



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA  
ADMINISTRACIÓN ORAL DE NEONICOTINOIDES  
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA  
RATA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A:**

**ALEJANDRA KARINA MORA GUTIÉRREZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Moisés Rubio Osornio**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIA

A mis ratas...

Porque las ratas han sido un pilar importante del avance, el descubrimiento y el camino a la verdad. Porque a costa de su muerte, el ser humano ha recibido inmerecidamente la respuesta a muchos enigmas que han salvaguardado a la humanidad. Porque aunque su labor es inconsciente, se les debe un respeto supremo y la defensa de su bienestar a costa de cualquier ignorante que no las sepa valorar. Porque sin ellas mucho de lo que hoy es, no sería... ni será.

Alejandra Mora



## AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque nunca me dejó sola.

A todas mis ratas, porque nunca me va a alcanzar mi vida para reemplazar una de sus vidas.

A mi madre por todo su apoyo, comprensión, paciencia y cariño. Gracias por tus enseñanzas, porque sin ellas me hubiera rendido fácilmente.

Al Dr. Moisés Rubio por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por su paciencia, disposición, confianza y ánimos. Gracias por formar a la persona que escribió esta tesis.

Al equipo de trabajo del Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, principalmente a la Dra. Minerva Calvillo por enseñarme el arte de la histología y a la Dra. Daniela Silva por su paciencia con el conteo celular.

Gracias Marce, Gil, Ari, Erandi, Alfredo y Oscar, por darme ánimos cuando creía que ya no podía más y por hacer del laboratorio un lugar lleno de alegría.

A la Dra. Socorro Retana y a la M. en C. Diana Méndez de la UAM-I por compartir sus conocimientos conmigo.

A todo el equipo de trabajo del bioterio de la UAM-I, principalmente a la MVZ Ma. del Rocío González Vieira por su disposición y alegría.

A mis sinodales, al Dr. Miguel Ángel Martínez Castillo, al Dr. Santiago René Anzaldúa Arce, a la Dra. Laura Patricia Romero Romero y la Dra. María del Carmen Frias Domínguez por el tiempo dedicado a la corrección de mi tesis.

Gracias Clau, Angie, Sandra y Chris, por su cariño, comprensión y lealtad.

Y muchas gracias a todas las personas que a lo largo de mi camino hicieron que el sueño de mi infancia se hiciera realidad.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
1) RESUMEN	1
2) INTRODUCCIÓN	2
3) ANTECEDENTES	5
3.1 Hipótesis	11
3.2 Objetivos	11
3.2.1 Objetivo general	11
3.2.2 Objetivos específicos	11
4) MATERIAL Y MÉTODOS	12
4.1 Administración subcrónica de neonicotinoídes	13
4.2 Laberinto Acuático de Morris	16
4.3 Histología	19
4.3.1 Cresil violeta	22
4.3.2 Fluoro-Jade	23
4.4 Conteo celular	24
4.5 Análisis estadístico	24
5) RESULTADOS	25
5.1 Administración subcrónica de neonicotinoídes	25
5.2 Laberinto Acuático de Morris	28
5.3 Histología	31
5.4 Conteo celular	49
6) DISCUSIÓN	54
7) CONCLUSIONES	63
8) PERSPECTIVAS	65
9) REFERENCIAS	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>4) MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
Figura 1. Laberinto Acuático de Morris	17
Figura 2. Metodología: Laberinto Acuático de Morris	19
Figura 3. Hipocampo dorsal de la rata	21
Figura 4. Corteza motora de la rata	22
<b>5) RESULTADOS</b>	
Figura 5. Porcentaje de mortalidad para cada una de las dosis de la mezcla de neonicotinoides.	27
Figura 6. LAM: Latencias de llegada	28
Figura 7. LAM: Latencias promedio	29
Figura 8. LAM: Número de cruces	30
Figura 9. LAM: Permanencia en el cuadrante	30
Figura 10. CA1: 72 h.	33
Figura 11. CA1: 19 d	34
Figura 12. CA3: 72 h.	35
Figura 13. CA3: 19 d	36
Figura 14. CA4: 72 h.	37
Figura 15. CA4: 19 d	38
Figura 16. GD: 72 h	39
Figura 17. GD: 19 d.	40
Figura 18. Fluoro Jade: CA1	41
Figura 19. Fluoro Jade: CA3	42
Figura 20. Fluoro Jade: CA4	43
Figura 21. Fluoro Jade: GD	44
Figura 22. Corteza Motora	45
Figura 23. Corteza Motora	46
Figura 24. Fluoro Jade: Corteza Motora	47
Figura 25. Fluoro Jade: Corteza Motora	48
Figura 26. CA1: Conteo celular	50
Figura 27. CA3: Conteo celular	51
Figura 28. CA4: Conteo celular	52
Figura 29. GD: Conteo celular	53
<b>6) DISCUSIÓN</b>	
Figura 30. Mecanismo de excitotoxicidad por glutamato como consecuencia de la administración oral de neonicotinoides.	60

## ÍNDICE DE CUADROS

4) MATERIAL Y MÉTODOS	Página
Cuadro 1. Radioactividad residual total en tejidos por medio de la cuantificación por centelleo líquido, 72 horas después de la administración de clotianidina en ratas.	15
Cuadro 2. Radioactividad residual en órganos y tejidos de ratas, 48 horas después de la administración de <sup>14</sup> C-metileno unido a tiacloprid.	15
5) RESULTADOS	
Cuadro 3. Signología observada con cada dosis de la mezcla de neonicotinoídes.	26

## 1) RESUMEN

MORA GUTIÉRREZ ALEJANDRA KARINA. Caracterización del efecto de la administración oral de neonicotinoides en el sistema nervioso central de la rata (bajo la dirección del Dr. Moisés Rubio Osornio).

Los neonicotinoides son plaguicidas que actúan como agonistas de los receptores nicotínicos para acetilcolina en el sistema nervioso central de insectos. La exposición crónica en humanos está relacionada con autismo, pérdida de la memoria y temblor de dedos. En consecuencia, ha resultado pertinente evaluar el efecto de estos plaguicidas en mamíferos. En el presente estudio se determinó el efecto de la administración oral subcrónica de una mezcla de dos neonicotinoides: PONCHO 600 y CALYPSO 480. Se administraron dosis decrecientes de la mezcla de ambos plaguicidas (5/10, 3/10 y 2/10 de la DL50 de cada uno). La administración de 5/10 y 3/10 de la mezcla dio lugar al 100% de muerte después de la primera toma; 2/10 de la mezcla causó el 20% de muerte y los animales sobrevivientes continuaron con un esquema de administración subcrónica y 72 h después de la décima dosis se realizaron una serie de pruebas de aprendizaje y memoria en el Laberinto Acuático de Morris (LAM). Nuestros resultados revelan picnosis, retracción nucleosomática y pérdida de la arquitectura tisular en las neuronas granulares del giro dentado y por otro lado una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en el número de cruces realizados en la prueba de memoria a corto plazo en el LAM. En conclusión, las dosis 5/10 y 3/10 de la DL50 administrados en mezcla son letales, mientras que la dosis 2/10, está involucrada en la pérdida de la memoria a corto plazo y alteraciones histológicas en el giro dentado en la rata Wistar.

## 2) INTRODUCCIÓN

En México y alrededor de todo el mundo existen agricultores, peones de campo, obreros industriales, exterminadores de plagas y pilotos, entre muchos otros trabajadores, así como poblaciones aledañas a los lotes asperjados, que se exponen diariamente y por largos periodos de tiempo a mezclas de plaguicidas que se utilizan vía aérea o terrestre, para la protección de diversos cultivos como hortalizas y plantas ornamentales; del mismo modo, el uso diario de plaguicidas incrementa el riesgo de accidentes que causan intoxicaciones agudas, principalmente por contacto dérmico o inhalación. Para la población en general, constituyen un peligro latente a partir de las cadenas tróficas, al consumir alimentos contaminados con estas sustancias químicas (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007); de la misma manera, la contaminación del aire, agua y suelo con mezclas de plaguicidas, contribuye a la dispersión más allá de donde son aplicados.

En la República Mexicana, 186 plaguicidas considerados como altamente peligrosos están registrados comercialmente ante la COFEPRIS e incluso son recomendados para diversos cultivos por SENASICA (RAPAM, 2013); además, se utilizan 25 plaguicidas que han sido prohibidos en otros países por sus efectos perjudiciales para la salud y el ambiente (Pérez Olvera *et al*, 2011).

Las cantidades de plaguicidas utilizadas son exorbitantes, tanto que en 2006 alcanzaron las 95025 toneladas (Hernández y Hansen, 2011) y en el año 2014, el “Programa Nacional Campo Limpio” recolectó un total de 3110 toneladas de envases vacíos de plaguicidas de uso agrícola (SAGARPA, 2015). Por otro lado, existen

registros del periodo de enero a septiembre del año 2006 de 135 casos de intoxicaciones y 4 muertes causadas por el manejo inadecuado de estos productos químicos, siendo la intoxicación vía oral la más común (SINTOX, 2006).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define como plaguicida: “Cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos” (FAO, 2003).

Los neonicotinoides son insecticidas que pertenecen a un subgrupo de plaguicidas que se utilizan comúnmente en la agricultura para la protección de los cultivos contra insectos dañinos (Özdemir *et al.*, 2014) de los géneros *Aphidae* (áfidos), *Aleyrodidae* (mosca blanca), *Cicadellidae* (chicharras), *Chrysomelidae* (gusano de la raíz del maíz), *Elateridae* (gusano de alambre), *Pseudococcidae* (cochinillas) y ácaros fitófagos (Simon-Delso *et al.*, 2014).

Los neonicotinoides actúan como agonistas sobre los receptores nicotínicos para acetilcolina (RnAch) (Tomizawa y Casida, 2005; Fischer *et al.*, 2014; Simon-Delso *et al.*, 2014; Van der Sluijs *et al.*, 2015), particularmente sobre el subtipo  $\alpha 4\beta 2$  de insectos y mamíferos (Tomizawa y Casida, 2005); son derivados de la nicotina y se

clasifican como N-nitroguanidinas (imidacloprid, tiametoxam, dinotefurano, y clotianidina) y N-ciano-aminidas (acetamiprid y tiacloprid) (Calderón-Segura *et al.*, 2012). Estos plaguicidas se aplican por aspersion foliar, revestimiento de semillas o son adicionados al suelo (Pappas *et al.*, 2013), además presentan un desarrollo muy bajo de resistencia cruzada y por ello han comenzado a sustituir a los piretroides, organoclorados, organofosforados, carbamatos y otros insecticidas (Nauen y Denholm, 2005).

En 1985 Bayer CropScience patentó el primer plaguicida neonicotinoide, el imidacloprid, pero fue hasta 1991 que salió al mercado; posteriormente desarrolló y comercializó otros neonicotinoides como el tiacloprid en el año 2000 y clotianidina en el 2002 (Tomizawa y Casida, 2005; Liu *et al.*, 2008). En el año 2008 los neonicotinoides llegaron a México (Calderón Segura *et al.*, 2011) y hoy en día, están registrados globalmente en más de 120 países por su efectividad como insecticidas en el control de plagas (Jeschke *et al.*, 2011).

En Estados Unidos en el año 2013, la empresa Dow AgroSciences recibió la aprobación de la Environmental Protection Agency (EPA) para la comercialización del sulfoxaflor (Dow AgroSciences, 2013), el plaguicida neonicotinoide de más reciente formulación (Zhu *et al.*, 2010, Shao *et al.*, 2013), el cual se unió a la familia de los siete neonicotinoides disponibles en el mercado: imidacloprid, acetamiprid, tiacloprid, clotianidina, tiametoxam, dinotefurano y nitenpiram (Jeschke *et al.*, 2011).

En China, nuevos compuestos neonicotinoides están siendo desarrollados y probados para su pronto lanzamiento a la venta (Shao *et al.*, 2013) y aunque se ha demostrado

que son un factor involucrado en el fenómeno de “colapso de colonia” de la abeja *Apis mellifera* (Decourtye *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 2012; Farooqui, 2012; Lu *et al.*, 2014), esto no ha servido como una razón suficiente para la regulación de su producción, incluso, cuando aún no están del todo claros, los efectos nocivos que pueden causar a otros animales, al ambiente y a la salud del ser humano.

### 3) ANTECEDENTES

Los receptores colinérgicos nicotínicos son abundantes en el cuerpo humano, principalmente en la placa neuromuscular y en el SNC, sin embargo, también se les ha identificado en los adipocitos, macrófagos, linfocitos, queratinocitos, hepatocitos, pulmón y en las células epiteliales intestinales (Özdemir *et al.*, 2014). Estos receptores son proteínas compuestas por cinco subunidades (pentámeros), que pueden ser de naturaleza homomérica o heteromérica. Por ejemplo, en la placa neuromuscular sólo se ha identificado al subtipo heterómero  $\alpha 1\gamma\alpha 1\delta\beta 1$ , mientras que a nivel de SNC la naturaleza de los receptores nicotínicos es sumamente variada, ya que se han identificado subtipos de ambas clases, como los  $\alpha 7$  y  $\alpha 8$  que son considerados como pentámeros homólogos, o bien, existen combinaciones complejas como por ejemplo la  $(\alpha 2)_2(\beta 4)_2\alpha 5$ ,  $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$  o la  $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ , siendo esta última la más abundante en el cerebro (Taylor y Brown, 2006).

Los plaguicidas neonicotinoides actúan como agonistas sobre los RnACh de insectos y mamíferos, principalmente sobre el subtipo  $\alpha 4\beta 2$  (Tomizawa y Casida, 2005) y aunque desde hace varios años se ha argumentado que tienen un efecto bajo o nulo

sobre los receptores nicotínicos de mamíferos, tanto a nivel central (sobre los subtipos  $\alpha 3\beta 2$  [y/o  $\beta 4$ ],  $\alpha 5$ ,  $\alpha 4\beta 2$ , y  $\alpha 7$ ) como periférico (sobre el subtipo  $\alpha 1\alpha \delta 1\beta 1$ ) (Tomizawa y Casida, 2003; Tomizawa y Casida, 2005), existen evidencias científicas que demuestran que los neonicotinoides si pueden causar efectos en el SNC de los mamíferos.

Por ejemplo, en estudios de toxicidad aguda en ratas, tras la administración oral a dosis altas de tiacloprid (100-1000 mg/kg), los animales cursan con signos como piloerección, disminución de la movilidad, reflejos lentos, marcha espástica, estado espasmódico, convulsiones, temblores, taquipnea y disnea; signos considerados como transitorios y que en las dosis más altas anteceden a la muerte (ECHA, 2013).

También se ha demostrado que la administración oral de clotianidina genera signos muy similares a los provocados por la administración de tiacloprid, como temblores, ataxia, disminución en la actividad, postura encorvada, hipotermia, piloerección y disnea y aún no se ha descartado el posible efecto directo sobre los receptores colinérgicos nicotínicos centrales (Metrucchio y Boobis, 2010).

Por otro lado, cuando se administran 5mM de clotianidina por microdiálisis en el cuerpo estriado de la rata, se eleva significativamente (hasta en un 4604 +/- 516% más en comparación con los niveles basales) la liberación de dopamina por parte de las neuronas dopaminérgicas de este núcleo cerebral, efecto que podría estar relacionado con la unión del agonista a los RnACh que se encuentran en estas neuronas (Oliveira *et al.*, 2009).

En otro estudio, se demostró que el acetamiprid, imidacloprid y la nicotina, ejercen efectos excitadores similares entre sí, sobre los RnACh de neuronas del cerebelo de ratas neonatas, a concentraciones superiores de 1  $\mu$ M y que por ello pueden afectar negativamente la salud humana, especialmente al cerebro en desarrollo (Kimura Kuroda *et al.*, 2012).

Hoy en día, incluso existen evidencias histopatológicas de daño neuronal en diversas regiones del SNC (cerebelo, hipocampo y corteza cerebral) de la rata Wistar, como consecuencia de la administración oral del neonicotinoide imidacloprid (Bhardwaj *et al.*, 2010; Nellore *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha demostrado que la administración crónica de clotianidina a una dosis de 24 mg/kg, parece disminuir el rendimiento del aprendizaje y la memoria en ratas juveniles (Özdemir *et al.*, 2014).

Es importante mencionar que los efectos de los neonicotinoides no se limitan a la salud del SNC, en ratas machos cuando clotianidina es administrada a dosis altas, causa efectos adversos en el sistema reproductivo (Bal *et al.*, 2012a) y tiacloprid puede causar daño genotóxico, ya que aumenta significativamente las aberraciones cromosómicas y el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos de sangre periférica humana (Kocaman *et al.*, 2012).

Los efectos dañinos que los neonicotinoides podrían ocasionar al SNC de los seres humanos, aún están por descubrirse, aunque existen reportes de intoxicaciones agudas accidentales o intencionales, causadas por contacto dérmico, inhalación o

ingestión de imidacloprid y acetamiprid, en las que se observaron signos como somnolencia, disnea, midriasis, calambres abdominales y espasmos musculares (Wu *et al.*, 2001; Shadnia y Moghaddam, 2008; Kumar *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2013); signología muy similar a la presentada por animales de experimentación (Chao y Casida, 1997; Metruccio y Boobis, 2010; ECHA, 2013; Sheets, 2014).

En humanos la exposición crónica a plaguicidas neonicotinoides se ha relacionado con problemas neurológicos y del desarrollo, como tetralogía de Fallot, anencefalia y trastorno del espectro autista y síntomas como pérdida de la memoria y temblor de dedos (Cimino *et al.*, 2016). Por otro lado, la European Food Safety Authority (EFSA) evaluó el posible vínculo entre la exposición a neonicotinoides y sus efectos neurotóxicos en el cerebro en desarrollo de los humanos y concluyó que, tanto el acetamiprid como el imidacloprid, pueden afectar potencialmente algunas funciones cerebrales como el aprendizaje y la memoria (EFSA, 2013a).

En México, la información acerca de los efectos sobre la salud humana causados por plaguicidas neonicotinoides es deficiente y se considera que su toxicidad es subestimada en la última versión del catálogo de plaguicidas expedido por la CICOPLAFEST en 2004 (COFEPRIS, 2010).

En normas oficiales mexicanas como la NOM-003-STPS-1999 “Actividades agrícolas- Uso de insumos fitosanitarios o plaguicidas e insumos de nutrición vegetal o fertilizantes- Condiciones de seguridad e higiene”, no se hace especial énfasis en los efectos que puede generar la exposición crónica o el mal uso de plaguicidas y mucho

menos, se hace referencia a los neonicotinoides. Incluso en la NOM-005-STPS-1998 “Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas”, no se menciona nada en relación al manejo de neonicotinoides y de los plaguicidas en general y aunque en la NOM-256-SSA1-2012 “Condiciones sanitarias que deben cumplir los establecimientos y personal dedicados a los servicios urbanos de control de plagas mediante plaguicidas” se mencionan las medidas de protección para los trabajadores, tampoco se expone nada acerca de las consecuencias del uso de plaguicidas, que podrían ayudar a concientizar a las personas para el cumplimiento de la norma.

El deseo de los agricultores por tener una rápida destrucción de las plagas o la economía de realizar una sola operación de rociado (Afari Sefa *et al.*, 2015), ha hecho que el uso de mezclas de plaguicidas sea una práctica común en la agricultura (Kishi, 2002; Afari Sefa *et al.*, 2015), en la que los trabajadores mezclan plaguicidas con palos, sacudiendo las mochilas pulverizadoras e incluso con las manos desnudas (Afari Sefa *et al.*, 2015).

En estudios que se han realizado en Estados Unidos y en algunos países en desarrollo, se ha demostrado que las intoxicaciones son causadas por mezclas de agroquímicos (Kishi, 2002) y a pesar de su uso habitual y excesivo, existen preocupaciones en torno a sus repercusiones para la salud humana, que derivan de la exposición de los agricultores al mezclar y aplicar plaguicidas o trabajar en campos tratados y de los residuos en el alimento y el agua para la población en general

(Damalas y Eleftherohorinos, 2011). Incluso, hoy en día se sabe que las mezclas de insecticidas son las más relacionadas con efectos neurotóxicos (Rizzati *et al.*, 2016).

Debido a que el uso de plaguicidas neonicotinoides va en aumento y en 2008 representaron cerca del 24% del mercado mundial de insecticidas (Wu-Smart y Spivak, 2016), se hace necesario investigar el potencial efecto tóxico que pueden tener sobre otros seres vivos y de este modo, abrir camino a la regulación de su producción y uso a partir de modificaciones pertinentes a la normatividad nacional.

Los efectos ocasionados a la salud del cerebro y sus repercusiones en la memoria y el aprendizaje de los mamíferos, por exposición prolongada a neonicotinoides, no han sido del todo esclarecidos y la mayor parte de la información disponible presenta resultados obtenidos a partir del estudio de diversos neonicotinoides de manera individual (Bhardwaj *et al.*, 2010; Nellore *et al.*, 2013; Özdemir *et al.*, 2014), en los que se realizan técnicas histológicas o bien, de conducta, sin embargo, no se ha encontrado evidencia de una correlación entre ambas.

En base a las evidencias anteriores, se estudiaron los posibles efectos de la administración subcrónica de una mezcla de dos plaguicidas neonicotinoides PONCHO 600 (clotianidina) y CALYPSO 480 (tiacloprid), agonistas de los receptores nicotínicos para acetilcolina, con la finalidad de demostrar un posible daño neurodegenerativo en el hipocampo de la rata Wistar y por lo tanto, alteraciones conductuales en pruebas de aprendizaje y memoria en el Laberinto Acuático de Morris.

### 3.1 Hipótesis

La administración subcrónica de una mezcla de dos plaguicidas neonicotinoides: PONCHO 600 (clotianidina) y CALYPSO 480 (tiacloprid) agonistas de los receptores nicotínicos para acetilcolina, produce cambios conductuales y daño neurodegenerativo en el hipocampo y corteza motora de la rata Wistar.

### 3.2 Objetivos

#### 3.2.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la administración subcrónica de la mezcla de PONCHO 600 y CALYPSO 480 sobre el hipocampo y corteza motora de la rata Wistar a nivel conductual y neurodegenerativo.

#### 3.2.2 Objetivos específicos

- Determinar los posibles signos nerviosos (tremores, ataxia, convulsiones, etcétera) y la sobrevivencia de los animales después de la administración oral de una mezcla de plaguicidas neonicotinoides a dosis decrecientes: 5/10, 3/10 y 2/10 de la DL50 de la hoja de datos de seguridad de Bayer CropScience para cada compuesto.

- Evaluar el efecto de la administración subcrónica de una mezcla de dos plaguicidas neonicotinoides (PONCHO 600 y CALYPSO 480) en el aprendizaje y la memoria de la rata Wistar en el Laberinto Acuático de Morris.
- Después del esquema de administración subcrónica, realizar un estudio histológico del hipocampo y la corteza motora, para examinar la posible presencia de células en proceso de neurodegeneración en el cerebro de la rata Wistar.

#### 4) MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon ratas macho, convencionales, de la estirpe Wistar, de 300-310 g de peso, proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM; los animales fueron alojados en cajas transparentes de acrílico. La temperatura del cuarto de alojamiento osciló entre los 20 a 22 °C; con 15 recambios de aire por hora y un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad, regulado con un *timer* de la marca TORK modelo 403A, conectado a la fuente de energía. Las ratas fueron alimentadas con dieta de roedor de la marca LabDiet 5001 Rodent Diet y agua potable *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales se realizaron bajo las condiciones éticas y de manejo señaladas en la NOM-O62-ZOO-1999: “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Los plaguicidas neonicotinoides utilizados, PONCHO 600 (Clotianidina) y CALYPSO 480 (Tiacloprid), corresponden a los producidos y/o importados por

Laboratorios Bayer CropScience México. La concentración del principio activo de PONCHO es de 600g de clotianidina por litro de producto y la de CALYPSO de 480g de tiacloprid en un litro. La dosis letal cincuenta oral en rata, es de: >2000 mg/kg y >300 - <500 mg/kg para PONCHO y CALYPSO, respectivamente (Hojas de Datos de Seguridad de Laboratorios Bayer CropScience México, 2005).

