substantia nigra pars compacta; SNpl, substantia nigra pars lateralis; SNpr, substantia nigra pars reticulata; VTA, ventral tegmental area.

NAcc and D1-DA receptors are involved in motor control. In this regard, the intracerebral administration of 1 or 2 $\mu\text{g}/\text{side}$ of the D1-antagonist SCH23390 into the core or shell of the rat NAcc decreases crossings in an open field (Baldo et al., 2002), while acute or chronic subcutaneous administration of SCH23390 (0.5 mg/kg) into male rats causes catalepsy (Hess et al., 1988).

Additionally we observed that striatal extracellular DA levels decreased by 50% in the first microdialysis sample (20 min) obtained after Glyph (150 mg) administration. This decrease coincided with the 50% reduction in total distance traveled observed during the first 15 min after Glyph (150 mg) administration in the behavioral experiments. In addition, striatal DA levels (both basal release and induced by high potassium) were significantly decreased after Glyph (150 mg) administration for up to 5 h. Thus, the decrease in striatal extracellular DA levels after acute Glyph administration could, in principle, explain the behavioral hypoactivity (Supplementary Fig. 1).

The effects of Glyph exposure on locomotor activity and dopamine markers were evident for 48 h after the end of exposure but not after 16 days, suggesting that these alterations occur while a “critical” concentration of Glyph is present in the system. With regard to clearance of Glyph, in male rats orally exposed to 10 mg of [¹⁴C] and [¹²C] Glyph/kg BW, approximately 76% of Glyph is eliminated through urine and feces within 28 h after administration, and only about 1% of the Glyph injected remains in the animal 7 days after exposure (Brewster et al., 1991).

Since the effects on D1-DA receptors in the NAcc were only detected at 2 days but not at 16 days post-treatment, we concluded that repeated Glyph exposure causes short-term effects on mechanisms that regulate either the density or the affinity of D1-DA receptors in NAcc. Direct mechanisms could involve modifications ranging from transcription to translocation of receptors into the membrane or structural changes of the receptor. For example, the herbicide 2,4-D has been shown to cause internalization of D2-DA receptors, altering their density in striatum, prefrontal cortex, hippocampus and cerebellum of rats chronically exposed to 70 mg 2,4-D/kg (Bortolozzi et al., 2002). An indirect mechanism could involve temporal alterations of membrane features that affect receptor properties. Cattani et al. (2014) detected increases in levels of TBARS, a lipoperoxidation marker, in hippocampal slices of immature rats exposed to 0.01% Roundup[®], an herbicide which contains Glyph. Similarly, in male rats exposed to Glyph, Astiz et al. (2009) found decreases in cardiolipin levels, a membrane glycerolipid, in the mitochondria of the substantia nigra and cerebral cortex. Also, the mixture of Glyph with other pesticides increased TBARS levels in the mitochondrial fraction of substantia nigra and cerebral cortex. In the present study, we did not determine whether Glyph exposure affected the density or the affinity of DA receptors.

