



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**La exposición crónica a atrazina altera los marcadores del sistema
antioxidante en los blancos dopaminérgicos en rata de la cepa Sprague-
Dawley.**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA: Biol. José Trinidad Almonte Zepeda

Dirigida por:

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

Instituto de Neurobiología-UNAM

Comité Tutorial:

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Instituto de Neurobiología-UNAM

Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez

Facultad de Estudios Superiores de Iztacala-UNAM

Campus Juriquilla Querétaro, Querétaro México. Julio de 2019



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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del jurado certificamos que la tesis elaborada por: Biol. José Trinidad Almonte Zepeda, cuyo título es: “La exposición crónica a atrazina altera los marcadores del sistema antioxidante en los blancos dopaminérgicos en rata de la cepa Sprague-Dawley”, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología), cumpliendo con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. _____

Secretario (Tutor)

Dr. _____

Vocal

Dr. _____

Suplente

Dr. _____

Suplente

Dr. _____

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

Mi más profunda gratitud a mi tutora, la Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova por sus enseñanzas y guía en el desarrollo de mi formación, así como sus conocimientos e inspiración durante mi formación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No. de registro 626201) para la realización de mis estudios de posgrado. Agradecimiento al Programa de Apoyo de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica UNAM-DGAPA-PAPIIT IN203916 y CONACYT 251510 por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto de investigación.

A los integrantes del comité tutorial; Dr. Mauricio Diaz Muñoz y al Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez, por sus valiosos comentarios y observaciones realizadas durante mi formación y la realización de mi trabajo.

Un especial agradecimiento a la Biol. María Soledad Mendoza Trejo por su enseñanzas y apoyo en la elaboración de las pruebas que permitieron realizar este trabajo. También quiero agradecer su colaboración y guía a la Dra. Eva Olivia Vázquez Martínez, Dra. Isela Hernández Plata, M en C. Dulce Jazmín Reyes Bravo por sus enseñanzas y guía para el cumplimiento de los objetivos en el desarrollo mi proyecto de investigación. Así como a la Sra. Flor Bernandino Peláez auxiliar de laboratorio, por su aporte y ayuda en las labores de laboratorio.

A la M en C. Leonor Casanova Rico y a la Dra. Nuri Aranda López por su apoyo en cuestiones administrativas. Así como a la Dra. Deisy Gasca Martínez de la unidad de análisis conductual, y a la Lic. María de Lourdes Lara Ayala por su ayuda en el uso de videoconferencia.

Resumen

La exposición de forma crónica y simultánea a tóxicos en el medio ambiente es un factor inevitable y de preocupación económico-social, debido a que se les ha relacionado con la generación de cáncer y alteraciones neurológicas. Actualmente, los modelos experimentales se han centralizado en tóxicos como los herbicidas que afectan el transporte de electrones como atrazina, debido a que pueden alterar la producción de adenina trifosfato (ATP) y ocasionar alteraciones dopaminérgicas, así como la generación de las especies reactivas de oxígeno, modificando el entorno intracelular produciendo citotoxicidad, predisponiendo a la neurodegeneración. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto neurotóxico por la exposición crónica al herbicida ATR en los sistemas oxidantes/antioxidantes en los blancos dopaminérgicos, en el modelo de rata albina y su posible relación con la alteración en el comportamiento y la conducta motor. La evaluación crónica de atrazina en el modelo de rata dio como resultado una actividad locomotora espontánea alterada, en los últimos meses de tratamiento en el grupo tratado con 10 mg ATR/kg. Mientras que en la conducta motora no se observaron efectos del tratamiento con el herbicida atrazina en la coordinación motora, pero en el protocolo de barra de equilibrio y en el laberinto elevado en cruz se observaron efectos ansiolíticos en el grupo tratado con 10 mg ATR/kg en comparación con el grupos control. El ensayo de lipoperoxidación mostró una disminución en la formación de dienos conjugados en cerebelo y mesencéfalo, y la nula tasa de formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) en las regiones analizadas. Concluyendo que las concentraciones de 1 ó 10 mg ATR/kg no es un afactor que altere el estatus antioxidante y la conducta en rata.

Abstract

The exposure of chronic and simultaneous to toxics in the environment is an inevitable, factor of social economic-concern. Currently the studies have focused on herbicides that effect the transport of electrons, such as atrazine, since they alter then production of ATP and increase the concentration of reactive oxygen species by modifying the intracellular environment generating cytotoxicity, which could predispose the generation of neurodegenerative, diseases affecting the antioxidant system. The objective of the present study was to determine the neurotoxicity effect by the chronic exposure to the herbicide ATR in the oxidant/antioxidant system in the white dopaminergic targets, in the model of the albino rat and it also effects to motorbike behavior. The atrazine chronic evaluation in the rat model resulted in impaired spontaneous locomotor activity in different months of treatment for those treated with 10 mg ATR. While in the motor behavior protocols they did not show effects on motor coordination, but shower anxiety effects in the 10 mg ATR group, unlike the 1 mg ATR group and the control group. These results indicate that the chronic exposure to ATR caused different changes in the white dopaminergic, which induce different effects on the behavior of the rat. The lipoperoxidation assay showed a decrease in the formation of conjugated dienes in cerebellum and mesencephalon, and the null ravni of formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) in the regions analyzed. Concluding that the concentrations of 1 and 10 mg ATR/kg is not an agent that alters the antioxidant status in rat brain.

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
1.1 Alteración del sistema nervioso central por efecto de tóxicos ambientales	1
2. Antecedentes	3
2.1 Atrazina	3
2.1.1 Propiedades fisicoquímicas de atrazina	3
2.1.2 Toxicocinética	4
2.1.2.1 Mecanismo de desintoxicación de xenobióticos en el sistema nervioso central	7
2.1.3 Efectos tóxicos por exposición a la atrazina	7
2.1.3.1 Efectos de la exposición a atrazina en humanos	8
2.1.3.2 Efectos de la exposición a atrazina <i>in vivo</i>	9
2.1.3.3 Efectos de la exposición a atrazina en aves	9
2.1.3.4 Efectos de la exposición a atrazina en peces y anfibios	10
2.1.3.5 Efectos de la exposición a atrazina en roedores	11
2.1.3.5.1 Efectos de la exposición a atrazina en los sistemas dopaminérgicos de roedores	13
2.2 Sistema dopaminérgico	14
2.2.1 Vías dopaminérgicas	16
2.3 Estrés oxidante	18
2.3.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)	20
2.3.2 Mecanismo de daño por efecto de la lipoperoxidación en membranas celulares	21
2.3.3 Antioxidantes	24
2.3.4 Técnicas analíticas para la detección de daño lipídico	26
3. Justificación	28
4. Hipótesis	28
5. Objetivo general	29
6. Objetivos particulares	29
7. Materiales y métodos	29
8. Sujetos	29
9. Preparación de galletas	30
10. Diseño experimental	30
11. Tareas conductuales durante la exposición a atrazina	31
11.1 Registró de actividad locomotora espontánea	31
11.2 Barra de equilibrio	32
11.3 Coordinación motora (Rotarod)	34
11.4 Protocolo de laberinto elevado en cruz	36
12. Determinación del nivel de lipoperoxidación por efecto de atrazina	37
12.1 Determinación de dienos conjugados en los blancos dopaminérgicos	37
12.2 Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)	38
12.3 Detección de enzimas antioxidantes (Western Blot)	38
13. Análisis estadístico	40
14. Resultados	41
14.1 Efecto de la administración de atrazina sobre el peso corporal	41
14.1.1 Efecto de la administración de atrazina sobre el índice de Lee	42
14.2 Efectos de la exposición a atrazina en la primera hora de exploración en el registro de la actividad locomotora espontánea durante el tratamiento	43
14.2.1 Efecto de la exposición crónica a atrazina sobre la actividad vertical	43
14.3 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre la actividad locomotora global	45
14.4 Efecto de la exposición crónica a la ATR sobre la actividad locomotora espontánea (24 horas)	46
14.4.1 Efecto de la exposición crónica a atrazina sobre la actividad vertical	47
14.4.2 Efecto de la exposición crónica a atrazina sobre la número de estereotipias	48
14.4.3 Efecto de la exposición crónica a atrazina sobre el tiempo de movimiento	49
14.5 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre el protocolo la barra de equilibrio	50
14.6 Evaluación del efecto de la exposición a atrazina en la prueba de coordinación motora (Rotarod)	51
14.7 Evaluación de la exposición crónica a atrazina en el protocolo de laberinto elevado en cruz	53

14.8 Cuantificación del daño en las membranas celulares por exposición a atrazina.....	53
14.8.1 Dienes conjugados.....	53
14.8.2 Reacción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	55
15. Discusión.....	56
15.1 Aspecto corporal.....	56
15.2 Actividad locomotora espontánea.....	58
15.3 Barra de equilibrio.....	60
15.4 Coordinación motora.....	61
15.5 Laberinto elevado en cruz.....	62
15.6 Dienes conjugados.....	64
15.7 Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	65
16. Conclusión.....	67
17. Bibliografía.....	68
18. Índice de figuras.....	89
19. ANEXO.....	90

1. Introducción

1.1 Alteraciones del sistema antioxidante por efecto de tóxicos ambientales

La exposición crónica y simultánea a contaminantes ambientales como herbicidas, metales y tóxicos se les ha relacionado con la afectación del sistema antioxidante, así como de su posible papel en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y cáncer. La alteración del sistema antioxidante (enzimático y no enzimático), la acumulación de hierro en la sustancia nigra en su parte compacta (SNpc), la alteración en la homeostasis de calcio, proteólisis alterada (Michel et al., 2016), así como proteínas mal plegadas (Riederer et al., 1989) conduce a la formación desregulada de especies reactivas de oxígeno (ERO), que al interactuar con los componentes celulares generan metabolitos activos, causando falla en la homeostasis celular y daño al ADN. El daño provocado aumenta con la edad, induciendo la activación o silenciamiento de genes que codifican para factores de transcripción, produciendo desregulación enzimática para proteínas con función antioxidante y estructural (Dalton et al., 1999). Durante la degeneración, disminuye la síntesis de ATP por fallas en la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial (complejo II), alterando la actividad sináptica al aumentar los niveles de ERO (Singh et al., 2017), así como en el ciclo de Krebs (Rustin & Rötig 2002) y la función autofagosómica y el pH lisosomal (Filomeni et al., 2015), contribuyendo a producir inflamación (Dexter & Jenner 2013) y neurodegeneración (Singh et al., 2017), por medio de activar vías proapoptóticas y de muerte celular (Michel et al. 2016), con la consecuente manifestación de alteraciones cognitivas y conductuales (Langston 2006).

Con el fin de describir los aspectos del proceso de la neurodegeneración, por efecto de la exposición a contaminantes ambientales, se han desarrollado diferentes modelos experimentales. Entre los modelos con mayor éxito en reproducir los aspectos neurodegenerativos están algunos herbicidas, debido a que estos afectan el transporte de electrones en el complejo 1 de la mitocondria, ocasionando degeneración dopaminérgica nigroestriatal altamente selectiva (Singh et al., 2017), así como proteólisis (Dexter & Jenner 2013), inflamación central y periférica (Hernández-Romero et al., 2012), debido a que provocan un desequilibrio en la formación de radicales libres en la mitocondria, manifestándose conductualmente con hipocinesia, temblor, inestabilidad postural y rigidez por la disminución en los niveles de dopamina (DA) y la muerte de células dopaminérgicas (Singh et al., 2017). Un modelo usualmente utilizado para estudiar la neurodegeneración nigroestriatal es el herbicida rotenona, que en la rata provoca alteraciones neuroquímicas,

conductuales y neuropatológicas que pueden asociarse con el fenotipo de la enfermedad de Parkinson (EP) (Betarbet et al., 2000). Existen otros agentes productores de estrés oxidativo e insuficiencia energética por inhibición del complejo 1 de la cadena de transportadores de electrones mitocondrial, como es el caso de la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y el herbicida 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo (paraquat) que son usados para el desarrollo de modelos de neurodegeneración dopaminérgica (Singh et al., 2017).

Estudios recientes se han centralizado en el herbicida atrazina (ATR), debido a que este herbicida inhibe el transporte de electrones en los cloroplastos en plantas y a su amplio espectro de uso. Resultados en modelos con roedores han demostrado que el herbicida ATR causa neurotoxicidad dopaminérgica, que se manifiesta con la disminución en los niveles de DA en estriado (Coban y Filipov 2008; Bardullas et al., 2011, 2013; Rodríguez et al., 2013), con deficiencias en tareas de aprendizaje e hiperactividad locomotriz en ratas cuando fueron expuestas de forma crónica (un año de tratamiento) a 10 mg ATR/kg (Bardullas et al., 2011), y disminución en el número de células positivas a tirosina hidroxilasa (TH^+) en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) (Coban y Filipov 2008; Bardullas et al., 2013). Mientras que la exposición repetida al herbicida ATR (6 inyecciones) indujo hipoactividad y una reducción de los niveles de DA y sus metabolitos ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA), sin producir alteraciones en la expresión estriatal de los mRNA para superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) y tiorredoxina-1 (Trx-1), por el contrario, en el núcleo accumbens solo se reportó una baja regulación de mRNA para Trx-1 (Rodríguez et al., 2013). Por otro lado, en el mesencéfalo ventral se reportó una regulación a la baja del mRNA para TH^+ y transportador de dopamina (DAT), y un aumento de la expresión de transportador vesicular de monoaminas de tipo 2 (VMAT-2). Actualmente se desconoce cómo la ATR afecta los sistemas antioxidantes en los blancos dopaminérgicos del cerebro de rata cuando se les expone de forma crónica por un año a ATR, así como de su posible afectación en los blancos dopaminérgicos que regulan la actividad motora y cognitiva. Por tal motivo, se decidió realizar el presente estudio con el fin de conocer la afectación de los sistemas antioxidantes en los blancos dopaminérgicos en el modelo de rata albina (Sprague-Dawley).

2. Antecedentes

2.1 Atrazina

La atrazina (ATR; *6-cloro-N-etil-N-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina*) es un herbicida de tipo organoclorado, selectivo, sistémico y residual de uso pre y post emergencia, perteneciente a la familia de las cloro-s-triazinas. La ATR normalmente es aplicada en cultivos de maíz, sorgo y caña de azúcar para el control de malezas y gramíneas inhibiendo su crecimiento (Rong et al., 2013). La ATR es absorbida por medio de las raíces y las hojas inhibiendo el proceso de fotosíntesis, bloqueando el transporte de protones en el fotosistema 2 de la clorofila en las membranas de tilacoidales en los cloroplastos, aumentando la generación de radicales libres y la disminución en la producción de ATP. La ATR al competir selectivamente por el complejo II de unión a la plastoquinona (PQ) en la proteína D1 (gen *psbA* en plantas) en el fotosistema 2 (Hess 2000), aumenta el estrés oxidativo (aumento de los niveles oxígeno singulete 1O_2) provocando la muerte celular (Macpherson et al., 1993; Gotardo et al., 2006). Lo que plantea la hipótesis, dado que los complejos 1 y 3 de la cadena de transferencia de electrones mitocondrial poseen sitios bioquímicos similares en la estructura de unión a PQ en plantas. Se especula que ATR podría unirse a los complejos mitocondriales 1, II y III dando como resultado, la supresión de la fosforilización oxidativa mitocondrial y la síntesis de ATP alterando el medio intracelular (Cheney et al., 1997) activando vías proapoptóticas y de muerte celular (Michel et al. 2016).

Debido a su uso general y consistente en una variedad de cultivos, ATR puede tener una alta persistencia en suelos y subsuelos de hasta un año en condiciones de humedad, lo que le confiere un elevado potencial de contaminar los mantos acuíferos por efecto de la erosión y la lixiviación (Song et al., 2009), así como de encontrarse en alimentos y agua de personal expuesto y no expuesto a herbicidas (Curwin et al., 2005; Gammon et al., 2005). Estudios epidemiológicos han relacionado la exposición a ATR con efectos adversos en humanos (Catenacci et al., 1993) y en organismos no blanco (Gammon et al., 2005), lo que ha motivado el desarrollo de investigaciones en modelos animales para determinar cómo se producen las alteraciones metabólicas, fisiológicas y de comportamiento (Simpkins et al., 2011).

2.1.1 Propiedades fisicoquímicas de atrazina

La atrazina es un compuesto orgánico que consiste en un anillo aromático heterocíclico y dos restos alquilo, perteneciente a los herbicidas triazínicos organoclorados (Hansen et al., 2013). La ATR se

presenta en forma de polvo blanco, cristalino e inodoro, tiene una fórmula molecular de $C_8H_{14}ClN_5$ y un peso molecular de 215.68 g/mol, con una densidad de 1.87 g/cm³ a 20 °C y una solubilidad en agua de 33 mg/L a 25.7 °C (Fan y Alexeeff 1999). La ATR puede ser estable en un medio neutro (pH es de 6 - 8 a 24 °C), aunque se puede hidrolizar en medios ácidos a temperaturas mayores de 60 °C, por lo que puede ser ligeramente ácida o básica dependiendo del medio en que se disuelva (Fan & Alexeeff 1999; Gammon et al., 2005). Por lo que ATR se puede comportar como una base débil que se protona a un $pH \leq 4$, favoreciendo la absorción en sustancias iónicas, y ser alterada por la composición del suelo (Ahmad & Rahman 2009).

La baja solubilidad de ATR en agua le confiere una baja movilidad en sólidos y una volatilidad por presión en vapor menor de 3×10^{-7} mm Hg a 20 °C, lo que le permite una alta persistencia en el suelo con una vida media de 100 días, y una vida media de degradación bacteriana de 12 días (Gammon et al., 2005). Normalmente la ATR se degrada por hidrólisis en suelos a una temperatura de 55.7 °C (Orme & Kegley 2004). Por lo que ATR y sus metabolitos son considerados químicos potencialmente tóxicos en mantos acuíferos y el suelo, en zonas donde se les utiliza para el control y tratamiento de maleza en cultivos de maíz y trigo (Fan & Alexeeff 1999).

2.1.2 Toxicocinética

El herbicida ATR tiene amplio espectro de uso, lo que le permite una alta permanencia en zonas de cultivo de hasta un año. En el suelo, la fotólisis y la acción microbiana degradan el ATR en el medio ambiente produciendo metabolitos más móviles y reactivos que la propia molécula de ATR, esto se debe a que no pueden romper o deshalogenar el anillo s-atrazina (Mulbry 1994). Como es el caso de las bacterias *Rhodococcus sp* (Behki et al., 1993) y *Pseudomonas sp* (De Souza et al., 1995) que degradan la ATR por medio de la actividad de citocromo P450 (N-desalquilación) en dietilatrizona, deisopropilatrizona e hidroxiatrizona contaminando los mantos acuíferos (De Souza et al., 1995), alterando procesos fisiológicos en organismos no blancos como anfibios y peces (Khan et al., 1979). Desde 1991, en los EE. UU. se implementó la regulación del uso de ATR en los cultivos, debido a que se le relacionó con efectos perjudiciales en el ser humano y organismos no blanco (Gammon et al., 2005). Implementando un límite permisible de detección en agua para consumo humano de 2 µg/L (Shipitalo & Owens 2003). Mientras que, para el caso de la Unión Europea la concentración permitida en el suelo para ATR es de 0.1 µg/kg, y en el agua de 0.1 µg/L

para compuestos únicos del plaguicida, y de 0.5 µg/L para mezclas de herbicidas (suelo y agua) (Vonberg et al., 2014).

Al ingerirse y absorberse la ATR por el tracto gastrointestinal, sus metabolitos se excretan por medio de la orina y las heces fecales, mientras que en sangre la ATR tiene una vida media de 24 a 48 h a una exposición de 0.1 mg/kg (Abarikwu et al., 2012). De acuerdo con estudios, donde se administró de forma crónica ATR en ratas de la cepa Wistar, se observó que el 20 % de la dosis administrada de ATR se excretó a través de las heces fecales dentro de las 72 h posteriores a la ingesta, y el 80 % restante permaneció en sangre, por lo que el 65 % se elimina a través de la orina y el 15 % puede detectarse en cerebro, hígado, riñones y pulmón (Campos-Pereira et al., 2012). Mientras que, por contacto su sintomatología es irritación ocular y cutánea, por ingesta provoca diarrea, vómitos, espasmos musculares, dificultad respiratoria, así como daño en el riñón, hígado, corazón y cerebro produciendo alteraciones fisiológicas (Khan et al., 1979).

Tras su administración oral de ATR (30 mg ATR/kg) en ratas (cepa Fisher), se metaboliza mediante la oxidación del citocromo P450 a metabolitos clorados desalquilados, los cuales pueden sufrir una segunda conjugación con glutatión (GSH) para formar conjugados no clorados por N-desalquilación, eliminando un grupo alquilo formando 2-cloro-4,6-diamino-s-triazina (DACT), un compuesto más soluble que se metaboliza y se elimina mayoritariamente a través de la orina y las heces dentro de las primeras 48 horas tras su ingesta (Timchalk et al., 1999).

En un estudio donde se examinó la distribución de ATR en la madre lactante y el neonato, se encontró que después de una exposición aguda (tres días) de 2 - 4 mg ATR/kg vía nasogástrica, y después del periodo de lactancia (2.5 horas), los resultados mostraron que ATR se transfería en un 0.007 % de la dosis al estómago y 0.002 % al cerebro de las crías después del periodo de lactancia. Por otro lado, en la madre se encontró que la ATR se distribuía en hígado y riñón cuando se les administraba las concentraciones mayores de ATR (2 y 4 mg ATR/kg), mientras que el 0.003 % de la dosis se encontró en hipotálamo, caudado y corteza cerebral (Stoker & Cooper 2007).

En protocolos donde utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 que fueron expuestos a diferentes concentraciones de ATR (5, 25, 125 o 250 mg ATR/kg), encontraron que el principal metabolito encontrado en cerebro fue DACT (Lin et al., 2011). Cuyos niveles disminuyeron lentamente en paralelo a la cinética del DACT en plasma, lo que sugiere que ATR se distribuye y metaboliza ampliamente a niveles elevados cuando se excreta por medio de orina, encontrándose en altas

concentraciones en orina, plasma, hígado y cerebro después de un lapso de 2 horas de la ingesta de ATR (Ross et al., 2009) (Figura 1).

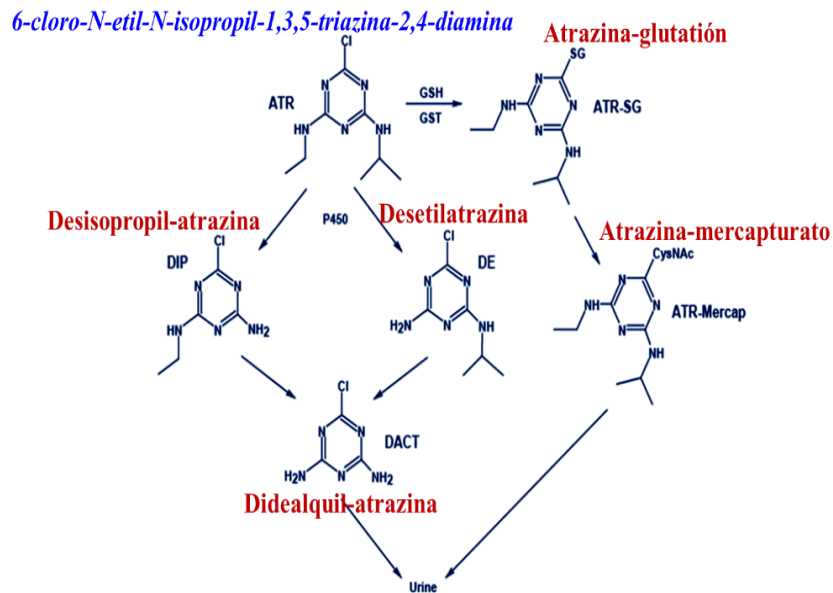


Figura 1. Biotransformación de ATR en estudios *in vitro*. La ATR es metabolizada por citocromo P450 y en menor grado por glutatión transferasa (GST). Donde los principales metabolitos derivados de la acción de P450 son N-desalquilados a desetilatrazina (DE), desisopropil-atrazina (DIP) y didealquil-atrazina (DACT) siendo el principal metabolito detectado en rata, ratón y humano cuando estuvieron expuestos de forma crónica a ATR (Ross et al., 2009).

Actualmente se desconoce cómo es que la ATR interacciona con los órganos diana, pero estudios en rata (Sprague-Dawley) que fueron expuestos a diferentes concentraciones de ATR (0, 10, 30, 100 o 300 mg ATR/kg/día) por tres días, observaron que ATR formaba aductos covalentes con la hemoglobina, al reaccionar con sitios nucleofílicos en proteínas y lípidos modificando su solubilidad produciendo cambios en los grupos sulfhidrilo de proteínas en los aminoácidos cisteína, lisina, arginina y metionina lo que facilita su incorporación y permanencia en el organismo, permitiéndole atravesar la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica (Dooley et al., 2006). En estudios de espectrometría de masas, han demostrado que tanto ATR y su metabolito DACT son capaces de formar aductos covalentes con macromoléculas celulares, interaccionando con residuos de cisteína en proteínas membranales de células en roedores y posiblemente con la albúmina en humanos (McMullin et al., 2003), inhibiendo la señalización por calcio en la hormona luteinizante (LH), al formar aductos en proteínas involucradas en la regulación de calcio, inhibiendo la función hormonal de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y la liberación de la hormona luteinizante (LH) en la línea celular adenohipofisarias β (L β T2) a una concentración de 300 μ M durante 24 horas (Dooley et al., 2013). Con el propósito de conocer los aspectos que

relacionan a los xenobióticos y la relación en la aparición de enfermedades neurodegenerativas, se han desarrollado modelos experimentales para determinar cómo se produce la afectación en el sistema nervioso central (SNC).

2.1.2.1 Mecanismo de desintoxicación de xenobióticos en el sistema nervioso central

El proceso de desintoxicación se encarga de metabolizar drogas, neurotoxinas, así como componentes endógenos y exógenos que actúan sobre el SNC (Ferguson y Tyndale 2011). Los mecanismos de desintoxicación en el SNC se producen de forma conjunta entre la familia de las enzimas citocromo P450 produciendo N-desalquilación y el GSH que es catalizada por la glutatión transferasa (GST) (Gotardo et al., 2006). El proceso se da a través del desplazamiento del enlace carbono-cloro y su posterior formación de un conjugado de atrazina-GSH (dipéptidos y conjugados de ATR-Cisteína) permitiendo la desintoxicación (Rong et al., 2013).

Durante el metabolismo de xenobióticos por citocromo P450 y GST, las defensas antioxidantes enzimáticas (SOD-Mn y GPx-1) pueden reducir su actividad y ocupar sustratos endógenos que los convierten en metabolitos neuronales activos, induciendo la predisposición a la neurotoxicidad por el desequilibrio entre agentes formadores de ERO (Dutheil et al., 2008). O bien, por la inhibición del citocromo P450 (isoforma CYP2E1) por acción de xenobióticos, ya que puede generar una nueva ruta metabólica de DA, aumentando los niveles de DA extracelular en la sustancia nigra en rata, afectando la neurotransmisión dopaminérgica en el estriado como se observa en enfermedades neurodegenerativas (Nissbrandt et al., 2001).