#### 4.1 Administración subcrónica de neonicotinoides

Para observar la posible signología y encontrar una dosis de los plaguicidas combinados que generará la muerte del menor número de animales después de la primera dosis y hasta finalizar el periodo de administración subcrónica, se utilizaron tres grupos (Grupo 1,2 y 3) de ratas con una n de 10 cada uno, las cuales recibieron dosis decrecientes de los plaguicidas combinados, determinadas a partir de la dosis letal cincuenta de cada uno, presentadas en las hojas de datos de seguridad de Laboratorios Bayer CropScience. Además, se administraron 10 ratas con solución salina fisiológica (SSF) como grupo control (Grupo 4).

Los plaguicidas fueron diluidos 1:5, es decir, por cada 100 mL de plaguicida se agregaron 400 ml de SSF; esto con la finalidad de evitar la subdosificación, ya que en las dosis más reducidas, los plaguicidas se quedaban impregnados en las paredes de la jeringa de administración. Una vez diluidos se conservaron en recipientes separados y se mezclaron hasta el momento previo a la administración en un vaso de precipitado de 10 mL, en el cual se combinó la dosis correspondiente para cada rata y se tomó con una cánula de alimentación forzada conectada a una jeringa de 3 o 5 mL

según el volumen a administrar, el cual osciló entre 1 a 3 mL por animal dependiendo de la dosis en miligramos.

Los grupos 1, 2 y 3 fueron administrados con 5/10 (1000 mg/kg de PONCHO y 200 mg/kg de CALYPSO), 3/10 (600 mg/kg de PONCHO y 120 mg/kg de CALYPSO) y 2/10 (400 mg/kg de PONCHO y 80 mg/kg de CALYPSO) de la DL50 de cada plaguicida respectivamente y el grupo 4 con SSF.

Los animales fueron administrados una hora después del inicio de su ciclo de oscuridad y se mantuvieron en observación por lo menos las cuatro horas siguientes. Se identificó la signología de los animales con cada una de las dosis y se registró la mortalidad.

Los animales sobrevivientes a la primera dosis continuaron con un esquema de administración subcrónica, cada 72 horas durante 28 días, es decir, hasta completar 10 administraciones; durante este periodo de tiempo se monitoreó la pérdida o ganancia de peso, así como el estado de salud general. Los animales fueron pesados cada 72 horas para corregir la dosis de plaguicida a administrar y para cuantificar porcentualmente que la pérdida no rebasará el 20% de su peso corporal inicial, pues de haber sido así se habría realizado la eutanasia. Durante el periodo de administración, los animales estuvieron en observación constante para identificar la posible presencia de signos neurológicos.

El intervalo de administración fue determinado con base en estudios toxicocinéticos en ratas, en los que se menciona que después de la administración de clotianidina a una dosis de 250 mg/kg, la cantidad de este principio activo en cerebro a las 72 horas

no alcanza el microgramo ( $\mu\text{g}$ ) por gramo de tejido cerebral (Weber, 2000); como se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 1**  
Radioactividad residual total en tejidos por medio de la cuantificación por centelleo líquido, 72 horas después de la administración de clotianidina en ratas.

Sample	TRR ( $\mu\text{g/g}$ )				
	Dose (ng/kg bw)				
	2.5		250	25 <sup>b</sup>	2.5 <sup>c</sup>
	Test 2-3		Test 4	Test 5	Test 7
	Male	Female	Male	Male	Male
Red blood cells	0.0056	0.0044	0.789	0.0537	0.0119
Plasma	0.0033	0.0027	0.361	0.0257	0.0079
Spleen	0.002	<LOQ	0.263	<LOQ	0.0047
Gastrointestinal tract	0.0021	0.0031	0.245	<LOQ	0.0234
Liver	0.0313	0.0167	2.880	0.2077	0.0329
Kidney	0.0093	0.0070	0.864	0.0693	0.0380
Testes	0.0011	---	0.167	0.0124	0.0031
Skeletal muscle	<LOQ	<LOQ	0.235	<LOQ	0.0028
Bone (femur)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.0041
Heart	0.0022	0.0022	0.318	0.0219	0.0046
Lung	0.0042	0.0037	0.560	0.0400	0.0084
Brain	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.0018
Skin	0.0035	0.0034	0.317	<LOQ	0.0104
Carcass	0.0020	0.0021	0.254	0.0267	0.0037

(Weber, 2000).

LOQ, limit of quantification

En el caso del tiacloprid, cuando es administrado a una dosis de 100 mg/kg, la cantidad del mismo en el cerebro después de 48 horas, tampoco alcanza el  $\mu\text{g}$  por g de tejido cerebral analizado (Klein y Bornatsch, 1998), como puede observarse en el Cuadro 2.

**Cuadro 2**  
Radioactividad residual en órganos y tejidos de ratas, 48 horas después de la administración de <sup>14</sup>C-metileno unido a tiacloprid.

Organ/tissue	Residual radioactivity ( $\mu\text{g/g}$ equivalent)							
	1 mg/kg (i.v)		1 mg/kg (gavage)		1 mg/kg (repeated doses, gavage)		100 mg/kg (gavage)	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females	Males	Females
Erythrocytes	0.0029	0.0035	0.0030	0.0036	0.0027	0.0032	0.4118	9.572
Plasma	0.0031	0.0042	0.0032	0.0041	0.0030	0.0035	0.4265	11.97
Spleen	0.0040	0.0032	0.0032	0.0031	0.0033	0.0032	0.3510	8.395
Gastrointestinal tract	0.0209	0.0193	0.0086	0.0140	0.0127	0.0116	5.5612	215.5
Liver	0.0147	0.0148	0.0165	0.0140	0.0178	0.0171	2.0905	30.23
Kidney	0.0093	0.0173	0.0109	0.0160	0.0136	0.0195	1.4715	23.04
Fat	0.0019	0.0033	0.0020	0.0016	0.0015	0.0016	0.2810	6.747
Testes	0.0022	---	0.0020	---	0.0017	---	0.2796	---
Uterus	---	0.0059	---	0.0029	---	0.0032	---	8.763
Muscle	0.0022	0.0022	0.0022	0.0025	0.0018	0.0020	0.2489	9.865
Bone	0.0024	0.0033	0.0022	0.0034	0.0026	0.0044	0.3112	5.223
Heart	0.0029	0.0031	0.0027	0.0034	0.0024	0.0031	0.4028	12.33
Lung	0.0057	0.0064	0.0065	0.0066	0.0047	0.0056	0.7116	13.15
Brain	0.0014	0.0019	0.0013	0.0018	0.0013	0.0018	<b>0.1623</b>	7.129
Skin	0.0041	0.0044	0.0060	0.0042	0.0032	0.0048	0.5190	10.07
Carcass	0.0025	0.0032	0.0035	0.0041	0.0022	0.0027	0.3095	10.47

(Klein y Bornatsch, 1998).

LOQ, limit of quantification

Con base en los datos anteriores fue que los animales se administraron cada 72 horas, con la finalidad de reducir la posibilidad de desensibilización de los receptores colinérgicos nicotínicos cerebrales.

Setenta y dos horas después de la décima administración se aplicó la eutanasia a todos los animales, con una sobredosis (150 mg/kg) de pentobarbital sódico vía intraperitoneal y después se realizó la perfusión intracardiaca, primero con 250 mL de SSF, con la finalidad de eliminar la sangre de los órganos, especialmente del encéfalo y después con 250 mL de formol al 10%. Al finalizar la perfusión, se extrajeron los cerebros y se conservaron por separado en frascos de vidrio, en 25 mL de formol al 10% hasta su corte y procesamiento para la técnica histológica.

## 4.2 Laberinto Acuático de Morris

El Laberinto Acuático de Morris (LAM) consistió en una piscina cilíndrica de 170 cm de diámetro y 50 cm de altura y un fondo verde oscuro, que se llenó con agua a una temperatura de  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$  y hasta una altura de 30 cm, dos centímetros por encima de una plataforma rectangular de acrílico transparente (19 x 22 cm) colocada en una posición constante y equidistante del centro y la pared de la piscina, dentro de uno (noreste) de los cuatro cuadrantes imaginarios (noreste, noroeste, sureste y suroeste) en los que se dividió ésta (Guerrero Aguilera *et al.*, 2016).

La piscina estaba rodeada por paredes blancas, en las que se colocaron tres imágenes como señales visuales espaciales para los animales y que representaron tres de las cuatro posibles posiciones de partida; la cuarta posición fue identificada por los

animales como la puerta de entrada a la piscina, la cual se encontraba entre los cuadrantes suroeste y sureste (Guerrero Aguilera *et al.*, 2016), como se ilustra en el Figura 1.

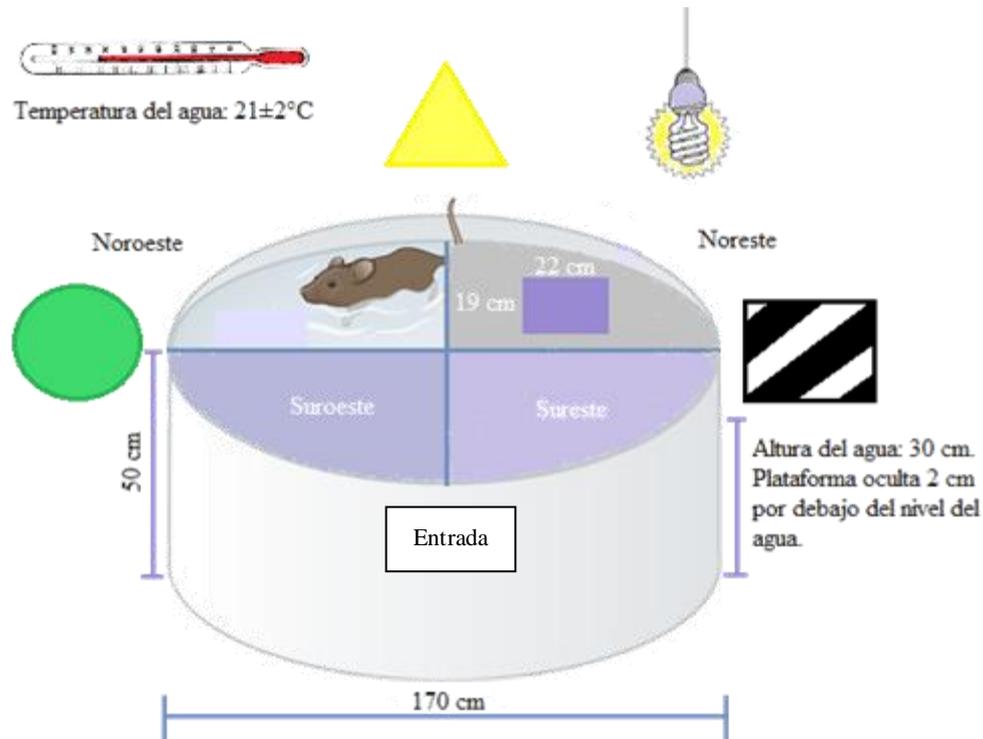


Figura 1. Laberinto Acuático de Morris. Representación de los lineamientos y dimensiones utilizadas para realizar las pruebas en el LAM. Se ilustran las cuatro posibles posiciones de partida con un círculo verde, un triángulo amarillo y un rectángulo a rayas, la cuarta posición fue identificada por los animales como la puerta de entrada a la piscina, la cual se encontraba entre los cuadrantes suroeste y sureste. La plataforma siempre se ubicó en el cuadrante noreste a una distancia equidistante del centro y de la pared de la piscina. La piscina se llenó hasta una altura de 30 cm, 2 cm por encima de la base de la plataforma (19x22 cm) y la temperatura del agua se mantuvo en  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Previo a la realización de las pruebas de aprendizaje y memoria en el LAM, dos grupos de ratas ( $n=10$  cada uno) fueron administrados, uno de ellos con 2/10 de la mezcla de la DL50 de cada plaguicida y el otro con SSF, cada 72 horas durante un periodo de 28 días, es decir, hasta realizar diez administraciones con plaguicidas o SSF.

Setenta y dos horas después de la última administración, las ratas fueron sometidas a 5 sesiones de aprendizaje, que consistieron en 4 ensayos por día durante 4 días consecutivos (días 1-4) y un ensayo único en el día 6, en los que se cuantificó la latencia de llegada a la plataforma. En el día uno, sólo en el primer ensayo, cada rata se colocó en una de las cuatro posibles posiciones de partida y si no encontraba la plataforma en los primeros 60 segundos, se le guiaba hasta la misma y se le dejaba sobre ella durante 30 segundos, con la finalidad de que se ubicará espacialmente. En los siguientes ensayos, las ratas se liberaron de los cuatro diferentes puntos de partida y si no encontraron la plataforma durante los primeros 60 segundos, se tomó este tiempo como la puntuación máxima y se retiró al animal de la piscina (Guerrero-Aguilera *et al.*, 2016).

Con la finalidad de evaluar la Memoria a Corto Plazo (MCP), en el día 7, se realizó un ensayo único, en el que se colocó a cada animal en una de las cuatro posibles posiciones de partida en ausencia de la plataforma, para cuantificar el número de cruces realizados en el lugar en el que se encontraba la misma y el tiempo de permanencia en ese cuadrante (Guerrero-Aguilera *et al.*, 2016).

En el día 13 se evaluó la Memoria a Largo Plazo (MLP), se realizó un ensayo único con presencia de la plataforma, en el que se liberó a cada rata desde una de las cuatro posibles posiciones de partida y se cuantificó la latencia de llegada a la misma (Guerrero-Aguilera *et al.*, 2016). La metodología día por día se resume en la Figura 2.

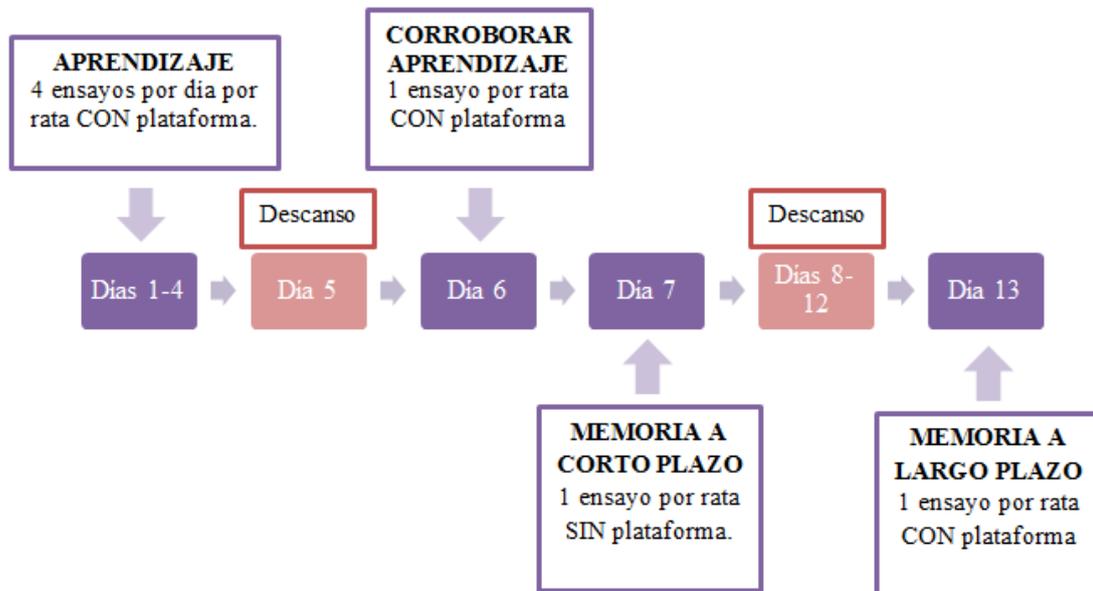


Figura 2. Metodología: Laberinto Acuático de Morris. Se esquetizan los días y las condiciones en las que se realizaron las pruebas de aprendizaje y memoria en el LAM, las cuales iniciaron 72 h después de la décima administración con SSF o neonicotinoides.

Setenta y dos horas después de la última prueba en el LAM, se aplicó la eutanasia a todos los animales y se realizó la perfusión intracardiaca de cada uno, como fue explicado anteriormente. Los cerebros se conservaron individualmente en frascos de vidrio en 25 mL de formol al 10% y fueron procesados para realizar las tinciones cresil violeta y fluoro-jade.

### 4.3 Histología

Para la histología se procesaron 20 cerebros, cinco de ellos pertenecientes a ratas administradas con 2/10 de la DL50 de la mezcla de plaguicidas, a las que se les aplicó la eutanasia 72 h después de la décima dosis (Grupo Neo 72 h) con sus respectivos controles, es decir, cinco cerebros pertenecientes a ratas administradas con SSF durante el mismo periodo subcrónico y tiempo de muerte (Grupo Ctrl 72 h).

Los otros diez cerebros pertenecientes a ratas administradas bajo las mismas condiciones, cinco de ellas con 2/10 de la mezcla de plaguicidas (Grupo Neo 19 d) y cinco con SSF (Grupo Ctrl 19 d), pero sometidas a pruebas en el LAM, a las que se les aplicó la eutanasia 19 días después de la décima administración.

Todos los cerebros fueron cortados manualmente e introducidos de manera individual en casetes de plástico y después se realizaron lavados de 30 minutos cada uno, con agua de la llave, con la finalidad de eliminar el formol de los tejidos. Al finalizar el último lavado se dejaron sumergidos en agua de la llave durante toda la noche y al día siguiente se realizó un lavado final de 30 minutos. Luego los cerebros fueron deshidratados, para ello se sumergieron en alcoholes a concentraciones ascendentes: alcohol (OH) 70%, 80%, 96%, 100%, después en una dilución 1:1 de OH 100%/xilol y por último en xilol puro.

Tras la deshidratación, se realizó una preinclusión en parafina durante dos horas y finalmente cada tejido cerebral fue colocado en moldes cúbicos previamente llenados con parafina caliente, se dejaron enfriar y con ello finalizó el proceso de inclusión.

Se realizaron cortes coronales del tejido cerebral de 5  $\mu$ m de grosor, con el uso del micrótopo, hasta observar el hipocampo dorsal del cerebro de la rata, tomando como referencia las regiones del Cuerno de Amón 1,2 y 3 (CA1, CA2 y CA3) y el Giro Dentado (GD).

La distancia considerada para la recolección de los cortes coronales fue de aproximadamente 3.8 mm posterior a bregma como se muestra en la Figura 3 (Paxinos y Watson, 1998).

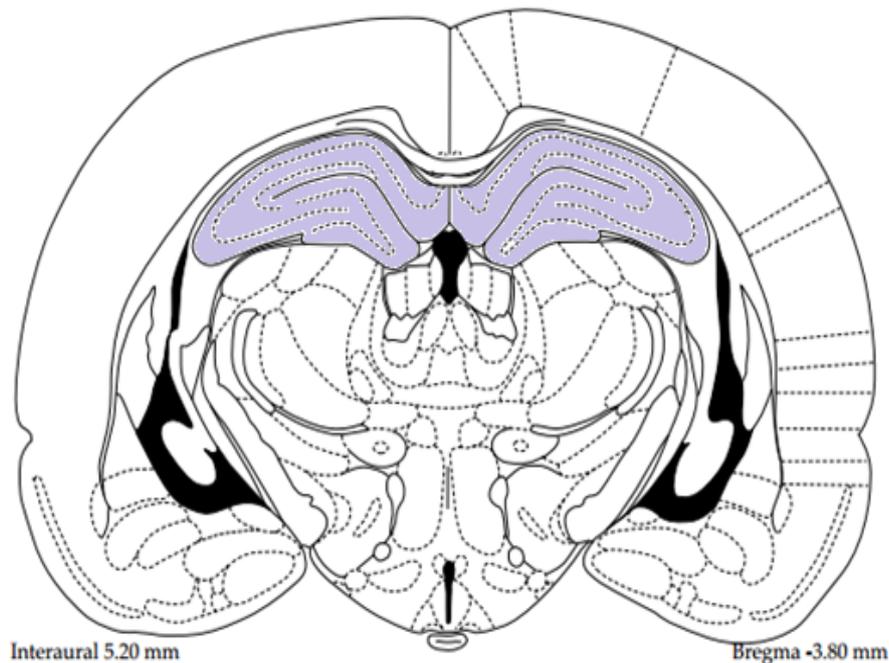
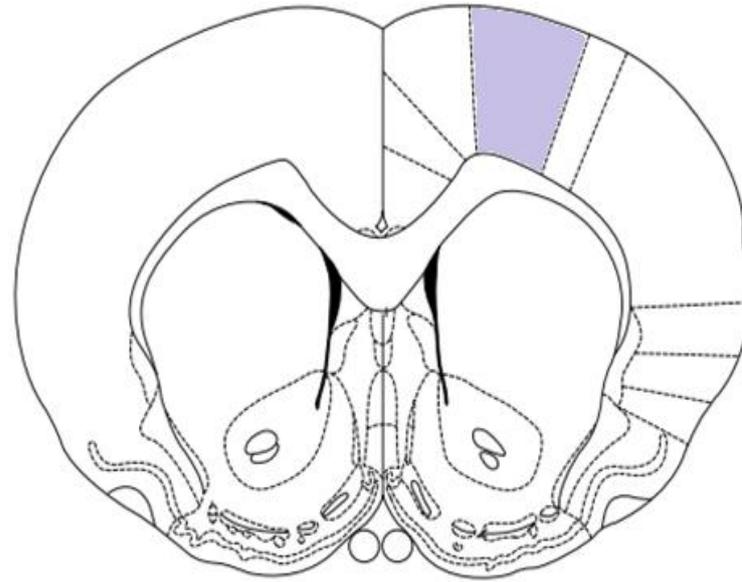


Figura 3. Hipocampo dorsal de la rata. En la figura de arriba se identifica en color plata, el hipocampo dorsal de la rata, visto desde un corte coronal del cerebro a una altura de 3.8 mm posterior a bregma (Paxinos y Watson, 1998).

Con la finalidad de conocer los posibles efectos histopatológicos y su relación con deficiencias motrices para realizar adecuadamente las pruebas en el LAM, se realizaron cortes coronales de 5  $\mu$ m de grosor de la corteza motora primaria (M1), aproximadamente 1.20 mm anterior a bregma, como se muestra en la Figura 4 (Paxinos y Watson, 1998).

Se obtuvieron aproximadamente 30 cortes seriados por cada cerebro procesado, considerados como suficientes para realizar las tinciones que se describen a continuación y el posterior conteo celular.



Interaural 10.20 mm

Bregma 1.20 mm

Figura 4. Corteza motora de la rata. En la figura de arriba se identifica en color plata la corteza motora de la rata, vista desde un corte coronal del cerebro a una altura de 1.20 mm anterior a bregma (Paxinos y Watson, 1998).

#### 4.3.1 Cresil violeta

Para esta tinción los cortes fueron desparafinados en:

Xilol puro	30 minutos
Xilol : OH 100% (1:1)	3 minutos

Posteriormente se hidrataron en alcoholes a concentraciones descendentes y finalmente en agua destilada:

OH 100%	3 minutos
OH 96%	3 minutos
OH 70%	3 minutos
Agua destilada	3 minutos

Después se sumergieron durante una hora en el colorante de violeta de cresilo y pasada la hora, se deshidrataron en alcoholes a concentraciones ascendentes hasta llegar a xilol puro:

OH 96%	2 minutos
OH 96%	2 minutos
OH 100%	2 minutos
OH 100% : Xilol (1:1)	2 minutos
Xilol	2 minutos

#### 4.3.2 Fluoro-Jade

Del mismo modo que en la tinción anterior, los tejidos fueron desparafinados e hidratados; sin embargo, tras la hidratación se continuó con el siguiente procedimiento: se eliminó el excedente de agua de los tejidos y se cubrieron con una solución de montaje que contenía OH 80% y agua al 1% de gelatina, durante 20 minutos. Después se eliminó la solución y los tejidos fueron calentados a 50°C durante 30 minutos. Pasados los 30 minutos se colocaron en:

OH 80%	5 minutos
OH 70%	2 minutos
Agua destilada	4 minutos

Posteriormente los tejidos fueron embebidos en una solución de permanganato de potasio al 0.06% durante 10 minutos y después se les realizaron dos lavados de 2 minutos cada uno, con agua destilada.

Los pasos a seguir después del último lavado con agua destilada se realizaron en oscuridad.

Los tejidos fueron cubiertos completamente con el reactivo de fluoro-jade durante 25 minutos y después se retiró el excedente del mismo con un único lavado de 2 minutos en agua destilada y luego fueron secados a una temperatura de 50°C durante 5 minutos y finalmente embebidos en xilol hasta su montaje.