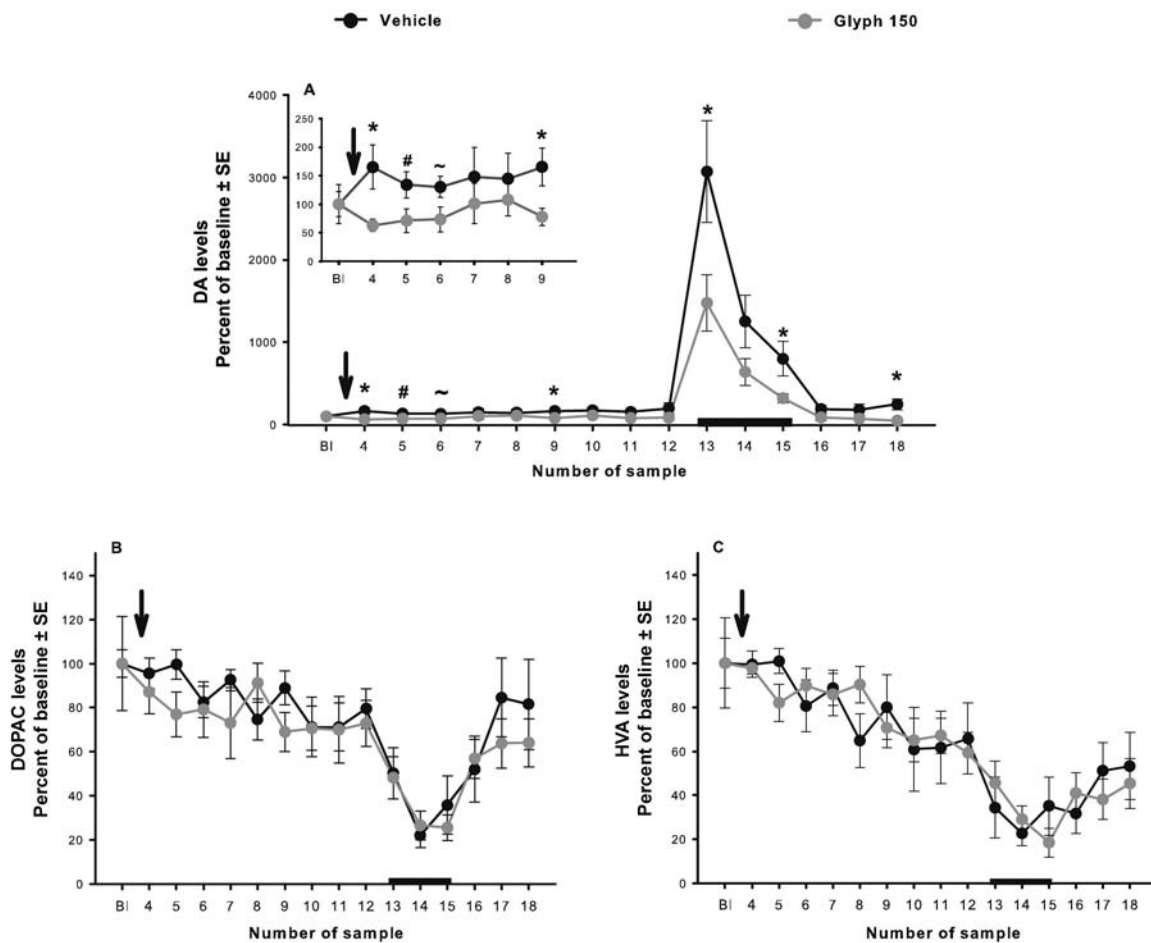


Fig. 8. Acute effects of Glyph on release of DA and its metabolites in STR of anesthetized rats. Extracellular levels of DA (A), DOPAC (B) and HVA (C). Arrow shows the time of injection with vehicle or 150 mg Glyph/kg BW. Dark bar indicates the time of high-potassium infusion (60 nM). $n = 5-6$. Inset in (A) shows an expanded scale of the results from baseline (BI) to sample 9. Number of sample corresponds to each of the 18 samples collected every 20 min, the first three were considered as baseline. Absolute values of baseline (ng/mL \pm SE) for vehicle group: DA = 0.2 ± 0.04 , DOPAC = 67 ± 4 , HVA = 71 ± 8 , and treated group: DA = 0.3 ± 0.1 , DOPAC = 44 ± 9 , HVA = 53 ± 10 . *Different from vehicle group $p < 0.05$; # $p = 0.05-0.07$; ~ $p < 0.1$.

The mechanisms by which acute Glyph administration immediately decreases extracellular levels of basal striatal DA are unknown, but we propose the following: (1) that Glyph may accelerate DA reuptake through an overactive dopamine transporter, (2) that mobilization of DA-containing vesicles to the extracellular membrane, and/or vesiculation are decreased, (3) that Glyph may affect DA synthesis, since this decrease is still present 3-h after Glyph administration, and (4) that Glyph may interfere with the phosphorylation of TH, mainly at Ser 40 or 19, since TH activation by phosphorylation is the primary short-term mechanism for maintenance of catecholamine levels (Dunkley et al., 2004). The same mechanisms may be responsible for the decrease in high-potassium-induced DA release.

Acute Glyph administration did not modify striatal DOPAC or HVA levels before or after the high-potassium challenge. A similar observation was also made in male rats exposed to the pesticides Allethrin (20 or 60 mg/kg i.p.) and Cyhalothrin (20 or 60 mg/kg i.p.) (Mubarak Hossain et al., 2006). Both pesticides decreased DA release; they did not alter DOPAC or HVA levels but did increase 3-methoxytyramide (3-MT) levels. This finding suggests that decreased DA levels may be the result of the metabolism of DA to 3-MT (Mubarak Hossain et al., 2006). Although these are possible explanations for our results, they remain to be tested in the case of Glyph.