2.1.3 Efectos tóxicos por exposición a atrazina

La exposición ambiental u ocupacional a contaminantes ambientales puede acarrear diferentes efectos y perturbaciones celulares como; alteraciones inmunológicas, metabólicas y conductuales (Khan et al., 1979), tanto en modelos animales como en el humano (Carpenter et al., 1998).

2.1.3.1 Efectos de la exposición a ATR en humanos

Se estima que las poblaciones que utilizan aguas subterráneas como su fuente principal de agua potable, pueden estar expuestas a una concentración de 1 µg ATR/L (Abarikwu et al., 2012). En Indiana EE. UU. las mujeres que consumieron agua contaminada con ATR mostraron niveles cuantificables de ATR (> 1 µg ATR/L) y mercapturato de ATR en la orina (> 0.2 µg ATR/L), lo

que se asoció con la restricción del crecimiento fetal y el tamaño de la circunferencia de la cabeza del bebé (Chevrier et al., 2011), así como de parto prematuro (Ochoa-Acuña et al., 2009). Por otro lado, un estudio reveló que la exposición combinada de ATR y a otros herbicidas de jardín como glifosato, tiocarbamatos, carbaril e insecticidas tuvieron una correlación positiva con la generación de aborto prematuro (Savitz et al., 1997). La ATR también se ha relacionado con el desarrollo de cáncer en riñón, cerebro (Mcelvoy et al., 2006) y de mama en mujeres (20 a 79 años) que estuvieron expuestas de 1 a 2.9 mg ATR/kg en áreas rurales de Wisconsin (Bassil et al., 2007). Estudios epidemiológicos donde se incluyó a trabajadores agrícolas del estado de Iowa en los EE. UU. se observó que después de su día laboral presentaban compuestos de acetato de etilo, trazas y mercapturato, así como un pH ácido ($\text{pH} = 2$) en su orina como efecto de la exposición a ATR (Mendaš et al., 2012). Entre tanto, obreros de una planta procesadora de ATR, mostraron una excreción diferencial de ATR (10 a 700 μmol) y de sus metabolitos como ATR-desalquilada (80 %), ATR-desisopropilada (10 %) y ATR-desetilada (8 %) a través de la orina en un lapso de 24 horas (Catenacci et al., 1993).

2.1.3.2 Efectos de la exposición a ATR *in vitro*

Estudios epidemiológicos han señalado que la ATR puede generar efectos adversos a la salud, sin embargo, el mecanismo celular es desconocido. Con el fin de esclarecer el mecanismo de acción de ATR y su efecto celular, se han realizado estudios *in vitro* para determinar su posible efecto en el organismo. En un estudio donde se utilizó células de neuroblastoma humano (línea celular SH-SY5Y) y que fueron expuestas a concentraciones mayores de 50 $\mu\text{g ATR/mL}$ en un rango de tiempo de 24 a 48 horas, los resultados mostraron una disminución en la viabilidad celular e inducir la presencia de características fenotípicas apoptóticas, con un aumento de la expresión de marcadores asociados a la apoptosis como Bax, p53 y p21, así como el aumento en la formación de ERO conforme aumentaba la concentración de ATR (Abarikwu & Farombi 2015). Al observar los cambios en la expresión de los marcadores apoptóticos, se llevó a cabo una indagación de como la ATR produciría daño en el ADN. En células epiteliales de mamas humanas (MCF-10A) cuando se expusieron a concentraciones que variaron de 0.1 a 10 $\mu\text{g ATR/mL}$, la ATR aumentó la expresión del receptor de muerte celular TNRF1 (receptor 1 del factor de necrosis tumoral) y la Rad17 (proteína RAD17 es el punto de control del ciclo celular en células humanas) fosforilada (ser 635),

sugiriendo que la ATR induciría roturas de la doble cadena de ADN predisponiendo a las células al desarrollo de cáncer (Huang et al., 2015).

En diferentes estudios se ha reportado que la ATR tiene el potencial de afectar el sistema dopaminérgico (Coban & Filipov 2007; Bardullas et al., 2011; Bardullas et al., 2013; Rodríguez et al., 2013) lo que ha motivado a realizar estudios *in vivo* para revelar la consecuencia de la exposición a ATR en neuronas dopaminérgicas a nivel celular. Un ejemplo de esto se observó en la exposición a ATR en un cultivo celular en células tirosina hidroxilasa positivas (TH⁺) de mesencéfalo o N27, que demostró una disminución de la viabilidad celular en células diferenciadas y no diferenciadas, cuando estuvieron en exposición a una concentración de 300 µM de ATR y de su metabolito DACT (300 µM) por un lapso de 48 horas. También se observó una disminución de la capacidad mitocondrial en producir ATP, y un tamaño disminuido en el soma, lo que demostró el efecto citotóxico en el cultivo celular y la susceptibilidad en producir apoptosis mientras aumenta el tiempo de exposición a ATR (Lin et al., 2013). Las modificaciones en la síntesis y los niveles de DA, se observaron en explantes de estriado de rata cuando estuvieron expuestas a 100 µM ATR, con la diferencia en que no se produjo efecto en la actividad de TH⁺, pero se observó un aumento en los niveles de los metabolitos DOPAC y HVA en relación con los niveles de DA (Filipov et al., 2007). Hay que tener en cuenta que la ATR no se puede degradar por completo, el análisis de estudios anteriores han revelado que la ATR es una molécula que presenta grupos Cl⁻ e OH⁻ unidos al anillo de triazina, lo que le confiere una alta persistencia en el organismo, tal y como se observó en una preparación *in vitro*, donde se evaluó la degradación por hidrolisis y N-desalquilación de una mezcla de atrazina/simazina en homogenados de una fracción soluble de hígado de oveja y cerdo (Khan et al., 1979).

2.1.3.3 Efectos de la exposición a ATR en aves

La bioacumulación y la persistencia ambiental de ATR plantea un peligro para el ecosistema, las aves al ser sensibles a la contaminación ambiental pueden ser considerados como un bioindicador del estado ecológico por efecto de la exposición a tóxicos ambientales. Lo que ha motivado a realizar estudios para determinar las alteraciones y los mecanismos tóxicos en modelos animales como las codornices. La exposición a 250 mg ATR/kg puede regular positivamente el nivel de actividad de la citocromo P450 en ovarios de codornices (*Coturnix coturnix*) hembras, predisponiendo a los órganos reproductivos al daño por la acumulación de ATR en el tejido

ovárico, afectando la síntesis de hormonas esteroideas produciendo infertilidad (Qin et al., 2015). También puede evitar el desarrollo ovárico y del oviducto, como efecto del ajuste hormonal, regulando el factor esteroideogénico interrumpiendo el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, sin inducir efecto sobre la mortalidad ni en su peso corporal. Por otro lado, la ATR ocasionó un aumento de la expresión de factores apoptóticos y disfunción mitocondrial en codornices machos cuando se les administró ATR (0, 50, 250 o 500 mg ATR/kg) vía oral por 45 días, así como un aumento del estrés oxidativo y la disminución de las defensas antioxidantes (enzimático-no enzimático) cuando estuvieron expuestas a concentraciones letales de ATR (500 mg ATR/kg), bloqueando la respuesta de defensa mediada por el factor nuclear derivado de eritrocitos 2 (Nrf2), derivando en cambios estructurales-funcionales en el hígado (Zhang et al., 2017). En otro estudio, donde se utilizó la misma metodología y tratamiento de ATR, se observó una respuesta alterada en la homeostasis de la actividad de citocromo P450, así como de su expresión en el cerebelo, permitiendo la acumulación de ATR en el organismo generando neurotoxicidad en el cerebelo, modificando la ejecución motora. En el estudio también se observaron efectos al alza en la expresión de factores de transcripción activados por ligando, siendo el responsable de la transcripción de genes relacionados con la respuesta a xenobióticos como receptores nucleares a xenobióticos (NXR)/receptor constitutivo de androstano (CAR), lo que aumentó la respuesta tóxica producida por ATR en el cerebelo (Xia et al., 2017).

2.1.3.4 Efectos de la exposición a ATR en peces y anfibios

Debido a su persistencia en el suelo y de su probabilidad a contaminar los mantos acuíferos, la ATR es considerada un factor ecotóxico, con la cualidad de inducir defectos en organismos acuáticos como peces y anfibios. La exposición a ATR (10 o 20 mg ATR/kg) en etapas tempranas del desarrollo, puede ser una condicionante en el efecto teratogénico en peces cebras (*Danio rerio*), produciendo defectos fisiológicos y sistémicos en las primeras 48 horas de desarrollo, como retardos en la organogénesis, una desaceleración en sus movimientos y trastornos funcionales en el corazón. La ATR también puede inducir una baja actividad en la glutatión-s-transferasa (GST), lo que indicaría que el sistema de desintoxicación se ve afectado, dando lugar a anomalías morfológicas en el pez (Wiegand et al., 2001). En otro estudio, con diferentes concentraciones de ATR (0, 0.3, 3 o 30 µg ATR/kg) y el mismo modelo animal, se observaron alteraciones en los niveles de serotonina (5-HT) y su metabolito ácido 5-hidroxiindolacético (5-

HIAA) en peces hembras, cuando se mantuvieron en su etapa de embriogénesis (3 µg ATR/kg por 3 días), así como alteración en los niveles de expresión para los mRNA para genes implicados en la síntesis, transporte y metabolismo de 5-HT (VMAT y sus receptores a serotonina como HTR2C y HTR1A), alterando la función neuroendocrina y el ciclo celular, contribuyendo a modificar las funciones neurológicas en la etapa adulta del pez (Wirbisky et al., 2015). ATR también puede inducir la secreción de mucosidad en las branquias alterando su respiración, generando movimientos letárgicos y descoordinados, así como la reducción en la pigmentación corporal. Al aumentar el tiempo de exposición (15 días) a concentraciones letales de ATR (4.24, 5.3 ó 10.6 mg ATR/L), produce cambios en la actividad de desintoxicación, generan estrés oxidativo en el hígado, con aumento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR) aumentando la mortalidad en peces (*Channa Punctatus*) (Ddidigwu et al., 2010). Otro de los organismos que presentan efectos fisiológicos y reproductivos por exposiciones a ATR son los anfibios. Uno de los modelos utilizados para determinar el efecto de ATR, son las ranas de la especie *Xenopus laevis*, que a concentraciones de 0.1–1 µg ATR/L presentan desmasculinización con cambios morfológicos gonadales y reducción en los niveles de testosterona (Gammon et al., 2005). Mientras que en ranas leopardo macho (*Rana pipiens*) expuestas a diferentes concentraciones de ATR (0.1 o 25 ppm) en transectos agrícolas entre los estados de Utah a Iowa en los EE. UU. ATR les indujo anomalías con retraso en el desarrollo y la generación de hermafroditismo, como resultado de la alteración de la enzima aromatasa, causando efectos en la síntesis y secreción de estrógenos en los machos, inhibiendo la espermatogénesis como resultado posible del agotamiento de andrógenos, por lo que ATR es considerada una amenaza para la población de anfibios en los ecosistemas en los EE. UU (Hayes et al., 2002).

2.1.3.5 Efectos de la exposición a ATR en roedores

Los estudios epidemiológicos han demostrado el vínculo entre la exposición a ATR y los resultados adversos para la salud humana, aunque estos no son concluyentes y es debido a que la exposición a ATR no se ha cuantificado con precisión. Por tal motivo se han realizado diferentes estudios en roedores de laboratorio con el fin de esclarecer su mecanismo de acción.

ATR puede provocar alteraciones en roedores, como se pudo observar en ratones C57BL/6 cuando se exponen oralmente a dosis única de ATR (5 - 250 mg ATR/kg), reportando que su principal metabolito encontrado después de su dosificación fue DACT en orina, plasma y tejido, aunque los

niveles de DACT disminuyeron después de 2 horas de la dosificación. Por otro lado, los niveles cerebrales de ATR (1.5 μ M) se mantuvieron hasta las 72 horas después de la dosificación, a medida que aumenta la concentración (Ross et al., 2009). Por otra parte, cuando se administra ATR por un lapso de 21 días en ratones Balb/c a diferentes concentraciones de ATR (100 - 400 mg/kg), produce inmunotoxicidad con afectación en la homeostasis del calcio, 24 horas después de su administración, en conjunto con la generación de ERO en el bazo de ratones causando agotamiento de GSH en suero, desencadenando cambios en la transcripción en el ADN (Gao et al., 2016). Los resultados de las investigaciones en ratas Wistar, reportan cambios en las concentraciones de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) 15 minutos después de la exposición, encontrando como metabolito principal el DACT, aunque DACT no tuvo efectos sobre ACTH y en la liberación de esteroides, esto cuando estuvieron expuestas a ATR una dosis de 0.5 a 200 mg ATR/kg de peso (Laws y Hotchkiss 2009). Mientras que en ratas Sprague-Dawley, cuando se les administró una inyección de ATR (100 mg ATR/kg), no causó alteraciones en los niveles tisulares del aminoácido ácido γ -aminobutírico (GABA) y L-glutamato, mientras que el marcador de actividad neuronal c-Fos aumentó su expresión en el tálamo, la amígdala, el núcleo accumbens y la sustancia nigra, lo que estuvo conductualmente asociado a hipoactividad locomotora durante 90 minutos de su administración (Rodríguez et al., 2017).

La ATR tiene la cualidad de afectar el sistema reproductivo en ratas Long-Evans y Sprague-Dawley, cuando se les expone por 21 días a concentraciones de 75, 150 ó 300 mg ATR/kg, se observó interrumpido el ciclo estral (Cooper et al., 1996). La ATR puede causar un inicio tardío de la pubertad en ratas hembras Sprague-Dawley cuando se les administra 30 ó 100 mg ATR/kg por 25 días (Ashby et al., 2002), o alterar los niveles de la hormona luteinizante y el nivel sérico de prolactina (Cooper et al., 2000). Por otro lado, en ratas Sprague-Dawley de ocho semanas de edad expuestas a 30 ó 300 μ g ATR/kg en el agua debida por un lapso de 5 meses, ocasionó obesidad y resistencia a la insulina, bloqueando la actividad de los complejos de fosforilización oxidativa 1 y 3, disminuyendo los niveles de ATP y el consumo de oxígeno. Mientras que en el hígado y el músculo esquelético se observaron mitocondrias hinchadas con crestas parcialmente alteradas, así como una disminución de la tasa metabólica y aumento del peso corporal (Lim et al., 2009). La ATR también puede modificar las defensas antioxidantes en ratas, como se pudo observar en un estudio donde se evaluó una dosis de ATR (120 mg ATR/kg) en co-tratamiento con selenio (0.25 mg/kg) en ratas macho de la cepa Wistar (118 g de peso corporal). El tratamiento produjo inhibición

de la actividad de la GST y un aumento de la formación de malondealdehído (MDA) en hígado, testículos y el epidídimo. La dosis de ATR disminuyó la actividad de SOD en hígado y testículo, pero aumentó su actividad en epidídimo. Mientras que los niveles de glutatión hepático y de lactato deshidrogenasa aumentaron, y la actividad enzimática para la enzima catalasa aumentó en epidídimo, disminuyendo la actividad del glutatión peroxidasa (GPx-1) en el hígado (Adesiyan et al., 2011).

2.1.3.5.1 Efectos de la exposición a ATR en los sistemas dopaminérgicos de roedores

La exposición a herbicidas que afectan el transporte de electrones en la mitocondria se les ha relacionado con la etiología de la enfermedad de Parkinson, como estaría actuando ATR. Esto ha motivado a realizar investigaciones con el fin de esclarecer el mecanismo de acción de ATR en el sistema dopaminérgico en roedores. Resultados previos de varios autores (Coban & Filipov 2007; Bardullas et al., 2011; Bardullas et al., 2013; Rodríguez et al., 2013) han demostrado que la exposición a ATR produce alteraciones en la fisiología de los sistemas dopaminérgicos, con afectación en la actividad locomotora y en procesos cognitivos.

La exposición a sustancias tóxicas durante la etapa gestacional puede atraer una variedad de efectos adversos en organismos en desarrollo, al evaluar los efectos de ATR (0, 25 ó 50 mg ATR/kg, vía oral) en la descendencia de ratas preñadas Sprague-Dawley durante la etapa de gestación al día postnatal 1. Los resultados mostraron una disminución de los niveles de DA en estriado en las hembras preñadas cuando fueron tratadas con 50 mg ATR/kg, también se observó que la madre podría transferir la ATR a los fetos vía barrera placentaria, observando niveles bajos de DA en los sistemas dopaminérgicos de las crías. Al mismo tiempo, se pudo observar una disminución en la expresión de mRNA para Nurr1 (gen esencial para el mantenimiento del sistema dopaminérgico en el mesencéfalo), DAT, VMAT-2, mostrando un efecto transitorio en la descendencia, predisponiéndolos a la generación de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Li et al., 2014). ATR produjo una disminución en los niveles tisulares de DA estriatal, así como en la captación de DA en las vesículas sinápticas en ratas Sprague-Dawley. Mientras que sus metabolitos formados por acción de la citocromo P450 y GSH, dietilatrazina (DE) y diisopropilatrazina (DIP) pero no DACT, inhibieron la captación de DA en las vesículas sinápticas estriatales y en el transportador vesicular, lo que sigue que ATR disminuye la DA vesicular y aumenta la DA citoplasmática (Hossain & Filipov 2008), que al oxidarse y acumularse en las terminales sinápticas

ocasionaría estrés oxidante con la posible formación de radicales libres, produciéndose así lipoperoxidación en las membranas celulares.

Estudios en ratas de la cepa Sprague-Dawley expuestas crónicamente (un año de tratamiento) a una concentración 10 mg ATR/kg de peso corporal y en ratones macho de la cepa C57BL/6 a concentraciones de 5 - 200 mg ATR/kg durante 14 días, han demostrado que ATR es un agente potencialmente tóxico para los sistemas dopaminérgicos con repercusiones tanto cognitivas como motoras. Los resultados mostraron que ATR en roedores altera la actividad motora, como reflejo de disminución de los niveles de DA en estriado y en el número de células positivas a la enzima TH⁺ en la SNpc (Coban & Filipov 2007; Bardullas et al., 2013), y el área ventral tegmental (AVT) (ratón) (Coban & Filipov 2007). De igual forma, la exposición repetida a 100 mg ATR/kg (seis inyecciones vía intraperitoneal en un lapso de dos semanas) produce hipoactividad inmediatamente después de cada inyección, y dicha hipoactividad prevalece por un lapso de cinco días, acompañada de la reducción de los niveles de DA, DOPAC y HVA en estriado, sin producir cambios en los niveles de expresión en la enzima TH. La administración repetida no produjo efectos en la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes SOD-Mn y Trx-1 en estriado, aunque en el núcleo accumbens reportó disminuida la expresión del gen Trx-1 sin cambios en los niveles de DA y sus metabolitos. Mientras que en el mesencéfalo ventral se encontró que ATR inducía una regulación a la baja del mRNA para TH⁺ y DAT, pero producía un aumento en la expresión de mRNA para VMAT2 (Rodríguez et al., 2013). Conductualmente ATR induce defectos en la memoria espacial en la prueba del laberinto acuático de Morris en ratas puberales de la cepa Sprague-Dawley, que estuvieron expuestas por 28 días a ATR de forma oral (50, 100 ó 200 mg/kg de peso corporal), reduciendo el número de visitas a plataforma de escape a medida que aumentaba la dosificación de ATR (Li et al., 2015).

Es importante resaltar que el metabolismo alterado de DA genera estrés oxidativo. Debido a que la DA normalmente se vesícula, el exceso de DA en el espacio extracelular puede oxidarse por vía enzimática generando dopamina-quinona, por modificación covalente de los nucleófilos celulares como el GSH y residuos de cisteinilo de las proteínas. También se ha observado que la dopamina-quinona puede inactivar el DAT y producir disfunción mitocondrial e inflamación en las mitocondrias cerebrales. Este proceso se produce por la oxidación de DA y la modificación de quinona, siendo los dos principales factores generadores de estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas (Berman & Hasting 1999). Estudios anteriores sugieren que la exposición a ATR

produce deficiencias motoras, produciendo alteraciones en la neuroquímica dopaminérgica estriatal (Coban & Filipov 2007; Bardullas et al., 2011; 2013, Rodriguez et al., 2013), que son consecuencia de la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo (Coban & Filipov 2007; Bardullas et al., 2013; Sun et al., 2014), lo que explicaría las alteraciones en la conducta motora, tal y como se observan en patologías como la enfermedad de Parkinson.

2.2 Sistema dopaminérgico

La dopamina (DA) o 3,4-dihidroxifenilalanina es una catecolamina formada por dos anillos de benceno con dos grupos hidroxilos que forman el núcleo catecol y un radical etilo unido al núcleo. La DA necesita de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en presencia de Fe^{2+} y tetrahidropteridina forma L-DOPA o levodopa (4,3-dihidroxifenilalanina), la L-DOPA se descarboxila a DA por medio de L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) en presencia de fosfato piridoxal como coenzima (Brady et al., 2012). La DA se encuentra en el núcleo arcuato en el mesencéfalo ventral (Voiculescu et al., 2014), bulbo raquídeo (Höglinger et al., 2015), en el eje hipotálamo-hipófisis (Grattan 2015) y las capas plexiformes de la retina (Hamilton et al., 2012). Las diferentes regiones donde se encuentra DA puede formar múltiples aferencias y eferencias desde y hasta el neocórtex, la corteza cerebral, hipotálamo, el sistema límbico y los ganglios basales regulando el control del movimiento, sistema inmune y la secreción hormonal (Voiculescu et al., 2014).

La DA presenta una variedad de receptores de tipo metabotrópicos, cada uno con características farmacológicas y bioquímicas particulares. Keibian y Calne en 1979 dividieron a los receptores dopaminérgicos en dos grupos; D_1 y D_2 , en el grupo D_1 incluyeron a los receptores D_1 y D_5 , mientras que los receptores del grupo D_2 incluyen los receptores D_2 , D_3 y D_4 (Voiculescu et al., 2014). Al liberarse la DA en la hendidura sináptica pueden activar receptores de clase D_1 , por medio de activación de la familia de $G_{\alpha s/olf}$ de las proteínas G que estimulan la formación de AMPc por acción del adenilato ciclasa. Mientras los receptores de clase D_2 se unen a la familia $G_{\alpha i/G_{\alpha o}}$ inhibiendo la actividad del adenilato ciclasa (Beaulieu & Gainetdinov 2011). La DA regula la acción de circuitos neuronales por medio de la modulación de forma lenta o rápida de la transmisión de glutamato y GABA, dependiendo del tipo de receptor (D_1 y D_2) que active. La DA regula las vías nigroestriatal, mesolímbica y mesocortical mediante la activación del receptor de DA, regulando las funciones del organismo como el control del movimiento, recompensa, funciones cardiovasculares y el sistema inmunológico (Beaulieu & Gainetdinov 2011).

2.2.1 Vías dopaminérgicas

Las vías dopaminérgicas en el SNC se encargan del control movimiento voluntario, se asocian con los mecanismos de motivación y las emociones (Brady et al., 2012). Las neuronas dopaminérgicas mesodiencefálicas tienen la función de regular las funciones cerebrales como el movimiento, cognición y conductuales. Estas funciones son ejecutadas por distintos subtipos de neuronas dopaminérgicas localizadas en la sustancia nigra en su parte compacta (SNpc) y el área ventral tegmental (AVT) que forman las vías nigroestriatal, mesolímbica y mesocortical que producen la mayoría de la DA del SNC. Los axones de neuronas de la SNpc se dirigen al estriado dorsal formando la vía nigroestriatal que controla el comportamiento motor, mientras que las neuronas dopaminérgicas del AVT inervan numerosas regiones que incluyen el estriado, núcleo accumbens (vía mesolímbica) y la corteza prefrontal (vía mesocorticolímbico), áreas que están involucradas en procesos conductuales, de recompensa y motivación (Chabrat et al., 2017) (Figura 2).

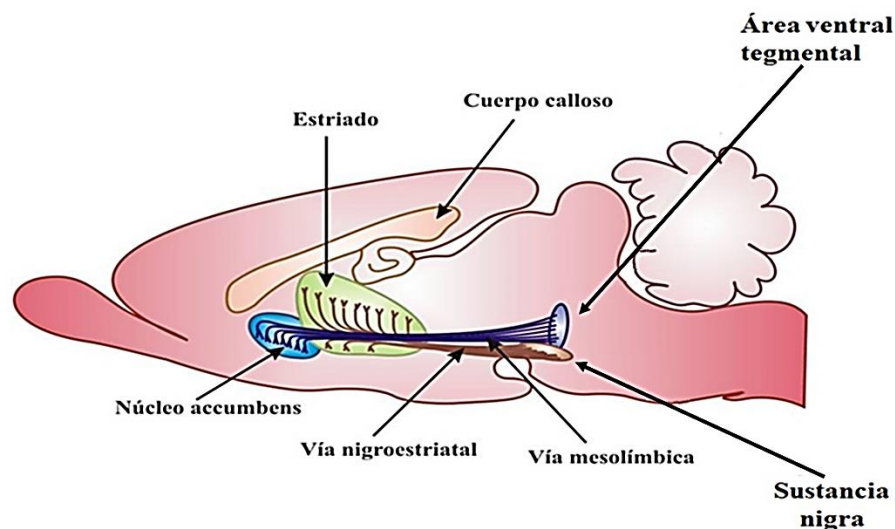


Figura 2. Localización de las vías dopaminérgicas en el sistema nervioso central de rata, en el que se esquematizan las vías nigroestriatal, mesolímbica y mesocorticolímbica. Corteza prefrontal (CPF), Núcleo accumbens (Ncc), Área ventral tegmental (AVT), sustancia nigra (SN) (Modificado de Kandel et al., 2001).

La información procesada en la corteza cerebral se proyecta a el cuerpo estriado formando el sistema corticoestriatal (Raju et al., 2006), por medio de proyecciones glutamatérgicas a las dendritas de las neuronas espinosas medianas (MSN por sus siglas en inglés) estriatales. Las neuronas piramidales de la capa 3 y 4 de la corteza inervan la matriz del estriado dando lugar a la vía indirecta, mientras que las neuronas de la capa 5 proyectan al estriosoma en el estriado formando la vía directa (Lei et a., 2004). Por otro lado, la vía nigroestriatal se origina en la SNpc proporcionando la DA que llega al estriado (Haber et al., 2000), los axones nigroestriatales realizan

sinapsis con MSN, generando la entrada dopaminérgica con un efecto facilitador en D₁ en MSN formando la vía directa y un efecto inhibitor sobre los receptores D₂ en MSN en la vía indirecta, por lo que este tipo de conectividad ejerce un efecto modulador de la DA por las proyecciones nigroestriatales (Matsuda et al., 2009). La regulación del flujo de DA en el control motor, se puede observar en el flujo de información que se forma en los ganglios basales y sus núcleos se pueden categorizar en tres; los núcleos de entrada, los núcleos de salida y los núcleos intrínsecos, modulando la función a través de la vía tálamo - cortical. Los núcleos de entrada son las estructuras que reciben información proveniente de la corteza, tálamo y la SN, es decir el núcleo caudado, putamen y el núcleo accumbens son considerados como núcleos de entrada. Los núcleos de salida son aquellas estructuras que envían información a los ganglios basales, al tálamo, al globo pálido interno (GPi) y a la sustancia nigra en su parte reticular (SNpr). Y los núcleos intrínsecos como el globo pálido externo (GPe), el núcleo subtalámico (NST) y la SNpc se ubican entre los componentes de entrada y salida en el relevo del paso de información. El funcionamiento de los ganglios basales necesita de DA en los núcleos de entrada, por lo que su disfunción se asocia con diferentes trastornos del movimiento (Lanciego et al., 2012).