#### 4.4 Conteo celular

Se seleccionaron 8 cortes seriados por rata del hipocampo dorsal, teñidos con cresil violeta y de cada uno, se tomaron microfotografías en el objetivo 40X del CA1 (Kiyota *et al.*, 1991), CA3, CA4 y GD, para la cuantificación celular de 250  $\mu\text{m}$  lineales por región, tanto del hipocampo derecho como de su homólogo izquierdo. Para el conteo de células viables solamente se tomaron en cuenta las células con una membrana nuclear bien definida y nucléolos prominentes y para el conteo de células dañadas, aquellas que se observaron picnóticas.

#### 4.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las latencias de llegada del LAM, se analizaron con una ANOVA de un factor, seguida de una prueba *post-hoc* de Duncan; el análisis de los porcentajes de permanencia en el cuadrante, se realizó con una prueba Chi-cuadrada y el número de cruces, así como las latencias promedio con una t-Student. Los datos obtenidos del conteo celular se analizaron con una ANOVA de un factor seguida de

una prueba *post-hoc* de Tukey. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a partir de una  $P < 0.05$ .

## 5) RESULTADOS

### 5.1 Administración subcrónica de neonicotinoides

Todos los animales del grupo 1 y 2 murieron, los cuales recibieron las dosis más altas de la mezcla de neonicotinoides (5/10 y 3/10 de la DL50 respectivamente) y previamente presentaron los siguientes signos: disminución en el consumo de agua y alimento, disminución de la actividad y ptosis, seguida de marcha lenta y postración, mioclonias anteriores, así como sobresaltos durante la postración, que levantaban a algunos animales hasta 10 centímetros desde el piso de la caja, en algunos casos se observaron movimientos de carrera y chillidos; con el paso de las horas la presencia y ausencia de signos se alternaba, pero tras episodios continuos de mioclonias anteriores y postración, los animales desarrollaron disnea y crisis convulsivas con duración de pocos segundos (aproximadamente 10s) en las que se sacudían agresivamente de manera generalizada y que finalmente culminaban con la muerte, la cual se presentó de 3 a 4 horas después de la administración en la mayoría de los casos registrados, ya que algunas muertes ocurrieron durante la noche.

Los animales del grupo 3 presentaron una signología muy similar, se observó disminución en el consumo de agua y alimento, disminución en la actividad, ptosis,

marcha lenta, chillidos, mioclonias anteriores, postración y disnea, pero sólo en el 20% hubo convulsiones y muerte.

En el Cuadro 3 se presentan los signos observados con cada una de las dosis administradas.

Cuadro 3  
Signología observada con cada dosis de la mezcla de neonicotinoídes.

Signos observados	Dosis administrada			
	Control	5/10 DL <sub>50</sub>	3/10 DL <sub>50</sub>	2/10 DL <sub>50</sub>
Disminución en consumo agua/alimento	-	x	x	x
Disminución de la actividad	-	x	x	x
Ptosis	-	x	x	x
Marcha lenta	-	x	x	x
Sobresaltos	-	x	x	-
Ataxia	-	x	x	-
Chillidos	-	x	x	x
Mioclonias anteriores	-	x	x	x
Postración	-	x	x	x
Disnea	-	x	x	x
Convulsiones	-	x	x	x

La mortalidad se representa por medio de una gráfica (Figura 5) en la que se observa el porcentaje de mortalidad con cada dosis administrada, donde se hace evidente que las dosis 5/10 y 3/10 de la mezcla de neonicotinoides son 100% letales para los animales después de la primera administración.

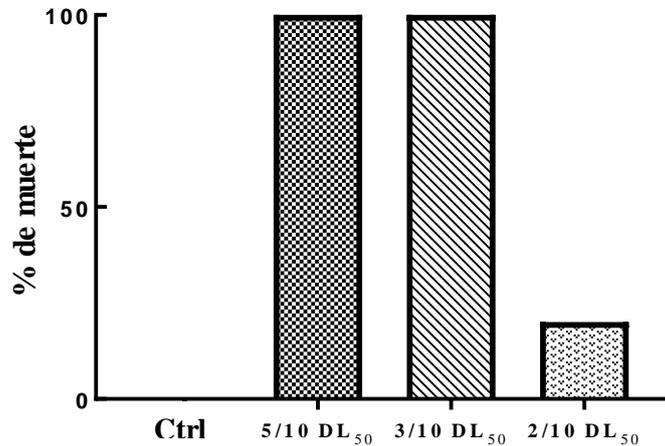


Figura 5. Porcentaje de mortalidad para cada una de las dosis de la mezcla de neonicotinoides. Como se observa en la gráfica, el porcentaje de mortalidad fue del 100% para las dosis 5/10 y 3/10 de la DL<sub>50</sub> de los neonicotinoides combinados; por otro lado, con la dosis 2/10 el porcentaje de mortalidad fue del 20%, y fue por ello que se eligió esta dosis para el protocolo de administración subcrónico.

La dosis 2/10 (400 mg/kg y 80 mg/kg de PONCHO 600 y CALYPSO respectivamente) provocó la muerte del 20% de los animales (Figura 5) y fue por ello que se eligió para el protocolo de administración subcrónica y por ende, para los experimentos siguientes; esta dosis no tuvo repercusiones en la sobrevivencia de las demás ratas durante las siguientes administraciones, sin embargo, se observaron signos como: disminución en el consumo de agua y alimento, disminución de la actividad, ptosis y mioclonias anteriores de ligeras a moderadas, que sólo se manifestaron después de la primera y la segunda dosis. Una pérdida de peso que no rebasó el 10% del peso corporal inicial se observó en ratas control y experimentales, sin embargo, a partir de la cuarta administración comenzaron a recuperarlo y lo

mantuvieron, e incluso algunos animales aumentaron más allá de su peso corporal inicial.

## 5.2 Laberinto Acuático de Morris

Como se observa en la Figura 6, los resultados obtenidos en las pruebas de aprendizaje durante los días 1 al 4 y 6, muestran que las latencias de llegada de las ratas administradas con la mezcla de neonicotinoides, no fueron estadísticamente diferentes cuando se les comparó con las ratas del grupo control; del mismo modo ocurrió en el día 13, en el que se evaluó la MLP, donde las latencias de llegada promedio fueron 8.66 s para el grupo control y 10.88 s para el grupo administrado con neonicotinoides, las cuales tampoco fueron estadísticamente diferentes.

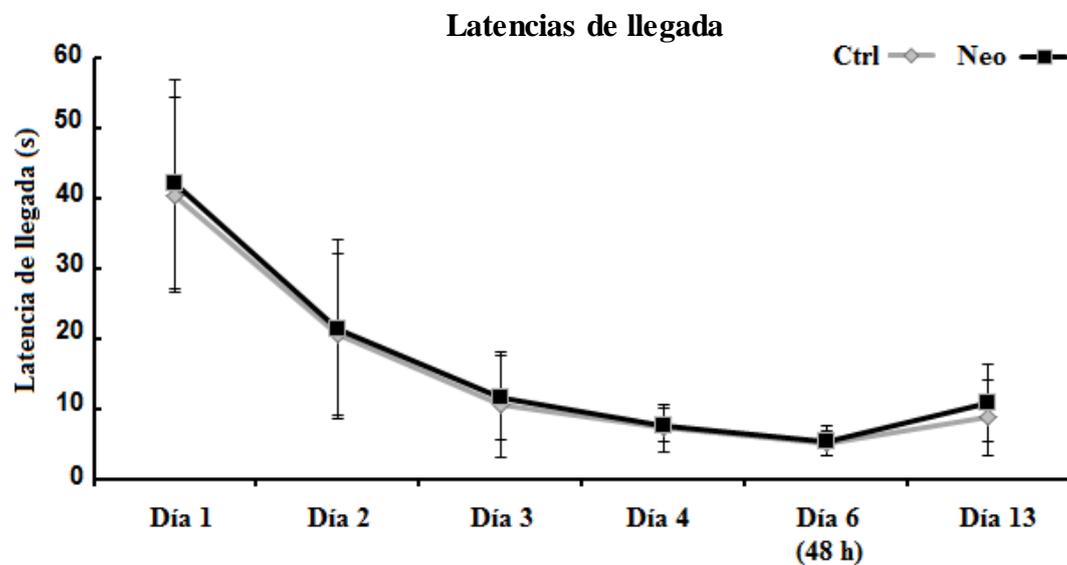


Figura 6. LAM: Latencias de llegada. Los ensayos para las pruebas de aprendizaje (días 1-4 y 6) y memoria a largo plazo (día 13), no arrojaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon ambos grupos (n=10). (Ctrl: control, Neo: neonicotinoides).

En la figura 7 se grafican las latencias de llegada promedio finales para cada grupo, siendo 15.38 para las ratas del grupo control y 16.45 segundos para el grupo administrado con la mezcla de neonicotinoideos.

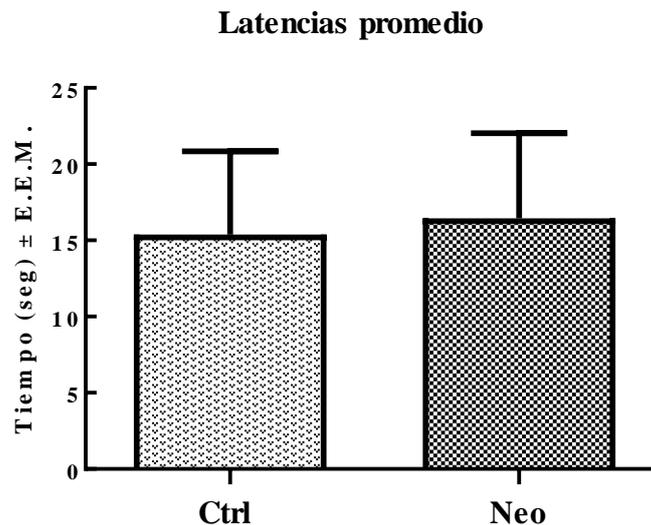


Figura 7. LAM: Latencias promedio. Latencias de llegada promedio al final de las pruebas en el LAM, donde se aprecia el tiempo en segundos que tardaron los animales del grupo control (Ctrl) en comparación con el experimental (Neo); la latencia de llegada promedio final de los animales experimentales fue de 16.45 segundos, la cual no resultó estadísticamente diferente cuando se le comparó con el grupo control, con una latencia de llegada promedio final de 15.38 segundos. (n= 10).

En el día 7 se evaluó la MCP en ausencia de la plataforma durante un tiempo de 60 segundos; los resultados revelaron una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en el número de cruces promedio realizados por las ratas control (4.6 cruces en 60 segundos) en comparación a las administradas con neonicotinoideos (2.8 cruces en 60 segundos) como puede observarse en la Figura 8. Sin embargo, el tiempo de permanencia en el cuadrante, no arrojó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, como puede observarse en la Figura 9, en la que se evidencia un 35% de permanencia en el cuadrante del grupo control en comparación con un 27% del grupo administrado con neonicotinoideos.

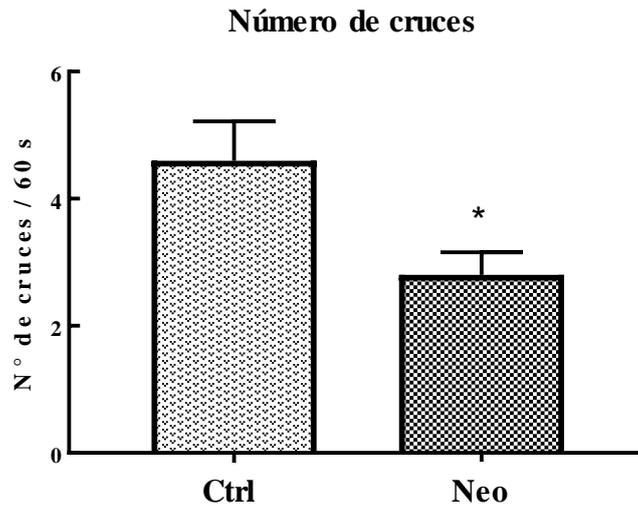


Figura 8. LAM: Número de cruces. Número de cruces promedio realizados por las ratas sometidas a la administración subcrónica de neonicotinoides (2.8 cruces/60s), comparado con el grupo control (4.6 cruces/60s), donde se aprecia una disminución en el número de cruces realizados por el grupo administrado con plaguicidas (Neo) en comparación con el grupo control (Ctrl) y que se hace evidente con una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (n=10; P<0.05).

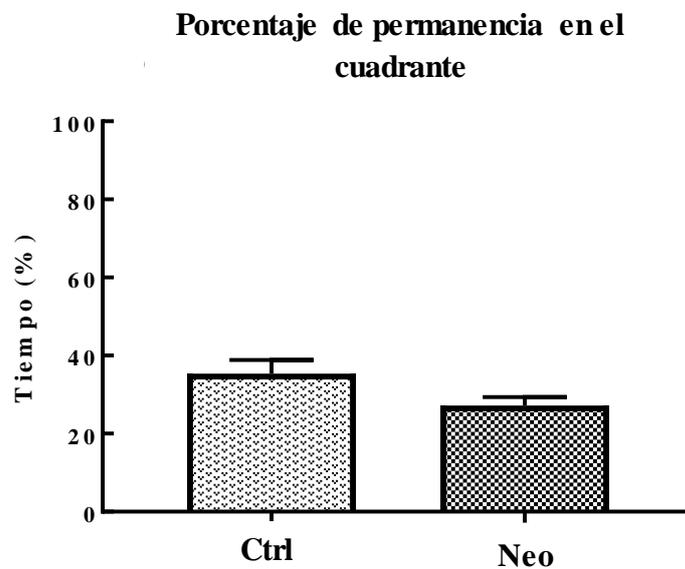


Figura 9. LAM: Permanencia en el cuadrante. Tiempo de permanencia en el cuadrante en 60 segundos representado en porcentaje, donde se aprecia un 27% de permanencia en ratas sometidas a la administración de neonicotinoides (Neo), comparado con un 35% de permanencia en los animales del grupo control (Ctrl) y que no resultó estadísticamente diferente cuando se compararon ambos grupos (n=10).

### 5.3 Histología

No se observó ningún hallazgo histopatológico importante en las regiones del CA1 y CA3 del hipocampo en ninguno de los cuatro grupos evaluados (Neo 72 h, Ctrl 72 h, Neo 19 d y Ctrl 19 d); mientras que en el CA4 en algunos casos, se observaron células picnóticas con retracción nucleosomática y una ligera pérdida de la arquitectura tisular.

En las figuras 10, 12 y 14 se presentan las microfotografías para las regiones CA1, CA3 y CA4 del hipocampo, teñidas con cresil violeta y vistas con el objetivo 40X, de los animales a los que se les aplicó la eutanasia 72 horas después de la décima administración.

Las figuras 11, 13 y 15 corresponden a las microfotografías de las regiones del CA1, CA3 y CA4 del hipocampo, pero de ratas a las que se les aplicó la eutanasia 19 días después de la décima administración, todas comparadas con sus respectivos controles.

Los hallazgos histopatológicos más representativos con la tinción cresil violeta se observaron en el GD de las ratas a las que se les aplicó la eutanasia 72 horas después de la décima administración con la mezcla de neonicotinoideas, donde se identificó retracción nucleosomática, picnosis y pérdida de la arquitectura tisular de ligera a moderada (Figura 16) en las células granulosas del brazo ectal y endal del GD, siendo el primero el más afectado.

Las células del GD de las ratas 19 días después de la última administración con plaguicidas presentaron hallazgos histopatológicos similares, pero menos severos (Figura 17. GD: 19 d).

Los cuatro grupos evaluados (Neo 72 h, Ctrl 72 h, Neo 19 d y Ctrl 19 d) fueron negativos a la tinción de Fluoro-Jade, ya que no se identificaron células en proceso de neurodegeneración en ninguna de las regiones del hipocampo, como se evidencia en las figuras 18 a 21, en las que se presentan microfotografías de animales sometidos a 10 dosis de neonicotinoides comparados con sus respectivos controles, observados con el objetivo 40X. Las microfotografías de esta tinción tienen el propósito de evidenciar el resultado negativo, es por ello que no se presentan microfotografías de los cuatro grupos.

En todos los grupos evaluados (Neo 72 h, Ctrl 72 h, Neo 19 d y Ctrl 19 d), en la corteza motora (CM) con la tinción cresil violeta, no se observaron hallazgos histopatológicos relevantes (Figuras 22 y 23).

Cuando se realizó la tinción Fluoro-Jade a los cortes de la corteza motora, tampoco se observaron células en proceso de neurodegeneración (fluorescentes), como se observa en las figuras 24 y 25.

Las microfotografías de las tinciones descritas se presentan a continuación (Figuras 10 a 25).

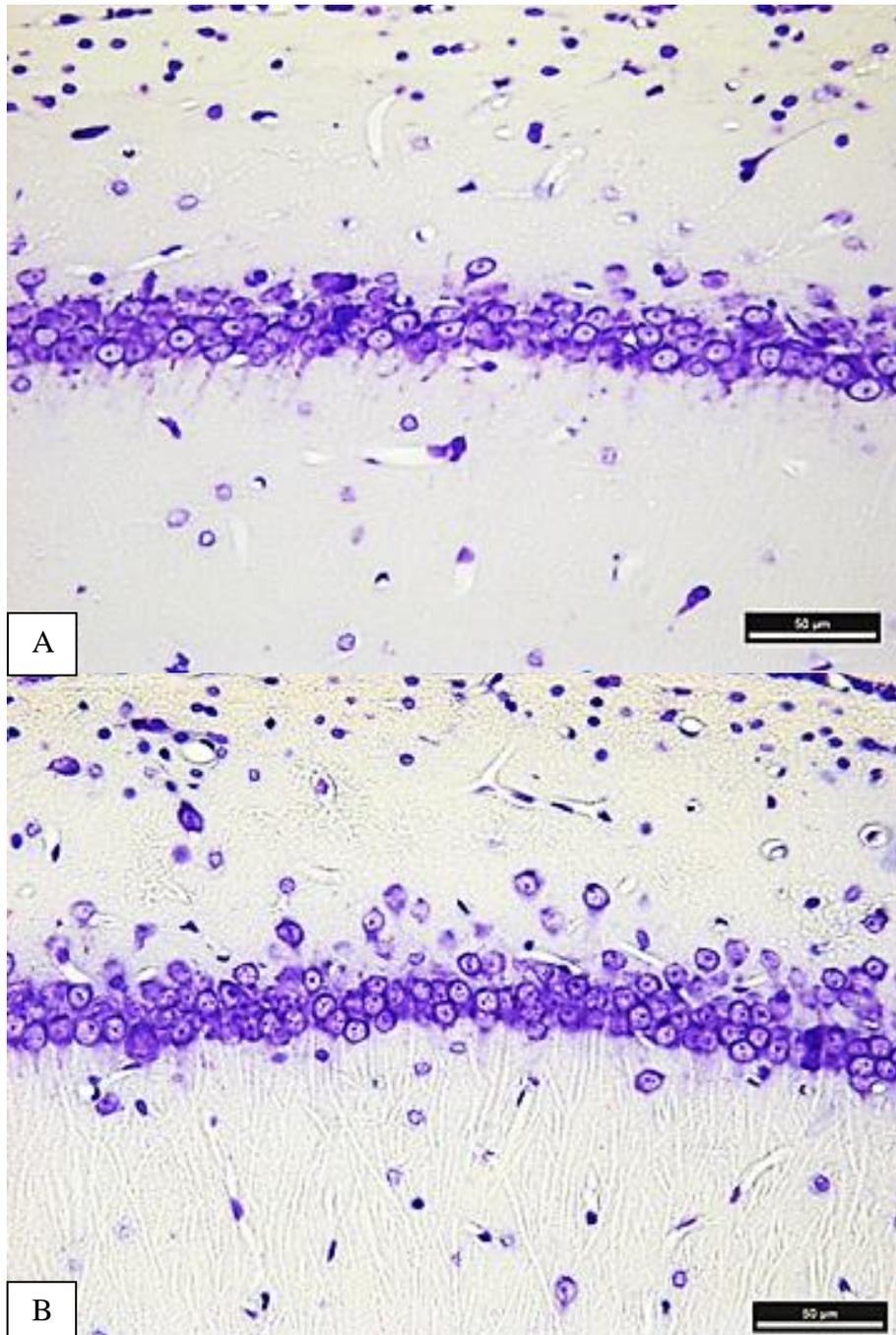


Figura 10. CA1: 72 h. Microfotografías de la tinción cresil violeta vistas con el objetivo 40X, que muestran el estrato de células piramidales de la región del CA1 del hipocampo dorsal. A, corresponde a una rata administrada con solución salina fisiológica (Ctrl 72 h) y B a una rata administrada con la mezcla de neonicotinoides (Neo 72 h); ambas 72 horas después de la décima administración. No se observa ningún hallazgo histopatológico relevante (n=5).

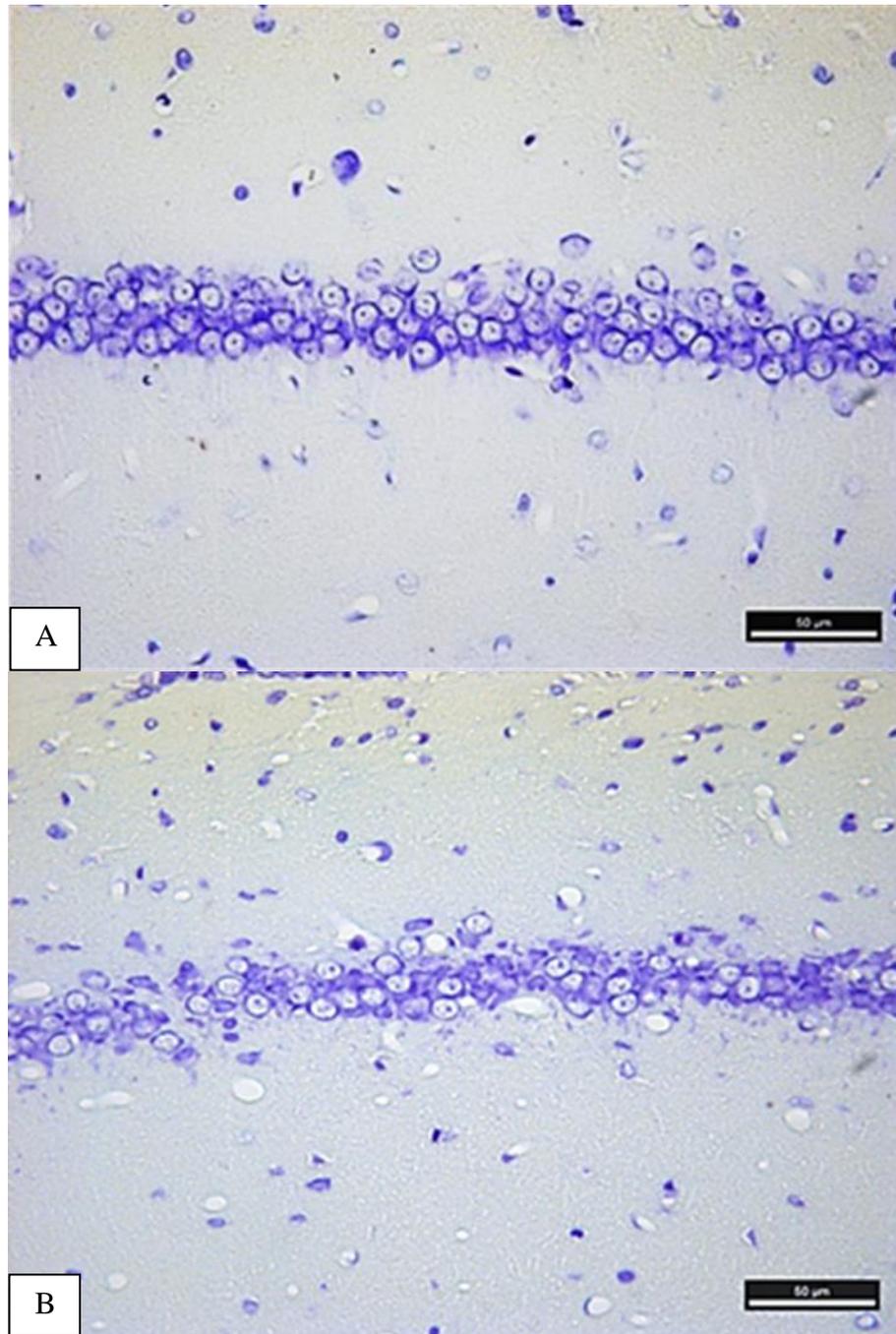


Figura 11. CA1: 19 d. Microfotografías de la tinción cresil violeta vistas con el objetivo 40X, que muestran el estrato de células piramidales de la región del CA1 del hipocampo dorsal. A, corresponde a una rata administrada con solución salina fisiológica (Ctrl 19 d) y B a una rata administrada con la mezcla de neonicotinoides (Neo 19 d); ambas, 19 días después de la décima administración. No se observa ningún hallazgo histopatológico relevante (n=5).