Although the hypoactivity caused by acute Glyph administration is similar to that observed after administration of dopamine

antagonists, Glyph may affect additional neurotransmitter systems involved in motor control. Recently, it was reported that hippocampal slices of 15-day-old rats chronically exposed to 1% Roundup[®] showed a decrease in [³H]-glutamate reuptake and an increase in glutamate release (Cattani et al., 2014). In rodent models, it has been shown that herbicides such as 2,4-D (Bortolozzi et al., 2003), ATR (Lin et al., 2013) or paraquat (Kuter et al., 2007) affect several neurotransmitters systems such as noradrenaline, serotonin or their metabolites in cerebellum, prefrontal cortex, striatum, midbrain, substantia nigra or cerebellum. In the present study, we found that serotonin and its metabolite levels were not affected by Glyph administration (Table 3).

Our results show that the STR and NAcc were differentially vulnerable to Glyph exposure. This may be due to the peculiar anatomic and physiological properties of the nigrostriatal and mesolimbic pathways such as brain connectivity (Gerfen, 2004; Humphries and Prescott, 2010), membrane properties, cellular excitability, lipoperoxidation levels, and enzymatic activity of catalase and glutathione peroxidase (Hung and Lee, 1998; Ma et al., 2012), among others. In this study, ambulation and rearing behavior correlated with D1-DA binding in the NAcc but not in the STR; on the other hand, stereotypical behavior, which is considered to be controlled by the STR, was not as affected and did not correlate with DA binding. Thus, this suggests a differential sensitivity to Glyph in these nuclei.