Las anomalías del sistema motor son una de las características de las enfermedades neurodegenerativas, estas presentan un cuadro clínico con diferentes grados de temblor en reposo, rigidez, bradicinesia y trastorno en la marcha, como resultado de la disfunción de los ganglios basales y su participación de los circuitos cerebelo – tálamo – cortical por la disminución en los niveles de dopamina (Lewis et al., 2011). El proceso de neurodegeneración se produce en diferentes fases, que de acuerdo a la progresión de las alteraciones motoras y cognitivas se divide en tres fases. En la fase inicial o temprana se inicia en la medula espinal y el bulbo olfatorio, la cual se caracteriza por alteraciones en el gusto y el olfato, sin presentarse trastornos motores. En la fase media del proceso de neurodegeneración, se generan alteraciones en el mesencéfalo (SNpc), observándose alteraciones motoras, y finalmente en la fase tardía se producen cambios en el área premotora y en el neocórtex alterando funciones sensoriales y cognitivas (Ferrer 2011), así como degeneración axonal en los nervios motores periféricos, produciendo disfagia y disartria (Mu et al., 2013). Además de las alteraciones motoras y cognitivas, el daño oxidativo y la disfunción mitocondrial son la interfaz de las alteraciones genéticas que codifican para proteínas relacionadas con la enfermedad de Parkinson, como la α -sinucleína, quinasa 1 inducida por PTEN (PINK I),

quinasa repetida rica en leucina 2 (LRRK2) y Parkin, que es una ligasa cuya función radica en el proceso de ubiquitinación (Schapira 2008).

Nuestro campo de estudio se circunscribe, al estudio de los mecanismos mediante los cuales la ATR puede inducir daño oxidativo en los blancos dopaminérgicos en el cerebro de roedores y cómo afecta el control del movimiento y la cognición. El estrés oxidativo generado por ATR pudiera ser el responsable de la inducción del estrés oxidativo al interferir en la producción de ATP en la mitocondria, aumentando los niveles de ERO produciendo un desequilibrio entre los ERO endógenos y exógenos, disminuyendo las defensas de tipo antioxidantes como, el GSH, vitamina E y carotenoides, así como interferir en la actividad enzimática de SOD-Mn, catalasa (CAT), GPx lo que desencadenaría daño en hígado, riñón y cerebro (Valavanidis et al., 2006).

2.3 Estrés oxidante

El estrés oxidante se define como una situación en la que las concentraciones de ERO y antioxidantes se encuentran en desequilibrio, provocando afectación en la homeostasis celular y daño al ADN (Dalton et al., 1999), ocasionando citotoxicidad lo que aumenta los niveles de ERO y el daño celular (Lushchak, 2014; Singh et al., 2017). Las alteraciones fisiológicas producidas por ERO, puede generar neurodegeneración que se exagera en el SNC, debido a que es un tejido con un grado alto de vulnerabilidad a los radicales libres, esto debido a su consumo excesivo de O₂ y por estar formado por ácidos grasos poliinsaturados oxidables, así como la presencia de metales redox activos en las membranas como el Fe²⁺ y Cu²⁺, que en patologías o traumas cerebrales se oxidan produciendo un aumento desregulado de ERO, que los mecanismos antioxidantes no pueden regular induciendo cambios bioquímicos en la mitocondria y en el núcleo celular (Valko et al., 2006; Jones 2008). El daño oxidativo puede generar variaciones en los niveles de calcio citosólico por el aumento de la descarga en neuronas dopaminérgicas, aumentando la tasa de formación del radical superóxido (O₂⁻), disminuyendo la fluidez de la membrana celular, reduciendo el potencial de membrana aumentando la permeabilidad de la membrana celular a iones catiónicos (Na⁺ y Ca²⁺) generando daño celular (Valko et al., 2006) por la activación sostenida de receptores de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) en NST (Blandini et al., 2004).

La disfunción mitocondrial es la principal fuente de estrés oxidativo, por lo que se le ha asociado con el daño oxidativo en la enfermedad de Parkinson. La disfunción mitocondrial produce cambios en el proceso de respiración aeróbica al cambiar la generación del ATP, lo que lleva a un aumento

de los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical superóxido (O_2^-) que se forman durante la alteración del proceso de fosforilización oxidativa como productos de la disfunción mitocondrial (Hwang 2013). Durante el proceso de neurodegeneración, se produce la muerte celular como resultado de la inhibición del complejo I de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, induciendo cambios en la producción de ERO y en la actividad proteasoma, modificando la función mitocondrial al aumentar el estrés oxidativo y la expresión de proteínas alteradas (Hyun et al., 2002), mientras que en el citosol se inhibe el complejo III (St-Pierre et al., 2002) y la alteración del ADN como resultado de la afectación del complejo II al alterar la función de ubiquinona (Sun et al., 2005) por el aumento de los niveles de succinato intracelular iniciando la vía apoptótica (Ishii et al., 2005). Aunque hay que tener en cuenta, que el oxígeno consumido en el transporte de electrones no se reduce por completo por acción de citocromo c a agua, sino a O_2^- por proteínas que contiene Fe^{2+} y Cu^{2+} (reacción de Fenton), o la interacción de O_2^- con H_2O_2 (reacción de Harber-Weiss) formando ONOO^- (Murphy 2008), por la coenzima Q semiquinona, ejerciendo un doble papel en la regulación de los niveles de oxígeno (Beyer 1990). Al incrementar la concentración de oxígeno, produce un estado oxidado de la coenzima Q elevando la tasa de formación de O_2^- en la mitocondria, incrementando los niveles intracelulares de ERO (Dalton et al., 1999). Por lo que cualquier variación en los niveles ERO disminuyen las defensas antioxidantes afectando a los lípidos de membrana, causando lipoperoxidación en la membrana mitocondrial liberando el citocromo c al citosol, permitiendo la activación de la vía de la caspasa 9 que llevaría al inicio del proceso de apoptosis (Hwang 2013). Pero debemos tener en cuenta que la consecuencia del estrés oxidativo mitocondrial en la célula es la reducción de la capacidad energética en neuronas dopaminérgicas, volviendo vulnerables por una condición de mayor requerimiento metabólico (Rivero-Ríos et al., 2014).

Un aspecto importante del daño oxidativo es la pérdida de la capacidad proliferativa para restaurar el medio, que se produce en el transcurso de la edad. También se puede observar la disminución del nivel de expresión de genes que reducen la eficacia en la reparación del ADN, el ensamble de proteínas mal plegadas, así como proteínas dañadas por la oxidación, unido a un funcionamiento inmunológico anormal, que conduce a generar neurodegeneración y cáncer. Se ha descrito que la aconitasa mitocondrial, una enzima del ciclo tricarboxílico es el blanco del daño oxidativo durante el envejecimiento, sensibilizando a los lípidos mitocondriales a la oxidación (Barja & Herrero 2000).

2.3.1 Especies reactivas de oxígeno

El SNC es vulnerable a la lesión oxidativa debido a su composición celular, requerimiento y su baja capacidad antioxidante. En la SNpc se ha observado daño oxidativo en su ADN, con niveles significativos de aldehídos y una alta actividad de la enzima monoamino-oxidasa (MAO), alterando el metabolismo dopaminérgico y la excesiva formación de H_2O_2 y ON generando estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Mizuno et al., 2008). La vulnerabilidad del SNC aumenta con el paso del tiempo, debido a la reducción de la integridad de la barrera hematoencefálica y a la disfunción mitocondrial, produciendo inflamación crónica por activación de la microglía y a su alto nivel de citocinas proinflamatorias formadas por el estrés oxidativo (Cappellano et al., 2013). El aumento de la concentración de ERO en las membranas celulares afectan la actividad enzimática, produciendo cambios en la fluidez y permeabilidad de la membrana, alterando el transporte de iones (Na^+ y Ca^{2+}) e inhibición de procesos metabólicos (Nigam & Schewe 2000), predisponiendo a generar neurodegeneración por la disminución de ATP, y el aumento de los niveles de glutamato y calcio intracelular (Miller et al., 2014). Las ERO se forman por la reducción secuencial del oxígeno por efecto del metabolismo celular, así como por el proceso de metabolismo de xenobióticos y lesión celular. Las ERO se forman a partir del radical superóxido (O_2^-) y el radical perhidroxilo (HO_2^-), posteriormente se forma el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical oxhidrilo (OH^-), ON, oxígeno singulete (1O_2), anión peroxinitrito ($ONOO^-$) y el radical peroxilo, donde su tasa de formación es dependiente de la presencia de metales de transición (Ferreira et al., 2013). La formación de ERO induce una baja estabilidad de la membrana celular y alta reactividad de sus componentes, que al interactuar con moléculas intracelulares forman una diversidad de reacciones causando desequilibrio en el funcionamiento celular (Lushchak 2014), ya sea produciendo inactivación enzimática, peroxidación de lípidos y/o daño a la hebra del ADN (Ddidigwu et al., 2010). En condiciones patológicas, las ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) se generan a tasas superiores de las normales, produciendo peroxidación lipídica con deficiencia de α -tocoferol, formando aldehídos que pueden inhibir la síntesis de proteínas, alterando las señales quimiotácticas y la actividad enzimática intracelular (Halliwell y Gutteridge 1984). Entre los aldehídos formados se encuentran malondialdehído (MDA) y el 4-HNE, 4-oxo-trans-2-nonenal (4-ONE), alcoholes, cetonas, alcanos, éteres, acroleína, isoprostanos que se derivan del ácido araquidónico liberado de los glicerofosfolípidos de la membrana neuronal a través de la activación de fosfolipasas A2n (cPLA2) (Reis y Spickett 2012).

2.3.2 Mecanismo de daño por efecto de la lipoperoxidación en membranas celulares

Tanto las proteínas como los lípidos de membrana son vulnerables a la oxidación, debido a la presencia de oxígeno en la bicapa lipídica que interacciona con los PUFA de las membranas celulares. El daño oxidativo en la membrana celular se produce en cadena hasta que los PUFA se desintegran, formando hidroperóxidos y OH^\cdot , atacando el carbono alílico para formar un radical centrado en carbono, iniciando la lipoperoxidación (Reed 2011). La oxidación de fosfolípidos altera las propiedades de las membranas biológicas, cambiando la polaridad de los fosfolípidos de la membrana, reorientando la cadena del grupo acilo exponiéndolo a formar un dieno conjugado, modificando las propiedades biofísicas de las membranas alterando la comunicación celular, por cambios en las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína (Catalá 2012).

Existen dos vías implicadas en el proceso de lipoperoxidación; la vía enzimática y no enzimática. En el proceso de lipoperoxidación enzimática, las enzimas como la ciclooxigenasa (COX), lipooxigenasa (LOX) y citocromo P450, se encargan de catalizar la reacción de lipoperoxidación, debido a que contiene Fe^{2+} en la forma hemo o no hemo, que les permite formar aductos con aminoácidos (cisteína, lisina o histidina) de los componentes de la membrana celular. La reacción es catalizada en el fosfolípido cardiolipina en mitocondrias y fosfatidilserina en la membrana, por medio de la reacción de adición de Michael, interrumpiendo la homeostasis de calcio deteriorando el transporte de glutamato dañando la membrana celular (Esterbauer et al., 1991), o formar productos altamente reactivos como las prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano que median procesos como la inflamación, vasodilatación, transporte de iones y la actividad neuronal aumentando el daño celular (Kuhn et al., 2015). Por otro lado, en la vía no enzimática de lipoperoxidación, se produce por la interacción de los radicales libres con metales de transición (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}) por medio de la reacción de Fenton, formando el radical hidroxilo que al interactuar con los ácidos grasos de las membranas celulares producen lipoperoxidación (figura 3) alterando la actividad metabólica oxidativa en el SNC, generando metabolitos reactivos de oxígeno facilitando las reacciones oxidativas aumentando el daño celular (Anthony-muthu et al., 2016).

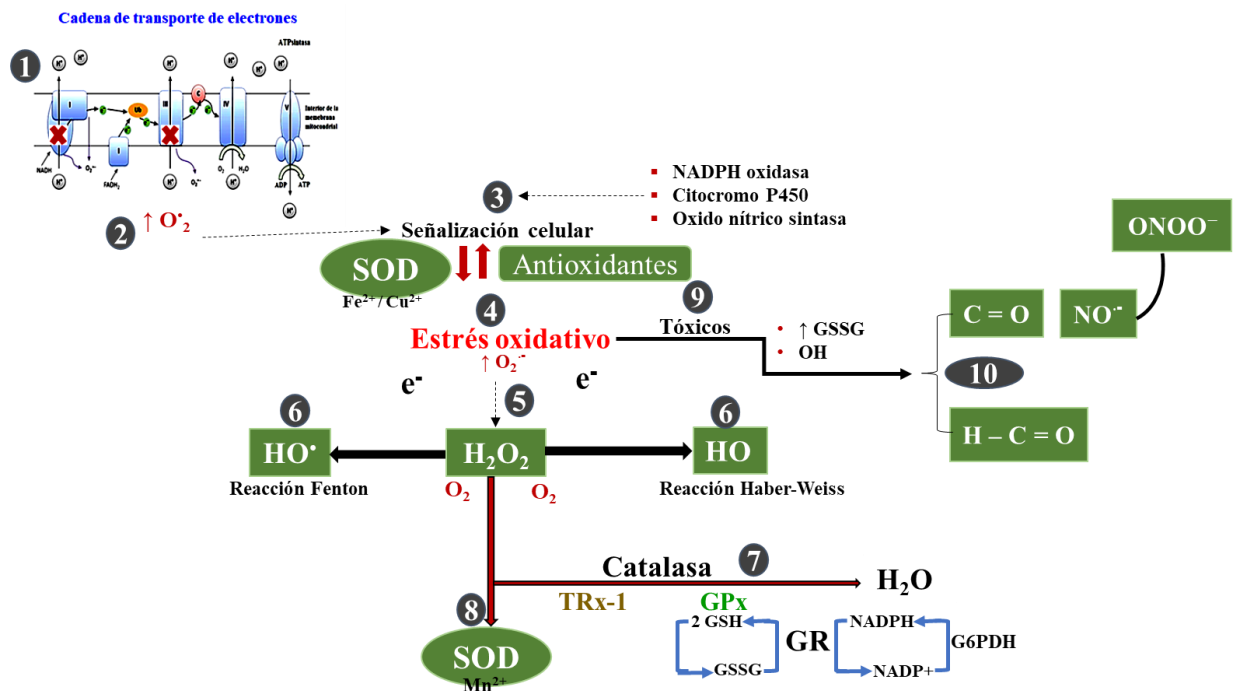


Figura 3. Proceso de lipo-peroxidación por la exposición a atrazina. La atrazina inhibe el foto complejo II en cloroplastos. 1) Estos al tener sitios bioquímicos similares a la mitocondria se inhiben, 2) aumentando la formación del radical superóxido, 3) que la regulación enzimática/no enzimática regulando los niveles de superóxido, 4) si el factor generador se mantiene se produce estrés oxidativo, 5) que en regiones con altos niveles de hierro como el mesencéfalo, 6) que es regulado por la reacción de Fenton/Haber-Weiss produciendo oxhidrilo o en forma de radical, 7) y 8) que al aumentar sus niveles es regulado por la actividad enzimática. Pero si se mantiene el factor generador de estrés oxidativo, 9) se produce estrés oxidativo que se manifestará con altos niveles de glutatión oxidado e hidroxilo, 10) que lleva a producir aldehídos activos, grupos carbonilo y óxido nítrico (ON)/peroxinitrito (ONOO). (modificado de Anthonymuthu et al., 2016; Catalá 2012; Valko et al., 2006, Walters et al., 2015). Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), superóxido dismutasa (SOD), tioredoxina (Trx-1), glutatión (GSH), glutatión peroxidasa (GPx-1), glutatión reductasa (GR), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NAPDH), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

El proceso de peroxidación lipídica se divide en tres etapas: iniciación, prolongación y terminación. En la fase inicial de peroxidación se extrae un átomo de H^+ de un grupo metileno ($-CH_2$) en la cadena de los PUFA, en el que se produce un enlace desapareado al C en su orbital ($^{\bullet}CH$), produciendo la liberación de un protón de H^+ de los PUFA, formando un radical libre, dando lugar a la formación de un dieno conjugado. La reacción inicial del $^{\bullet}OH$ con los ácidos grasos es que producen un radical lipídico (L^{\bullet}), que reacciona con O_2 formando el radical LOO^{\bullet} . El radical LOO^{\bullet} extrae el H^+ del ácido graso adyacente para formar $LOOH$ y un segundo radical $LOOH$. El $LOOH$ se somete a la escisión reductora por metales reducidos como Fe^{2+} produciendo un radical alcoxilo lipídico (LO^{\bullet}). Por lo que los radicales alcoxilo y peroxilo, estimulan la reacción en cadena de la peroxidación de lípidos al extraer los átomos de H^+ . Posteriormente, el radical $LOOH$ atrae al O_2 de la reserva de O_2 disponible para la formación del peroxilo lipídico, para volver iniciar el proceso al extraer un H^+ desencadenando la reacción de peroxidación. En la terminación se forma un no

radical a partir de la combinación de dos radicales, teniendo como productos finales hidroperóxidos y aldehídos activos (4-HNE y MDA) (Anthonymuthu et al., 2016), así como productos de la degradación de proteínas y carbohidratos (Guillén-Sans & Guzmán-Chozas 1998) (Figura 4).

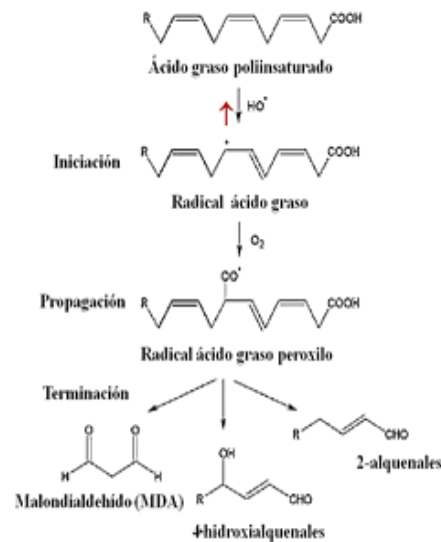


Figura 4. Reacción en cadena del proceso de peroxidación lipídica. La reacción en cadena de la peroxidación lipídica se produce en tres pasos: 1) Iniciación, se elimina un H^+ de PUFA para formar un radical lipídico centrado en carbono; 2) Propagación, se une un grupo peróxido al radical lipídico para formar un radical peroxilo lipídico. Este radical inicia un nuevo ciclo extrayendo un H^+ , perpetuando así la reacción de peroxidación; 3) Terminación, se produce la desaparición del radical libre formando un no radical tal como hidróxido, teniendo como producto el malondialdehído, 4-hidroxi-2-alkenales y 2-alkenales. Modificado de Mimica-Dukic et al. (2012). Malondialdehído (MDA), oxígeno molecular (O_2), radical oxhidrilo (OH^\bullet), extremo carboxilo (COOH).

En las enfermedades neurodegenerativas, se forman aductos entre aldehídos y los componentes de las membranas celulares en las neuronas neocorticales como producto de la lipoperoxidación, alterando el transporte de dopamina, disminuyendo la densidad de neuronas dopaminérgicas (Morel et al., 1998). La determinación del grado de daño producido por el estrés oxidativo se divide en tres categorías; la cantidad de productos como MDA es proporcional a la concentración de ERO, ya que pueden detectarse en los sitios donde ocurre el ataque. El nivel de actividad enzimática se asocia con el metabolismo de ERO, como el γ -glutamil-cisteína-glicina (GSH) que indica el estado del estrés oxidativo. La modificación de factores de transcripción en la expresión de enzimas antioxidantes como SOD-Mn (Reed 2011; Mañón et al., 2016). Mientras que la disminución de GSH aumenta la producción de ON y la ruptura de hierro en células dopaminérgicas, en conjunto con la disfunción del complejo I mitocondrial (Hsu et al., 2005).

Las ERO que se forman en la mitocondria y el citosol determinan el estado redox en las células. Debido a esto las células tienen un sistema antioxidante que regulan las ERO formadas, donde el

glutación (GSH) es el principal regulador del estado redox celular, por lo que su relación GSH/glutación disulfuro oxidado (GSSG) (20:1 mM respectivamente) es un bioindicador del estado oxidante celular (Dringen et al., 2000). En el SNC, los astrocitos disminuyen la toxicidad por H_2O_2 aportando los grupos cisteínicos en las neuronas para la síntesis de GSH, y la actividad de GST (Dringen et al., 2000). Por lo que pequeñas variaciones en la proporción GSH/GSSG, produce un aumento en el nivel de GSSG, promoviendo la oxidación de proteínas alterando el proceso de transducción de señales (Thomas et al., 1995; Dalton et al., 1999), generando mutaciones somáticas en genes responsables del mantenimiento de la expresión de genes como la síntesis de proteínas como la proteína activadora 1 (AP1) y factor nuclear de interleucina 6 (NF-IL6) (Hsu et al., 1994). Esto se debe a que las ERO, en específico el radical OH rompen el enlace formado entre la desoxirribosa en los carbonos 4 y 5 los sitios primarios del ataque y el grupo fosfato de los nucleótidos, así como las bases nitrogenadas degenerando la cadena de ADN, por medio de deleciones e inserciones en el par guanosina-citocina, o en su defecto eliminando la guanosina de la cadena de ADN (González-Torres et al., 2000). Ante este factor de riesgo celular, el organismo presenta estrategias para contrarrestar los efectos producidos por los radicales libres y evitar la perturbación de la homeostasis del medio intracelular (Ahmad et al., 2014) y la función celular (Lushchak, 2014).

2.3.3 Antioxidantes

Para mantener la integridad celular, las células contienen un sistema de defensa antioxidante que se ubica de manera estratégica en distintos orgánulos celulares para reparar las macromoléculas lesionadas. Los antioxidantes son sustancias que se presentan en concentraciones bajas en comparación con la del sustrato oxidable, retrasando la oxidación del sustrato disminuyendo o evitando la formación de ERO y el daño celular (Reed 2011). Los antioxidantes pueden ejercer su acción por medio de dos sistemas; sistemas enzimáticos y no enzimáticos a partir de regular los niveles intracelulares de ERO. Entre los mecanismos de desintoxicación enzimática se encuentran las enzimas antioxidantes como SOD, GPx y CAT, mientras que el sistema no enzimático ocupa vitaminas liposolubles como vitamina E, vitamina C y GSH para disminuir el exceso de formación de radicales, que al reaccionar con el H_2O_2 detienen la reacción de peroxidación lipídica, al donar un protón al H_2O_2 controlando su concentración intracelular (Martínez-Sámano et al., 2011), así

como agentes reductores o secuestrantes que se ubican en diferentes orgánulos celulares, evitando los cambios transduccionales y la conformación y/o ensamble de moléculas.

En condiciones fisiológicas los niveles intracelulares de antioxidantes son determinados por la regulación de pH intracelular (Shen et al., 2005). El GSH puede interactuar de forma directa o indirecta (vía enzimática) con ERO neutralizándolo evitando el daño celular (Lushchak 2014), o servir como sustrato para la actividad de la generación de GST en el proceso de eliminación de xenobióticos o productos endógenos, lo que disminuye el nivel de GSH (Díaz-Hung et al., 2015). Pero si aumenta los niveles de ERO y disminución de GSH, se forma el GSH oxidado (GSSG) que se acumula en la célula, (Jones 2008), si disminuyeran los niveles de GSH generarían un ambiente oxidante iniciando la vía apoptótica (Valko et al., 2006) (Figura 5).

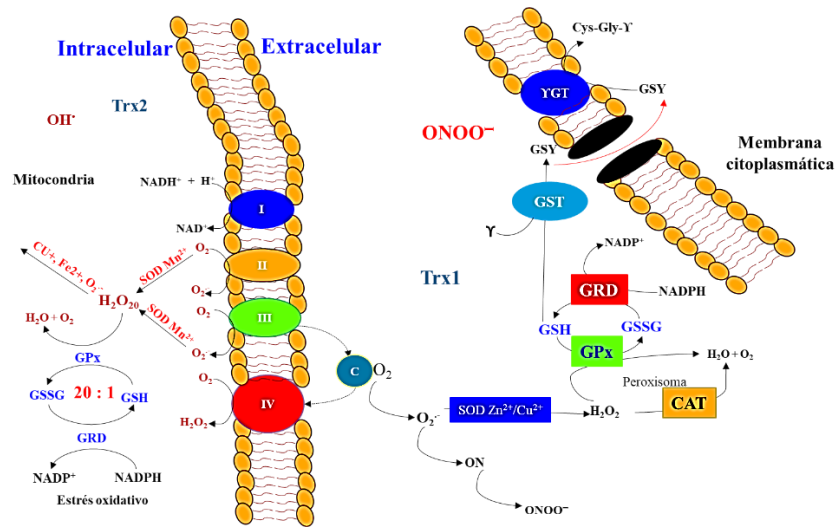


Figura 5. Metabolismo oxidativo. En el esquema se muestra cómo es la interacción de agentes oxidantes, prooxidantes y el sistema antioxidante que presentan los organismos en la mitocondria y el citosol (Modificado de Díaz-Hung et al., 2015). Glutatión peroxidasa (GPx), glutatión oxidado (GSSG), glutatión-S-transferasa (GST), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$), radical oxhidrilo (OH), radical superóxido (O_2^-), superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD Cu/Zn), superóxido dismutasa manganeso (SODMn), tiorredoxina tipo 1 (Trx1) y tiorredoxina tipo 2 (Trx2),

En el sistema enzimático SOD/CAT, se encarga de reducir la concentración de radicales OH y el O_2^- , evitando la generación peroxidación de lípidos, al mismo tiempo que reducen la velocidad de reacción en la formación de ERO en sistemas modificados por la concentración de ERO. SOD disminuye la concentración de OH por medio de la reacción de Fenton, aumentando la concentración de H_2O_2 , e internalizarse a otros compartimentos celulares y ser oxidados a H_2O y O_2 por CAT (Kalyanaraman 2013). Las modificaciones oxidativas en las proteínas las hacen susceptibles al ataque proteolítico, lo que sucede después de la exposición a un agente oxidante.

La señalización redox es un proceso regulador, la ausencia de dicha regulación puede conducir a un desequilibrio en la respuesta fisiológica a ERO, por lo que en condiciones patológicas se pueden producir cambios permanentes en la transducción en la expresión genética (Valko et al., 2006).