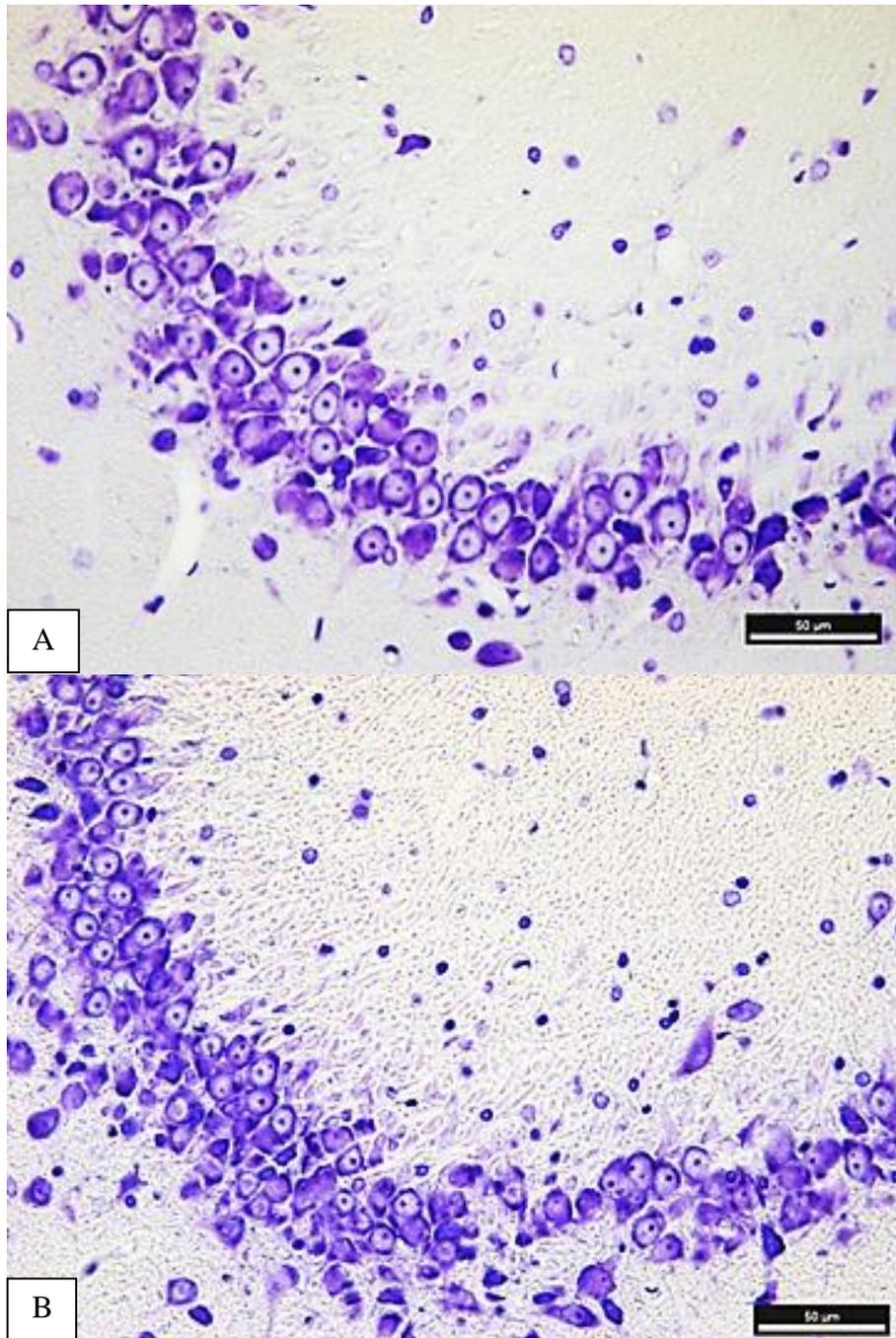


Figura 12. CA3: 72 h. Microfotografías de la tinción cresil violeta vistas con el objetivo 40X, que muestran las células piramidales de la región del CA3 del hipocampo dorsal. A, corresponde a una rata administrada con solución salina fisiológica (Ctrl 72 h) y B a una rata administrada con la mezcla de neonicotinoides (Neo 72 h); ambas, 72 horas después de la décima administración. No se observa ningún hallazgo histopatológico relevante (n=5).

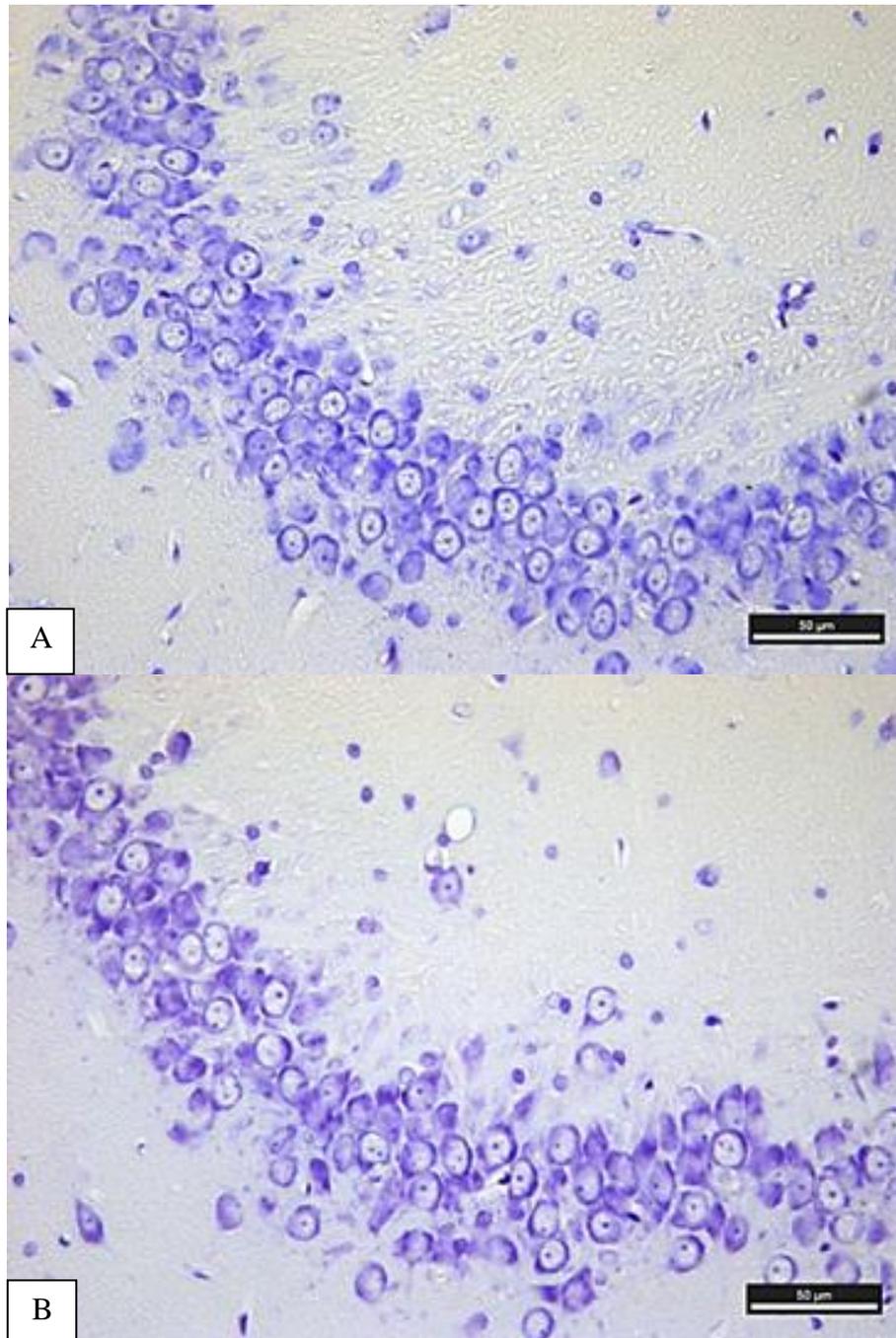


Figura 13. CA3: 19 d. Microfotografías de la tinción cresil violeta vistas con el objetivo 40X, que muestran el estrato de células piramidales de la región del CA3 del hipocampo dorsal. A, corresponde a una rata administrada con solución salina fisiológica (Ctrl 19 d) y B a una rata administrada con la mezcla de neonicotinoides (Neo 19 d); ambas, 19 días después de la décima administración. No se observa ningún hallazgo histopatológico relevante (n=5).

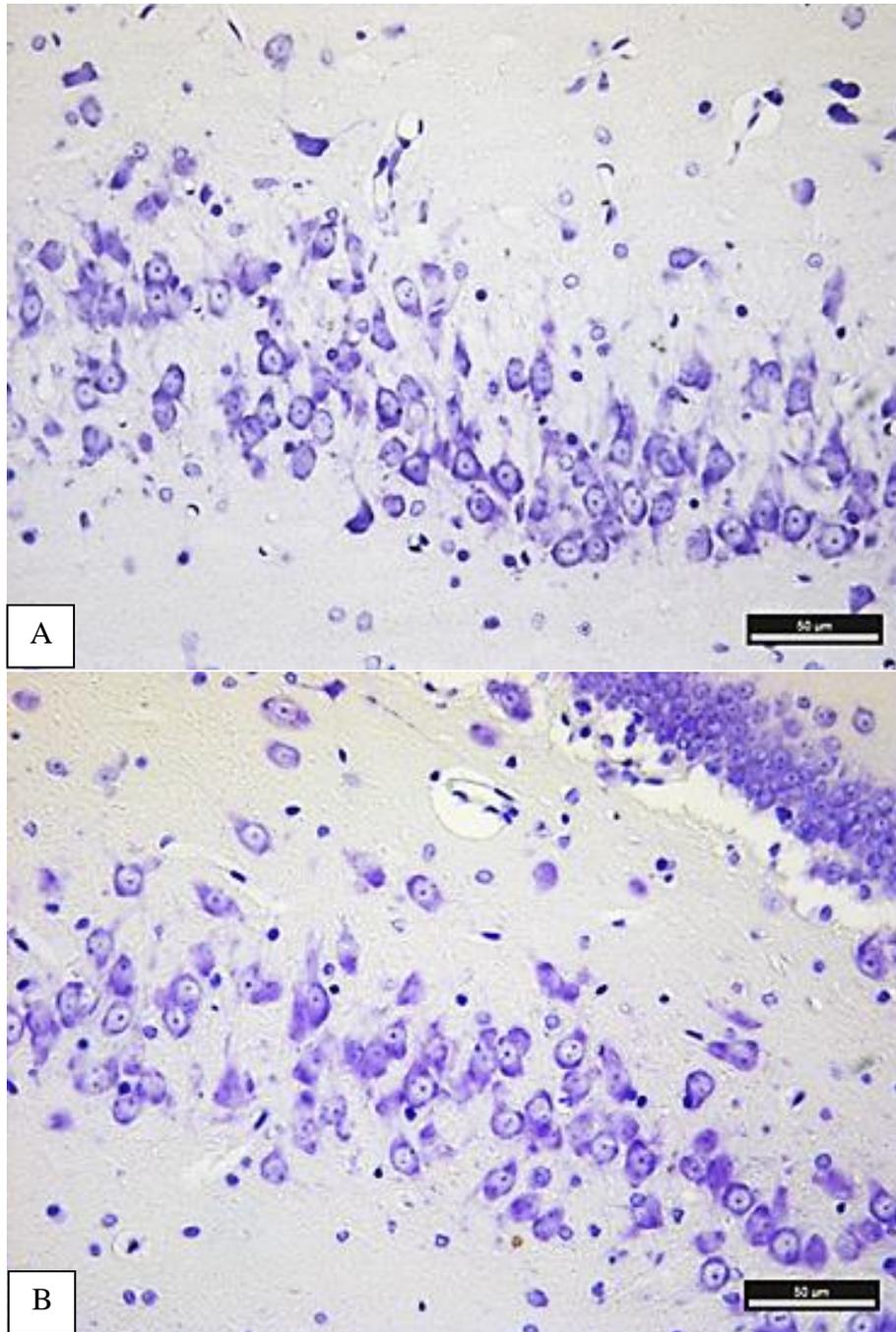


Figura 14. CA4: 72 h. Microfotografías de la tinción cresil violeta vistas con el objetivo 40X; que muestran el estrato de células piramidales de la región del CA4 del hipocampo dorsal. A, corresponde a una rata administrada con solución salina fisiológica (Ctrl 72 h) y B a una rata administrada con la mezcla de neonicotinoides; ambas (Neo 72 h), 72 horas después de la décima administración. No se observa ningún hallazgo histopatológico relevante (n=5).

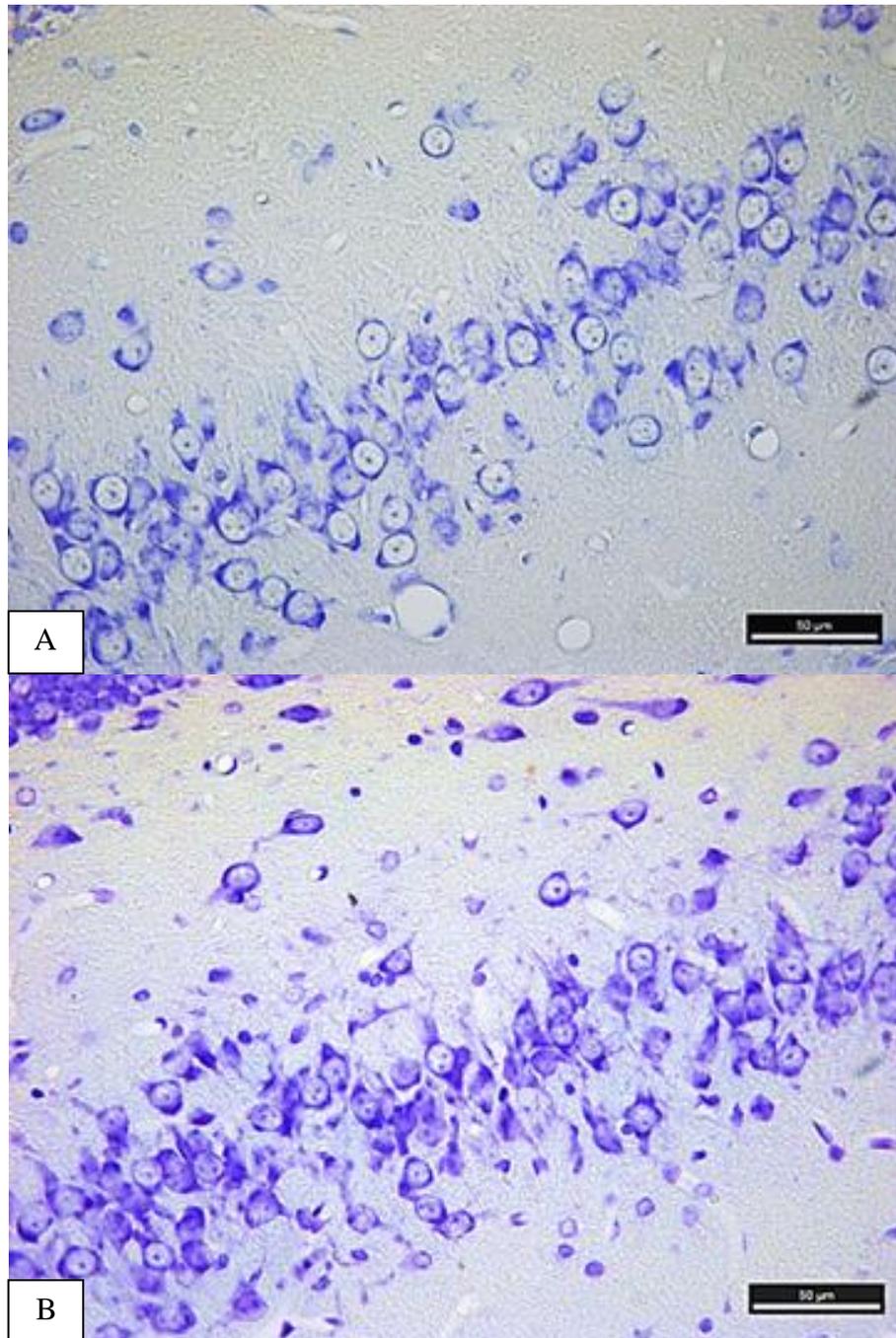


Figura 15. CA4: 19 d. Microfotografías de la tinción cresil violeta vistas con el objetivo 40X, que muestran el estrato de células piramidales de la región del CA4 del hipocampo dorsal. A, corresponde a una rata administrada con solución salina fisiológica (Ctrl 72 h) y B a una rata administrada con la mezcla de neonicotinoides (Neo 19 d); ambas, 19 días después de la décima administración. No se observa ningún hallazgo histopatológico relevante (n=5).

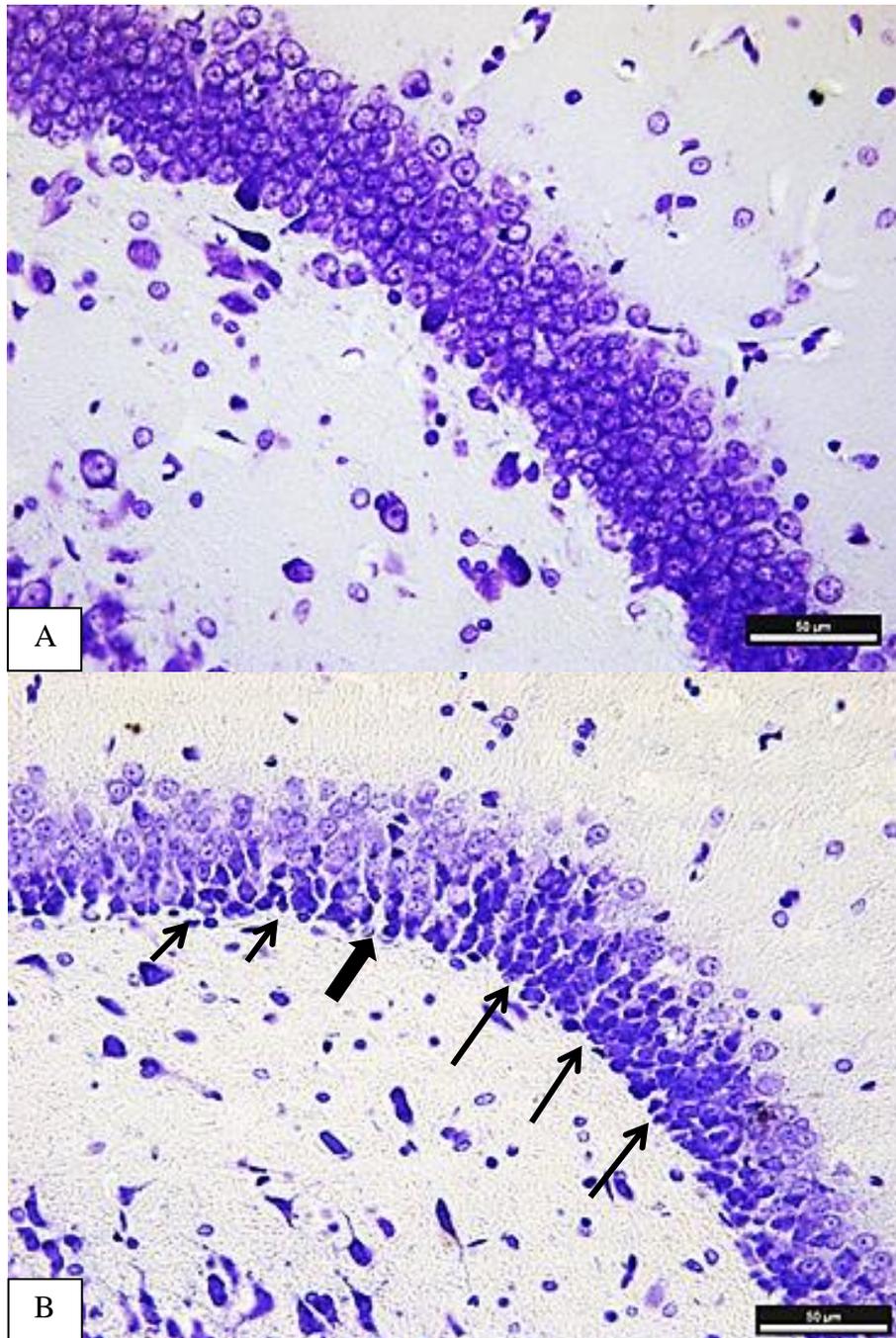


Figura 16. GD: 72 h. Microfotografías de la tinción cresil violeta vistas con el objetivo 40X, que muestran las células granulares del GD del hipocampo dorsal. A, corresponde a una rata administrada con solución salina, 72 horas después de la décima administración (Ctrl 72 h) y B a una rata bajo las mismas condiciones, pero administrada con la mezcla de neonicotinoides (Neo 72 h). En B se observa picnósis (flechas delgadas), retracción nucleosomática (flecha gruesa) y pérdida de la arquitectura tisular (flechas cortas).

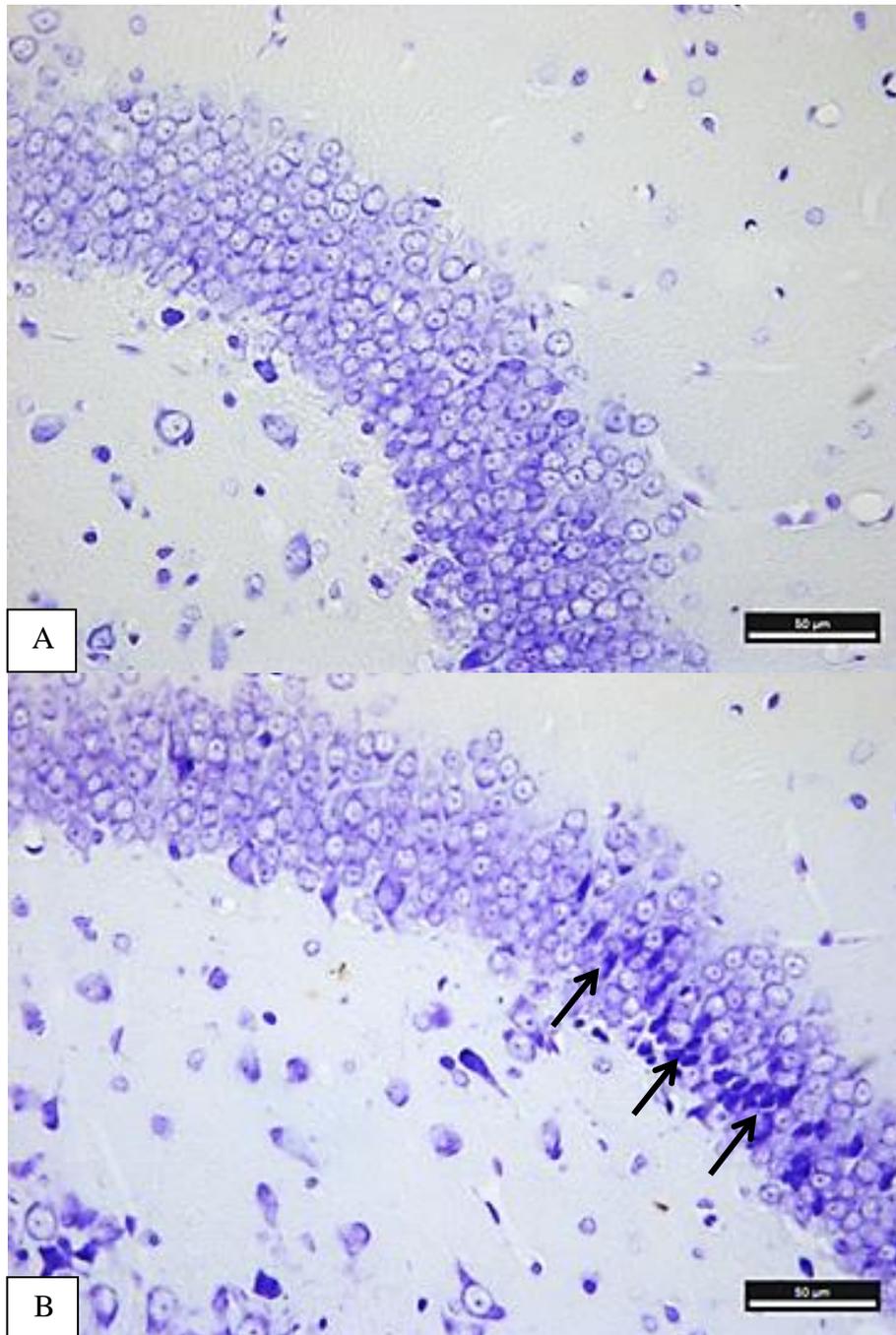


Figura 17. GD: 19 d. Microfotografías de la tinción cresil violeta vistas con el objetivo 40X, que muestran las células granulares del GD del hipocampo dorsal. A, corresponde a una rata administrada con solución salina, 19 días después de la décima administración (Ctrl 19 d) y B a una rata bajo las mismas condiciones, pero administrada con la mezcla de neonicotinoides (Neo 19 d). En B se observa picnosis (flechas).