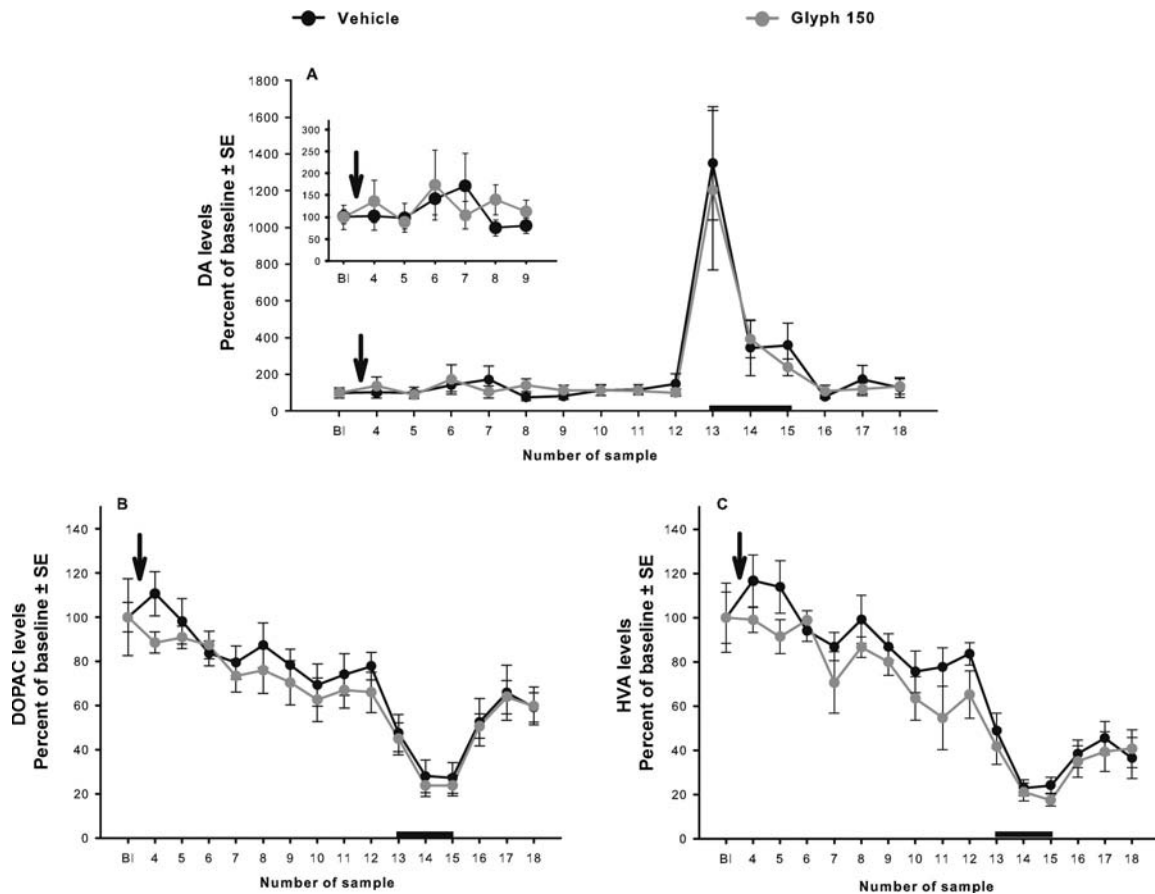


Fig. 9. Acute effects of glyphosate injection on release of DA and its metabolites in NAcc of anesthetized rats. Extracellular levels of DA (A), DOPAC (B) and HVA (C). Arrow shows the injection with vehicle or 150 mg Glyph/kg BW. Dark bar indicates the high-potassium infusion (60 nM). $n = 6$. Inset in (A) shows the results from baseline (BI) to sample 9 on an expanded scale. Number of sample corresponds to each of the 18 samples collected every 20 min, the first three were considered as baseline. Absolute values of baseline (ng/mL \pm SE) for vehicle group: DA = 0.06 ± 0.01 , DOPAC = 30 ± 5 , HVA = 43 ± 7 , and treated group: DA = 0.08 ± 0.02 , DOPAC = 32 ± 2 , HVA = 46 ± 5 .

5. Conclusion

In the present study, we have shown that exposure to Glyph, the active ingredient employed in some herbicides, decreased locomotor activity, binding to the D1-DA receptor in the NAcc, and extracellular DA levels in the STR. These results suggest that Glyph affects the dopaminergic system. Additional experiments are necessary in order to unveil the specific targets of Glyph on dopaminergic system, and whether Glyph could be affecting other neurotransmitter systems involved in motor control.

Funding

This work was supported by the Consejo Mexicano de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [60662 and 152842 to V.M.R. and 103907 to M.G.] and the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) [214608-19 and 202013 to V.M.R.]. Isela Hernández Plata received fellowship 164300 from CONACYT.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgments

The authors would like to thank Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray for her comments relating to this project, Soledad Mendoza Trejo, Olivia Vázquez-Martínez, and Fernando López-Barrera for their technical support. Wendy Portillo, Francisco Camacho and María Isabel Miranda for their comments and advice on behavioral studies, Jorge Limón Pacheco for technical support in western blot technique, and Dorothy Pless for critically reviewing this manuscript. The 12G10 anti- α -tubulin developed by Frankel J and Nelsen M was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242, USA. Isela Hernández Plata is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2014.12.001>.

References

Astiz M, de Alaniz JTM, Marra CA. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009;72:2025–32.