2.3.4 Técnicas analíticas para la detección de daño lipídico

Los biomarcadores en el daño lipídico por estrés oxidativo se definen como medidas que indican el estado de un proceso biológico o patológico, por acción del metabolismo celular o en respuesta a fármacos y toxinas. Los biomarcadores ofrecen información del daño a las proteínas y lípidos, que tras ser afectando la función fisiológica promueve el daño celular (Niki 2014). En el estrés oxidativo, se produce la acumulación de compuestos carbonilos provenientes de proteínas, que se forman por la acumulación directa de ERO en los residuos de aminoácidos (Amici et al., 1989), mientras que por peroxidación de lípidos se originan los, formando fragmentos carbonilo reactivos a β -insaturados (Esterbauer et al., 1991). En la etapa de inicio de la peroxidación se produce la sustracción de un protón (H^+) por efecto de un ERO reordenándose el ácido graso, formando un radical libre que se caracteriza por la formación de un dieno conjugado, el cual se puede monitorear por medio de métodos espectrofotométricos (Halliwell & Gutteridge 1999). En la etapa de terminación de la peroxidación, se producen diferentes productos secundarios como los aldehídos provenientes del ácido araquidónico, los cuales pueden utilizarse como biomarcadores del estado funcional de las membranas por acción de los radicales libres (Miller et al., 2014), los cuales pueden detectarse por reacción colorimétrica con el ácido tiobarbitúrico por efecto de la formación de un aducto (Grntzalis et al., 2013; Mañon et al., 2016) (figura 6).

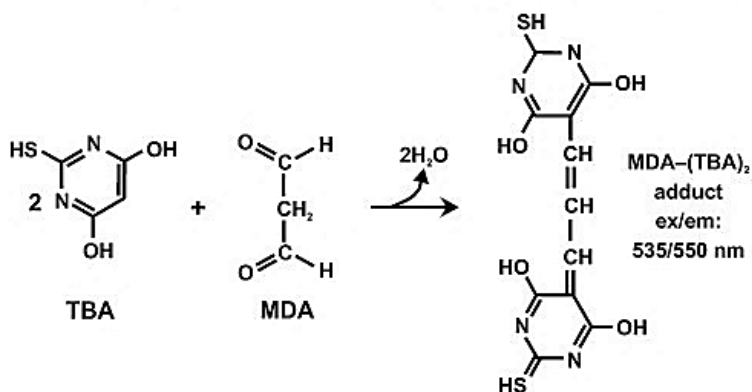


Figura 6. Mecanismo de la reacción entre el malondialdehído y el ácido tiobarbitúrico. Reacción entre malondialdehído (MDA) y ácido tiobarbitúrico (TBARS) para la formación de un aducto que es detectado a un rango de 535-550 nm del espectro de luz visible.

Existen otros métodos para la detección de los niveles de ERO en las patologías, una de ellas es por medio de la vía directa, en esta técnica se ocupa la resonancia paramagnética electrónica y el método de atrapamiento de spin, aunque menos utilizado debido al tiempo de vida reactiva de los radicales libres (Grintzalis et al., 2013). Motivo por el cual se utiliza la técnica de medición de F₂-isoprostano (F₂-IsoPs), siendo el mejor biomarcador *in vivo* e *in vitro* para la detección de los componentes en el proceso de lipoperoxidación. En este proceso el ácido araquidónico se somete a varias abstracciones de átomos de H⁺ y la inserción de oxígeno, concluyendo la formación de radical peroxilo, para formar cuatro endoperóxidos que pueden reducirse a F₂-IsoPs. Por lo que su medición por espectrometría de masas es un buen marcador de estrés oxidativo *in vivo*. Los IsoP se pueden cuantificar en diferentes fluidos corporales como la orina, sangre y el líquido cefalorraquídeo (LCR), o por medio del aire exhalado, lo cual nos da un índice confiable y no invasivo del estado de la peroxidación lipídica (Miller et al., 2014).

3. Justificación

La contaminación ambiental es un factor condicionante en la generación de estrés oxidante y su posible papel en el surgimiento de enfermedades neurodegenerativas. En este tipo de patologías, el aumento de los niveles de ERO se debe a la exposición recurrente a tóxicos que afectan el transporte de electrones, aumentando los niveles de ERO y la consecuente disminución de los niveles de antioxidantes, predisponiendo a la neurodegeneración. En los últimos años, los estudios se han centralizado en el herbicida ATR, debido a que, ante su exposición a diferentes concentraciones (3 - 500 mg ATR/kg de peso) en una variedad de organismos, se ha observado la disminución en la actividad enzimática antioxidante como SOD-Mn y en el contenido de GSH después de su exposición (Ddidigwu et al., 2010; Campos-Pereira et al., 2012; Blahova et al., 2013; Li et al., 2014; Abarikwu 2014; Zhang et al., 2016). Lo que sugiere que, ATR aumenta la producción de ERO generando estrés oxidante, causando daño en las membranas celulares y al ADN induciendo neurodegeneración (Song et al., 2009), con la consiguiente disminución en los niveles de dopamina por efecto de la muerte de células dopaminérgicas y alteraciones en la actividad locomotora (Bardullas et al., 2011; 2013).

Por tal motivo, realizamos evaluaciones conductuales durante el transcurso del tratamiento con ATR, lo que nos permitiría explicar cómo la exposición al herbicida provoca alteraciones en el sistema dopaminérgico y su consecuente cambios en su actividad motora, así como relacionarlos con la modificación en los sistemas prooxidantes/antioxidantes al final del tratamiento. Ya que actualmente se desconoce cómo es que ATR afecta los sistemas antioxidantes en los blancos dopaminérgicos en el cerebro de rata, cuando se les expone de forma crónica a ATR, así como su relación con las modificaciones motoras y cognitivas que presenta durante el transcurso de la exposición.

4. Hipótesis

La exposición crónica a ATR causaría alteraciones en los sistemas prooxidantes/antioxidantes en los blancos dopaminérgicos en ratas de la cepa de Sprague-Dawley, las cuales pudieran producir alteraciones motoras y conductuales por efecto de la susceptibilidad en los blancos dopaminérgicos.

5. Objetivo general

Determinar el efecto neurotóxico por la exposición crónica al herbicida ATR en los sistemas oxidantes/antioxidantes en los blancos dopaminérgicos de las vías nigroestriatal, mesolímbica y mesocortical de la cepa Sprague-Dawley, y su probable relación con defectos motores y conductuales.

6. Objetivos particulares

- ♦ Evaluar los niveles de TBARS y dienos conjugados en el estriado, núcleo accumbens, corteza prefrontal, mesencéfalo ventral, hipocampo y amígdala en ratas de la cepa de Sprague-Dawley crónicamente tratadas con atrazina.
- ♦ Determinar los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes SOD-Mn y GP-x1 en estriado, núcleo accumbens, corteza prefrontal, mesencéfalo ventral, hipocampo y amígdala en ratas de la cepa Sprague-Dawley crónicamente tratadas con ATR.
- ♦ Evaluar la conducta motora y la actividad locomotora espontánea en rata de la cepa Sprague-Dawley cuando fueron expuestas crónicamente a ATR.

7. Material y métodos

Para determinar los efectos de ATR en los marcadores del estatus antioxidante en los blancos dopaminérgicos en roedores, así como su relación en los blancos dopaminérgicos y su efecto conductual se planteó el siguiente diseño experimental:

8. Sujetos

En el presente estudio se usaron 30 ratas de la cepa Sprague-Dawley de 19 días de edad posnatal, obtenidas de Envigo Inc. México las cuales se mantuvieron con acceso al agua *ad libitum*, y restricción de alimento en un ciclo de luz/oscuridad invertido (20:00/8:00), con humedad y temperatura controladas. Los procedimientos conductuales como los experimentales, se llevaron a cabo según las regulaciones y procedimientos establecidos por el reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación de la Salud de la Secretaria de Salud (publicación de 1987), y en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, en su apartado de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

9. Preparación de galletas

Se prepararon galletas con 30 ó 300 mg ATR/kg de alimento purina. Para la preparación de las galletas, se mezcló el alimento control de purina (Rat Chow formula 5001) con agua desionizada, para homogenizar la mezcla y se adicionó atrazina, que se obtuvo de Chem Service (West Chester, PA, USA). La masa formada fue moldeada en trozos regulares de 60 g y secada en un horno (Cole Parmer modelo 05015-50) a 60°C por un lapso de ocho horas.

10. Diseño experimental

Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 19 días postnatal, habituadas a un ciclo de luz/oscuridad (20:00/8:00) de las cuales se formaron tres grupos, el grupo control fue alimentado con Rat Chow fórmula 5001, mientras que los grupos tratados con ATR fueron alimentados con galletas elaboradas en el laboratorio (galletas de 30 y 300 mg ATR/kg previamente descritas), de las cuales se les administró diariamente una dosis de 1 ó 10 mg ATR/kg de peso por un lapso de 12 meses (los roedores fueron pesados una vez al mes). La dosis administrada de ATR se seleccionó de estudios previos del laboratorio, en el que Bardullas et al. (2011, 2013) observaron alteraciones conductuales y una disminución en los niveles de dopamina acompañados por la disminución en el número de células TH⁺ en la SNpc en el modelo de rata. Una vez que los roedores alcanzaron los 300 g de peso corporal, se mantuvieron en ese rango de peso por medio de la restricción del alimento, mientras que el agua se mantuvo *ad libitum* durante el curso del experimento. Al final de la administración se evaluó el índice de Lee para determinar la talla del roedor, para cuantificar el índice se utilizó el peso del roedor y la longitud corporal. El índice de Lee se calculó tomando la longitud desde la nariz al inicio de la cola, obteniendo la raíz cúbica del peso corporal, dividiendo longitud corporal y la raíz cúbica del peso por mil (Lee & Ma 1929).

Al final de cada mes de exposición se evaluó la actividad locomotora, y se realizó una batería de pruebas conductuales (barra de equilibrio, coordinación motora (rotarod) y laberinto elevado en cruz) en dos fases que correspondieron a los 6 y 12 meses de tratamiento, lo anterior fue con la finalidad de determinar si se presentó afectación durante la administración con ATR y descartar el efecto de la edad del roedor. Al final del experimento, los roedores se sacrificaron por decapitación y se les extrajo el cerebro, para ser diseccionadas las regiones cerebrales. Las muestras de tejido se procesaron para las pruebas bioquímicas (determinación dienos conjugados y TBARs, el nivel de

expresión de enzimas antioxidantes), con la finalidad de determinar el grado de afectación por el herbicida ATR en las regiones cerebrales (Figura 7).

Diseño experimental

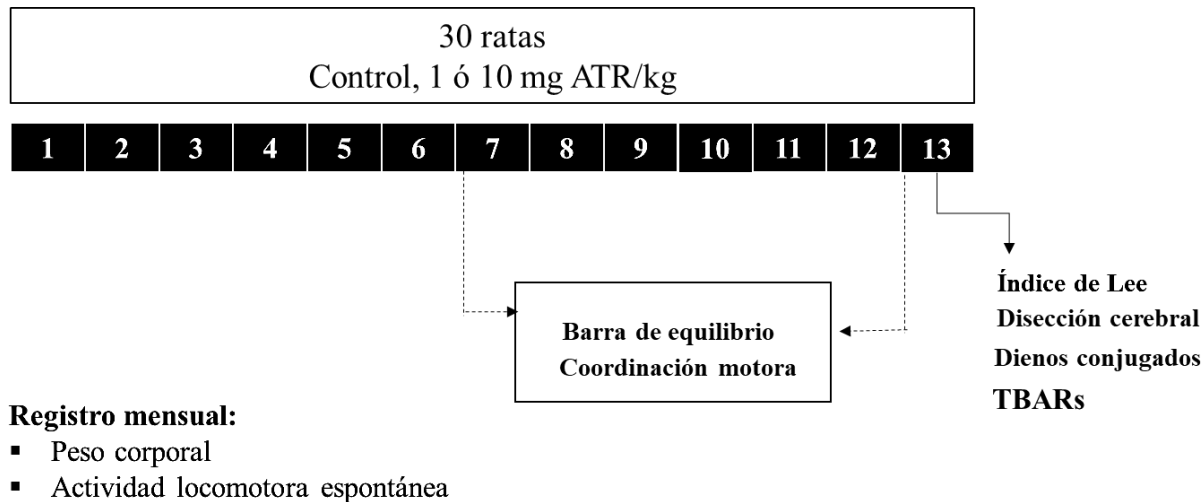


Figura 7. Diseño experimental. En el esquema se muestra el diseño experimental, en el cual se muestran los grupos experimentales a los cuales se les registro el peso y la actividad locomotora al final del mes. En el registro se esquematiza por medio de una línea del tiempo, el cual se realizaron en dos fases (6 y 12 meses) una batería de pruebas motoras y conductuales. Una vez finalizado el tratamiento se cuantificó el índice de Lee, posteriormente se decapitaron los roedores y se les extrajo el cerebro para la disección de las diferentes regiones cerebrales, para posteriormente cuantificar los niveles de dienos conjugados y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

11. Tareas conductuales durante la exposición a atrazina

11.1 Registro de la actividad locomotora espontánea

A cada roedor de los tres grupos experimentales, se les evaluó mensualmente la actividad locomotora espontánea en una caja de registro que está hecha de acrílico transparente, sus dimensiones son 40 x 40 x 30 cm (Figura 8) acoplada con un sistema automatizado Accuscan Inc. (Columbus, Ohio, USA), el cual posee dos niveles de sensores infrarrojos los cuales detectan los movimientos del roedor. Los datos obtenidos son transmitidos a una interfase que los cuantifica y los ordena, para ser enviados a una computadora donde se clasifican en distintos parámetros según el tipo de actividad que realicen. El tiempo de registro tuvo una duración de 25 horas, durante el cual los animales tuvieron el alimento controlado y el agua *ad libitum*. Los registros de la actividad locomotora durante el ciclo de luz/oscuridad (6:00 p.m. – 6:00 a.m.) se ajustaron para cada registro realizados a los tres grupos experimentales, con el fin de estandarizar los registros de la actividad del roedor durante la prueba.

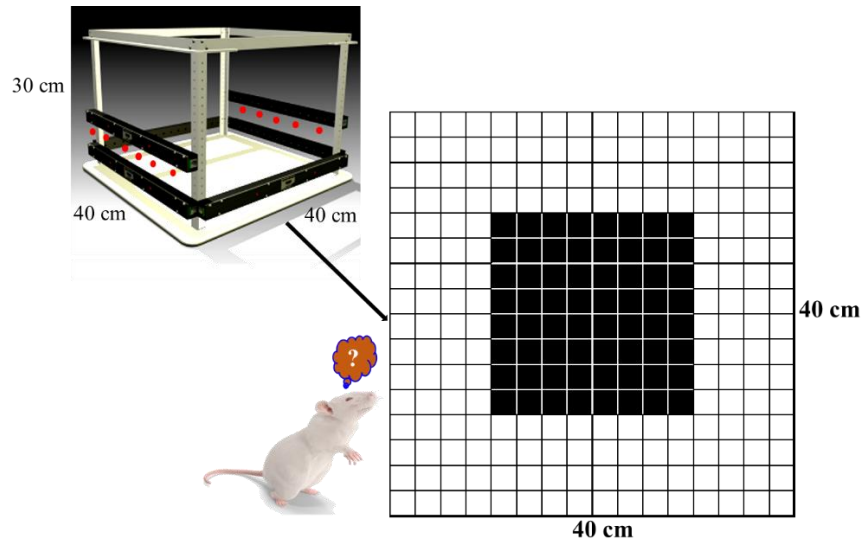


Figura 8. Caja de registro de actividad locomotora espontánea. La caja de registro está hecha de acrílico transparente de dimensiones 40 x 40 x 30 cm, con un sistema automatizado (Accuscan inc. Columbus, Ohio, USA) de dos niveles de sensores infrarrojo que está conectado a una interfase que ordena y cuantifica las variables.

Las variables en la prueba de actividad locomotora espontánea se definen de la siguiente forma:

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

Actividad Vertical (AV): es el número de interrupciones en el sensor vertical en un tiempo de muestreo.

Conteo de episodio de actividad estereotipada (CEAE): es el número de interrupciones del sensor por el roedor durante la actividad estereotipada.

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

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

Distancia total (DT): indica la distancia recorrida (cm) en un tiempo de muestra determinado. El cuál es el componente de la actividad ambulatoria dentro de la caja.

Número de estereotipias (NE): es el número de veces que el sistema capta el comportamiento estereotipado en el animal, tales como acicalamiento y balanceo de cabeza. Se requiere que el movimiento dure 1 segundo o más para poder diferenciar un episodio estereotipado del siguiente.

Número de movimientos (NM): es el número de movimientos horizontales realizados en un tiempo de muestreo, y se diferencian de los movimientos individuales en que están separados por un periodo de un segundo.

Tiempo de movimiento (TM): es el tiempo en segundos que el animal está en actividad ambulatoria durante un periodo de tiempo.

Tiempo de actividad vertical (TV): es el tiempo en segundos que el animal se encuentra obstruyendo el sensor vertical al incorporarse, por lo que la variable aumenta cuando el animal está por debajo del sensor vertical.

11.2 Barra de equilibrio

El protocolo de barra de equilibrio evalúa alteraciones motoras provenientes de la corteza sensoriomotora, por efecto de una lesión o intoxicación. La coordinación motriz puede ser afectada por alteraciones en la corteza motora y la falla en la regulación dopaminérgica proveniente de los componentes de salida en los ganglios basales. El protocolo de la barra de equilibrio evalúa la habilidad de mantener el balance y atravesar una barra de madera de 1.5 m de largo y 2 cm de espesor (figura 10). El protocolo consistió en colocar la barra de equilibrio a una altura del piso de 50 cm, mientras que en un extremo de la barra se coloca una caja negra que tuvo la función de plataforma de escape, la prueba se realizó en condiciones de silencio e iluminación roja para su registro, el cual se realizó en dos fases; la fase de entrenamiento y de prueba que se describen a continuación.

- **Entrenamiento:** Tuvo una duración de dos días, durante el cual se colocaron las ratas sobre la barra horizontal a diferentes distancias (20 y 150 cm) alejadas de la plataforma de escape. Durante cada día se realizó un ensayo por distancia con un intervalo de tiempo de 2 minutos entre ensayos, así como un periodo de habituación en la caja de escape por 1 minuto.
- **Prueba:** Después de la etapa de entrenamiento (tercer día), la prueba consistió en colocar al roedor a 10 cm de la plataforma de escape para que recordara la tarea. Durante la prueba se colocó la rata a 150 cm de la plataforma de escape, en la prueba se evaluó la latencia de llegada a la plataforma, así como el número de errores, congelamiento y número de pasos que cometió al realizar la prueba.

La latencia se considera como el tiempo que le toma a la rata en llegar desde su colocación en la barra horizontal, hasta que consigue entrar a la plataforma de escape con sus cuatro patas. Se considera error cuando el animal durante su traslado a la plataforma de escape pierde la posición sobre la barra de cualquiera de las patas trasera, o cuando al dar el paso no consigue colocar la pata

sobre la barra, también se considerará error por cada pata que pierda su posición con respecto a la barra.

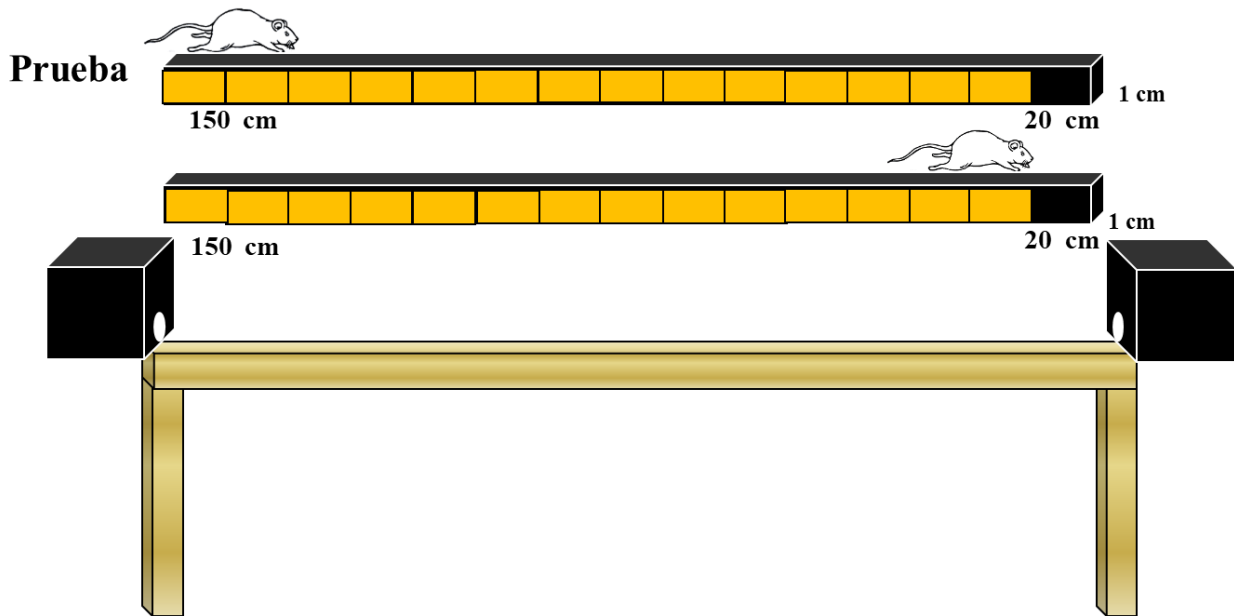


Figura 10. Barra de equilibrio: En el esquema se muestra la barra de equilibrio, la barra tiene una superficie plana de 1.5 mm de espesor, 150 cm de largo y 5 cm de ancho, suspendida a una altura de 50 cm del piso, y en sus extremos hay una plataforma de escape (caja negra). Modificado de Sweis et al. (2016).

11.3 Coordinación motora (Rotarod)

El protocolo de coordinación motora evalúa y analiza la habilidad del roedor de mantener el equilibrio de sus extremidades traseras y delanteras sobre un rodillo de 7 cm de diámetro (3.5 pulgadas), que se mantiene a una velocidad constante en diferentes patrones de tiempo (figura 9). Esta prueba se fundamenta, en que la coordinación motora puede verse afectada por alguna patología cerebral en las cuales se presenta implicada la vía nigroestriatal, alterando el sistema motor. Para la realización de la prueba de coordinación motora se utilizó el equipo IITC 755 Rotarod (IITC life science, Woodland Hills, San Diego, CA, EUA) (Figura 9), que consiste en una estructura de metal con cinco cilindros internos de 3.75 pulgadas de diámetro impulsados por un motor, el cilindro tiene una superficie rugosa que permite que el roedor no se resbale del cilindro. El equipo rotarod registra el tiempo y la velocidad (rpm) a las cuales el roedor pierde el equilibrio y cae durante la prueba. El método de coordinación motora consiste en tres etapas: la fase de reconocimiento, entrenamiento y la prueba, en las cuales se utilizan diferentes velocidades para medir la coordinación del roedor, el protocolo se describirá a continuación:

- Reconocimiento: se coloca al roedor durante 60 segundos sobre el rodillo sin movimiento, se realizarán 2 ensayos por un día, entre cada ensayo se dejó un intervalo de 20 a 30 minutos de reposo.
- Entrenamiento: en esta fase se realizaron 2 ensayos por cada patrón de velocidad (6, 12, 18 y 24 rpm) con una duración de 60 segundos cada uno, por tres días consecutivos.
- Prueba: en el periodo de prueba se realizó un protocolo de aceleración que consistió en colocar al roedor sobre el rodillo, que tuvo una velocidad de giro de 42 rpm por un tiempo de 300 segundos, el protocolo se realizó durante cinco días consecutivos.

La prueba Rotarod se determinó en dos fases del tratamiento, a los seis y a los doce meses. En cada fase de prueba se evaluó la latencia de caída del rodillo o cuando se detiene al finalizar la tarea. Esta tarea conductual se realizó en la fase de oscuridad con luz roja para permitir la visibilidad.

Códigos para programar el aparato Rotarod para el protocolo de coordinación motora

Entrenamiento	
Tiempo:	E0160
Línea:	E2001
Velocidad Inicial:	E3004
Velocidad Final:	E4020
Velocidad Aceleración:	E5020
Giro de rodillo:	E6004

Prueba	
Tiempo:	E1240
Línea:	E2001
Velocidad Inicial:	E3010
Velocidad Final:	E4045
Velocidad Aceleración:	E5180
Giro de rodillo:	E6004

NOTA: la velocidad de aceleración hace referencia a las revoluciones finales (20 a 45 rpm) que se alcanzan hasta los 20 u 80 segundos según sea el caso.



Figura 9. Rotarod IITC 755. Es un aparato automatizado con cinco compartimentos atravesados por un rodillo de 3.5 pulgadas, posee controles de velocidad que dispara el temporizador una vez que la rata cae en la varilla, la varilla gira a diferentes variaciones de aceleración (rpm) en un tiempo determinado (Bardullas et al., 2011).

11.4 Protocolo de laberinto elevado en cruz

La prueba de laberinto elevado en cruz fue diseñada con el fin de proporcionar una medida del nivel de ansiedad en roedores. La prueba de laberinto se basa en el conflicto del roedor por permanecer un área segura y evitar la exploración de áreas abiertas. La prueba se realizó en una área aislada del ruido mantenida en completa oscuridad, asemejando las características de un ambiente propicio para el roedor, y así poder visualizar su conducta exploratoria fielmente.

La prueba se realizó dos veces durante el tratamiento (a los 6 y 12 meses del tratamiento con ATR) con el fin de determinar el efecto de la exposición crónica a ATR a lo largo del tiempo. La prueba consistió en una sesión para cada roedor, en los dos tiempos diferentes del tratamiento. Para lo cual utilizamos el laberinto elevado en cruz, que consta de un aparato elevado 50 cm con respecto al piso, el cual está formado por cuatro brazos (dos brazos abiertos y dos brazos cerrados) de 50 cm de largo y 10 cm de ancho (figura 11). El protocolo consistió en colocar al roedor en el centro del laberinto viendo hacia un brazo abierto (brazo 4), tomando como variable el tiempo que cursa el roedor entre brazos del laberinto como medida del rendimiento motor, así como, el número de entradas de los brazos como medida de alteración cognitiva. Para corroborar los datos obtenidos de la prueba, se grabó la prueba. Entre el cambio del roedor, el laberinto fue limpiado con una solución de ácido acético al 1% v/v, después de cada sesión.

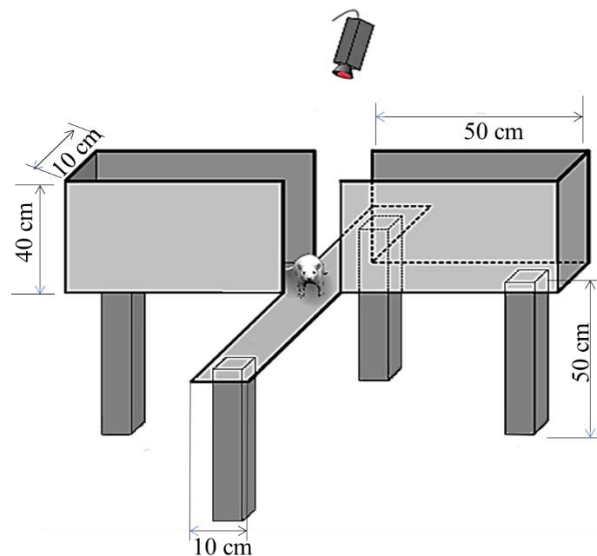


Figura 11. Laberinto elevado en cruz. Es un equipo hecho de acrílico, que se usa para realizar la prueba de ansiedad. Consta de 4 brazos (dos brazos abiertos y dos brazos cerrados) de 50 cm de largo y 10 cm de ancho, los cuales están a una altura de 50 cm del piso. Modificado de Sweis et al. (2016).