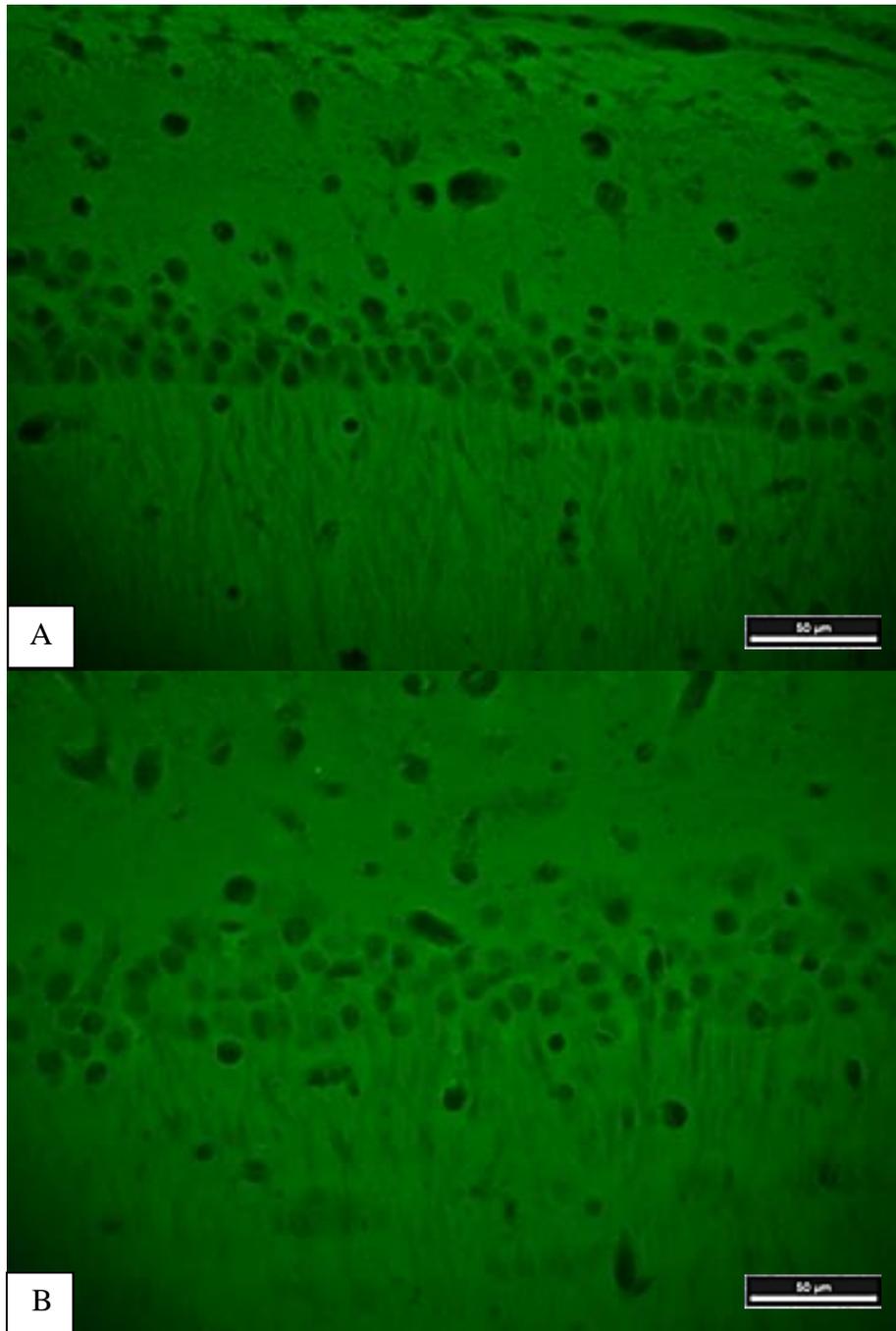


Figura 18. Fluoro Jade: CA1. Microfotografías de la tinción Fluoro-Jade vistas con el objetivo 40X, donde se observa el estrato de células piramidales de la región del CA1 del hipocampo dorsal. A, corresponde a una rata administrada con solución salina fisiológica y B a una rata administrada con la mezcla de neonicotinoides. No se observan células en proceso de neurodegeneración (fluorescentes).

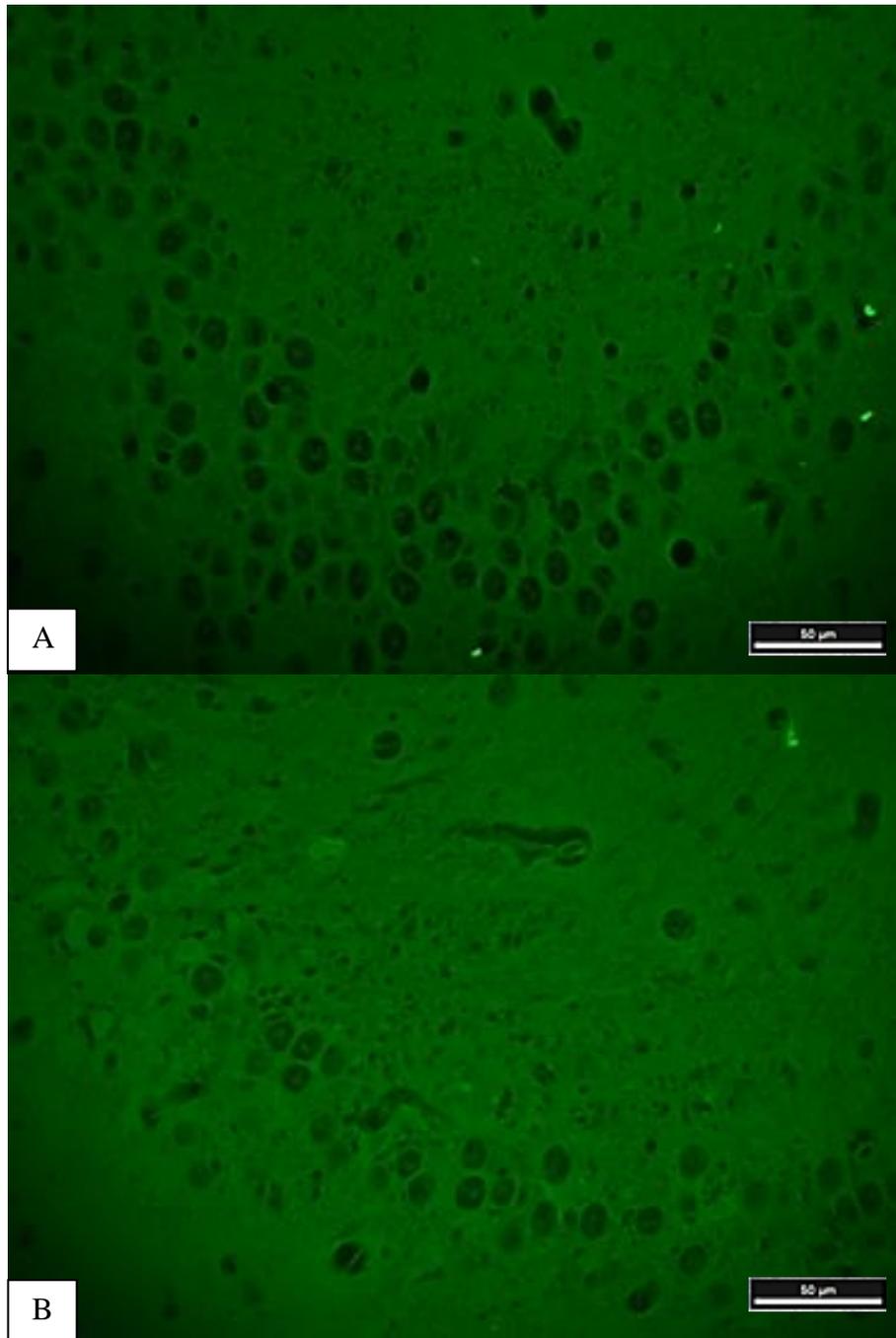


Figura 19. Fluoro Jade: CA3. Microfotografías de la tinción Fluoro-Jade vistas con el objetivo 40X, donde se observan las células piramidales de la región del CA3 del hipocampo dorsal. A, corresponde a una rata administrada con solución salina fisiológica y B a una rata administrada con la mezcla de neonicotinoides. No se observan células en proceso de neurodegeneración (fluorescentes).

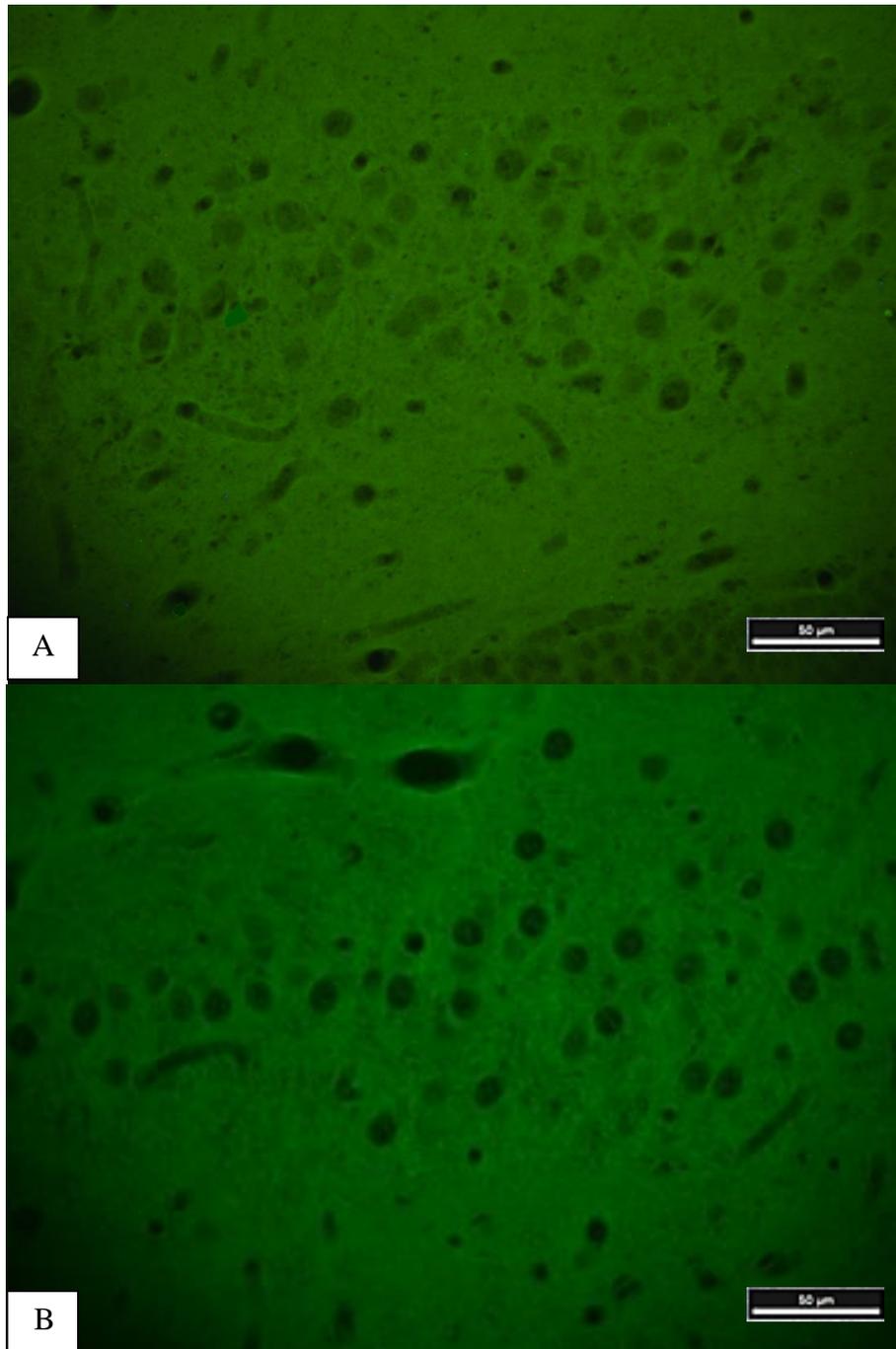


Figura 20. Fluoro Jade: CA4. Microfotografías de la tinción Fluoro-Jade vistas con el objetivo 40X, donde se observa el estrato de células piramidales de la región del CA4 del hipocampo dorsal. A, corresponde a una rata administrada con solución salina fisiológica y B a una rata administrada con la mezcla de neonicotinoides. No se observan células en proceso de neurodegeneración (fluorescentes).

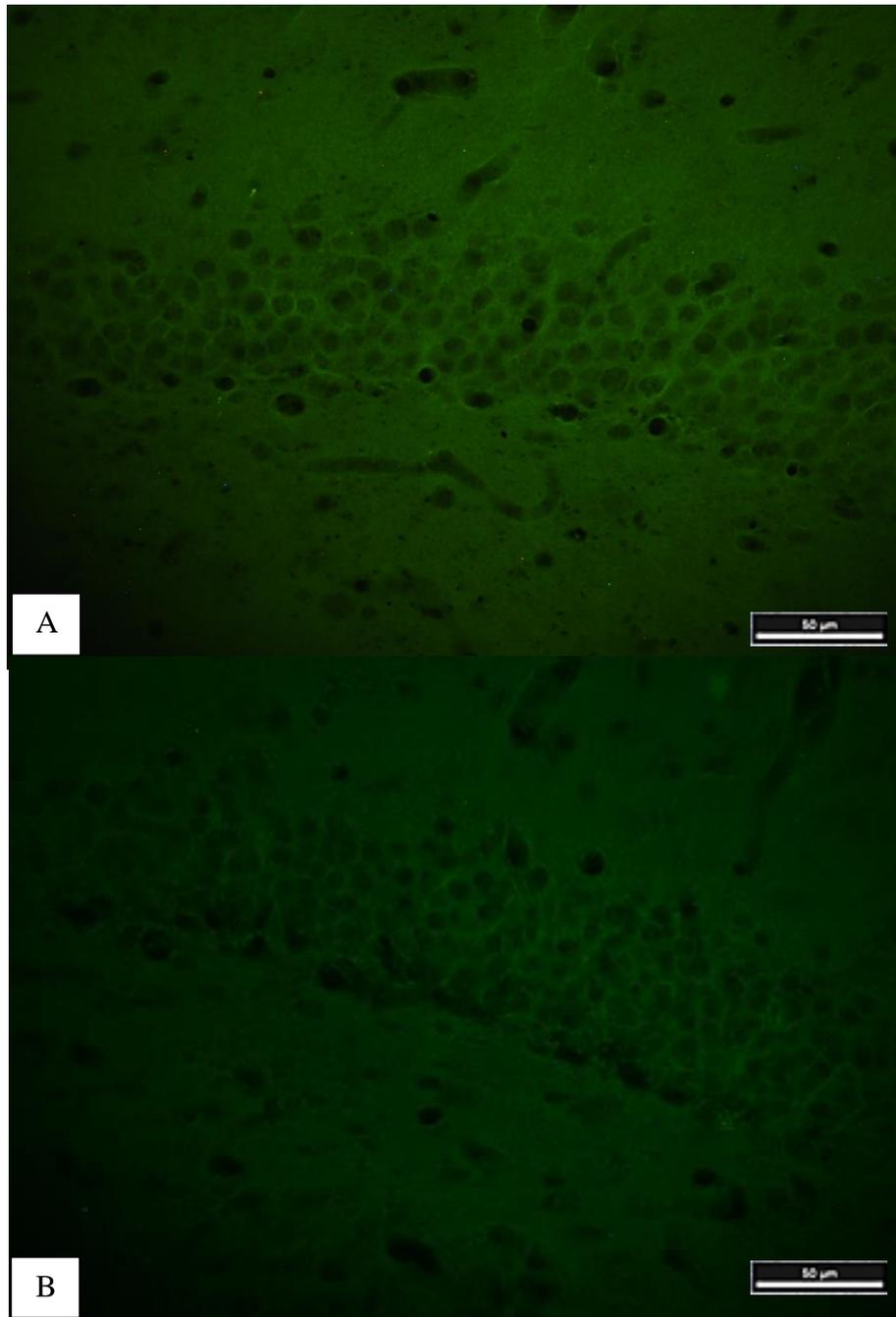


Figura 21. Fluoro Jade: GD. Microfotografías de la tinción Fluoro-Jade, vistas con el objetivo 40X, donde se observan las células granulares del GD del hipocampo dorsal. A, corresponde a una rata administrada con solución salina fisiológica y B a una rata administrada con la mezcla de neonicotinoides. No se observan células en proceso de neurodegeneración (fluorescentes).

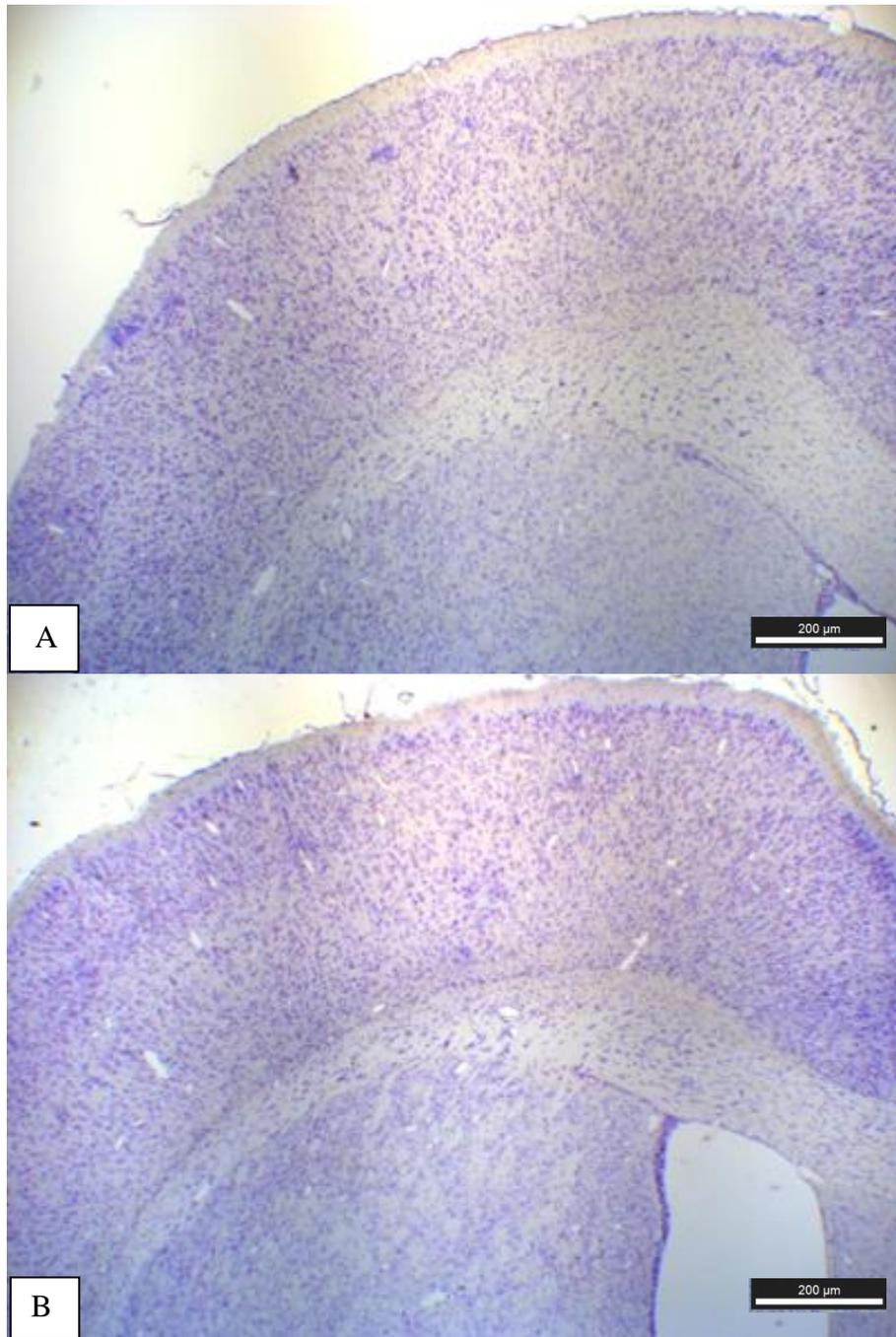


Figura 22. Corteza Motora. Microfotografías de la CM vistas con el objetivo 4X, teñidas con cresil violeta. A, corresponde a una rata administrada con diez dosis de SSF y B comparada a una rata administrada con diez dosis de neonicotinoides. No se observan hallazgos histopatológicos.

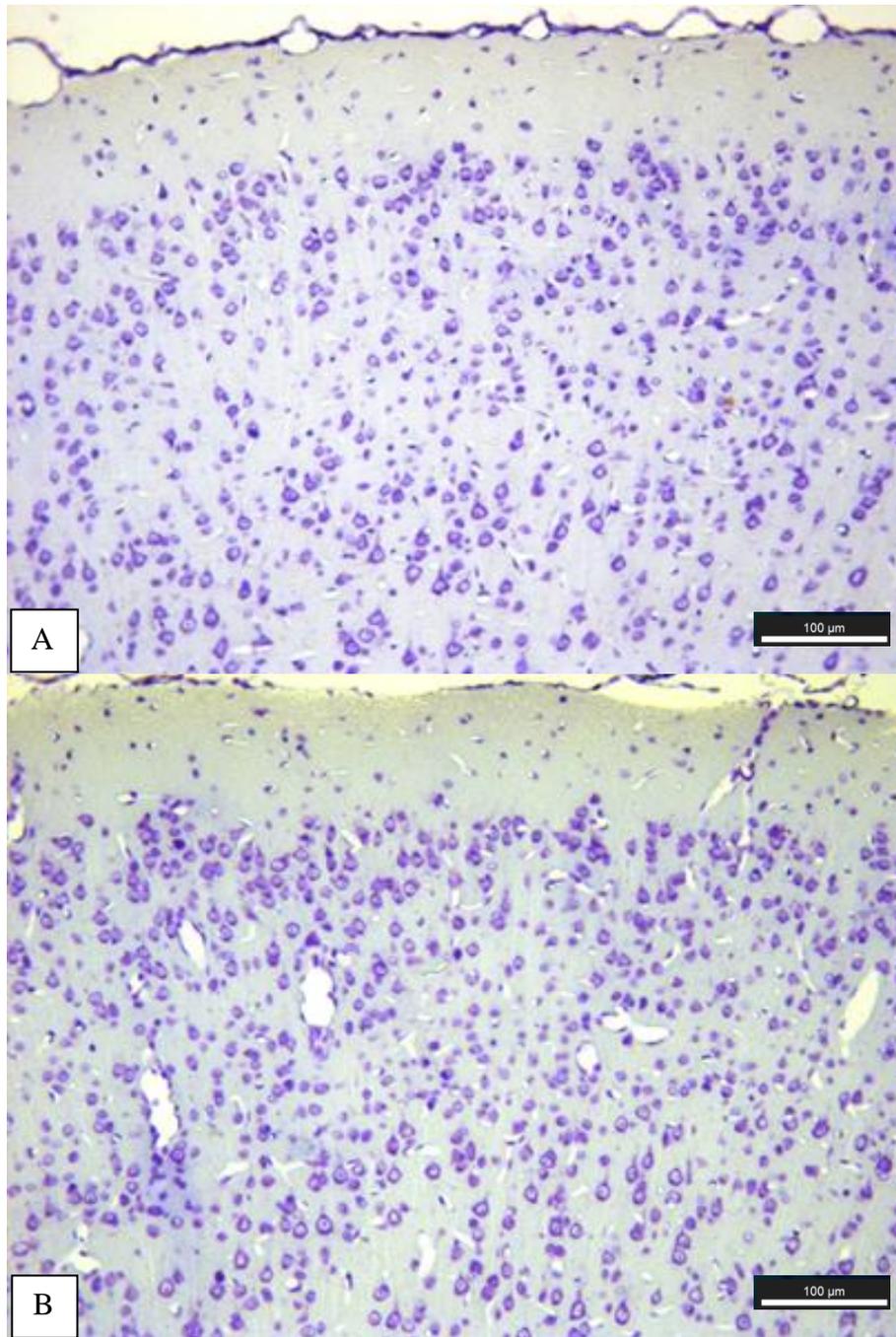


Figura 23. Corteza Motora. Microfotografías de la CM vistas con el objetivo 20X, teñidas con cresil violeta. A, corresponde a una rata administrada con diez dosis de SSF y B a una rata administrada con diez dosis de neonicotinoides. No se observan hallazgos histopatológicos.