- Barbosa E, Da costa M, Bacheschi L, Scaff M, Leite CC. Parkinsonism after glycine-derivate exposure. *Mov Disord* 2001;16:565–8.
- Baldo BA, Sadeghian K, Basso A, Kelley AE. Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. *Behav Brain Res* 2002;137:165–77.
- Bardullas U, Giordano M, Rodríguez VM. Atrazine is primarily responsible for the toxicity of long-term exposure to a combination of atrazine and inorganic arsenic in the nigrostriatal system of the albino rat. *Neurotoxicol Teratol* 2013;40:59–66.
- Bortolozzi A, Duffard R, Antonelli M, Evangelista de Duffard AM. Increased sensitivity in dopamine D2-like brain receptors from 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-exposed and amphetamine-challenged rats. *Ann N Y Acad Sci* 2002;965:314–23.
- Bortolozzi A, Duffard R, de Duffard AM. Asymmetrical development of the monoamine systems in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid treated rats. *Neurotoxicology* 2003;24:149–57.
- Brewster D, Warren J, Hopkins W. Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: tissue distribution, identification, and quantification of glyphosate-derived materials following a single oral dose. *Fundam Appl Toxicol* 1991;17:43–51.
- Brooks AI, Chadwick C, Gelbard A, Cory-Slechta D, Federoff HJ. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res* 1999;823:1–10.
- Cattani D, de Liz Oliveira Cavalli VL, Heinz Rieg CE, Domingues JT, Dal-Cim T, Tasca CI, et al. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology* 2014;320:34–45.
- Daruich J, Zirulnik F, Gimenez MS. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ Res* 2001;85:226–31.
- Dill GM, Cajacob CA, Padgett SR. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Manag Sci* 2008;64:326–31.
- Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, Von Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem* 2004;91:1025–43.
- Gerfen C. Basal ganglia. In: Paxinos G, editor. *In the rat nervous system*. San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press; 2004. pp. 455–508.
- Gui YX, Fan XN, Wang HM, Wang G, Chen SD. Glyphosate induced cell death through apoptotic and autophagic mechanisms. *Neurotoxicol Teratol* 2012;34:344–9.
- Hess EJ, Norman AB, Creese I. Chronic treatment with dopamine receptors antagonist: behavioral and pharmacologic effects on D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurosci* 1988;8:2361–70.
- Hoffman G, Le WW, Sita LV. The importance of titrating antibodies for immunocytochemical methods. In: Gerfen CR, Holmes A, Sibley D, Skolnick P, Wray S, editors. *Current protocols in neuroscience*. John Wiley & Sons, Inc.; 2008. pp. 2.12.1–2.12.26.
- Mubarak Hossain M, Suzuki T, Sato N, Sato I, Takewaki T, Suzuki K, et al. Differential effects of pyrethroid insecticides on extracellular dopamine in the striatum of freely moving rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;217:25–34.
- Humphries MD, Prescott T. The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy and reward. *Prog Neurobiol* 2010;90:385–417.
- Hung HC, Lee EH. MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Radic Biol Med* 1998;24:76–84.
- Kuter K, Smialowska M, Wieronska J, Zieba B, Wardas J, Pietraszek M, et al. Toxic influence of subchronic paraquat administration on dopaminergic neurons in rats. *Brain Res* 2007;1155:196–207.
- Levant B. Characterization of dopamine receptors. In: Enna SJ, Williams M, Kenakin T, McGonigle P, Ruggeri B, editors. *Current protocols in pharmacology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2007. pp. 1.6.1–1.6.15.
- Lin Z, Dodd CA, Filipov NM. Short-term atrazine exposure causes behavioral deficits and disrupt monoaminergic systems in male C57BL/6 mice. *Neurotoxicol Teratol* 2013;39:26–35.
- Ma YY, Cepeda C, Chatta P, Franklin L, Evans CJ, Levine MS. Regional and cell-type-specific effects of DAMGO on striatal D1 and D2 dopamine receptor-expressing medium-sized spiny neurons. *ASN Neuro* 2012;4:59–70.
- Malhotra RC, Ghia DK, Cordato DJ, Beran RG. Glyphosate-surfactant herbicide-induced reversible encephalopathy. *J Clin Neurosci* 2010;17:1472–3.
- Menkes DB, Temple WA, Edwards IR. Intentional self-poisoning with glyphosate containing herbicides. *Hum Exp Toxicol* 1991;10:103–7.
- Pan Y, Berman Y, Haberny S, Meller E, Carr KD. Synthesis, protein levels, activity, and phosphorylation state of tyrosine hydroxylase in mesoaccumbens and nigrostriatal dopamine pathways of chronically food-restricted rats. *Brain Res* 2006;1122:135–42.
- Paxinos G, Watson C. *The brain rat in stereotaxic coordinates*. 5th ed. San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press; 2005.
- Rodríguez VM, Limon-Pacheco J, Mendoza-Trejo MS, Gonzalez-Gallardo A, Hernández-Plata I, Giordano M. Repeated exposure to the herbicide atrazine alters locomotor activity and the nigrostriatal dopaminergic system of the albino rat. *Neurotoxicology* 2013;34:82–94.
- Sato C, Kamijo Y, Yoshimura K, Ide T. Aseptic meningitis in association with glyphosate-surfactant herbicide poisoning. *Clin Toxicol* 2011;49:118–20.
- Schulze GE, Dougherty J. Neurobehavioral toxicity and tolerance to the herbicide 2,2-dichlorophenoxyacetic acid-*n*-butyl ester (2,4-D ester). *Fundam Appl Toxicol* 1988;10:413–24.
- Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA. The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci* 2000;20:9207–14.
- Wang G, Fan XN, Tan YY, Cheng Q, Chen SD. Parkinsonism after chronic occupational exposure to glyphosate. *Parkinsonism Relat Disord* 2011;17:486–7.
- Williams G, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000;31:117–65.