12. Determinación del nivel de lipoperoxidación por efecto de atrazina

Después de haber terminado el tratamiento con ATR (12 meses) y de haber realizado las pruebas motoras y conductuales, se sacrificaron a los roedores por decapitación para posteriormente ser diseccionadas las regiones cerebrales usando el método de Glowinski - Iversen (1966). Primeramente, se sacrificaron a los roedores por decapitación y se extrajo el cerebro el cual fue colocado en una caja Petri (mantenida a una temperatura de 4 °C) para la disección de las regiones cerebrales, las cuales preservamos a una temperatura de -70 °C para posteriormente medir los niveles de peroxidación de lípidos mediante la determinación de dienos conjugados y especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), así como el nivel de expresión de enzimas antioxidantes GPx-1 y SOD-Mn²⁺, por medio del uso de anticuerpos específicos (Western Blot).

12.1 Determinación de dienos conjugados en los blancos dopaminérgicos

En el proceso de peroxidación de lípidos, se produce el desprendimiento de un protón (H⁺) de los PUFA formando un radical libre, el electrón desapareado se reordena para estabilizar la cadena del PUFA formando un dieno conjugado. La formación de dienos conjugados es la etapa inicial del proceso de lipoperoxidación, estos se producen como resultado de la degradación de los PUFA debida al aumento en los niveles de ERO intracelulares. En el inicio de protocolo se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Lowry, utilizando albúmina sérica de suero bovino como estándar. Para esto se homogenizó cada región en 200 µL de solución balanceada de fosfatos (PBS 0.1 M, pH =7.4). Para cuantificar la formación de dienos conjugados se utilizó el método de Klaassen y Plaa (1969), en el cual se hizo reaccionar 1 mg de proteína de tejido. El método consistió en colocar un volumen proporcional a 250 µg de proteína de muestra, 40 µL de agua desionizada y 400 µL del reactivo Folch (dos partes de cloroformo y una parte de etanol) en un tubo de ensaye, realizándose este procedimiento para cada región cerebral. La muestra se agitó en un vortex por 15 segundos, para posteriormente ser centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos, se tomaron 250 µL del sobrenadante del vial y se dejó secar por 8 horas. Una vez secos los frascos se les agregó 150 µL ciclohexano y se agitaron por 15 segundos. Posteriormente, los dienos conjugados se midieron en un espectrofotómetro usando como agente blanco (control) el ciclohexano, que fue colocado en una cubeta de cuarzo para ser leído en un rango del espectro de luz a 233 nm.

12.2 Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)

El ensayo de TBARs permite medir el grado de oxidación/actividad antioxidante en una muestra, la prueba mide los aldehídos formados en ausencia de un catalizador como $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$, o por efecto de la aceleración de la reacción por un catalizador (FeSO_4). Este método nos permite medir los productos del proceso de peroxidación lipídica, que se cuantificaron usando el método del TBARs y la concentración de aldehídos reactivos que se expresara en nmol/mg de proteína (Figura 12). El método se basa en la que una molécula del aldehído reacciona con dos moléculas del ácido tiobarbitúrico formando un cromóforo con una absorbancia de 532 nm. Para lo que se realizaron dos ensayos, el primero que se llama basal en donde se llevan a cabo reacciones con el ácido tiobarbitúrico y otro al que se le agregó $\text{Fe}^{2+}\text{SO}_4$, la reacción forma hidropéroxido (LOOH) en la fase de propagación en el proceso de peroxidación de lípidos, aumentando los niveles de TBARS. Para determinar la reacción de TBARs se tomó como referencia el protocolo de Luna-Moreno et al. (2007), el cual se describe a continuación: Este ensayo se realiza por duplicado, un ensayo es el basal y el otro es el grupo con hierro (FeSO_4 , reto). En el ensayo basal se le colocan un volumen proporcional a 250 μL de proteína de la muestra, y se ajusta a un volumen de 100 μL con buffer TRIS 0.15 M, mientras que en los tubos de ensayo con hierro se adicionaron 50 μL de FeSO_4 (500 μM) para las diferentes regiones cerebrales, posteriormente las muestras se incubaron a 37 °C por 30 minutos. Después de la incubación se tomaron 40 μL y se le adicionaron a cada tubo 150 μL de ácido acético al 20 %, 150 μL de ácido tiobarbitúrico y 50 μL de agua desionizada, se agitaron y se colocaron en un baño maría a una temperatura de 95 °C por un tiempo de 45 minutos. Para posteriormente enfriarlos a chorro de agua, después se les agregó 100 μL de KCl y 500 μL de la solución piridina/butanol (1:15 v/v respectivamente) agitándose por 15 segundos. Finalmente, se tomó la fase superior del tubo (cromóforo) y se le colocó en viales para posteriormente ser centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos, después de ser centrifugados se tomó el sobrenadante y se depositó en la celdilla de cuarzo para ser determinado en un espectrofotómetro a un rango de luz de 532 nm.

12.3 Detección de enzimas antioxidantes (Western Blot)

El método de inmunotransferencia de proteínas (Western Blot), nos ayudará a cuantificar el estado enzimático de los sistemas antioxidantes SOD-Mn y GPx-1 de los blancos de los sistemas dopaminérgicos de ratas expuestas a ATR.

En el método de Western Blot se determinaron las enzimas antioxidantes, permitiendo la detección, separación y cuantificación de proteínas específicas por medio del uso de anticuerpos específicos (SOD y GPx-1). El protocolo se divide en tres etapas; la electroforesis que permite determinar proteínas presentes en una determinada muestra que se desplazan dentro de un gel de poliacrilamida separándose de acuerdo con su peso molecular, en la segunda etapa se realizó la transferencia de las proteínas separadas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), y finalmente se incubó la membrana con anticuerpos primarios y específicos para las proteínas inertes.

Para la determinación de las enzimas antioxidantes SOD y GPx1. Las muestras se homogenizaron con un buffer de homogenización modificado de Pan et al. (2006) que contiene; 50 mM de TRIS-HCl, 50 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1% de TRITON X-100, 0.1 % de SDS, 10 % v/v glicerol y 0.1 % de coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas, para posteriormente determinarse la concentración de proteínas por el método de Lowry.

Electroforesis. Las muestras se cargarán en geles de poliacrilamida al 12%, posteriormente se corrieron las muestras con un buffer de electroforesis ((MOPS-SDS Running buffer 1X) a 100 V durante 120 minutos a temperatura ambiente (Scopes et al., 2001).

Transferencia: Los geles fueron colocados en forma de sándwich con un papel filtro y una membrana de PVDF (previamente equilibrada con metanol) en un buffer de transferencia (buffer MOPS-SDS 1x) a 15 Volts por 110 minutos.

Inmunodetección: Las membranas se bloquearon con blotto por un lapso de 120 minutos, después se realizaron tres lavados con TBS-Tween 1X por 10 minutos cada uno. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario (dilución 1:1000) por un lapso de 18 horas, después se retiró el anticuerpo y se realizaron tres lavados con TBS-Tween 1X de 10 minutos cada uno. Después se colocó el anticuerpo secundario (dilución 1:3000) durante 2 horas, para luego lavar el anticuerpo con TBS-Tween 1X. Finalmente, las bandas de proteínas se revelaron con una solución quimioluminiscente (ECL), en la cual se incubaron por un lapso de tres minutos, la membrana se llevó a una caja de revelado en donde se colocó en una placa fotográfica hasta obtener el revelado de la placa. Las bandas se analizaron utilizando el software libre Imagen J.

13. Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas para evaluar efectos del tratamiento en el peso corporal, actividad locomotora espontánea, pruebas conductuales (rotarod y barra de equilibrio), así como de la prueba de laberinto elevado en cruz y de las diferentes pruebas bioquímicas (determinación de dienos conjugados, reacción de TBARs, expresión de enzimas con actividad antioxidante SOD y GPx), se analizaron por medio de una varianza (ANDEVA) de una o dos vías según sea el caso. Las diferentes comparaciones se realizaron con un nivel mínimo de significancia de 95 % ($p \leq 0.05$). Los datos obtenidos de los sujetos expuestos a ATR se analizaron con el paquete estadístico Statview versión 5.0 (SAS Institute Inc. Cary. NC, USA), mientras que la elaboración de las gráficas, fueron realizadas utilizando el programa Sigmaplot (Systat Software Inc.4.0 SYSTAT Software).

14. Resultados

14.1 Efecto de la administración de atrazina sobre el peso corporal

El tratamiento con ATR no produjo cambios en el aspecto de los roedores, al mismo tiempo que no se presentaron decesos durante el periodo de registro. Durante el tratamiento con atrazina, se registró el peso corporal de los roedores durante el proceso de intoxicación crónica (12 meses) a dos diferentes dosis de ATR (1 ó 10 mg ATR/kg de peso corporal) y el grupo control. La administración con atrazina no produjo diferencias significativas entre los grupos durante el tratamiento [$F(2, 27) = 0.547, p = 0.5852$], solo se observó efecto en el tiempo de muestreo [$F(12, 324) = 691.453, p < 0.0001$], sin observarse efecto en la interacción tratamiento x tiempo [$F(24, 324) = 1.345, p = 0.1321$]. En la siguiente gráfica se muestran los pesos registrados en los 13 meses de exposición a ATR en los grupos tratados (1 ó 10 mg ATR/kg) y el grupo control (Figura 12).

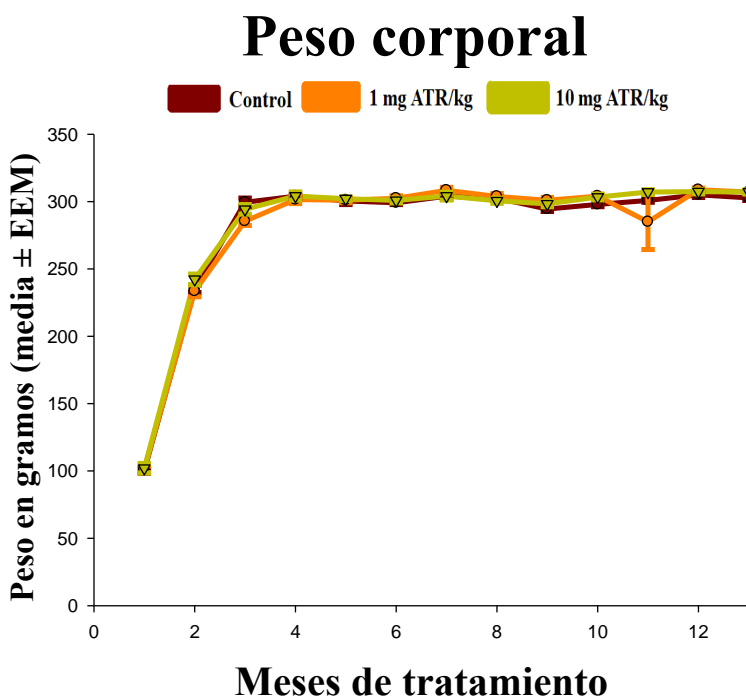


Figura 12. Registro del peso corporal. Cada figura muestra el peso corporal de los tres grupos experimentales (control, 1 ó 10 mg ATR/kg) durante 13 meses, en el que se muestra el registro mensual de los grupos cuando fueron tratados con atrazina y el grupo control. Cada figura muestra el promedio del grupo experimental por mes de tratamiento, media \pm EEM.

Al no observar efecto en el peso corporal del roedor, decidimos analizar el efecto de ATR sobre el índice de obesidad o de Lee. El cual es un parámetro antropométrico que nos proporciona si ATR modificó el aspecto de los roedores durante el tratamiento con ATR.

14.1.1 Índice de Lee

El parámetro antropométrico de obesidad puede cuantificarse por el índice de Lee, este parámetro se analizó al final del tratamiento el cual arrojó que tras el fin de la administración de ATR produjo efecto debido al tratamiento [$F(2, 24) = 3.693, p = 0.0400$]. El análisis *post hoc* de Fisher mostró que al final del tratamiento con ATR, los grupos tratados con el herbicida (1 y 10 mg ATR/kg) fueron diferentes entre ellos, mientras que el grupo de 1 mg ATR/kg disminuyó con respecto al grupo control (figura 13). Lo que nos demuestra que la administración de ATR, indujo efectos en el metabolismo de los roedores, aunque no en el tamaño de los roedores [$F(2, 24) = 0.998, p = 0.3834$].

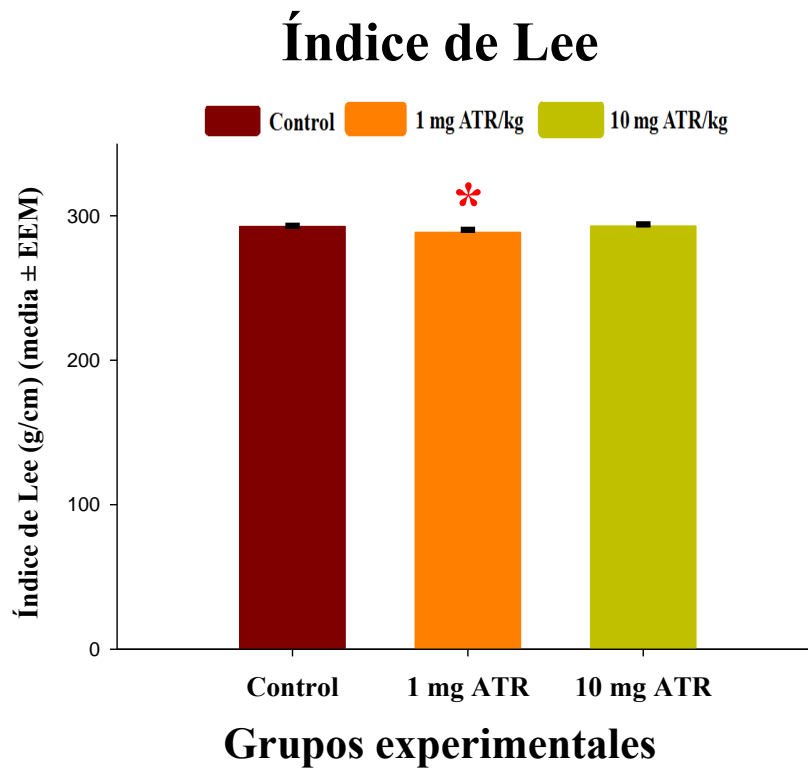


Figura 13. Índice de Lee. La gráfica muestra el valor de índice de Lee de los tres grupos experimentales (control, 1 mg ATR/kg, ó 10 mg ATR/kg) al final del tratamiento. Cada punto de la barra muestra el promedio de los grupos experimentales y el grupo control al final del tratamiento, media ± EEM. * muestra que el grupo de 1 mg ATR/kg fue diferente de los grupos control. $p < 0.05$.

14.2 Efectos de la exposición a atrazina en la primera hora de exploración en el registro de la actividad locomotora espontánea durante el tratamiento.

La actividad locomotora nos permite valorar el estado físico del roedor durante la exposición crónica a ATR (12 meses). Para determinar el grado de afectación por ATR en los roedores se cuantificó el proceso de exploración y la actividad locomotora espontánea. Para esto se tomaron diez variables como las más significantes: cuentas estereotipadas, actividad horizontal, distancia al centro, distancia total, distancia en el margen, número de estereotipias, tiempo de actividad vertical, tiempo en el centro, tiempo en el margen y el tiempo de movimiento. Para esto se analizó la primera hora de registro durante los 12 meses de tratamiento. Los datos generados muestran solamente efecto de tratamiento en la actividad vertical [$F(2, 23) = 4.132, p = 0.0272$]. Por otro lado, todas las variables analizadas mostraron efecto de tiempo (12 meses de registro) [$F's(11, 297) = 6.312 - 27.749, p < 0.05$]. Mientras que ninguna variable mostró efectos de interacción (tratamiento x tiempo). Los datos estadísticos de las variables analizadas con respecto a la primera hora de registro se pueden observar en la tabla 1 que muestra el resumen de los valores de $F's$.

14.2.1 Efecto de la exposición crónica a atrazina sobre la actividad vertical

El análisis de la actividad vertical de la primer hora de registro mostró mediante el análisis de ANOVA de medidas repetidas, efecto significativo en el tratamiento [$F(2,27) = 4.132, p = 0.0272$], se observó diferencias significativas en el tiempo de muestreo [$F(10, 270) = 27.149, p < 0.0001$], mientras que en la interacción tratamiento y tiempo no se observó efecto [$F(20, 270) = 0.921, p = 0.5612$]. Por otro lado, los resultados de la ANOVA de una vía nos arrojaron efecto de tratamiento para los meses 3, 4, 5, 6, 7, 11 y 12 [$F's(2, 27) = 2.607 - 6.131, p < 0.05$]. Donde el análisis *post hoc* de Fisher nos mostró que el grupo de 10 mg ATR/kg presento hipoactividad con respecto al grupo control. En la siguiente figura se muestra el periodo de exploración con respecto a la actividad vertical del roedor a lo largo del tratamiento (figura 14).

Actividad vertical

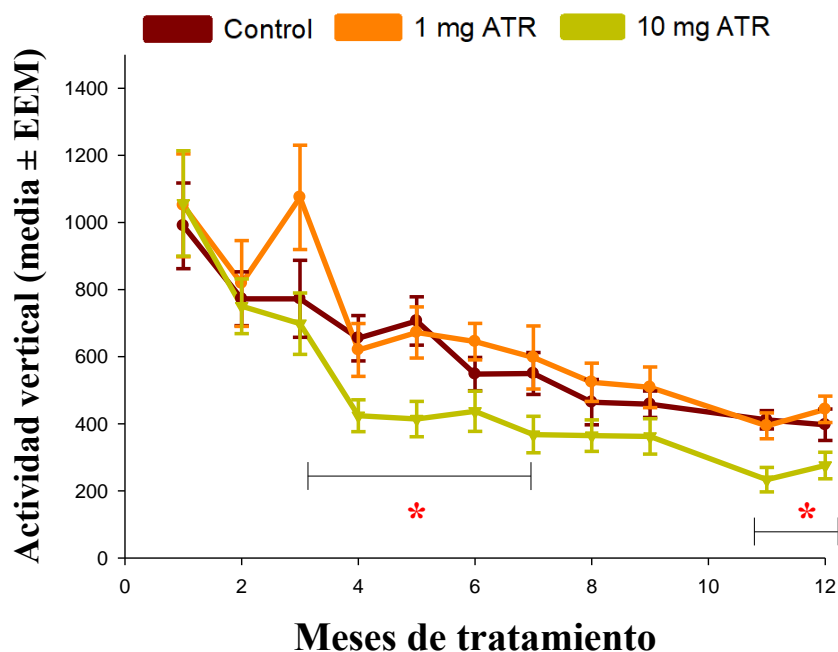


Figura 14. Actividad vertical. La gráfica representa la actividad vertical dentro de la caja de registro de la primera hora de la actividad locomotora espontánea de los tres grupos experimentales a lo largo de los 12 meses de tratamiento. Cada punto de la gráfica representa el promedio del grupo por mes de tratamiento (media \pm EEM). * Denota diferencias significativas entre el grupo de 10 mg ATR/kg y el grupo control.

Resumen de los valores de F 's para el análisis de la primera hora de registro de las diez variables analizadas de la actividad locomotora espontánea durante el tratamiento con ATR.

12 meses	CEAE	AH	DC	DT	DEM
Tratamiento	(2, 27) = 0.772, p = 0.4733	(2, 27) = 0.685, p = 0.5126	(2, 27) = 0.592, p = 0.5605	(2, 27) = 0.173, p = 0.8425	(2, 27) = 0.838, p = 0.4434
Tiempo	(11, 264) = 5.591 *, p < 0.0001	(11, 297) = 13.997 *, p = 0.0011	(11, 297) = 8.337 *, p < 0.0001	(11, 297) = 6.626 *, p < 0.0001	(11, 297) = 18.296 *, p < 0.0001
Interacción	(22, 264) = 1.564, p = 0.0546	(22, 297) = 0.847, p = 0.6654	(22, 297) = 0.843, p = 0.6707	(22, 297) = 1.237, p = 0.2153	(22, 297) = 1.117, p = 0.3272
12 meses	NE	AV	TC	TM	TEM
Tratamiento	(2, 27) = 1.238, p = 0.3059	(2, 27) = 4.132, p = 0.0272 *	(2, 27) = 0.391, p = 0.6805	(2, 27) = 2.126 *, p = 0.1388	(2, 27) = 0.207, p = 0.8145
Tiempo	(11, 297) = 3.348 *, p = 0.0002	(10, 270) = 27.749 *, p < 0.0001	(11, 297) = 14.731 *, p < 0.0001	(11, 297) = 6.723 *, p < 0.0001	(11, 297) = 6.312 *, p < 0.0001
Interacción	(22, 297) = 0.942, p = 0.5397	(20, 270) = 0.921, p = 0.5612	(22, 297) = 1.423, p = 0.1011	(22, 297) = 0.860, p = 0.5483	(22, 297) = 1.038, p = 0.4175

Tabla 1. Valores de F 's para las diferentes variables de actividad locomotora. La tabla muestra los valores de F para cada una de las variables analizadas por una ANOVA de medidas repetidas, para la primera hora de registro. Abreviaturas: Conteo de actividad de episodios estereotipados (CEAE), Actividad horizontal (AH), distancia al centro (DC), Distancia en el margen (DM, distancia total (DT), número de estereotipias (NE), actividad vertical (AV), tiempo en el centro (TC), tiempo en el margen (TEM), tiempo de movimiento (TM). p < 0.05, cada asterisco (*) representa diferencia significativa entre grupos.

14.3 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre la actividad locomotora espontánea durante el transcurso de los 12 meses (datos colapsados de las 24 horas).

La administración crónica de ATR (1 ó 10 mg ATR/kg) en comparación con el grupo control, alteró la actividad locomotora en el transcurso del tratamiento. Los datos obtenidos a lo largo de los doce meses de registro muestran efecto de tratamiento en la DT, NE, AV y TM [F's (2, 23) = 3.751 – 4.901, $p < 0.05$]. Todas las variables muestran efecto de tiempo (12 meses de registro) [F's (10, 230) = 2.542 – 26.670, $p < 0.01$]. Observamos efectos de interacción (tratamiento x tiempo) en DC, DT, DEM, TC y TEM [F's (20, 230) = 1.698 – 14.787, $p < 0.05$].

El análisis de la actividad en términos de la actividad vertical, número de estereotipias y tiempo de movimiento durante el tratamiento con ATR se observaron efectos debido al tratamiento [F (2, 23) = 4.616, 3.751, 4.901, $p < 0.05$, respectivamente].

El análisis de varianza para la actividad vertical arrojó efecto durante el tratamiento en el mes 4, 11 y 12 [F (2, 27) = 7.874, 18.121, 6.866, $p < 0.05$ respectivamente]. El análisis *post hoc* de Fisher mostró que en el mes 4 los grupos tratados con ATR (1 o 10 mg ATR/kg) exhibieron hipoactividad en comparación con el grupo control, mientras que en el mes 11 los grupos 1 ó 10 mg ATR/kg mostraron menor actividad que el grupo control, al mismo tiempo que fueron diferentes entre ellos, y para el mes 12 el grupo de 10 mg ATR/kg presentó menor actividad que los grupos de 1 mg ATR/kg y el grupo control (figura 15A).

El análisis de una vía para el número de estereotipias mostró efecto en el mes 4, 6 y 12 [F (2, 27) = 7.009, 4.032, 3.881, $p < 0.05$ respectivamente]. Mientras que el análisis *post hoc* de Fisher arrojó que los grupos de 1 ó 10 mg ATR/kg presentaron hipoactividad en comparación con el grupo control en el mes 4, para los meses 6 y 11 el grupo de 10 mg ATR/kg mostró hiperactividad en comparación con el grupo el control (figura 15B).

Por otro lado, el análisis de una vía en el tiempo de movimiento mostró efecto de tratamiento en el mes 4, 6 y 11 [F (2, 27) = 9.234, 5.004, 7.034, $p < 0.05$ respectivamente]. El análisis *post hoc* para el tiempo de movimiento arrojó que los grupos 1 ó 10 mg ATR/kg en el mes 4 son diferentes con respecto al grupo control mostrando efectos contrarios en los meses 6 y 12, donde el grupo de 10 mg ATR/kg presentó un mayor tiempo de movimiento en comparación con el grupo control y el grupo de 1 mg ATR/kg (figura 15C).

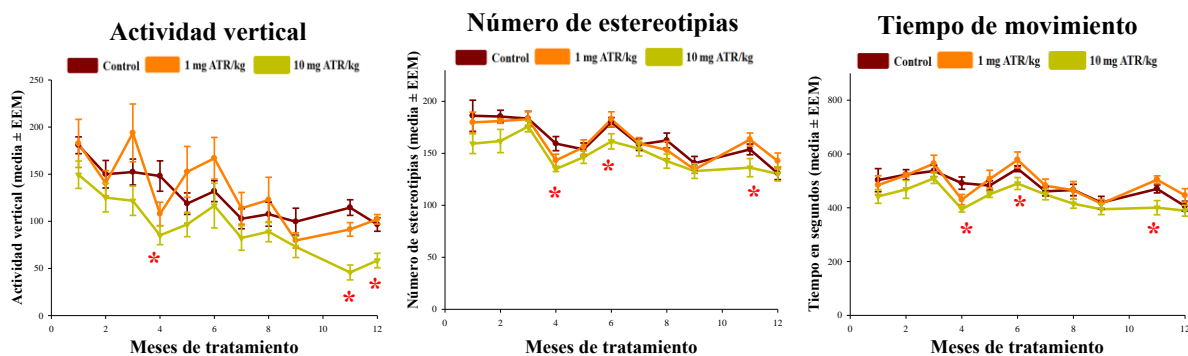


Figura 15. Diagrama que muestra el efecto de atrazina sobre las variables de la actividad locomotora espontánea durante los 12 meses de tratamiento. Las variables que se muestran son la actividad vertical (A), número de estereotipias (B) y tiempo de movimiento (C) de los grupos tratados con ATR (1 ó 10 mg ATR/kg) y el grupo control. Cada punto de la gráfica representa el promedio del grupo por mes de tratamiento (\pm EEM), * representa diferencia significativa con respecto al control, # representa diferencia entre grupos de 1 y 10 mg ATR/kg, $p < 0.05$.

Resumen de los valores de F 's para el análisis del promedio de las 24 horas de registro de las diez variables analizadas de la actividad locomotora espontánea para los doce meses de tratamiento.