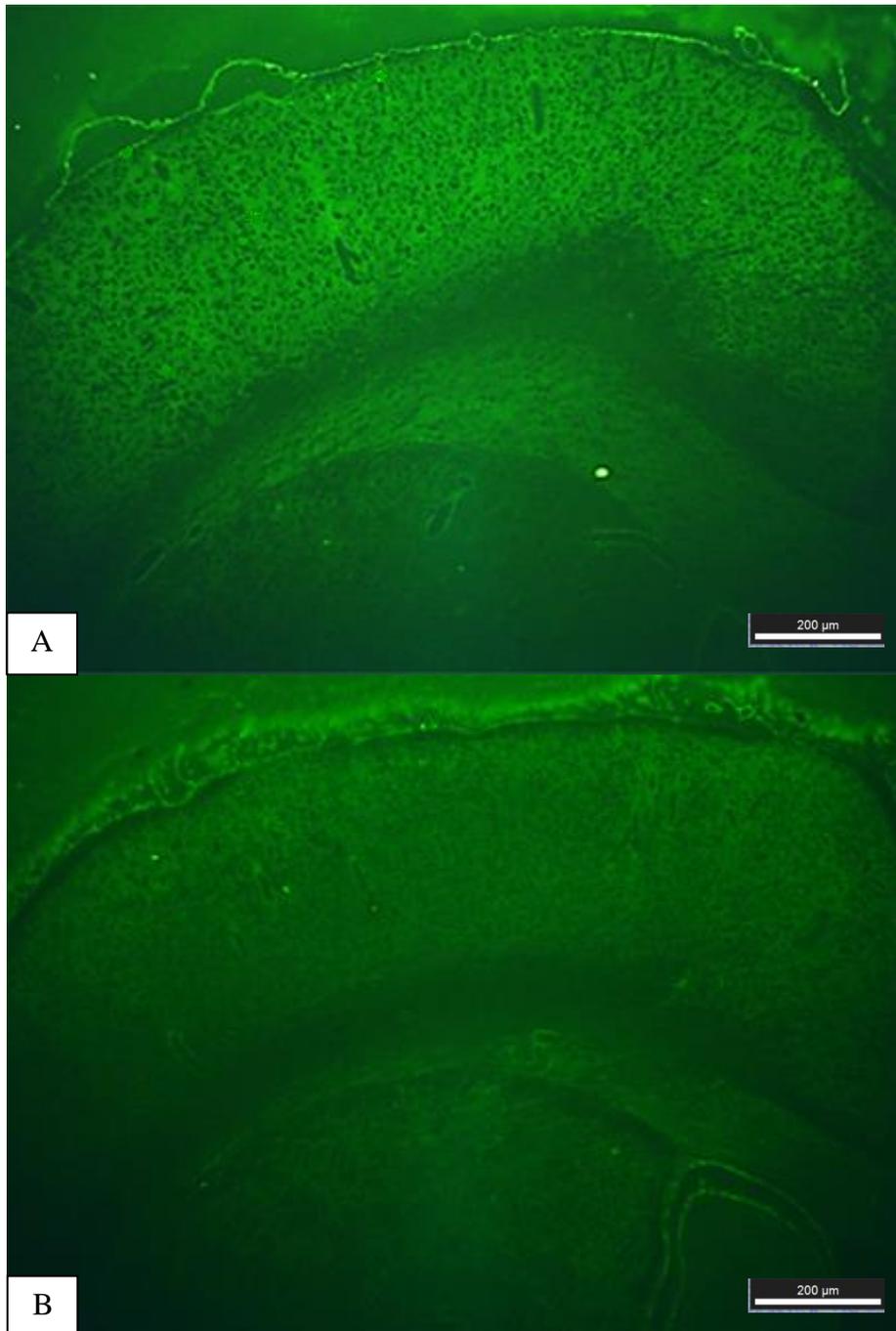


Figura 24. Fluoro Jade: Corteza Motora. Microfotografías de la CM, vistas con el objetivo 4X; teñidas con el reactivo de Fluoro-Jade. A, corresponde a una rata administrada con diez dosis de SSF y B a una rata administrada con diez dosis de neonicotinoides. En ninguno de los grupos se observaron células fluorescentes (en proceso de neurodegeneración) en ésta región del cerebro.

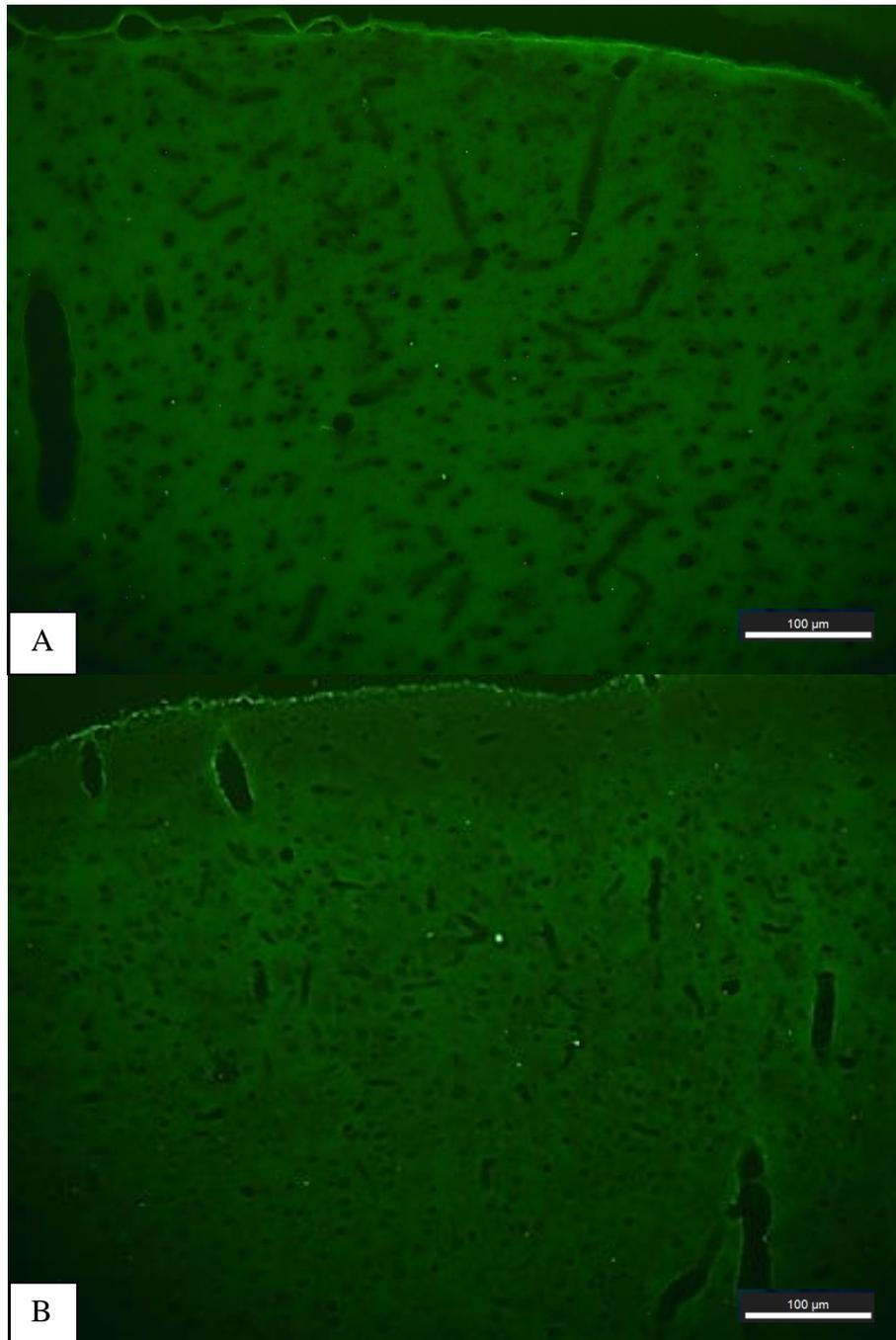


Figura 25. Fluoro Jade: Corteza Motora. Microfotografías de la corteza motora vistas con el objetivo 20X, teñidas con el reactivo de Fluoro-Jade. A, corresponde a una rata administrada con diez dosis de SSF y B a una rata administrada con diez dosis de neonicotinoides. En ninguno de los grupos se observaron células fluorescentes (en proceso de degeneración) en ésta región del cerebro.

## 5.4 Conteo celular

El conteo celular no arrojó diferencias estadísticamente significativas para las regiones del CA1, CA3 y CA4 en ninguno de los cuatro grupos evaluados (Ctrl 72 h, Neo 72 h, Ctrl 19 d y Neo 19 d).

Sin embargo, la cantidad de células picnóticas fue mayor y estadísticamente significativa en la región del GD de las ratas a las que se les aplicó la eutanasia 72 horas después de la décima administración, con una tendencia a la baja en el número de células viables en los mismos animales.

Los conteos celulares del GD de las ratas a las que se les aplicó la eutanasia 19 días después de la última administración, no fueron estadísticamente diferentes, pero el número de células picnóticas mostró una tendencia a la alta y una tendencia a la baja en el conteo de células viables cuando se les comparó con su respectivo control.

Las gráficas que evidencian los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 26 a 29, las cuales se presentan a continuación.

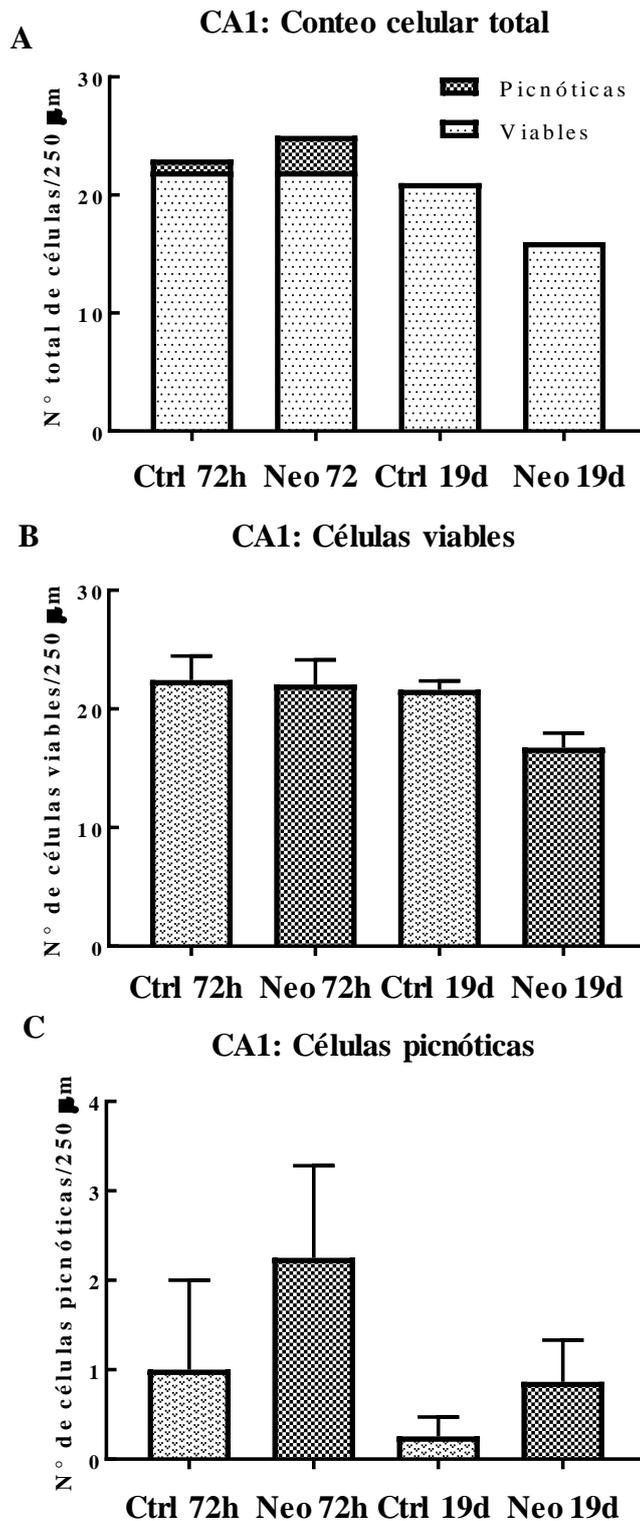


Figura 26. CA1: Conteo celular. A, representa el número total de células contadas en 250  $\mu\text{m}$  lineales de la región del CA1 del hipocampo dorsal. Las gráficas B y C, representan el promedio de células viables y picnóticas, contadas en 250  $\mu\text{m}$  lineales para la región del CA1 del hipocampo, donde se compara cada grupo experimental. Como se aprecia en B y C, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos evaluados ( $n=5$ ). (Ctrl: control, Neo: neonicotinoídes).

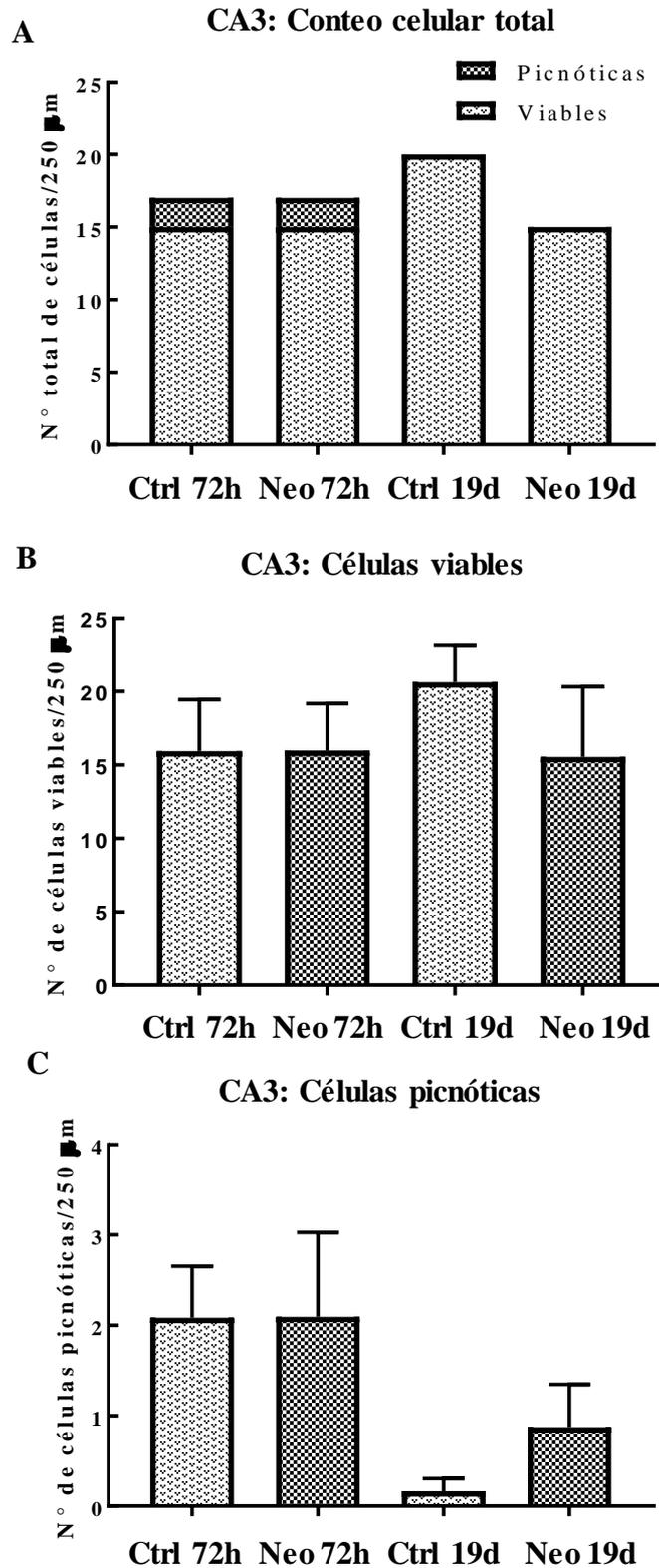


Figura 27. CA3: Conteo celular. A, representa el número total de células contadas en 250  $\mu\text{m}$  lineales de la región del CA3 del hipocampo dorsal. Las gráficas B y C, representan el promedio de células viables y picnóticas, contadas en 250  $\mu\text{m}$  lineales para la región del CA3 del hipocampo. Como se aprecia en B y C, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos evaluados ( $n=5$ ). (Ctrl: control, Neo: neonicotinoídes).

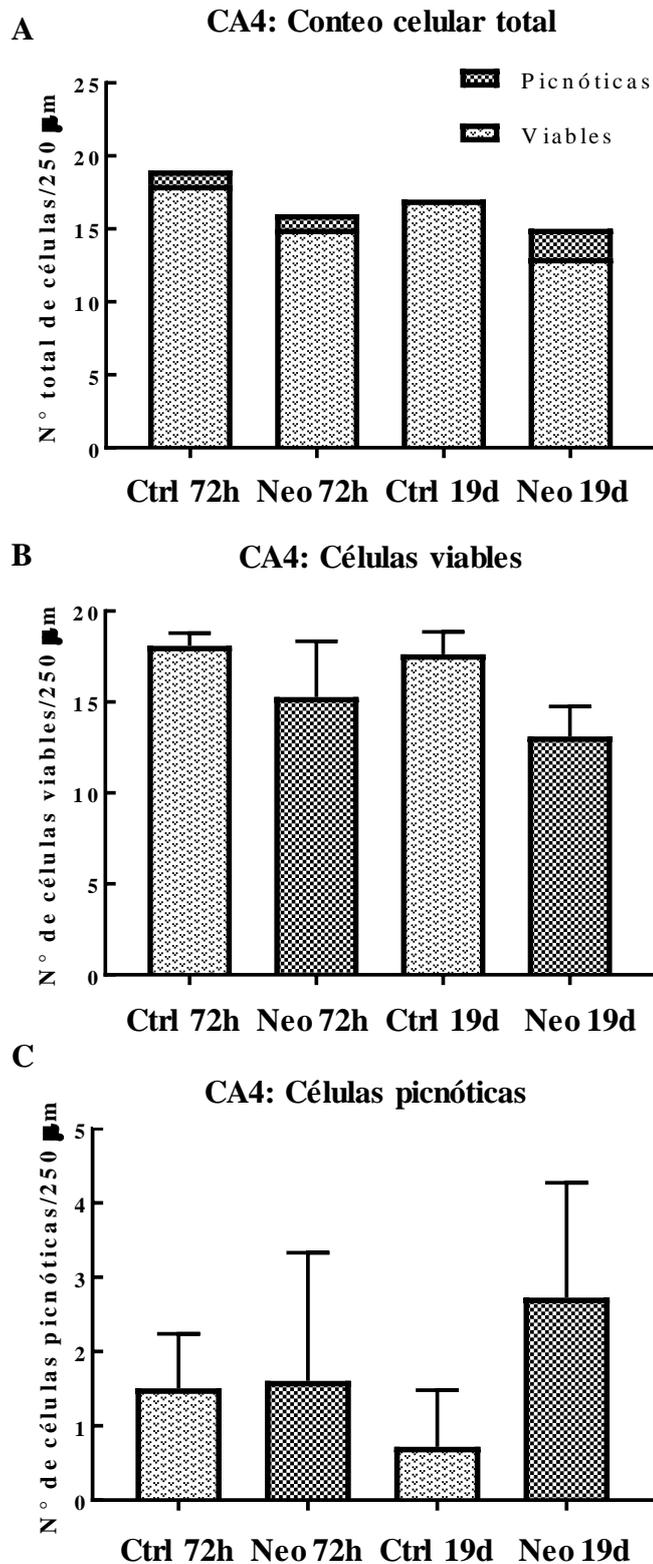


Figura 28. CA4: Conteo celular. A, representa el número total de células contadas en 250  $\mu\text{m}$  lineales de la región del CA4 del hipocampo dorsal. Las gráficas B y C, representan el promedio de células viables y picnóticas, contadas en 250  $\mu\text{m}$  lineales para la región del CA4 del hipocampo, donde se compara cada grupo experimental. Como se aprecia en B y C, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos evaluados ( $n=5$ ). (Ctrl: control, Neo: neonicotinoídes).

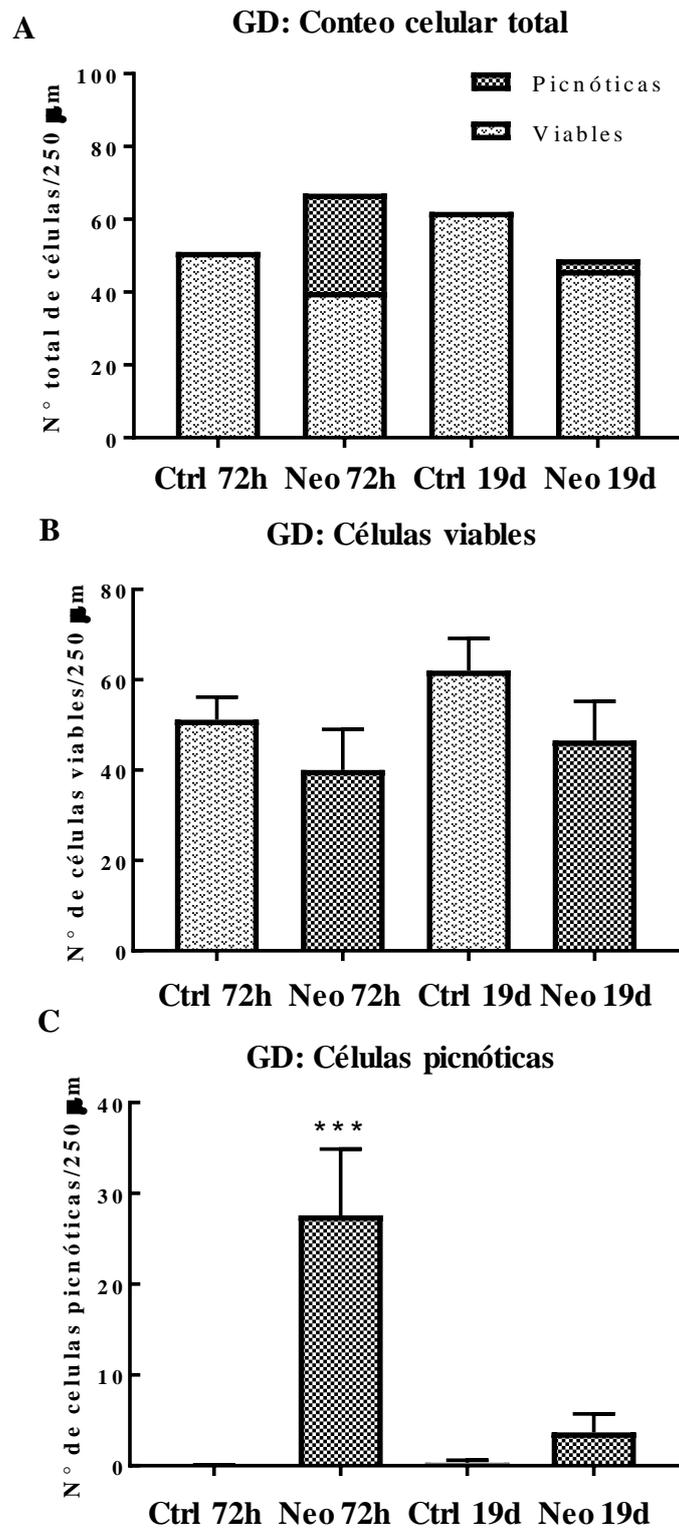


Figura 29. GD: Conteo celular. A, representa el número total de células contadas en 250  $\mu\text{m}$  lineales de la región del GD. Las gráficas B y C, representan el promedio de células viables y picnóticas, respectivamente, contadas en 250  $\mu\text{m}$  lineales para la misma región. C, revela una diferencia estadísticamente significativa, en el número de células picnóticas de las ratas a las que se les aplicó la eutanasia 72 h después de la décima administración con neonicotinoides (Neo 72 h), cuando se comparó con su respectivo control (Ctrl 72 h) ( $n=5$ ;  $p<0.05$ ). (Ctrl: control, Neo: neonicotinoides).