12 meses	CEAE	AH	DC	DT	DEM
Tratamiento	(2, 23) = 2.397, $p = 0.1134$	(2, 23) = 1.575, $p = 0.2286$	(2, 23) = 0.141, $p = 0.8689$	(2, 23) = 4.807 *, $p = 0.0180$	(2, 23) = 0.984, $p = 0.3890$
Tiempo	(10, 230) = 15.912 *, $p < 0.0001$	(10, 230) = 12.798 *, $p < 0.0001$	(10, 230) = 20.949 *, $p < 0.0001$	(10, 230) = 26.670 *, $p < 0.0001$	(10, 230) = 12.884 *, $p < 0.0001$
Interacción	(20, 230) = 0.893, $p = 0.5963$	(20, 230) = 1.303, $p = 0.1783$	(20, 230) = 1.754, $p = 0.0267$ *	(20, 230) = 14.787 *, $p < 0.0001$	(20, 230) = 1.921, $p = 0.0121$ *
12 meses	NE	AV	TC	TM	TEM
Tratamiento	(2, 23) = 3.751 *, $p = 0.0389$	(2, 23) = 4.616 *, $p = 0.0206$	(2, 23) = 0.979, $p = 0.3909$	(2, 23) = 4.901 *, $p = 0.0169$	(2, 23) = 1.017, $p = 0.3774$
Tiempo	(10, 230) = 20.705 *, $p < 0.0001$	(10, 230) = 18.089 *, $p < 0.0001$	(10, 230) = 2.542, $p = 0.0063$	(10, 230) = 14.391 *, $p < 0.0001$	(10, 230) = 2.861, $p = 0.0022$
Interacción	(20, 230) = 0.912, $p = 0.5722$	(20, 230) = 1.500, $p = 0.0823$	(20, 230) = 1.719, $p = 0.0314$ *	(20, 230) = 0.903, $p = 0.5837$	(20, 230) = 1.698, $p = 0.0347$ *

Tabla 2. Valores de F 's de la actividad locomotora espontánea global. La tabla muestra los valores de F 's para cada una de las variables analizadas por una ANOVA de medidas repetidas. Abreviaturas: Conteo episodio de actividad estereotipada (CEAE), actividad horizontal (AH), distancia al centro (DC), distancia en el margen (DMM), distancia total (DT), número de estereotipias (NE), actividad vertical (AV), tiempo en el centro (TC), tiempo en el margen (TEM) y tiempo de movimiento (TM). $P < 0.05$, cada asterisco (*) representa diferencia significativa entre grupos.

14.4 Efecto de la exposición crónica a la ATR sobre la actividad locomotora espontánea durante el protocolo de 24 horas en los 12 meses de tratamiento.

Para valorar el efecto de ATR sobre la actividad locomotora espontánea, se realizó el protocolo de registro de 24 horas a lo largo de los 12 meses de exposición de las variables antes descritas. El registro de la actividad locomotora se muestra en lapsos de cuatro meses, como una parte representativa del registro de los doce meses que duró el tratamiento.

14.4.1 Efecto de la exposición crónica a atrazina sobre la actividad vertical

Los resultados del análisis para la actividad vertical arrojaron que para el caso del mes 4 se observó efecto de tratamiento [$F(2, 27) = 7.874, p = 0.0020$], con efecto en el tiempo de muestreo [$F(23, 621) = 17.307, p < 0.0001$], sin efecto en la interacción (tiempo vs tratamiento) [$F(46, 621) = 0.880, p = 0.6979$]. El análisis de varianza nos mostró que los grupos tratados con ATR (1 ó 10 mg ATR/kg) tuvieron efecto de tratamiento en la hora 13 [$F(2, 27) = 5.885, p = 0.0076$]. Por otro lado, la prueba *post hoc* de Fisher presentó hipoactividad en el grupo de 10 mg ATR/kg en comparación con el grupo de 1 mg ATR/kg y el grupo control. Para el mes 8, no se observó efecto de tratamiento [$F(2, 26) = 1.673, p = 0.2073$], con efecto en el tiempo [$F(23, 598) = 20.802, p < 0.0001$], sin efecto en la interacción (tiempo vs tratamiento) [$F(46, 598) = 0.872, p = 0.7115$]. En el mes 12 si se observó efecto en tratamiento [$F(2,27) = 6.865, p = 0.0039$] y el tiempo de muestreo [$F(23, 621) = 27.078, p < 0.0001$], pero para la interacción (tratamiento x tiempo) no se observó efecto [$F(46, 621) = 1.092, p = 0.3175$]. El análisis de ANOVA de una vía nos mostró que a lo largo del protocolo se presentó efecto de tratamiento en las horas 5, 15 y 17 [$F(2, 27) = 5.623, 4.999, 8.664, p < 0.05$ respectivamente]. Los resultados del análisis de Fisher nos arrojaron que en la hora 5 el grupo de 10 mg ATR/kg presentó hipoactividad con respecto al grupo de 1 mg ATR, sin ser diferente del grupo control, para la hora 15 y 17 el grupo de 10 mg ATR tuvo una menor actividad en comparación con el grupo de 1 mg ATR y el control (figura 16).

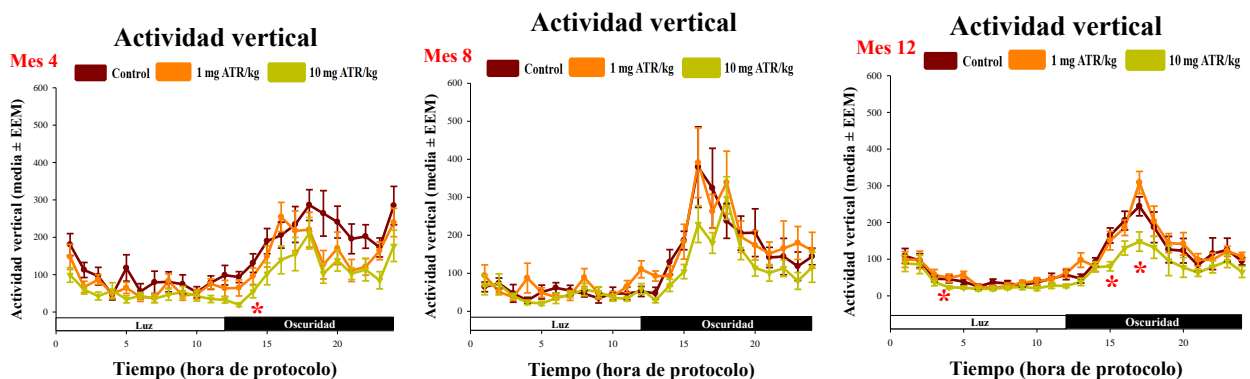


Figura 16. Actividad vertical en el protocolo de 24 horas. En las gráficas se observa el registro de las 24 horas en el protocolo de la actividad locomotora espontánea en los tres grupos experimentales para los meses 4, 8 y 12. Cada punto de la gráfica representa el promedio del grupo por mes de tratamiento (\pm EEM). * denota diferencia significativa entre grupos tratados con ATR y el grupo control.

14.4.2 Efecto de la exposición crónica a atrazina sobre la número de estereotipias

El análisis de ANDEVA para el número de estereotipias se observa en la gráfica 21, que muestra el número de estereotipias en el protocolo de 24 horas. En mes 4 se observó efecto de tratamiento [F (2, 27) = 7.009, p = 0.0035] y de tiempo [F (23, 621) = 13.270, p < 0.0001], pero no fue el caso para la interacción (tiempo vs tratamiento) [F (46, 621) = 1.127, p = 0.2661], el ANOVA de una vía para la hora 14 arrojó efecto de tratamiento [F (2, 27) = 5.849, p = 0.0079], mientras que el análisis *post hoc* de Fisher nos mostró que los grupos tratados con ATR presentaron hipoactividad en comparación con el grupo control. Para el mes 8, se observa que no hubo efecto de tratamiento [F (2, 26) = 2.619, p = 0.0920], pero sí para el tiempo [F (23, 598) = 20.406, p < 0.0001], sin efecto en la interacción entre tiempo x tratamiento [F (46, 598) = 1.042, p = 0.4004]. Para el caso del mes 12 no presentó efecto de tratamiento [F (2,27) = 0.268, p = 0.7671], pero se observó efecto en tiempo [F (23, 621) = 24.280, p < 0.0001] y para la interacción (tratamiento x tiempo) no se observó efecto [F (46, 621) = 0.758, p = 0.8788] (figura 17).

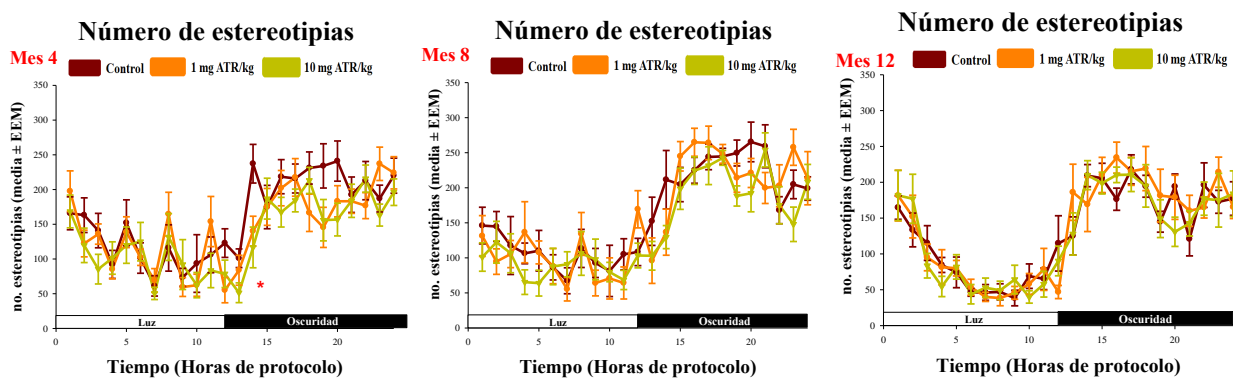


Figura 17. Número de estereotipias en el protocolo de 24 horas. En las gráficas se observa el registro de las 24 horas en el protocolo de la actividad locomotora espontánea en los tres grupos experimentales para los meses 4, 8 y 12. Cada punto de la gráfica representa el promedio del grupo por mes de tratamiento. * representa diferencia significativa entre grupos.

14.4.3 Efecto de la exposición crónica a atrazina sobre el tiempo de movimiento

El tiempo de movimiento se analizó por medio de una ANDEVA de medidas repetidas, la cual presentó efecto en el tratamiento [$F(2, 27) = 9.234, p = 0.0009$], tiempo de muestreo [$F(23, 621) = 15.454, p < 0.0001$], pero no para la interacción (tiempo vs tratamiento) [$F(46, 621) = 1.059, p = 0.3547$]. El ANOVA de una vía arrojó que en la hora 14 tuvo efecto en el tratamiento [$F(2, 27) = 6.409, p = 0.0053$]. Y el análisis de Fisher mostró que en la hora 14, los grupos tratados con ATR presentaron hipoactividad en los grupos tratados con ATR (1 y 10 mg ATR/kg) en comparación con el grupo control. En el mes 8, los resultados del análisis de ANDEVA mostraron que no hubo efecto de tratamiento [$F(2, 26) = 2.349, p = 0.1154$], con efecto en el tiempo de muestreo [$F(23, 598) = 26.279, p < 0.0001$], pero no para la interacción (tiempo vs tratamiento) [$F(46, 598) = 0.999, p = 0.47772$]. Mientras que para el mes 12, la ANDEVA de medidas repetidas no mostró efecto de tratamiento [$F(2, 27) = 0.469, p = 0.6309$], mientras que para el tiempo de muestreo se pudo observar efecto [$F(23, 621) = 26.456, p < 0.001$], pero no para la interacción (tiempo vs tratamiento) [$F(46, 621) = 0.748, p = 0.8893$] (figura 18).

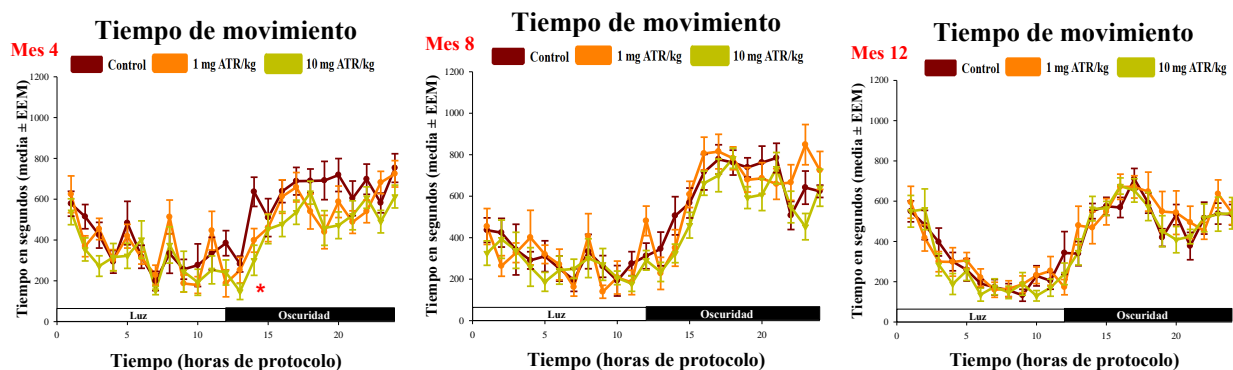


Figura 18. Tiempo de movimiento en el protocolo de 24 horas. En las gráficas se observa el registro de las 24 horas en el protocolo de la actividad locomotora espontánea en los tres grupos experimentales para los meses 4, 8 y 12. Cada punto de la gráfica representa el promedio del grupo por mes de tratamiento. * denota diferencia significativa entre el grupo control y los tratados con ATR (1 ó 10 mg ATR/kg).

Los valores complementarios de las variables de la actividad locomotora se pueden observar en el ANEXO 1 al final del escrito.

14.5 Efecto de la exposición crónica a la atrazina sobre el protocolo la barra de equilibrio durante los 12 meses de tratamiento.

El protocolo de barra de equilibrio es una prueba de coordinación motora fina, la cual permite evaluar la capacidad del roedor para atravesar una viga de 1 cm de grosor manteniendo el equilibrio. Se tomaron como resultado el tiempo que le lleva al roedor en cursar una sección de la viga, así como los errores en el trayecto y el número de congelamientos. La evaluación de la prueba de barra de equilibrio se realizó en dos etapas del tratamiento (6 y 12 meses), en la primera etapa de la prueba no se observó efecto de tratamiento en el número de errores totales [$F(2, 27) = 0.584, p = 0.5648$], de la misma forma para la fase dos [$F(2, 27) = 1.137, p = 0.3355$] (figura 19 A). El tiempo del recorrido en el protocolo de barra de equilibrio se puede tomar como una medida de daño en el control motor. Al evaluar el tiempo promedio de recorrido en la barra de equilibrio en la fase 1 del tratamiento, no se observó efecto de tratamiento con ATR [$F(2, 27) = 0.135, p = 0.8739$], ni en la fase 2 [$F(2, 27) = 0.841, p = 0.4421$] (figura 19 B). Los datos complementarios de la prueba de barra de equilibrio se muestran en la tabla 3.

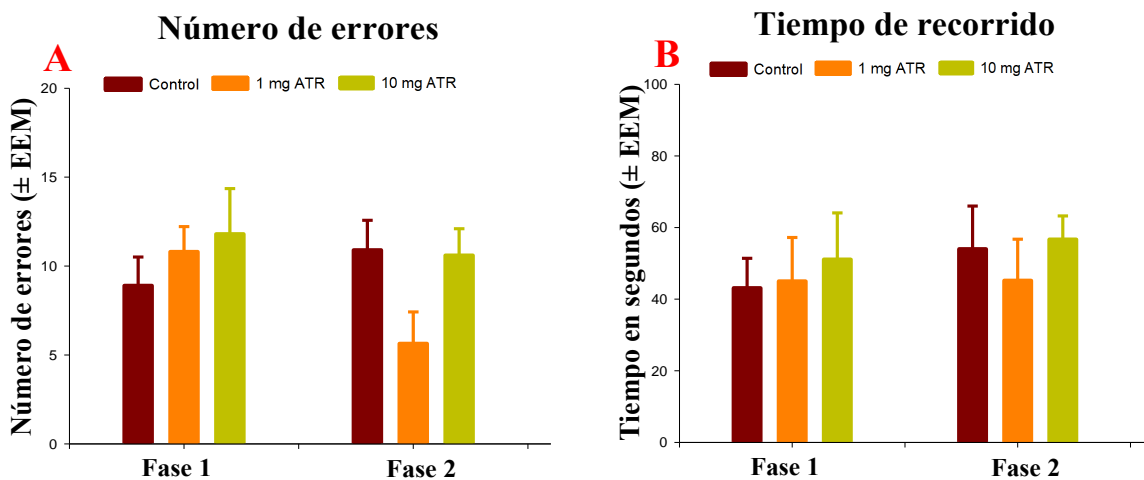


Figura 19. Número de errores y tiempo de recorrido en el protocolo de barra de equilibrio. La siguiente gráfica nos muestra el número de errores y el tiempo de recorrido durante la prueba de barra de equilibrio. Cada barra representa el promedio del número de errores y el tiempo de recorrido del grupo control y los tratados con ATR (1 y 10 mg ATR/kg) (media ± EEM).

Barra de equilibrio (1 cm)				
Etapa 1. Prueba				
Grupo	Control	1 mg ATR / kg	10 mg ATR / kg	Estadística
Tiempo de recorrido	43.10 ± 8.305	45.0 ± 12.214	51.100 ± 12.996	F (2, 27) = 0.135, p = 0.8739
Pasos totales	30.4 ± 1.258	31.2 ± 1.254	33.0 ± 1.571	F (2, 27) = 0.946, p = 0.4007
Errores	8.9 ± 1.609	10.8 ± 1.420	11.8 ± 2.56	F (2, 27) = 0.584, p = 0.5648
Número de Congelamientos	2.3 ± 0.335	2.2 ± 0.327	2.0 ± 0.422	F (2, 27) = 0.176, p = 0.8392
Tiempo congelamiento	1.4 ± 0.371	1.7 ± 0.517	2.5 ± 0.687	F (2, 27) = 1.105, p = 0.3457
Arrastres	0.10 ± 0.10	0.2 ± 0.133	0.2 ± 0.133	F (2, 27) = 0.220, p = 0.8043
Distancia de arrastre	0.6 ± 0.60	1.33 ± 0.923	1.62 ± 1.088	F (2, 27) = 0.346, p = 0.7103
Etapa 2. Prueba				
Tiempo de recorrido	64 ± 12.022	45.2 ± 11.542	56.7 ± 6.525	F (2, 27) = 0.841, p = 0.4421
Pasos totales	33.7 ± 0.817	28.8 ± 3.476	32.5 ± 1.815	F (2, 27) = 1.22, p = 0.3111
Errores	10.9 ± 1.676	7.7 ± 1.783	10.6 ± 1.5	F (2, 27) = 1.137, p = 0.3356
Número de Congelamientos	3.1 ± 0.314	1.8 ± 0.442	3.1 ± 0.314	F (2, 27) = 4.297, p = 0.0240 *
Tiempo congelamiento	25.2 ± 3.392	16.8 ± 5.179	30.2 ± 5.168	F (2, 27) = 2.115, p = 0.1401
Arrastres	0.10 ± 0.10	0.10 ± 0.10	0.40 ± 0.221	F (2, 27) = 1.306, p = 0.2874
Distancia de arrastre	0.67 ± 0.67	1.0 ± 1.0	2.29 ± 1.333	F (2, 27) = 0.681, p = 0.5144

Tabla 3. Parámetros del protocolo de barra de equilibrio. Se muestran los diferentes parámetros de la prueba de barra de equilibrio, los datos presentados son la media de los tres grupos experimentales ± EEM, $p < 0.05$, * diferencia significativa con respecto al grupo control.

14.6 Evaluación del efecto de la exposición a atrazina en la prueba de coordinación motora a los 6 y 12 meses de tratamiento.

La evaluación del protocolo de coordinación motora (Rotarod) se realizó en dos etapas (6 y 12 meses de tratamiento) en el transcurso del tratamiento con ATR. El análisis ANDEVA para el tiempo de permanencia en el rodillo en la primera etapa de prueba (seis meses de tratamiento) no se observó efecto de tratamiento [F (2, 27) = 0.203, $p = 0.8178$], hubo efecto de tiempo de muestreo [F (7, 189) = 3.870, $p = 0.0006$], y no hubo efecto de interacción (tiempo vs tratamiento) [F (14, 189) = 0.574, $p = 0.8831$] a lo largo de 8 sesiones vespertinas (figura 20 A). Mientras que el análisis de la segunda fase de la prueba (1 año de tratamiento), no se observó efecto de tratamiento [F (2, 27) = 0.133, $p = 0.8761$], ni para el tiempo de muestreo [F (4, 108) = 0.776, $p = 0.5430$] o para la interacción de tiempo vs tratamiento [F (8, 108) = 0.531, $p = 0.8313$] (figura 20 B) en cinco sesiones vespertinas.

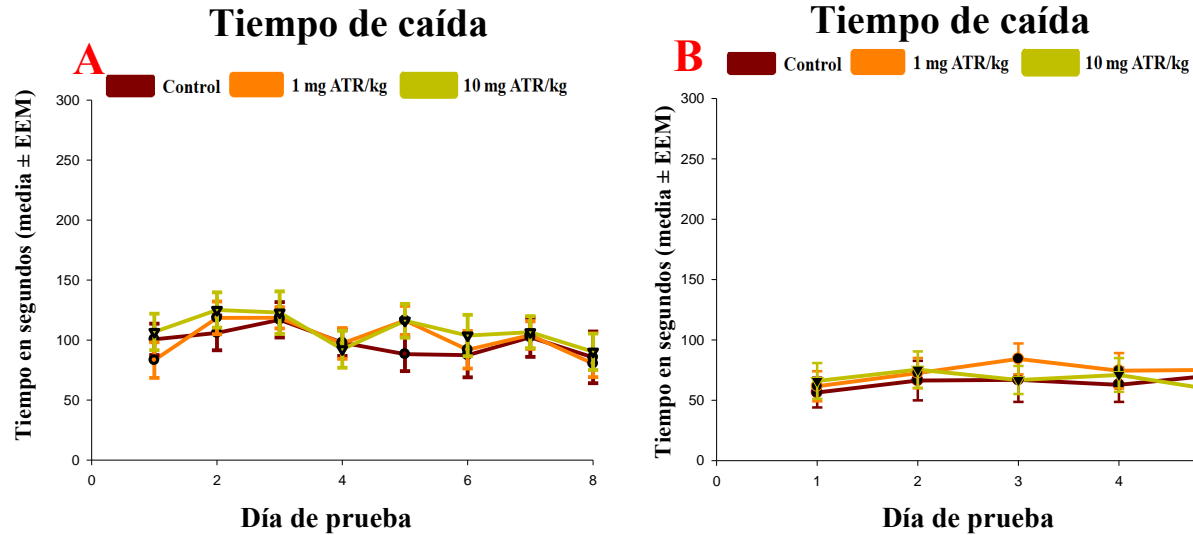


Figura 20. Tiempo de permanencia sobre el cilindro. La gráfica A corresponde al registro de las 8 sesiones en el rodillo giratorio (rotarod) a los seis meses de tratamiento y la gráfica B es la evaluación al año de tratamiento, donde cada punto de la gráfica es el promedio del tiempo de latencia que el roedor permaneció sobre el rodillo durante la etapa de prueba (promedio \pm EEM).

14.7 Evaluación del protocolo de laberinto elevado en cruz sobre la exposición crónica a atrazina durante los 12 meses de tratamiento.

La prueba de laberinto elevado en cruz se realizó en dos etapas del tratamiento (6 y 12 meses), con el fin de determinar el grado de ansiedad en los roedores, por efecto del tiempo de permanencia en los brazos cerrados, evitando los brazos abiertos. La evaluación del laberinto elevado en cruz en la primera etapa con respecto al tiempo de permanencia en los brazos cerrados y abiertos no presentó efecto de tratamiento en la latencia en los brazos cerrados [$F(2, 27) = 0.280, p = 0.7577$], ni para los brazos abiertos [$F(2, 27) = 0.449, p = 0.6427$] (figura 21 A). Para la segunda fase de la evaluación de la conducta durante el tratamiento no se observó efecto significativo en la latencia en los brazos cerrados [$F(2, 27) = 2.115, p = 0.1402$], observándose efecto de tratamiento para los brazos abiertos [$F(2, 27) = 4.009, p = 0.0299$]. El análisis de Fisher arrojó que el grupo de 10 mg ATR/kg fue diferente del grupo control en el tiempo de permanencia entre ambos brazos (cerrados y abiertos) (figura 21 B), mostrando una conducta ansiolítica en los roedores tratados con ATR.

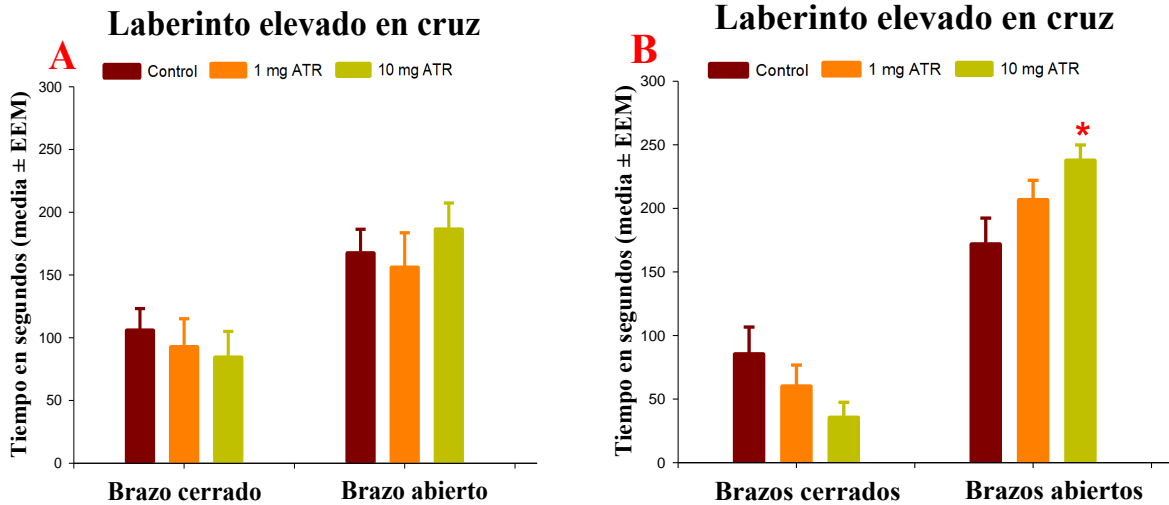


Figura 21. Tiempo de permanencia de los roedores en los brazos abiertos y cerrados. Las gráficas muestran el tiempo de permanencia de los roedores en los brazos abiertos y cerrados para los grupos tratados con ATR (1 ó 10 mg ATR/kg) y el grupo control. Cada barra representa el promedio \pm EEM del tiempo en los brazos, tanto para la primera fase (figura A) y la segunda fase (B) durante el tratamiento con ATR, $p < 0.05$, * diferente del grupo control.

Al observar efecto en la latencia de permanencia por lo roedores en los brazos del laberinto, decidimos analizar la trayectoria de los roedores durante la prueba como una medida de una alteración cognitiva y poder descartar el defecto motor. La evaluación del laberinto elevado en cruz en la primera etapa (figura 22 A) con respecto el número de trayectos o visitas a los brazos cerrados, para los tres grupos experimentales no se observó efecto de tratamiento [$F(2, 27) = 0.674$, $p = 0.5178$], de la misma forma para las visitas en los brazos abiertos [$F(2, 27) = 0.797$, $p = 0.4611$]. Mientras que en la fase dos de la prueba (1 año de tratamiento), los roedores no mostraron efecto significativo con respecto al tratamiento en el número de visitas en los brazos cerrados [$F(2, 27) = 1.291$, $p = 0.2914$], pero se observó efecto en el número de visitas en los brazos abiertos [$F(2, 27) = 3.632$, $p = 0.0401$]. La prueba *post hoc* de Fisher mostró que el grupo de 10 mg ATR presentó un mayor número de visitas en el brazo abierto con respecto al grupo de 1mg ATR/kg y el grupo control (figura 22 B).

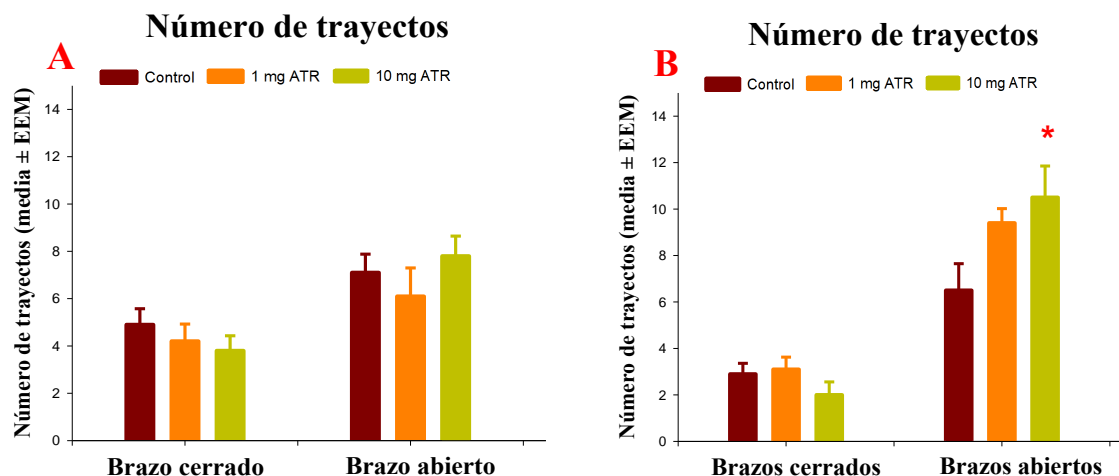


Figura 22. Número de trayectos de los roedores en los brazos abiertos y cerrados. Las gráficas muestran la media del número de veces de visitas de los roedores en los brazos abiertos y cerrados para los tres grupos experimentales. Cada barra representa la media del número de vistas \pm EEM del tiempo en los brazos, tanto para la primera fase (figura A) y la segunda fase (B) durante el tratamiento con ATR, $p < 0.05$, * diferencia significativa con respecto al grupo control.

Al finalizar las pruebas conductuales, los roedores fueron sacrificados y su cerebro diseccionado en las diferentes regiones cerebrales con el fin de analizar la cuantificación de dienos conjugados y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, como medidas del daño en la membrana celular por la exposición a ATR.

14.8 Cuantificación del daño en las membranas celulares en las diferentes regiones cerebrales por efecto de la exposición a atrazina

14.8.1 Dienes conjugados

El daño producido por las ERO en las membranas celulares se divide de acuerdo al proceso de degeneración de los PUFA. En la etapa inicial del daño en los lípidos de membranas celulares, se produce la formación de dienos conjugados por efecto de la extracción de un protón (H^+) en el grupo metileno ($-CH_2-$) en la cadena de los PUFA, desapareando un carbono de la cadena degenerando la membrana celular. El análisis de la varianza de una vía en la cuantificación de dienos conjugados en las diferentes regiones cerebrales nos mostró efecto de tratamiento en cerebelo [$F(2, 15) = 5.072, p = 0.0208$] y mesencéfalo dorsal [$F(2, 17) = 5.242, p = 0.0169$]. El análisis *post hoc* de Fisher nos mostró que en el cerebelo los grupos tratados con ATR (1 y 10 mg ATR/kg) fueron diferentes entre ellos, y el grupo de 10 mg ATR/kg fue diferente del grupo control, mientras que en el mesencéfalo los grupos tratados con ATR (1 y 10 mg ATR/kg) fueron diferentes del grupo control. Por otro lado, no se observó efecto de tratamiento en corteza prefrontal estriado, núcleo accumbens, hipocampo y amígdala (figura 23).

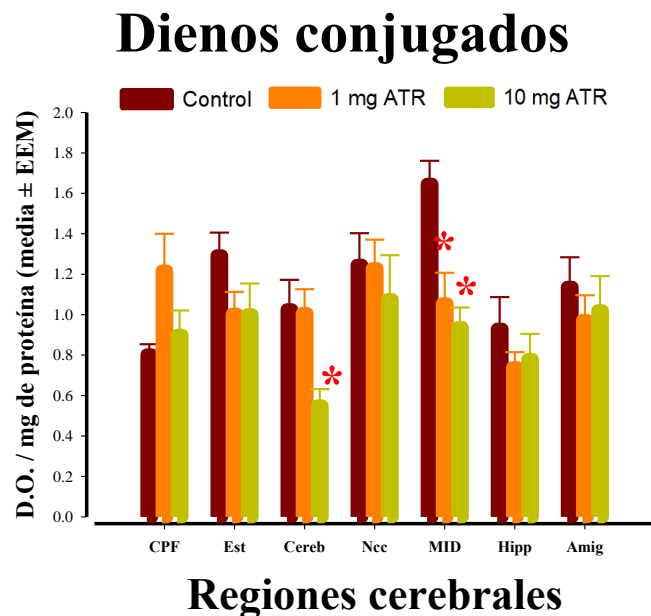


Figura 23. Formación de dienos conjugados en las diferentes regiones cerebrales. La gráfica muestra la formación de dienos conjugados en las diferentes regiones cerebrales, cada barra representa la media de la densidad óptica/mg de proteína (promedio \pm EEM) de los grupos tratados con ATR (1 ó 10 mg ATR/kg) y el grupo control, * denota diferencia significativa en comparación del grupo control. Corteza prefrontal (CPF), estriado (Est), cerebelo (cereb), núcleo accumbens (Ncc), mesencéfalo (MID), hipocampo (Hipp) y amígdala (Amig).

14.8.2 Reacción de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

En el mismo ensayo que se cuantificó la formación de dienos conjugados, se realizó el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico como medida del daño celular, siendo proporcional a la formación de ERO en la fase de terminación en el proceso de peroxidación lipídica. El análisis de varianza en el ensayo basal no mostró efecto debido al tratamiento con ATR en corteza prefrontal, estriado, cerebelo, núcleo accumbens, mesencéfalo, hipocampo y amígdala (figura 24 A). Por otro lado, en el ensayo de reto hierro (figura 24 B) no se observó efecto en la formación de aldehídos en la corteza prefrontal, estriado, cerebelo, núcleo accumbens, mesencéfalo, hipocampo y amígdala. Como resultado de que la exposición crónica a ATR no indujo lipoperoxidación en las membranas celulares de los tejidos cerebrales, lo que nos muestra que la administración de 1 ó 10 mg ATR/kg no degenera la membrana celular (figura 24).

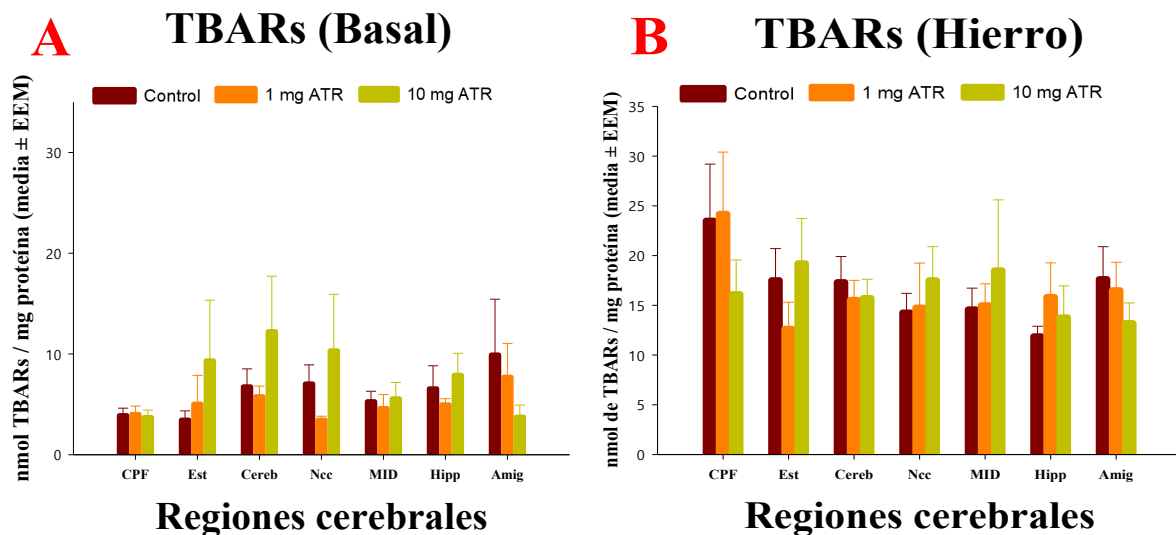


Figura 24. Formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Cada barra representa el promedio de la tasa de formación de aductos entre aldehídos y TBARs (nanomoles/mg de proteína) \pm EEM, de las diferentes regiones cerebrales en los animales tratados con 0, 1 o 10 mg ATR/kg de peso corporal. La imagen A muestra el ensayo basal, mientras que la figura B es el ensayo en el que se produjo el reto con hierro para las mismas regiones cerebrales. Corteza prefrontal (CPF), estriado (Est), cerebelo (cereb), núcleo accumbens (Ncc), mesencéfalo (MID), hipocampo (Hipp) y amígdala (Amig).

15. Discusión

Con el fin de conocer los procesos degenerativos en patologías neurológicas como la enfermedad de parkinson y el Alzheimer, ha motivado a utilizar diferentes modelos experimentales. Entre los modelos usualmente empleados para estudios neurodegenerativos destacan los herbicidas como paraquat (Thiruchelvam et al., 2000), rotenona (Betarbet et al., 2000) o toxinas como MPTP, cuyo efecto es que afectan el transporte de electrones en la mitocondria (Ayton et al., 2013), en conjunto con la alteración del sistema dopaminérgico nigroestriatal en roedores (Thiruchelvam et al., 2000; Coban & Filipov 2007; Bardullas et al., 2011; 2013, Rodriguez et al., 2013). Estudios de nuestro grupo con ratas macho de la cepa Sprague-Dawley expuestas a 10 mg ATR/kg de peso corporal durante un año, han mostrado que el herbicida ATR puede ser considerado un agente tóxico para el sistema dopaminérgico con el potencial de alterar la actividad locomotora y cognitiva (Bardullas et al., 2011; 2013), debido a la muerte de células dopaminérgicas modificando las conexiones que se encargan de procesar el movimiento (Gómez-Chavarín et al., 2014). El presente estudio muestra que la exposición crónica por un año a ATR (1 y 10 mg ATR/kg) en rata, causa variaciones en la actividad locomotora y en la conducta motora, como efecto de la alteración en la homeostasis en los sistemas dopaminérgicos. Como se pudo observar en un estudio previo de nuestro grupo donde la administración de ATR de forma repetida (6 inyecciones de 100 mg ATR/kg) por dos semanas en rata, produjo alteraciones conductuales y motoras desde la primera inyección, así como alterar la expresión de mRNA para Trx-1 en núcleo accumbens (Rodríguez et al., 2013).

15.1 Aspecto corporal

El tiempo que duro la administración con ATR en los roedores, se les mantuvo en restricción de alimento hasta alcanzar los 300 gramos de peso corporal. El registro del peso corporal de los grupos tratados con ATR (1 ó 10 mg ATR/kg) y el grupo control durante un año de tratamiento, no presentaron diferencias significativas en su ganancia o pérdida de peso, tal y como se informó anteriormente (Bardullas et al., 2011, 2013; Qin et al., 2015; Walters et al., 2015). Contrastando con el estudio publicado por Lim y colaboradores, en el cual se observó obesidad en ratas de la cepa Sprague-Dawley de 8 semanas cuando fueron administradas con dos dosis de ATR (30 o 300 µg ATR/kg) en el agua (Lim et al., 2009). Por lo que no podemos descartar, que la dieta suministrada (1 ó 10 mg ATR/kg) con pellets elaborados en el laboratorio pueda alterar el peso corporal de los roedores debido a que su alimentación fue restringida. Sin embargo, Zhang y

colaboradores informan un menor peso corporal en los roedores (ratas Wistar) tratados con pellets combinados con ATR (14.24 ó 89 mg ATR/kg/día) (Zhang et al., 2018). Y Elbridgea y colaboradores, que informan una disminución en el peso corporal de ratas Sprague-Dawley cuando fueron administradas con 40 mg ATR/kg de peso corporal por 6 semanas vía nasogástrica (Eldridgea et al., 1999).

Como se ha mencionado anteriormente, la exposición a atrazina en roedores puede alterar la funcionalidad de diferentes órganos y su fisiología, desde aumentar los niveles de metabolitos en orina (Zhang et al., 2018), generar estrés oxidativo en hígado, riñón y cerebro (Abarikwu 2014), inmunotoxicidad en el bazo (Gao et al., 2016), alteraciones en los niveles hormonales (Laws & Hotchkiss 2009) generar obesidad (Lim et al., 2009), así como incrementar la actividad neuronal (Rodríguez et al., 2017). Cabe mencionar que, en nuestro estudio los animales estuvieron en restricción alimenticia con el fin de aminorar el daño oxidativo, retardando los cambios asociados con la edad (Ingram et al., 1987) así como mantener el metabolismo celular, a partir de proporcionar un menor número de electrones en la transferencia por la mitocondria (Thornton 2002). Por tal motivo se evaluó el índice de Lee, con la finalidad de conocer si la administración de atrazina alteró el metabolismo basal en los roedores. Este es un parámetro antropométrico que toma en cuenta la longitud del roedor (inicio de la nariz y la cola) y su peso corporal, para conocer las variaciones en la talla corporal como resultado de cambios en el metabolismo del animal (Lee & Am 1929). Al finalizar el tratamiento con atrazina se cuantificó el índice de Lee, el análisis nos mostró que la administración de 1 mg ATR/kg de peso corporal, disminuyó la talla de los roedores en comparación con el grupo control. Este cambio en el aspecto de los roedores se pudo observar en el estudio de Zhang y colaboradores, en el cual observó un menor peso corporal cuando fueron administrados 14.24 mg ATR/kg de peso corporal a los 4 meses de haber iniciado el tratamiento, como resultado del cambio en el metabolismo energético hepático (Zhang et al., 2018). Con base a lo anterior, podemos mencionar que la exposición a químicos que alteran la función neuronal también afecta otros sistemas, modificando el metabolismo energético en diferentes órganos alterando el aspecto corporal en los roedores (Contini et al., 2012).

15.2 Actividad locomotora espontánea

Las tareas que evalúan la conducta del roedor son comúnmente empleadas en estudios toxicológicos con el fin de comprender los cambios en la conducta, como resultado de las alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica (Alder & Zbinden 1983). Así como las modificaciones en las vías moduladas por dopamina en los ganglios basales, y a su vulnerabilidad genética para proteínas con función antioxidante durante el proceso neurodegenerativo (Ekstrand & Galter 2009) o cognitivo, como un reflejo de la implicación de otras regiones cerebrales en el proceso (Braak et al., 2003; Asakawa et al., 2016). Estudios recientes han revelado que la exposición al herbicida atrazina produce variaciones en el comportamiento motor, como resultado de la degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la disminución de los niveles de dopamina en estriado (Bardullas et al., 2011; 2013; Rodriguez et al., 2013), generando comportamientos motores bifásicos en rata (Bardullas et al., 2011).

Partiendo de la información anterior, se realizó el análisis del comportamiento de los grupos tratados con el herbicida atrazina y el grupo control, basándonos en la premisa de que la conducta motora de los roedores es dependiente del ciclo luz/oscuridad, por lo que cualquier variación en esta actividad nos brinda evidencia de su estado fisiológico. La prueba de actividad locomotora espontánea consistió en medir la actividad motora del roedor al colocarlo en un ambiente nuevo (caja de registro). Para esto, evaluamos por separado la primer hora de registro (de un total de 25 horas) que denominamos hora de exploración, ya que es el periodo de mayor movimiento de los roedores ante un ambiente novedoso. El patrón conductual motor de los roedores durante la primer hora del registro disminuyó conforme finalizaba el tratamiento, como un reflejo de que los roedores de los tres grupos se habituaron a lo largo del periodo de exploración en la caja de registro. Observándose efecto significativo en la actividad vertical en los meses 3, 4, 5, 6, 7, 11 y 12 en el grupo de 10 mg ATR/kg en comparación con el grupo control. Estos resultados se ven sustentados por Bardullas y colaboradores en 2011, quienes al evaluar la hora de exploración observaron hipoactividad en el grupo expuesto a 10 mg ATR/kg a los 8 meses de haber iniciado el tratamiento (Bardullas et al., 2011), a diferencia de lo observado en este estudio que dicho efecto se observó desde el mes 3 y se postergó al final del tratamiento. Por lo que la exposición a ATR genera un comportamiento motor bifásico cuando se administra 10 mg ATR/kg en roedores, cuyo comportamiento oscilante puede ser reflejo de la alteración neuroquímica en la vía nigroestriatal durante el tratamiento (Bardullas et al., 2011; 2013).

Para conocer el comportamiento general de los roedores durante el tiempo de exposición, se evaluó de forma global la actividad de los roedores de los tres grupos formados. Dicho análisis nos arrojó efecto de tratamiento para las variables de actividad vertical, actividad horizontal y estereotipias, mientras que en las variables de posición se observó efecto de interacción de factores (tiempo vs tratamiento) en el grupo de 10 mg ATR/kg en comparación con el grupo control, modificando la conducta exploratoria de los roedores tratados con ATR. Dichos efectos varían con lo reportado por Bardullas y colaboradores, ya que, en su estudio del 2011 ellos reportaron hipoactividad en el mes 8 e hiperactividad en el mes 12 (Bardullas et al., 2011), mientras que en nuestro estudio observamos hipoactividad en el grupo de 10 mg ATR/kg en los meses 3 ó 4, que se posterga al final del tratamiento. Lo que nos sugiere que ATR tiene un comportamiento fluctuante en los roedores sin ser dependientes del tiempo de exposición (Walters et al., 2015).

Por otro lado, la actividad locomotora de los roedores en el protocolo de 24 horas disminuyó para las variables de actividad vertical, actividad horizontal, localización y estereotipias en el mes 4 como reflejo del inicio del proceso de neurodegeneración como se observan en modelos parkinsonianos (Ferrer 2011). Dicha hipoactividad se aplazó al final de la administración en el grupo tratado con 10 mg ATR/kg, para el tiempo en el centro, mientras que se observó hiperactividad en las variables de actividad vertical, distancia en el margen, tiempo en el margen. Estos resultados son congruentes ligeramente con los publicados por Bardullas y colaboradores, que en su reporte del 2011 mencionan que a una dosis de 10 mg ATR/kg, el herbicida atrazina indujo hipoactividad en el mes 8 e hiperactividad en el mes 12 para las variables verticales, horizontales, comportamiento estereotipado y de ubicación, dicho efecto lo atribuyeron a los cambios en la conectividad en la vía nigroestriatal al disminuir los niveles de dopamina en estriado (Bardullas et al., 2011). A diferencia de nuestro estudio, donde observamos un efecto hipoactivo en el mes 4, que se pospone al final de la administración.

Por lo que el efecto temporal en la conducta de los roedores puede estar determinado por la dosis y la edad, como dos factores preponderantes en el proceso de neurodegenerativo (Huang et al., 2017), así como a la alteración neuroquímica dopaminérgica (Bardullas et al., 2011; 2013) y el estrés oxidativo (Lim et al., 2009). Resultando en cambios en el comportamiento como un reflejo del grado de maduración y organización neuronal (Kállai et al., 2017). Con base a lo anterior, podemos especular que la exposición a ATR puede afectar la vía directa en el circuito de los ganglios basales, al disminuir la dopamina en el estriado inhibiendo a las neuronas del GPi/SNpr

alterando su neuroquímica, así como la reducción de los niveles de receptores D₁ (Gerfen & Surmeier 2011) en el estriado (Márquez-Ramos et al., 2017) y D₂ en los ganglios basales (Meredith & Surmeier 2011) modificando la actividad (Hikosaka et al., 1999; Bardullas et al., 2011) y la ejecución motora (Xia et al., 2017). Concluyendo que la exposición crónica a ATR ocasionó alteraciones en la conducta locomotora en rata, lo que sugiere que la dosis mínima necesaria para producir un efecto sobre la conducta ambulatoria es de 10 mg ATR/kg (Bardullas et al., 2011), como resultado del grado de la lesión en la vía dopaminérgica (Quinn et al., 2007).

15.3 Barra de equilibrio

La prueba de barra de equilibrio evalúa la habilidad del roedor para caminar sobre una viga de madera de 1 cm de grosor, esta prueba consistió en evaluar el caminar, sujeción y el equilibrio de los roedores en atravesar la viga. Para esto empleamos el protocolo de barra de equilibrio, el cual tiene por objetivo evaluar el proceso de iniciación motora fina, coordinación y equilibrio postural mientras atraviesa la viga de madera. Donde su efecto va a estar determinado por el grado de daño en la función vestibulo-motora, donde se observa la reducción de la capacidad motora por efecto de la disminución en el nivel de dopamina estriatal (Bardullas et al., 2011; 2013). Otro de los efectos visibles en estas lesiones es la ansiedad, como resultado de la implicación de otras regiones subcorticales en la lesión y los niveles de dopamina (Sweis et al., 2016) que modifican la conducta del roedor (Gómez-Chavarín et al., 2014). La evaluación de la barra de equilibrio mostró que la administración de ATR no ocasionó una discapacidad motora, ya que la latencia de llegada en la plataforma de escape, el número de errores, tiempo de congelamiento y el número de pasos no presentó diferencias significativas entre los grupos tratados con el herbicida atrazina y el grupo control (Sweis et al., 2016). Aunque, por otro lado, se ha comprobado que la ATR altera la neuroquímica dopaminérgica en la vía nigroestriatal (Coban & Filipov 2007; Bardullas et al., 2011; 2013; Rodríguez et al 2013), por lo que la concentración de 10 mg ATR/kg no fue una dosis que altere el proceso de equilibrio en rata pero si en su rendimiento motor, esto como una consecuencia de la dificultad en la ejecución de la tarea motora (Ramos-Moreno et al., 2012), o al desafío en su ejecución lo que llevo a un bajo rendimiento (Quinn et al., 2007). Lo anterior nos sugiere que la integridad de la vía nigroestriatal es indispensable para el control motor fino, por lo que, si se presentara un daño significativo como el que es producido por la toxina MPTP, alteraría el proceso de equilibrio, tal y como lo informado por Quinn y colaboradores, donde a una dosis de 30 mg/kg

de la toxina MPTP en ratones C57BL/6 observaron un mayor número de errores al atravesar la viga como el grado de afectación en el proceso de coordinación en las extremidades traseras e inestabilidad postural, acompañado de la disminución en los niveles de dopamina en estriado como reflejo del grado de daño en la vía nigroestriatal (Quinn et al., 2007). O por Jiménez-Martin y colaboradores, que tras la lesión neurotóxica (0.5 μ L NMDA) en el núcleo pedunculopontino observaron variación en el proceso de equilibrio y en su rendimiento motor fino, al aumentar su tiempo de llegada y un mayor número de errores al cruzar la barra (Jiménez-Martin et al., 2015). Por lo que el grado de la lesión cerebral, determina los efectos cognitivos como la ansiedad y la función motora (Sweis et al., 2016)

15.4 Coordinación motora

Para descartar la alteración en la función neuromuscular y la fuerza muscular (Alder & Zbinden 1983) como reflejo de variaciones en la función en la vía dopaminérgica, se realizó la prueba de coordinación motora (rotarod). La coordinación motora es un proceso complejo que necesita de la intervención de diferentes regiones cerebrales como los ganglios basales, cerebelo, corteza motora y tálamo para su ejecución. Esta metodología se fundamenta en la capacidad de los roedores en permanecer sobre un rodillo cuando este está girando, teniendo el fin de medir el déficit motor (Monville et al., 2006), así como acciones descoordinadas e ineficientes como consecuencia de la muerte neuronal en regiones cerebrales que intervienen en el proceso de balance (Bennet & Amrick 1987; Bardullas et al., 2011; 2013).

El análisis de la prueba de rotarod, no mostró variaciones en su proceso de coordinación motora por la administración de ATR (1 y 10 mg ATR/kg) con respecto al grupo control, ya que los roedores no generaron un proceso de aprendizaje en la realización de la prueba, sino que la prueba les generó una conducta ansiolítica evitando su realización. Esto puede ser explicado por el proceso de maduración de la vía dopaminérgica, ya que la exposición a edad temprana a tóxicos que alteren la vía dopaminérgica puede alterar el comportamiento y la función cognitiva de adulto (Ogata et al., 2019). Lo que induciría a desarrollar conductas alternativas (bajar del rodillo) (Gómez-Chavarín et al., 2014) como resultado de la modificación en la conectividad corticoestriatal al disminuir los niveles de dopamina (Bardullas et al., 2011). Parecido a lo observado en ratones C57BL/6 cuando fueron sometidos al protocolo de caja de aversión (caja luz-oscuridad), que, tras no generar el aprendizaje para evitar la zona de castigo, no disminuyó el tiempo en la transición

entre regiones (luz-oscuridad), sino en el tiempo de permanencia en la región con luz como un reflejo de la generación de conductas alternativas ante situaciones estresantes (Hascoët & Bourin 1998). Por lo que, el estrés puede alterar el rendimiento en el rotarod no dependiente de la disfunción motora, si no a un estado ansiogénico del comportamiento. Semejante a lo observado por Mizoguchi y colaboradores, en su estudio del 2002 en ratas Wistar cuando fueron expuestas a un estímulo estresante (inmersión en agua), en el cual observó un bajo rendimiento en el rotarod al final del procedimiento de estrés (semana 4) (Mizoguchi et al., 2002). A diferencia de lo publicado por Bardullas y colaboradores, que tras la administración de 10 mg ATR/kg se observó una disminución en la estadía sobre el rodillo a los 10 meses de haber iniciado el tratamiento con el herbicida, lo cual se le atribuyó a un estado de madurez o de integridad de la vía nigroestriatal, así como al cambio en la conectividad corticoestriatal como efecto de los cambios en los niveles de dopamina (Bardullas et al., 2011; Ayton et al., 2013). Con lo que concluimos que la exposición crónica a ATR (1 ó 10 mg ATR/kg) en ratas de la cepa Sprague-Dawley no indujo un efecto en la latencia de permanencia sobre el rodillo, si no que generó una conducta estresante en los roedores al realizar la prueba de rotarod, como resultado de la alteración en la homeóstasis dopaminérgica (Bardullas et al., 2011).