## 6) DISCUSIÓN

Los neonicotinoides como clotianidina y tiacloprid, son insecticidas considerados compuestos hidrosolubles (Bonmatin *et al.*, 2015; Schaafsma *et al.*, 2015), por lo que se argumenta que dicha propiedad les impide atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) (Hamm, 2013, Estrada *et al.*, 2016; Minnesota Department Agriculture, 2016), lo que aunado a su alta selectividad para los RnAch de los insectos, los ha colocado como plaguicidas con perfiles de seguridad favorables para los seres humanos (Sheets *et al.*, 2015).

Sin embargo, existen estudios científicos que evidencian que los neonicotinoides sí atraviesan la BHE (Klein, 1996; Weber, 2000; Ford y Casida, 2006), generando diversos efectos a nivel del SNC y que dan paso a considerar que la signología neurológica observada en nuestros experimentos, podría ser ocasionada por efecto directo de los neonicotinoides sobre los RnAch centrales, dejando abierta la posibilidad de que estos plaguicidas atraviesen la BHE.

Por ejemplo en estudios con ratas, Klein (1996) cuantificó la distribución en los tejidos de tiacloprid radiomarcado con  $^{14}\text{C}$ -metileno y sus resultados arrojaron, que en cerebro, la cantidad de tiacloprid 1 hora después de la administración oral de 5mg/kg, es de 1.044  $\mu\text{g}$  por gramo de tejido cerebral y de 0.352  $\mu\text{g}$  por gramo, 5 minutos post administración intravenosa de 1 mg/kg de tiacloprid radiomarcado. Del mismo modo, estudios toxicocinéticos con radiomarcadores realizados por Weber (2000), demuestran la presencia de 0.338  $\mu\text{g}$  por gramo de tejido cerebral analizado, 1 hora después de la administración vía oral de 5 mg/kg de clotianidina en ratas. Ford

y Casida (2006) cuantificaron la cantidad de imidacloprid, acetamiprid, tiacloprid y nitempiram en cerebro, después de la administración intraperitoneal de 10 o 20 mg/kg en ratones y obtuvieron cuantificaciones máximas de 11 a 16  $\mu\text{g}$  de nitempiram y tiacloprid, 6  $\mu\text{g}$  de imidacloprid y 3  $\mu\text{g}$  de acetamiprid en el tejido cerebral.

Es en base a los estudios anteriores, que no se descarta la posibilidad de que la mezcla de neonicotinoides (PONCHO 600 + CALYPSO 480) administrada en nuestros experimentos, ejerza un efecto central, ocasionado por la unión de los principios activos a los receptores  $\alpha 4\beta 2$  (principales blancos de éstos plaguicidas) de la corteza (Schuman Olivier *et al.*, 2014; Gotti y Clementi, 2004) u otras estructuras cerebrales que regulan el movimiento; generando signos motores como mioclonias, temores, ataxia y convulsiones, que coinciden con los signos reportados en la literatura, que incluyen disminución en la actividad, reflejos disminuidos, ataxia, temores y convulsiones (Metruccio y Boobis, 2010; ECHA, 2013; Sheets, 2014).

En cuanto a la muerte de los animales administrados con las dosis más altas de la mezcla de neonicotinoides, se cree que puede ser consecuencia de la combinación de ambos plaguicidas; ya que, en experimentos piloto en nuestro laboratorio, cuando se administraron a la misma dosis pero de manera individual, PONCHO 600 no causó la muerte de los animales después de la primera toma, pero si después de varias dosis y en el caso de CALYPSO 480, no generó la muerte tras dosis repetidas. Lo anterior se atribuye a un posible sinergismo entre ambos plaguicidas, en el que uno de los dos aumenta la toxicidad del otro.

Por otro lado, nuestros resultados indican que la administración subcrónica de la mezcla de dos plaguicidas neonicotinoides (PONCHO 600 + CALYPSO 480), genera cambios histológicos en las células granulares del GD, donde se observó retracción nucleosomática, picnósis y pérdida de la arquitectura tisular, en ratas a las que se les aplicó la eutanasia 72 horas después de la décima administración; hallazgos que se asemejan a lo reportado en la literatura para el neonicotinoide imidacloprid, que tras ser administrado oralmente a una dosis de 80 mg/kg cada 48 horas durante 25 días, genera una disminución en el número de células piramidales y gliales, degeneración glial y picnósis en la región de CA1 (Nellore *et al.*, 2013) y aunque no se reporta ningún hallazgo en el GD, con base en nuestros resultados, se hace evidente que los neonicotinoides pueden estar involucrados en procesos de muerte celular en ésta región.

Además, nuestros hallazgos histopatológicos, dan un indicio del estado histológico del hipocampo 72 h después de la décima dosis con la mezcla de neonicotinoides, es decir, tras el periodo de administración subcrónico y al inicio de las pruebas en el LAM y su posible correlación con la moderada deficiencia de los animales en las pruebas de MCP, como se explicará más adelante.

Los hallazgos histopatológicos observados en nuestro estudio en las células granulares del GD se atribuyen a un daño celular por excitotoxicidad, mediado por la sobrestimulación de los RnACh  $\alpha 4\beta 2$  (principal receptor de los neonicotinoides), presentes en las aferencias glutamatérgicas (Ghedini *et al.*, 2012) de la vía perforante (Márquez de Prado, 2004), las cuales hacen sinapsis con las células granulares del GD (Leranth y Hajszan, 2007; Olivares Hernández *et al.*, 2015) y debido a que los

neonicotinoides como clotianidina y tiacloprid, actúan como agonistas de los receptores colinérgicos nicotínicos, mimetizan la acción de la acetilcolina, favoreciendo la apertura de canales iónicos para la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de las células (EFSA, 2013b; Rose, 2012), causando neurotransmisión excitatoria a nivel de Sistema Nervioso Central (SNC) (Rose, 2012).

Kimura-Kuroda y colaboradores (2012), mencionan que neonicotinoides como el imidacloprid y acetamiprid tienen la capacidad de evocar afluencias de  $\text{Ca}^{++}$  excitatorias en células granulares del cerebelo de ratas neonatas y en otro estudio, Annabi y colaboradores (2015), demuestran que la exposición a imidacloprid durante 28 días provoca una elevación significativa de los niveles de calcio en el hipotálamo y la hipófisis y sugieren que es ocasionada por la hiperestimulación de los RnACh por la fijación sostenida del agonista (imidacloprid) a los mismos.

Hoy en día, se sabe que la elevación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular favorece el inicio de procesos como plasticidad sináptica, expresión génica, crecimiento axonal y liberación de neurotransmisores (Hidalgo y Nuñez, 2007) como el glutamato (Medina Marín *et al.*, 2007; Medel Matus *et al.*, 2010; Catteral, 2011), que bajo condiciones patológicas (hipoxia/ isquemia, enfermedad de Parkinson o Alzheimer) (Prentice *et al.*, 2015) en las que se libera en exceso, genera cambios histopatológicos como vacuolización neuronal inicial, que puede progresar a cariorrexis o picnosis en un día o dos (Bolton *et al.*, 2012), lo que coincide con nuestros resultados, donde aunque no se observó vacuolización neuronal, si se observaron células granulares picnóticas 72 h después de la décima administración e incluso, en un menor grado, en

las células de animales 19 días después de la última dosis con la mezcla de neonicotinoídes.

Nuestro estudio sugiere que la liberación de glutamato por parte de las neuronas glutamatérgicas provenientes de la corteza entorrinal, estimuladas por la unión de los neonicotinoídes a los RnACh  $\alpha 4\beta 2$ , favorece la elevación de los niveles de  $Ca^{2+}$  en las células granulares del GD, debido a la unión del glutamato a los receptores N-metil-D-aspartato (RNMDA) presentes en estas células (Watanabe *et al.*, 2016), lo que genera un daño por excitotoxicidad.

De acuerdo con Lorigados y colaboradores (2013) los niveles excesivos de glutamato endógeno o la hipersensibilidad de sus receptores, se relacionan con degeneración neuronal por excitotoxicidad, un mecanismo que origina la muerte celular por sobreactivación de los receptores glutamatérgicos, que a su vez favorecen la entrada excesiva de  $Ca^{2+}$  a la célula, el cual es secuestrado por la mitocondria, lo que provoca disfunción metabólica, producción de radicales libres y activación de proteasas como fosfolipasas, óxido nítrico sintasa y endonucleasas, así como la inhibición de la síntesis de proteínas (Lorigados *et al.*, 2013). El mecanismo de excitotoxicidad se explica brevemente a continuación.

La saturación de los mecanismos de regulación de la homeostasis del  $Ca^{2+}$ , como la bomba de calcio, el intercambiador sodio/calcio ( $Na^+/Ca^{2+}$ ) y las proteínas amortiguadoras de  $Ca^{2+}$ , provoca la captura del exceso de calcio por parte de la mitocondria, el cual se acumula en la matriz mitocondrial, induciendo, según lo descrito por Lorigados y colaboradores, la despolarización de la membrana

mitocondrial por 1) abatimiento parcial del potencial quimiosmótico por la acumulación de cargas positivas en la matriz mitocondrial y 2) ante la sobrecarga sostenida, ocurre una despolarización irreversible por la activación del poro de transición mitocondrial (Lorigados *et al.*, 2013).

El colapso del potencial quimiosmótico mitocondrial reduce la síntesis de adenosin trifosfato (ATP) y la activación del poro de transición, que constituye una vía por donde el calcio retorna al citosol (Lorigados *et al.*, 2013). Además, el aumento sostenido de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  promueve la generación de radicales libres, que inducen la peroxidación de lípidos de membrana, la síntesis de óxido nítrico (potencia el efecto excitotóxico del glutamato al favorecer su liberación desde las terminales presinápticas) y la activación de enzimas como la óxido nítrico sintasa y aquellas involucradas en el catabolismo de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Lorigados *et al.*, 2013).

Finalmente Lorigados y colaboradores señalan que, el daño mitocondrial y el aumento de la concentración de ácido araquidónico son factores implicados en el incremento de la generación de especies reactivas de oxígeno, que conducen a la muerte neuronal por el daño a las biomoléculas y activación de programas de muerte apoptóticos. Además, el déficit energético genera la perpetuación del proceso degenerativo porque favorece la despolarización de la membrana, debido al mal funcionamiento de la bomba sodio/potasio y mantiene el estado activo del receptor NMDA (Lorigados *et al.*, 2013).

En la figura 30 se esquematiza y se resume el posible mecanismo de excitotoxicidad por glutamato como consecuencia de la administración de neonicotínicos.

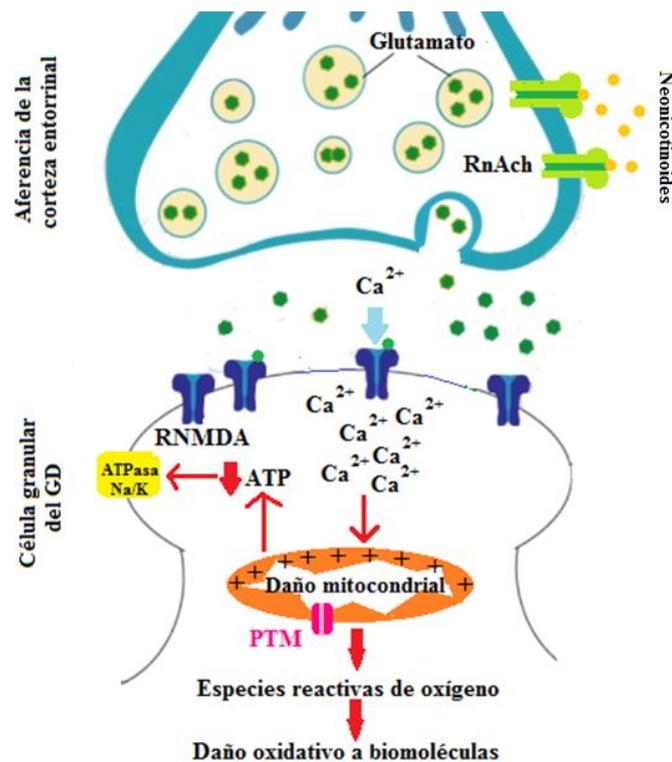


Figura 30. Mecanismo de excitotoxicidad por glutamato como consecuencia de la administración oral de neonicotínicos. Cuando los neonicotínicos se acoplan a los RnACh generan la liberación de glutamato desde la terminal presináptica, el cual se une a los receptores NMDA presentes en las células granulosas del GD, aumentando de manera anormal los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , generando daño mitocondrial, déficit energético, así como la producción de especies reactivas de oxígeno que conducen a la muerte neuronal por daño a las biomoléculas.

Por otro lado, nuestros hallazgos histopatológicos, coinciden con la moderada deficiencia en las pruebas de MCP en el LAM de los animales administrados con neonicotínicos, donde el número de cruces realizados y el tiempo de permanencia en el cuadrante fueron menores que los del grupo control.

Para explicar lo anterior, es necesario mencionar que el hipocampo es una estructura cerebral que participa en procesos como: el aprendizaje asociativo y espacial; la memoria espacial, declarativa, de trabajo y episódica; así como en la codificación de

la memoria a corto y a largo plazo; la adquisición; procesos de consolidación; atención; ansiedad; procesamiento emocional; plasticidad sináptica; potenciación a largo plazo y en la integración de información procedente de diversas áreas corticales, tanto sensoriales como asociativas (Khakpai *et al.*, 2013) y es por ello, que las lesiones en el mismo, generan deficiencias en pruebas de aprendizaje y memoria en el LAM (Scheff *et al.*, 1997; Byeon *et al.*, 2015).

Kesner y colaboradores (2000) mencionan que se han registrado deficiencias en la MCP espacial en experimentos realizados en ratas y ratones, después de lesiones isquémicas en el GD y en otro estudio en el que se evaluó el efecto del ejercicio en la rueda de ardilla en jerbos, tras generar una lesión isquémica en el GD, se concluyó que el ejercicio mejora la memoria a corto plazo al suprimir la muerte celular apoptótica inducida por isquemia en el mismo (Sim *et al.*, 2004), lo que nos hace creer que un daño histológico a este nivel, puede estar estrechamente relacionado con nuestros resultados, que revelaron una moderada deficiencia de los animales en las pruebas de MCP.

Cabe mencionar, que aunque el número de cruces fue significativamente menor en las ratas administradas con neonicotinoides, el tiempo de permanencia en el cuadrante no lo fue (sin embargo, mostró una tendencia a la baja), resultado que coincide con lo reportado por Özdemir y colaboradores (2014) que tampoco observaron diferencias significativas en la prueba de permanencia en el cuadrante en ratas adultas administradas con diferentes dosis de clotianidina; por lo que la tendencia a la baja, en nuestro resultado en la misma prueba, se atribuye a la administración combinada de neonicotinoides, ya que se ha reportado que las

mezclas de insecticidas, son las más relacionadas con efectos neurotóxicos (Rizzati *et al.*, 2016).

Aunque se podría pensar que el compromiso de la MCP en nuestras pruebas se reflejaría en los resultados obtenidos en las de MLP, no fue así, lo que puede deberse a que el proceso de consolidación de la MLP, involucra estructuras cerebrales como: la formación hipocampal, que incluye el giro dentado, la fimbria o fórnix y el hipocampo propio, así como el giro parahipocámpico, formado por las cortezas entorrinal, perirrinal y parahipocámpica (Muñoz Marrón *et al.*, 2012), es decir, no sólo el GD. Incluso existen estudios que proponen que los mecanismos involucrados en la memoria a corto y largo plazo son dissociables y que es posible observar deficiencias en la MCP sin compromiso de la MLP (Izquierdo *et al.*, 1999; Shipton *et al.*, 2014), por lo que se considera, que la administración subcrónica con la mezcla de neonicotinoides, si podría tener un efecto negativo en los procesos de MCP sin repercusión alguna en la MLP.

Los hallazgos histopatológicos no fueron tan evidentes ni estadísticamente significativos en el GD de las ratas a las que se les aplicó la eutanasia 19 días después de la décima administración con la mezcla de neonicotinoides; lo que se atribuye a la neurogénesis que ocurre continuamente en el GD del mamífero adulto (Drew *et al.*, 2013; Piatti *et al.*, 2013; Leuchtweis *et al.*, 2014, Olivares Hernández *et al.*, 2015). Se tiene la teoría de que después de haber suspendido la administración de neonicotinoides, las células que pudieron haber muerto durante el periodo de administración subcrónico, fueron remplazadas por neuronas granulares de nueva formación durante los 19 días que antecedieron a la muerte de los animales; idea que

se apoya en lo reportado por Olivares Hernández y colaboradores, que mencionan que: “La mayoría de la progenie de las células precursoras neurales (en el GD) dará origen a neuronas granulosas dentadas” las cuales “...se diferencian y se integran a la capa subgranular del giro dentado del hipocampo, entre una y cuatro semanas después de su generación. Posteriormente, desarrollan un axón y generan procesos neuríticos que les permiten integrarse sinápticamente entre dos y cuatro semanas después de su nacimiento” (Olivares Hernández *et al.*, 2015).

La falta de alteraciones histológicas en la corteza motora de los animales tratados con la mezcla de neonicotinoides y la ausencia de signos motores después de la segunda administración, confirma que los resultados obtenidos en el LAM, fueron producto de una alteración ajena (aumento de células picnóticas en el GD) a la capacidad motriz de los animales, que no influyó en su habilidad para nadar y por lo tanto, en su desempeño para realizar las pruebas.

## 7) CONCLUSIONES

La administración de la mezcla de dos neonicotinoides (PONCHO 600 y CALYPSO 480) a una dosis de 5/10 y 3/10 de la DL50 de cada uno, causa la muerte del 100% de los animales después de la primera administración, causando signos previos como: disminución de la actividad, disminución en el consumo de agua y alimento, marcha lenta, ataxia, sobresaltos, chillidos, mioclonias anteriores, disnea y convulsiones.

La administración subcrónica de la mezcla de dos plaguicidas neonicotinoides (PONCHO 600 y CALYPSO 480) a una dosis de 2/10 de la DL50 de cada uno, genera daños histopatológicos en las células granulares del GD de la rata Wistar, como retracción nucleosomática, picnósis y pérdida de la arquitectura tisular, los cuales se ven reflejados en un aumento estadísticamente significativo del número de células picnóticas, en esta región del hipocampo.

Los hallazgos histopatológicos, se atribuyen a un daño celular por excitotoxicidad, mediado por la sobrestimulación de los RnAch's  $\alpha 4\beta 2$ , que favorece la liberación de glutamato desde las neuronas glutamatérgicas de la vía perforante, las cuales, hacen sinapsis con las células granulares del GD, en las que los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular aumentan por efecto de la unión del glutamato a sus receptores; lo que activa diversas vías de daño celular, como disfunción metabólica, producción de radicales libres y activación de proteasas como fosfolipasas, la óxido nítrico sintasa y endonucleasas, así como la inhibición de la síntesis de proteínas, lo que deriva en muerte celular.

Los hallazgos histopatológicos fueron más evidentes y estadísticamente significativos, en las ratas a las que se les aplicó la eutanasia 72 horas después de la última administración, hallazgos que nos dan un indicio del estado del hipocampo justo en el momento de inicio de las pruebas en el LAM y que se cree, está relacionado con la moderada deficiencia de los animales en las pruebas de MCP, donde el número de cruces y el tiempo de permanencia en el cuadrante, fueron menores en las ratas administradas con la mezcla de neonicotinoides; es por ello que

se confirma que los neonicotinoides podrían estar involucrados en alteraciones relacionadas con la memoria, principalmente a corto plazo.

## 8) PERSPECTIVAS

En el año 2008, los neonicotinoides representaron cerca del 24% del mercado mundial de insecticidas y en vista de que su uso va en aumento, es necesario investigar los riesgos y efectos tóxicos para la salud de los seres humanos, ya que se ha comprobado que no sólo afectan a los insectos que causan plagas, sino también a las abejas (Christen *et al.*, 2016; Wessler *et al.*, 2016; Wu-Smart y Spivak, 2016; Andrione *et al.*, 2016; Samuelson *et al.*, 2016), mariposas (Gilburn *et al.*, 2015; Forister *et al.*, 2016) y vertebrados como aves granívoras y anfibios (Gibbons *et al.*, 2015), lo que aunado a investigaciones realizadas en roedores de laboratorio, donde se ha evidenciado su toxicidad a diferentes niveles (Abou-Donia *et al.*, 2008; Mondal *et al.*, 2009; Duzguner y Edogaan, 2010; Kimura-Kuroda *et al.*, 2011; Bal *et al.*, 2012a; Bal *et al.*, 2012b; Calderón-Segura *et al.*, 2012), hace crecer las dudas en relación a la magnitud de los efectos neurotóxicos en mamíferos, debido a que la información en torno al tema es limitada.

Hasta el momento nuestros resultados coinciden en parte con la hipótesis planteada, ya que, aunque el daño observado a nivel hipocampal y su repercusión a nivel conductual fueron moderados, tenemos una evidencia que relaciona directamente a los neonicotinoides con la histopatología observada y su efecto a nivel conductual,

debido a que la administración de la mezcla de estos plaguicidas, fue la única variable entre los grupos evaluados.

El siguiente paso es confirmar si el origen de los signos observados con las diferentes dosis de la mezcla de plaguicidas, es de origen central o periférico y para ello se realizarán registros electrofisiológicos después de la administración de dosis altas y bajas de la mezcla, lo que servirá para conocer el tipo de estímulo que generan a nivel cerebral, aún en ausencia de signos.

Por otro lado, se ha llevado a cabo la administración de ambos neonicotinoides por separado, con la finalidad de corroborar la DL50 reportada por el fabricante y hasta el momento nuestros resultados no coinciden, ya que al administrar oralmente a diez ratas Wistar macho con la DL50 de CALYPSO 480 (400 mg/kg) y a otro grupo igual de animales con la DL50 de PONCHO 600 (2000 mg/kg), se observó un 100% de mortalidad; lo que pone en duda la información emitida por el fabricante y por lo tanto, la clasificación toxicológica de cada uno de éstos plaguicidas, así como las directrices para la vestimenta y equipo adecuados, el establecimiento de los límites de exposición ocupacional y los procedimientos de emergencia en caso de derrame o accidentes, ya que la DL50 se utiliza como referencia para establecer dichos criterios.

Por lo que queda abierta la posibilidad de estudiar ambos plaguicidas por separado y del mismo modo que con la mezcla, realizar estudios histopatológicos y de conducta, que incluso evidencien si alguno de los dos neonicotinoides es más tóxico que el otro.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, incitan a seguir indagando las consecuencias de la exposición crónica a neonicotinoides, ya que los seres humanos están expuestos diariamente en mayor o menor grado, sin embargo, los agricultores, peones, pilotos, mezcladores y las comunidades aledañas a los campos asperjados, son las más afectadas, lo que se ve agravado con la falta de información acerca de las medidas adecuadas de protección, que podrían prevenir muchos de los efectos dañinos a la salud.

La investigación en torno a los efectos de los neonicotinoides generados a la salud humana, animal y al medio ambiente es sumamente necesaria, ya que a pesar de que se les relaciona estrechamente con la disminución masiva de las poblaciones de abejas, los conflictos de intereses detrás de la producción, venta, distribución y regulación de estos agroquímicos, son más grandes y fuertes que la generación del conocimiento que podría salvar a la humanidad de una de las tragedias más grandes de su historia: la extinción de las abejas.

Se pretende que a partir de la información generada se cuente con argumentos fiables para restringir el uso de neonicotinoides en nuestro país, o bien, sugerir la actualización de la información disponible en relación al uso de estos agroquímicos.

Como se mencionó anteriormente, los seres humanos no son los únicos seres vivos afectados por el uso indiscriminado de neonicotinoides; las abejas, los abejorros, las mariposas, las aves granívoras y los peces, sólo por mencionar algunos, están en riesgo en su día a día, cada vez que buscan y consumen su alimento, el cual ha sido envenenado con sustancias que el ser humano ha producido para su propia

sobrevivencia, dejando de lado las graves consecuencias de las soluciones fáciles que toma en el presente.

## 9) REFERENCIAS

1. Abou-Donia MB, Goldstein LB, Bullman S, Tu T, Khan WA, Dechkovskaia AM, *et al.* 2008. Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. *J Toxicol Environ Health A.* 71(2):119-30.
2. Afari Sefa V, Asare Bediako E, Kenyon L, Micah JA. 2015. Pesticide use practices and perceptions of vegetable farmers in the cocoa belts of the ashanti and western regions of Ghana. *Adv Crop Sci Tech* 3:174. doi:10.4172/2329- 8863.1000174.
3. Andrione M, Vallortigara G, Antolini R, Haase A. 2016. Neonicotinoid-induced impairment of odour coding in the honeybee. *Sci Rep.* 6:38110. doi: 10.1038/srep38110.
4. Annabi A, El-Bini Dhouib I, Dkhili H, Bdiri Y, Rejeb I, Gharbi N, *et al.* 2015. Mechanisms of imidacloprid-induced alteration of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis after subchronic exposure in male rats. *Recent Adv Biol Med.* 1: 51-59. doi: 10.18639 / RABM.2015.01.195931.
5. Bal R, Naziroğlu M, Türk G, Yılmaz Ö, Kuloğlu T, Etem E, *et al.* 2012b. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through

- oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochem Funct.* 30(6):492-9. doi: 10.1002 / cbf.
6. Bal R, Türk G, Yılmaz Ö, Etem E, Kuloğlu T, Baydaş G, *et al.* 2012a. Effects of clothianidin exposure on sperm quality, testicular apoptosis and fatty acid composition in developing male rats. *Cell Biol Toxicol.* 28(3):187-200. doi: 10.1007 / s10565-012-9215-0.
  7. Bayer CropScience. 2005. Hoja de datos de seguridad: CALYPSO. D.F. México.
  8. Bayer CropScience. 2005. Hoja de datos de seguridad: PONCHO. D.F. México.
  9. Bhardwaj S, Srivastava MK, Kapoor U, Srivastava LP. 2010. A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: Morphological, biochemical and histopathological evaluations. *Food Chem Toxicol.* 48 (2010): 1185–1190. doi: 10.1016 / j.fct.2010.02.009.
  10. Bolon B, Butt MT, Garman RH, Dorman DC. Chapter 52 – Nervous System. En: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, Bolon B, Ochoa R. Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology. 3ra ed. Vol. III: Systems toxicologic pathology. Londres: Academic Press. 2012. p. 2005–2093.
  11. Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, *et al.* 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22: 35–67. doi: 10.1007/s11356-014-3332-7.
  12. Byeon JH, Kim GH, Kim JY, Sun W, Kim H, Eun BL. 2015. Cognitive dysfunction and hippocampal damage induced by hypoxic-ischemic brain injury and prolonged febrile convulsions in immature rats. *J Korean Neurosurg Soc.* 58(1):22-9. doi: 10.3340/jkns.2015.58.1.22.

13. Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Martínez-Valenzuela C, Carbajal-López Y, Calderón-Ezquerro C, *et al.* 2012. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to neonicotinoid insecticides news. *J Toxicol.* 2012:612647. doi: 10.1155 / 2012/612647.
14. Catterall WA. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(8): a003947. doi: 10.1101 / cshperspect.a003947.
15. Chao SL y Casida JE. 1997. Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity. *Pestic Biochem Physiol.* 58:77–88. doi: 10.1006/pest.1997.2284.
16. Christen V, Mittner F, Fent K. 2016. Molecular Effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). *Environ Sci Technol.* 5;50(7):4071-81. doi: 10.1021 / acs.est.6b00678.
17. Cimino AM, Boyles AL, Thayer KA, Perry MJ. 2016. Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: A systematic review. *Environ Health Perspect.* 125(2):155-162. doi: 10.1289/EHP515.
18. COFEPRIS. 2010. Catálogo de plaguicidas. D.F., México. <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>. [consultado: 6 nov 16].
19. Damalas CA y Eleftherohorinos IG. 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int J Environ Res Public Health.* 8(5): 1402–1419. doi:10.3390/ijerph8051402.
20. Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delègue MH. 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees

- under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Saf.* (57) 3: 410–419. doi: 10.1016/j.ecoenv.2003.08.001.
21. DoW Agro Sciences. 2013. Indianapolis, Indiana: EUA. DoW AgroSciences receives US EPA Registration for Sulfoxaflor. [newsroom.dowagro.com/press-release/dow-agrosciences-receives-us-epa-registration-sulfoxaflor](http://newsroom.dowagro.com/press-release/dow-agrosciences-receives-us-epa-registration-sulfoxaflor) [consulta 6 nov 16].
22. Drew LJ, Fusi S, Hen R. 2013. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: why the dentate gyrus?. *Learn Mem.* 20(12):710-29. doi: 10.1101 / lm.026542.112.
23. Duzguner, V y Edogaan, S. 2010. Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats. *Pest. Biochem. Physiol.* 97, 13-18. doi:10.1016/j.pestbp.2009.11.008.
24. ECHA. 2013. Annex 1: Background document to the opinion proposing harmonised classification and labelling at community level of thiacloprid (ISO). Ver 1. [actualización: 12 mar 2015]. Reino Unido. [https://echa.europa.eu/documents/10162/13626/clh\\_bd\\_thiacloprid\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/13626/clh_bd_thiacloprid_en.pdf). [consulta: 6 nov 16].
25. EFSA. 2013a. EFSA assesses potential link between two neonicotinoids and developmental neurotoxicity. Parma, Italia. <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/131217> [consulta: 6 nov 16].
26. EFSA. 2013b. Scientific opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid. Parma, Italy. [http://www.lafranceagricole.fr/r/Public/FA/p1/Infographies/Web/2013-12-17/81782\\_1.pdf](http://www.lafranceagricole.fr/r/Public/FA/p1/Infographies/Web/2013-12-17/81782_1.pdf). [consulta 6 marzo 2017].

27. Estrada Atehortúa AF, Berrouet Mejía MC, Giraldo JA. 2016. Toxicidad por neonicotinoides: revisión de tema y reporte de dos casos. *Medicina UPB*. 35: 41-46. doi: 10.18566/medupb.v35n1.a06.
28. FAO. 2003. Código Internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Roma, Italia. <http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf> [consulta: 6 nov 16].
29. Farooqui T. 2012. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: a unique hypothesis. *Neurochem Int* 62 (1): 122-136. doi: 10.1016 / j.neuint.2012.09.020.
30. Fischer J, Müller T, Spatz AS, Greggers U, Grünewald B, Menzel R. 2014. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLoS One*. 19;9 (3):e91364. doi: 10.1371 / journal.pone.0091364.
31. Ford KA y Casida JE. 2006. Chloropyridinyl neonicotinoid insecticides: diverse molecular substituents contribute to facile metabolism in mice. *Chem Res Toxicol*. 19, 944–951. doi: 10.1021 / tx0600696.
32. Forister ML, Cousens B, Harrison JG, Anderson K, Thorne JH, Waetjen D, *et al.* 2016. Increasing neonicotinoid use and the declining butterfly fauna of lowland California. *Biol Lett*. 12(8). doi: 10.1098/rsbl.2016.0475.
33. Ghedini PC, Avellar MC, De Lima TC, Lima-Landman MT, Lapa AJ, Souccar C. 2012. Quantitative changes of nicotinic receptors in the hippocampus of dystrophin-deficient mice. *Brain Res*. 1483:96-104. doi: 10.1016 / j.brainres.2012.09.021.
34. Gibbons D, Morrissey C, Mineau P. 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ Sci Pollut Res Int*. 22(1):103-18. doi: 10.1007 / s11356-014-3180-5.

35. Gilburn AS, Bunnefeld N, McVean Wilson J, Botham MS, Brereton TM, Fox R, *et al.* 2015. Are neonicotinoid insecticides driving declines of widespread butterflies?. *PeerJ*. 2015; 3: e1402. doi: 10.7717 / peerj.1402.
36. Gotti C y Clementi F. 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* 74(6):363-96. doi: 10.1016/j.pneurobio.2004.09.006.
37. Guerrero Aguilera MA, Rubio Osornio MC, Portillo Martínez W, Retana-Márquez S. 2016. Tactile stimulation effects on hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory in prenatally stressed rats. *Brain Res Bull.* 124: 1–11. doi: 10.1016 / j.brainresbull.2016.03.003.
38. Hamm DG. 2013. Occupational NeuroToxicology. Disponible desde: <http://med-fom-spph.sites.olt.ubc.ca/files/2013/10/Occupational-NeuroToxicology-by-Dr.-R.-D.-Hamm.pdf> [consulta 6 marzo 2017].
39. Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, *et al.* 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336(6079): 348-350. doi: 10.1126 / science.1215039.
40. Hernández Antonio A y Hansen AM. 2011. Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Rev Int Contam Ambie.* 27, 115-127.
41. Hidalgo C y Núñez MT. 2007. Calcium, iron and neuronal function. *IUBMB Life.* 59(4-5):280-5. doi: 10.1080 / 15216540701222906.
42. Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res.* 103(1):1-11.

43. Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A. 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J Agric Food Chem* 59:2897–2908. doi: 10.1021 / jf101303g.
44. Kesner RP, Gilbert PE, Wallenstein GV. 2000. Testing neural network models of memory with behavioral experiments. *Curr Opin Neurobiol.* 10(2):260–265. doi: 10.1016/S0959-4388(00)00067-2.
45. Khakpai F, Nasehi M, Haeri-Rohani A, Eidi A, Zarrindast MR. 2013. Septo-hippocampo-septal loop and memory formation. *Basic Clin Neurosci.* 4(1):5-23.
46. Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Kuroda Y, Hayashi M, Kawano H. 2012. Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS One* 7(2): e32432. doi: 10.1371 / journal.pone.0032432.
47. Kishi M. 2002. Initial summary of the main factors contributing to incidents of acute pesticide poisoning. Boston, Massachusetts. EUA. JSI Research and Training Institute, Inc. <http://www.who.int/heli/risks/toxics/bibliographyikishi.pdf> [consulta: 6 jun 2017].
48. Kiyota Y, Miyamoto M, Nagaoka A. 1991. Relationship between brain damage and memory impairment in rats exposed to transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 538(2):295-302. doi: 10.1016/0006-8993(91)90443-Y.
49. Klein O. 1996. [Methylene-14C]YRC 2894: general rat metabolism part A: distribution of the total radioactivity in the rat determined by conventional whole-body autoradiography and radioluminography. Informe no publicado No. PF4145, edición No. M-000660-01-1, de 26 Junio 1996, de Bayer AG,

Leverkusen, Alemania. Presentado a la OMS por Bayer CropScience AG, Monheim, Alemania.

50. Klein O y Bornatsch W. 1998. [Methylene-14C] YRC 2894: general rat metabolism study part B: toxicokinetics and metabolism in the rat. Informe no publicado No. PF4331, edición No. M-001080-01-1, de 5 Febrero 1998, de Bayer AG, Leverkusen, Alemania. Presentado a la OMS por Bayer CropScience AG, Monheim, Alemania.
51. Kocaman AY, Rencüzoğulları E, Topaktaş M. 2012. In vitro investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of thiacloprid in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Environ Toxicol* 29 (6): 631-41. doi: 10.1002 / tox.21790.
52. Kumar A, Verma A, Kumar A. 2013. Accidental human poisoning with a neonicotinoid insecticide, imidacloprid: A rare case report from rural India with brief review of literatura. *Egypt J Forensic Sci.* 3(4): 123–126. doi: 10.1016/j.ejfs.2013.05.002.
53. Leranath C y Hajszan T. 2007. Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. *Prog Brain Res.* 163:63-84. doi: 10.1016 / S0079-6123 (07) 63004-0.
54. Leuchtweis J, Boettger MK, Niv F, Redecker C, Schaible HG. 2014. Enhanced neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus during antigen-induced arthritis in adult rat – A crucial role of immunization. *PLoS One.* 9(2): e89258. doi: 10.1371 / journal.pone.0089258.
55. Lin PC, Lin HJ, Liao YY, Guo HR, Chen KT. 2013. Acute poisoning with neonicotinoid insecticides: A case report and literature review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 112(4):282-6. doi: 10.1111 / bcpt.12027.

56. Liu Z, Yao X, Zhang Y. 2008. Insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs): Important amino acid residues contributing to neonicotinoid insecticides selectivity and resistance. *Afri J Biotechnol* Vol. 7 (25): 4935-4939, 29. doi: 10.1111 /j.1365-2885.2010.01160.x.
57. Lorigados L, Orozco S, Morales L, Estupiñán B, García I, Rocha L. 2013. Excitotoxicidad y muerte neuronal en la epilepsia. *Biotechnol Aplic* 30(1):9-16.
58. Lu C, Warchol KM, Callahan RA. 2014. Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honey bees winterization before proceeding to colony collapse disorder. *Bull Insectol.* 67 (1): 125-130.
59. Márquez de Prado García B. Ritmos circadianos y neurotransmisores: Estudios en la corteza prefrontal de la rata [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas; 2004.
60. Martínez Valenzuela C y Gómez Arroyo S. 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev Int Contam Ambient.* 23 (4) 185-200.
61. Medel Matus JS, Ramos Morales FR, Correa Basurto J, Cruz Sánchez JS, Saavedra Vélez MV, Velásquez Melgarejo V. 2010. Participación de los canales de calcio dependientes de voltaje en el desarrollo de la epilepsia. *Acta bioquím clín latinoam.* 44 (3).
62. Medina Marín AM y Escobar Betancourth MI. 2002. Sistema glutamatérgico, primera parte: Sinaptología, homeostasis y muerte celular. *Rev colomb psiquiatr.* 3(3).
63. Metruccio F y Boobis A. 2010. CLOTHIANIDIN: First draft. p. 19–116 JMPR.

64. Minnesota Department of Agriculture (2016). Review of Neonicotinoid Use, Registration, and Insect Pollinator Impacts in Minnesota. <https://www.leg.state.mn.us/docs/2016/other/160802.pdf> [consulta 6 marzo 2017].
65. Mondal S., Ghosh RC, Mate MS, Karmakar DP. 2009. Effects of acetamiprid on immune system in female Wistar rats. *Proc Zool Soc.* 62 (2), 109-117. doi: 10.1007 / s12595-009-0012-6.
66. Muñoz Marrón E, Adrover Roig D, Sánchez Cubillo, Miranda R, Periañez Morales JA. Capítulo Dos. Bases neuroanatómicas del aprendizaje y la memoria. En: Muñoz Marrón E y Periañez Morales JA. Fundamentos del aprendizaje y del lenguaje. Barcelona: UOC. 2012. p. 65-89.
67. Nauen R y Denholm I. 2005. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Arch Insect Biochem Physiol.* 58(4):200-15. doi: 10.1002/arch.20043.
68. Nellore K, Doss J, Krishna CM. 2013. Histopathological studies of neonicotinoid insecticide imidacloprid on different regions of albino rat Brain. *Int J Toxicol Appl Pharmacol* 3(4): 73-77.
69. Norma Oficial Mexicana NOM-003-STPS-1999. Actividades Agrícolas-Uso de insumos fitosanitarios o plaguicidas e insumos de nutrición vegetal o fertilizantes-Condiciones de seguridad e higiene. Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, México. 28-12-1999.
70. Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998. Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas. Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, México. 02-02-1999.

71. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1992. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, México. 06-12-1999.
72. Norma Oficial Mexicana NOM-256-SSA1-2012. Condiciones sanitarias que deben cumplir los establecimientos y personal dedicados a los servicios urbanos de control de plagas mediante plaguicidas. Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, México. 29-01-2013.
73. Olivares Hernández JD, Juárez Aguilar E, García García F. 2015. El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Rev Med UV*. Ene-Jun 2015: 20-28.
74. Oliveira IM, Nunes BV, Barbosa DR, Pallares AM, Faro LR. 2009. Effects of the neonicotinoid thiamethoxam and clothianidin in vivo dopamine release in the striatum. *Toxicol Lett*. 192(3):294-7. doi: 10.1016 / j.toxlet.2009.11.005.
75. Özdemir HH, Kara M, Yumrutas O, Uckardes F, Eraslan E, Demir CF, *et al*. 2014. Determination of the effects on learning and memory performance and related gene expressions of clothianidin in rat models. *Cogn Neurodyn*. 8(5): 411–416. doi: 10.1007 / s11571-014-9293-1.
76. Pappas ML, Migkou F, Broufa GD. 2013. Incidence of resistance to neonicotinoid insecticides in greenhouse populations of the whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) from Greece. *Appl Entomol Zool* 48:373–378. doi: 10.1007 / s13355-013-0197-z.
77. Paxinos G. y Watson C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Acad. Press.
78. Pérez Olvera MA, Navarro Garza H, Miranda Cruz E. 2011. Use of pesticides for vegetable crops in Mexico. En: *Pesticides in the Modern World Pesticides*

- Use and Management*. Rijeka, Croacia: InTech pp. 97-118.  
<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/21981.pdf>. [consulta: 6 nov 16].
79. Piatti VC, Ewell LA, Leutgeb JK. 2013. Neurogenesis in the dentate gyrus: carrying the message or dictating the tone. *Front Neurosci*. 4;7:50. doi: 10.3389 / fmins.2013.00050.
80. Prentice H, Modi JP, Wu JY. 2015. Mechanisms of neuronal protection against excitotoxicity, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction in stroke and neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2015 (ID 964518): 1-7. doi: 10.1155/2015/964518.
81. RAPAM. 2013. Boletín de prensa: “Se sigue exponiendo a la población a plaguicidas altamente peligrosos para beneficio de empresas transnacionales y nacionales en México”. Estado de México, México. RAPAM.  
<http://www.rapam.org.php56-26.dfw3-2.websitetestlink.com/wp-content/uploads/2015/12/Bol-Prensa-RAPAM-3-dic-2013-.pdf>. [consulta: 6 nov 2016].
82. Rizzati V, Briandb O, Guilloua H, Gamet-Payrastrea L. 2016. Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature. *Chem Biol Interact* 254: 231–246. doi: 10.1016 / j.cbi.2016.06.003.
83. Rose PH. Chapter 6. Nicotine and the neonicotinoids. En: Marss TC, editor. *Mammalian toxicology of insecticides*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 2012. p. 184-216.
84. SAGARPA. [actualización 2 may 15]. Recolecta Campo Limpio más de tres mil 100 toneladas de envases vacíos de agroquímicos en 2014. Mérida, Yucatán, México.

<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/yucatan/Boletines/Paginas/201505>

[B099.aspx](#) [consulta: 6 nov 16].

85. Samuelson EE, Chen-Wishart ZP, Gill RJ, Leadbeater E. 2016. Effect of acute pesticide exposure on bee spatial working memory using an analogue of the radial-arm maze. *Sci Rep.* 13;6:38957. doi: 10.1038 / srep38957.
86. Schaafsma A, Limay-Rios V, Baute T, Smith J, Xue Y. 2015. Neonicotinoid insecticide residues in surface water and soil associated with commercial maize (corn) fields in southwestern ontario. *PLoS One.* 10(2): e0118139. doi: 10.1371 / journal.pone.0118139.
87. Scheff SW, Baldwin SA, Brown RW, Kraemer PJ. 1997. Morris water maze deficits in rats following traumatic brain injury: lateral controlled cortical impact. *J Neurotrauma.* 14(9):615-27. 10.1089/neu.1997.14.615.
88. Schuman-Olivier Z, Stoeckel LE, Weisz E, Evins AE. Chapter Eleven–Smoking effects in the human nervous system. En: Madras B, Kuhar M, editores. *The effects of drug abuse on the human nervous system.* Oxford: Academic Press. 2014. p. 333–365.
89. Shadnia S y Moghaddam HH. 2008. Fatal intoxication with imidacloprid insecticide. *Am J Emerg Med.* 26(5): 634. doi: 10.1016 / j.ajem.2007.09.024.
90. Shao X, Liu Z, Xu X, Li Z, Qian X. 2013. Overall status of neonicotinoid insecticides in China: production, application and innovation. *J Pest Sci* 38:1–9. doi: 10.1584 / jpestics.D12-037.
91. Sheets LP, Li AA, Minnema DJ, Collier RH, Creek MR, Peffer RC. 2015. A critical review of neonicotinoid insecticides for developmental neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol.* 46(2): 153–190. doi: 10.3109 / 10408444.2015.1090948.

92. Sheets LP. Imidacloprid. En: Wexler P. Encyclopedia of toxicology. 3ra ed. Vol. 2. Londres: Academic Press; 2014. p. 1000–1003.
93. Shipton OA, El-Gaby M, Apergis-Schoute J, Deisseroth K, Bannerman DM, Paulsen O, *et al.* 2014. Left-right dissociation of hippocampal memory processes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(42):15238-43. doi: 10.1073 / pnas.1405648111.
94. Sim YJ, Kim SS, Kim JY, Shin MS, Kim CJ. 2004. Treadmill exercise improves short-term memory by suppressing ischemia-induced apoptosis of neuronal cells in gerbils. *Neurosci Lett.* 372(3):256-61. doi: 10.1016 / j.neulet.2004.09.060.
95. Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, *et al.* 2014. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22: 5–34. doi: 10.1007 / s11356-014-3470-y.
96. SINTOX. 2006. Base de datos de SINTOX 3.0. Distrito Federal, México. [http://arteym.com/amifac\\_primera/downloads/infoanual\\_sintox.pdf](http://arteym.com/amifac_primera/downloads/infoanual_sintox.pdf). [consulta: 6 nov 16].
97. Taylor P y Brown JH. Acetylcholine. En: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST y Price DL, editores. Basic Neurochemistry: Molecular, cellular y medical aspects. Massachusetts: Academic Press; 2006. p. 185-210.
98. Tomizawa M y Casida JE. 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol* 48: 339-64. doi: 10.1146 / annurev.ento.48.091801.112731.

99. Tomizawa M y Casida JE. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45: 247-68. doi: 10.1146 / annurev.pharmtox.45.120403.095930.
100. Van der Sluijs JP, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bijleveld van Lexmond MFIJ, Bonmatin JM, Chagnon M, *et al.* 2015. Conclusions of the worldwide integrated assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environ Sci Pollut Res.* 22:148–154. doi: 10.1007/s11356-014-3229-5.
101. Watanabe Y, Müller MK, von Engelhardt J, Sprengel R, Seeburg PH, Monyer H. 2016. Age-dependent degeneration of mature dentate gyrus granule cells following NMDA receptor ablation. *Front Mol Neurosci.* 12:8:87. doi: 10.3389 / fmmol.2015.00087.
102. Weber E. 2000. [Nitroimino-14C]- and [thiazolyl-2-14C]TI-435 toxicokinetic behaviour and metabolism in the rat including whole body autoradiography. Study Bayer AG, Leverkusen, FRG. Bayer Report No. 110270.
103. Wessler I, Gärtner HA, Michel-Schmidt R, Brochhausen C, Schmitz L, Anspach L, *et al.* 2016. Honeybees produce millimolar concentrations of non-neuronal acetylcholine for breeding: Possible adverse effects of neonicotinoids. *PLoS One.* 11(6):e0156886. doi: 10.1371 / journal.pone.0156886.
104. Wu IW, Lin JL, Cheng ET. 2001. Acute poisoning with the neonicotinoid insecticide imidacloprid in N-methyl pyrrolidone. *J Toxicol Clin Toxicol.* 39(6):617-21. doi: 10.1081/CLT-100108494.

105. Wu-Smart J y Spivak M. 2016. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Sci Rep.* 26;6:32108. doi:10.1038/srep32108.
106. Zhu Y, Loso MR, Watson GB, Sparks TC, Rogers RB, Huang JX, *et al.* 2010. Discovery and characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide targeting sap-feeding pests. *J Agric Food Chem* 59:2950–2957. doi: 10.1021 / jf102765x.