15.5 Laberinto elevado en cruz

Al evaluar la conducta en los roedores por medio de la actividad locomotora, el proceso de equilibrio y la coordinación motora, los resultados nos muestran que los roedores tratados con ATR (1 ó 10 mg ATR/kg) en comparación con el control, exhibieron un aumento en el proceso de exploración en el margen en la caja de registro, así como indecisión al atravesar la viga de madera y evitar realizar la tarea de coordinación motora. Por lo que decidimos evaluar el grado de ansiedad en los roedores por medio del protocolo del laberinto elevado en cruz y poder descartar el efecto emotivo en la ejecución motora (Alder & Zbinden 1983). La prueba de laberinto elevado en cruz mide la respuesta no condicionante (no aprendida) a un estímulo novedoso, ya que este puede provocar un aumento en la actividad exploratoria como resultado del conflicto de permanecer en un espacio abierto y/o cerrado. Este comportamiento se observó en el estudio de Montgomery, en el cual, los roedores presentaron una conducta de miedo inducido por una situación nueva. Mostrando inhibición de la conducta exploratoria, siendo proporcional a la fuerza del miedo,

disminuyendo el comportamiento exploratorio que puede explicarse en términos de la teoría del conflicto (Montgomery 1955).

La evaluación de la conducta en el protocolo de laberinto se analizó en términos del número de entradas y el tiempo de permanencia entre brazos (Rodgers et al., 1997). Ya que la entrada inicial a alguno de los brazos en el laberinto aludiría el estado inicial de motivación y/o aversión del roedor al entrar a algún brazo, lo que nos mostraría la evolución del comportamiento exploratorio y el nivel de ansiedad en los roedores al realizar la prueba. Los resultados del laberinto elevado en cruz nos indicaron que el grupo de 10 mg ATR/kg produjo un aumento de la actividad exploratoria del roedor en comparación con el grupo control, aumentando el tiempo de latencia (Hogg 1996) y número de visitas en los brazos abiertos (Walters et al., 2015) generando un comportamiento ansiolítico. Este mismo efecto ansiolítico se observó en el estudio publicado por Tejada y colaboradores, que tras la administración de agentes ansiolíticos (midazolam 1 mg/kg ó clordiazepóxido 5 mg/kg) en ratas, estas mostraron una mayor actividad exploratoria en los brazos abiertos (Tejada et al., 2009). Por lo que el daño en la vía dopaminérgica pudo generar un comportamiento hiperactivo, como lo observable en la prueba locomotora espontánea (Bardulla et al., 2011), induciendo un mayor proceso de exploración en el laberinto elevado encruz, como lo observado por Ogata y colaboradores que tras el administrar 6-OHDA (50 µg/µL) intraventricularmente en ratas macho de la cepa Wistar, observaron un aumento de la actividad exploratoria en los brazos abiertos (Ogata et al., 2019). Con lo que concluimos que la administración crónica de ATR (10 mg ATR/kg) en ratas de la cepa Sprague-Dawley, produjo cambios en la conducta exploratoria de los roedores al aumentar el tiempo y el número de entradas en los brazos abiertos. Estos efectos se pudieron deberse a la vulnerabilidad y el grado de maduración de la vía nigroestriatal, como lo menciona Gómez-Chavarín y colaboradores, en su ensayo donde menciona que con el transcurrir del tiempo se afecta la actividad de TH+ en SNpc, el nivel de expresión de D₁ y D₂, así como el grado de maduración de la vía nigroestriatal que se inician en etapas tempranas del desarrollo y que se modulan en la etapa adulta (Gómez-Chavarín et al., 2014). Aunado a esto, si se les expone a ATR (1 ó 100 µgATR/kg), este genera cambios en la actividad de la amígdala y el hipocampo (Giusi et al., 2006) reorganizando las redes neuronales modificando la conducta exploratoria de los roedores al generar un efecto ansiolítico (Gómez-Chavarín et al., 2014; Walters et al., 2015; Kállai et al., 2017).

15.6 Dienes conjugados

El proceso de neurodegeneración progresiva se puede observar en enfermedades como el Parkinson y Alzheimer, acompañada de una conducta motora deteriorada (Dawson et al., 2010), así como estrés oxidativo (Rustin & Rötig 2002). Durante el transcurso de la patología las ERO y ERN se generan a tasas superiores a las basales, formando dienos conjugados y un radical H_2O_2 como producto inicial de la lipoperoxidación. Los LOO^{\bullet} generados pueden alterar la síntesis de proteínas que contiene grupos Fe-S (Benchoua et al., 2006) y la actividad enzimática (Halliwell & Gutteridge 1984) haciendo un ambiente oxidativo degenerando la membrana celular (Reis & Spickett 2012). Con el fin de evaluar si la administración de ATR (1 ó 10 mg ATR/kg) en los roedores inicio el proceso de lipoperoxidación, evaluamos los niveles formados de dienos conjugados. Es importante mencionar que los roedores tratados con ATR (1 ó 10 mg ATR/kg) y el grupo control, se mantuvieron en restricción alimenticia con el fin de aminorar el daño oxidativo, a partir de proporcionar un número menor de electrones en el proceso de transferencia por la mitocondria (Thornton 2002). El análisis de los niveles de dienos conjugados para los grupos tratados con ATR (1 ó 10 mg ATR/kg) y el grupo control, mostraron una disminución en la generación de dienos conjugados en el cerebelo (10 mg ATR/kg) y en el mesencéfalo (1 ó 10 mg ATR/kg), lo que nos demuestra lo susceptible que son estas regiones al daño oxidativo. Actualmente no hay estudios de exposición crónica a ATR (1 ó 10 mg ATR/kg) y su acción en la generación de estrés oxidante, lo que nos limita el discutir estos resultados. Pero en estudios cuando se expone a corto tiempo a este herbicida en concentraciones bajas del herbicida (0.4 mg ATR/L), se observó la generación de estrés oxidativo que indujo el aumento de la actividad de GST y GR, sin observar un incremento en los niveles de TBARs en camarones *Palaemonetes argentinus*, como consecuencia del proceso de desintoxicación y no por efecto del daño oxidativo (Griboff et al., 2014). Por otro lado, la ausencia en la formación de dienos conjugados en corteza prefrontal, núcleo accumbens, estriado, hipocampo y amígdala se puede explicar por el propio metabolismo de ATR, ya que la ATR se metaboliza en las primeras 24 horas post-ingesta (Stoker & Cooper 2007), por lo que la cantidad del herbicida que llega al cerebro es menor y puede ser metabolizado por la citocromo P450 (isoforma CYP2E1) (Gherzi-Egea et al., 1993) y GSH, evitando el daño en las membranas celulares (Gotardo et al., 2006). Con lo que concluimos que tras la administración de 1 ó 10 mg ATR/kg de forma crónica, no fue una dosis que degenerara la membrana celular, por lo que el posible estrés oxidativo generado es regulado por la actividad enzimática y no enzimática antioxidante cerebral

(Ddidigwu et al., 2010; Campos-Pereira et al., 2012; Griboff et al., 2014; Xia et al., 2017) evitando la degeneración de la membrana. A diferencia de lo observado en la literatura, donde a mayor concentración de ATR se produce de forma desregulada el radical OH durante el proceso de desintoxicación (Arnold et al., 1995), aumentando la producción de ERO degenerando la membrana celular (Dutheil et al., 2008) en hígado (Ddidigwu et al., 2010; Campos-Pereira et al., 2012; Blahova et al., 2013), riñón (Li et al., 2014), corazón (Abarikwu 2014) y cerebro (Rodríguez et al 2013; Zhang et al.,2016).

Por otro lado, no debemos de excluir el efecto protector de los componentes de la dieta adicionada con atrazina, ya que está, contiene antioxidantes que retardaría la respuesta al daño oxidativo por la exposición a ATR (Griboff et al., 2014). Esto permitiría regular el metabolismo celular y neutralizar el exceso de radicales libres como lo menciona Abarikwu en 2014, que tras la administración de 120 mg ATR/kg y la adición de 5 ó 10 mg/kg de quercetina en ratas Wistar disminuyó el daño oxidativo en hígado, riñón, corazón y cerebro al disminuir la tasa de TBARs y la actividad de SOD (Abarikwu 2014).

15.7 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

La lipoperoxidación es uno de los efectos más notorios en la neurodegeneración por la sobreexposición a ERO, también se puede mencionar la pérdida de la permeabilidad en la membrana al disminuir la concentración de colesterol, aumento de la fosforilación de proteínas en los residuos de tirosina, y la salida de citocromo c de la mitocondria que desencadena la vía intrínseca de la apoptosis celular (Aitken & Baker 2013). La lipoperoxidación es el resultado de la degeneración de la membrana celular, que en modelos neurodegenerativos se caracteriza por altos niveles de TBARs como un indicador del daño en las membranas celulares, promoviendo la activación de vías proapoptóticas (Michel et al. 2016). Los resultados analizados nos mostraron que tras la administración de ATR (1 ó 10 mg ATR/kg), la dosis administrada no degeneró las membranas celulares al no presentarse diferencias significativas en la tasa de formación de TBARs en los grupos tratados con ATR (1 ó 10 mg ATR/kg). Lo que concuerda con lo publicado por Griboff y colaboradores, que tras la exposición a dosis bajas de ATR (0.4 mg ATR/L), la ATR indujo un aumento de la actividad de GST y GR en camarones *Palaemonetes argentinus* como consecuencia del proceso de desintoxicación, sin variaciones en la tasa de formación de TBARs (Griboff et al., 2014). A diferencia de lo observado en células de neuroblastoma humano (SH-

SY5Y) que al aumentar la concentración de ATR (50 µg ATR/mL), se redujeron la viabilidad celular por la sobreexpresión de marcadores de apoptosis celular Bax y p21, y su consiguiente aumento de los niveles de ERO (Abarikwu & Farombi 2015).

Otro aspecto que no podemos descartar y que nos permite explicar la nula tasa de formación de TBARs, es el metabolismo. Ya que estudios *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que la ATR se metaboliza principalmente por medio de la citocromo p450, GHS y GR (Ross et al., 2009), aunque también se puede degradar por medio de la reacción de Fenton (Arnold et al., 1995) retardando la formación de aldehídos activos. Aunado a esto, las células presentan un sistema antioxidante que regula la formación de radicales libres, estos son el GSH y la vitamina E, así como proteínas con función antioxidante (Martínez-Sámano et al., 2011) evitando que se desarrolle el estrés oxidativo y variaciones del pH, minimizando la probabilidad de generar daño en los lípidos de membrana (Reis & Spickett 2012). Esto se puede observar en diferentes modelos animales como peces *Channa Punctatus* (Ddidigwu et al., 2010), codornices (*Coturnix Coturnix*) (Zhang et al., 2016), ratas de la cepa Wistar (Li et al., 2014; Campos-Pereira et al., 2012, donde la ATR indujo estrés oxidativo, al aumentar los niveles cuantificables de TBARs en hígado, cerebro, hígado-riñón y en cerebro respectivamente. Así como aumentar la actividad de enzimas con actividad antioxidante como lo son SOD, CAT, GPx-1 y tiorredoxina-1 (Trx-1) (Ddidigwu et al., 2010; Campos-Pereira et al., 2012; Blahova et al., 2013; Li et al., 2014; Abarikwu 2014; Zhang et al., 2016; Rodríguez et al., 2013 respectivamente) al aumentar la dosis de ATR, volviendo susceptibles a las proteínas al ataque proteolítico alterando la transducción en la expresión genética (Valko et al., 2006).

Con lo que concluimos que al suministrar ATR (1 ó 10 mg ATR/kg) por un año, no se modifica la tasa de formación de TBARs en los blancos dopaminérgicos, por lo que la dosis administrada no es una dosis que degenere la membrana celular. Por lo que, tras su incorporación al organismo su efecto es regulado por la actividad enzimática (Griboff et al., 2014; Dutheil et al., 2008; Ddidigwu et al., 2010; Campos-Pereira et al., 2012; Blahova et al., 2013; Li et al., 2014; Abarikwu 2014; Zhang et al., 2016; Rodríguez et al., 2013) y no enzimática antioxidante (Gotardo et al., 2006) evitando la degeneración de la membrana.

16. Conclusión

El deterioro motor como el cognitivo parecer ser dependiente del estado cronológico de los roedores, así como de la susceptibilidad de la vía nigroestriatal a la exposición a atrazina al alterar la neuroquímica dopaminérgica. Con lo que concluimos que tras la administración crónica de atrazina (1 ó 10 mg ATR/kg de peso), está alteró la conducta motora, así como modificar su conducta de exploración. Por otro lado, la administración de 1 ó 10 mg ATR/kg no fue una dosis que degenere la membrana celular, al observarse una disminución en la formación de dienos conjugados en cerebelo y mesencéfalo y la nula tasa de formación de TBARs como resultado del posible aumento de la actividad antioxidante enzimática (GR y GST).

17. Bibliografia

- Abarikwu S. O. Pant A. B. Farombi E. O. (2012). Effects of quercetin on mRNA expression of steroidogenesis genes in primary cultures of Leydig cells treated with atrazine. *Toxicology in vitro*, volume 27, Issue 2, (2013), page 700 - 707.
- Abarikwu S. O. (2014). Protective effect of quercetin on atrazine-induced oxidative stress in the liver, kidney, brain, and heart of adult Wistar rats. *Toxicology International*, volume 21, Issue 2, (2014), page 148 - 155.
- Abarikwu S. O & Farombi E. O. (2015). Atrazine induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3-dependent pathway. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, volume 118, page 90 - 98.
- Adesiyun A. C. Oyejola T. O. Abarikwu S. O. Oyeyemi M. O. Farombi E. O. (2011). Selenium provides protection to the liver but not the reproductive organs in an atrazine-model of experimental toxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*, volume 63, Issue 3, (2011), page 201-207.
- Ahmad F. Nidadavolu P. Durgadoss L. Ravindranath V. (2014). Critical cysteines in Akt1 regulate its activity and proteasomal degradation: implications for neurodegenerative diseases. *Free radical Biology and Medicine*, volume 74, page 118 - 128.
- Ahmed S.S. Santosh W. Kumar S. Christlet H. T. (2009). Metabolic profiling of Parkinson's disease: evidence of biomarker from gene expression analysis and rapid neural network detection. *Journal Biomed Science*. volume 13, page 16 - 63.
- Aitken R. J. & Baker M. A. (2013). Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *International Journal of Developmental Biology*, volume 57, Issue 2, page 265 - 272.
- Aitken R. J. Baker M. A. Nixon B. (2015). ¿Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian Journal Andrology*, volume 17, Issue 4, page 633 - 639.
- Alder S. Zbinden G. (1983). Neurobehavioral tests in single and repeated-dose toxicity studies in small rodents. *Archives of Toxicology*, volume 54, Issue 1, page 1 - 23.
- Alkayed N. J. Goyagi T. Joh H-D. Klaus J. Harder D. R. Traystman R. J. Hurn P. D. (2002). Neuroprotection and P450 2C11 Up regulation after experimental transient ischemic attack. *Stroke*, 2002, volume 33, Issue 6, page 1677 - 1684.
- Amador-Alvarado L. Montiel T. Massieu L. (2014). Differential production of reactive oxygen species in distinct brain regions of hypoglycemic mice. *Metabolic Brain Disease*, volume 29, Issue 3, page 711.
- Amici A. Levine R. L. Tsai L. Stadtman E. R. (1989). Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *The Journal Biology Chemistry* (1989), volume 264, Issue 25, page 3341.
- Andres-Mateos E. Perier C. Zhang L. Blanchard-Fillion B. Greco T. M. Thomas B. Ko H. S. Sasaki M. Ischiropoulos H. Przedborski S. (2007). DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volume 104, Issue 37, page 14807-14812.
- Anthony-muthu T. S. Kenny E. M. Bayir H. (2016). Therapies targeting lipid peroxidation in traumatic brain injury. *Brain Research*. 2016, volume 1, 1640, page 57 - 76.
- Anzalone A. (2008). *Herbicidas: Modos y mecanismos de acción en plantas*. Edition 2016. ISBN 978-980-230-100-5, page.
- Arpa J. Campos Y. Gutierrez - Molina M. Martinez C. Arenas J. Caminero A. Palomo F. Barreiro P. (1994). Benign mitochondrial myopathy with decreased succinate cytochrome C reductase activity. *Acta Neurologica Scandinavica*, volume 90, pages 281-284.
- Arnold S. M. Hickey W. J. Harris R. F. (1995). Degradation of atrazine by Fenton's reagent: Condition optimization and product quantification. *Environmental Science & Technology*, volume 29 (8), page 2083-2089.
- Asakawa T. Fangc H. Sugiyama K. Nozakia T. Hongd Z. Yange Y. Huae F. Dingf G. Chaog D. Fenoyg A. J. Villarreal S. J. Onoeh H. Suzukib K. Nambaa H. Xiag Y. (2016). Animal behavioral assessments in current research of Parkinson's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, volume 65, page 63-94.
- Ashby J. Tinwell H. Stevens J. Pastoor T. Breckenridge C. B. (2002). The Effects of atrazine on the sexual maturation of female rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, volume 35, Issue 3, 2002, page 468 - 473.
- Ayton S. George J. L. Adlard P. A. Bush A. L. Cherny R. A. Finkelstein D. I. (2013). The effect of dopamine on MPTP-induced rotarod disability. *Neuroscience letters*, volume 543, 2013, pages 105-109.
- Bae Y. K. Kani S. Shimizu T. Tanabe K. Nojima H. Kimura Y. Higashijima S. Hibi M. (2009). Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development. *Developmental Biology*, volume 330, Issue 2, page 406 - 426.
- Banerjee R. Starkov A. A. Beal M. F. Thomas B. (2009). Mitochondrial dysfunction in the limelight of Parkinson's disease pathogenesis. *Biochemical et Biophysical acta*, volume 1792, Issue 7, page 651-663.
- Bardullas U. Giordano M. Rodríguez V. M. (2011). Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicology and Teratology*, volume 33, Issue 2, page 263 - 272.

- Bardullas U. Giordano M. Rodríguez V.M. (2013). Atrazine is primarily responsible for the toxicity of long-term exposure to a combination of atrazine and inorganic arsenic in the nigrostriatal system of the albino rat. *Neurotoxicology and Teratology*, volume 40, 2013, page 59 - 66.
- Barja G. (2000). The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Clinical and experiment research*, volume 12, Issue 5, page 342 – 355.
- Barja G. (2004). Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biological Review*, volume 79, page 235–251.
- Barr D. B. Panuwet P. Nguyen J. V. Udunka S. Needham L. L. (2007). Assessing exposure to atrazine and its metabolites using biomonitoring. *Environmental Health Perspectives*, volume 115, Issue 10, page 1474 - 1478.
- Bassil K. L. Vakil C. Sanborn M. Cole D. C. Kaur J. S. Kerr K. J. (2007). Cancer health effects of pesticides. Systematic review. *Canadian Family Physician*, volume 53, Issue 10, page 1704 - 1711.
- Beaulieu J. M. Gainetdinov R.R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Pharmacology*, volume 63 (1), page 182 - 217.
- Behki R. Topp E. Dick W. Germon P. (1993). Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 59 (6), page 1955 - 1959.
- Bélanger M. Allaman I. Magistretti P. J. (2011). Brain energy metabolism: Focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*, volume 14, Issue 6, page 724-738
- Bell C. C. (2002). Evolution of cerebellum-like structures. *Brain Behavior Evolution*, volume 59, page 312–326.
- Beltowski J. Jamroz-Wiśniewska A. Wójcicka G. Łowicka E. Wojtak A. (2008). Renal antioxidant enzymes and glutathione redox status in leptin-induced hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*, volume 319, Issue 1-2, page 163 – 174.
- Benchoua A. Trioulier Y. Zala D. Gaillard M. C. Lefort N. Dufour N. Saudou F. Elalouf J-M. Hirsch E. Hantraye P. Déglony N. Brouillet E. (2006). Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Molecular Biology of the Cell*, volume 17, page 1652-1663.
- Bennet D. A. & Amrick C. L. (1987). Home cage pretreatment with diazepam: Effects on subsequent conflict testing and rotorod assessment. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, volumen 242, Issue 2, page 595-599.
- Benninger D. H. Thees S. Kollias S. S. Bassetti C. L. Waldvogel D. (2009). Morphological differences in Parkinson's disease with and without rest tremor. *Journal Neurology*, 2009, volume 256 (2), page 256 - 263.
- Benzi G. & Moretti A. (1995). Age - and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radical Biology and Medicine*, volume 19, Issue 1, page 77–101.
- Berman S. B. Hasting T. G. (1999). Dopamine oxidation alerts mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria. *Journal of neurochemistry*, volume 73, issue 3, page 1127 - 1137.
- Betarbet R. Sherer T. B. MacKenzie G. Garcia-Osuna M. Panov A. Greenamyre J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience*, volume 3 (12), page 1301-1306.
- Bevan M. D. Magill P. J. Terman D. Bolam J. P. Wilson C. J. (2002). Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus–external globus pallidus network. *Trends in Neurosciences*, volume 25, Issue 10, page 525–531.
- Beyer R. E. (1990). The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, volume 8, Issue 6, page 545 - 565.
- Bjørklund G. Chirumbolo S. (2017). Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. *Nutrition*, volume 33, page 311-321.
- Bindokas V. P. Jordán J. Lee C. C. Miller R. J. (1996). Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *Journal Neuroscience*, volume 16 (4), page 1324 - 1336.
- Bissonette G. B. Roesch M. R. (2017). Development and function of the midbrain dopamine system: What we know and what we need to. *Genes, brain and behavior*, volume 15 (1), page 62 - 73.
- Birnie M. Morrison R. Camara R. Strauss K. I. (2013). Temporal changes of cytochrome P450 (Cyp) and eicosanoid-related gene expression in the rat brain after traumatic brain injury. *BMC Genomics*, volume 14, page 303.
- Björklund A. & Dunnett S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update, In *Trends in Neurosciences*, volume 30, Issue 5, page 194 - 202.
- Blahová J. Plhalová L. Hostovský M. Divišová L. Dobšíková R. Mikulíková I. Štěpánová S. Svobodová Z. (2013). Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine, *Food and Chemical Toxicology*, volume 61, pages 82 - 85.
- Blandini F. Braunevel K. H. Manahan-Vaughan D. Orzi F. Sarti P. (2004). Neurodegeneration and energy metabolism: from chemistry to clinics. *Cell Death & Differentiation*, volume 11, page 479–484.
- Blesa J. & Przedborski S. (2014). Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy*, volume 8, page 1 - 12.

- Bostan A. C. Dum R. P. Strick P. L. (2010). The basal ganglia communicate with the cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volume 107 (18), page 8452 - 8456.
- Bostan A. C. Dum R. P. Strick P. L. (2013). Cerebellar networks with the cerebral cortex and basal ganglia. *Trends in Cognitive Sciences*, volume 17 (5), page 241 - 254.
- Bowman A. & Birch-Machin M. A. (2016). Age-dependent decrease of mitochondrial complex II activity in human skin fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, volume 136, Issue 5, page 912-919.
- Braak H. Del Tredici K. Rüb U. A.I de Vos R. Jansen Steur E. N. H. Braak E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease, *Neurobiology of Aging*, volume 24, issue 2, pages 197-211.
- Brady S. T. Siegel G. J. Wayne Albers R. Price D. L. (2012). *Basic Neurochemistry. Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*, Eighth Edition, page 121.
- Broadbent N. J. Gaskin S. Squire L. R. Clark R. E. (2010). Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.), volume 17 (1), page 5 - 11.
- Butterfield D. A. (2002). Amyloid beta-peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. *Antioxidants & redox signaling*, volume 19 (8), page 1307 - 1313.
- Campos-Pereira F.D. Oliveira C.A. Pigoso A. A. Silva-Zacarin E.C.M. Barbieri R. Spatti E.F. Marin-Morales M.A. Severi-Aguilar G.D.C. (2012). Early cytotoxic and genotoxic effects of atrazine on Wistar rat liver: A morphological, immunohistochemical, biochemical, and molecular study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, volume 78, page 170 - 177.
- Cappellano G. Carecchio M. Fleetwood T. Magistrelli L. Cantello R. Dianzani U. Comi C. (2013). Immunity and inflammation in neurodegenerative diseases. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, volume 2 (2), page 89 - 107.
- Carocho M. Ferreira I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chemical Toxicology*, volume 51, page 15 - 25.
- Carpenter D. O. Arcaro K. F. Bush B. Niemi W. D. Pang S. Vakharia D. D. (1998). Human health and chemical mixtures: an overview. *Environmental Health Perspectives*, volume 106 (6), page 1263–1270.
- Castano P. Ferrario F. Vizzotto L. (1982). Sciatic nerve fibers in albino rats after atrazine treatment: A morpho-quantitative study. *International journal of tissue reactions*, volume 4 (4), page 269 - 275.
- Castle M. Aymerich M. S. Sánchez-Escobar C. Gonzalo N. Obeso J. A. Lanciego J. L. (2005). Thalamic innervation of the direct and indirect basal ganglia pathways in the rat: Ipsi- and contralateral projections. *The Journal of Comparative Neurology*, volume 483, page 143 - 153.
- Catalá A. (2012). Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “Fluid mosaic model” to the “Lipid whisker model”, *Biochemical*, volume 94, Issue 1, page 101 - 109.
- Catenacci G. Barbieri F. Bersani M. Fereoli A. Cottica D. Maroni M. (1993). Biological monitoring of human exposure to atrazine. *Toxicology Letters*, volume 69, Issue 2, page 217 - 222.
- Chabrat A. Brisson G. Doucet-Beaupré H. Salesse C. Schaan M. Dovonou A. Akitegetse C. Charest J. Lemstra S. Côté D. Pasterkamp R. J. Abrudan M. I. Metzakopian E. Ang S. L. Lévesque M. (2017). Transcriptional repression of *Plxn1* by *Lmx1a* and *Lmx1b* directs topographic dopaminergic circuit formation. *Nature communications*, volumen 8 (1), page 933.
- Chance B. Sies H. Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, volume 59, page 527 - 605.
- Cheney M. A. Fiorillo R. Criddle R. S. (1997). Herbicide and estrogen effects on the metabolic activity of *Elliptio complanata* measured by calorimetry. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, volume 118, Issue 2, page 159 - 164.
- Chen J. Rogers S. C. Kavdia M. (2013). Analysis of kinetics of dihydroethidium fluorescence with superoxide using xanthine oxidase and hypoxanthine assay. *Annals of Biomedical Engineering*, volume 41 (2), page 327 - 337.
- Chevrier C. Limon G. Monfort C. Rouget F. Garlandezec R. Petit C. Durant G. Cordier S. (2011). Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE birth cohort. *Environmental Health Perspectives*, volume 119 (7), page 1034-1041.
- Chinta S. J. Pai H. V. Upadhyya S. C. Boyd M. R. Ravindranath V. (2002). Constitutive expression and localization of the major drug metabolizing enzyme, cytochrome P4502D in human brain. In *Molecular Brain Research*, volume 103, Issues 1–2, page 49-61.
- Coban A. I. & Filipov N. (2007). Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. *Journal of neurochemistry*, volume 100, Issue 5, page 1177-87.
- Contini M. C. Millen N. Mahieu S. (2012). Antropometría, metabolismo y estado oxidativo en ratas hembras con obesidad inducida por glutamato monosódico oral. *FABICIB*. volume 16, page 48 – 60.

- Cook E. H. Stein M. A. Krasowski M. D. Cox N. J. Olkon D. M. Kieffer J. E. Leventhal B. L. (1995). Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *American Journal of Human Genetics*, volume 56 (4), page 993-998.
- Cooper R. L. Stoker T. E. Goldman J. M. Parrish M. B. Tyrey L. (1996). Effect of atrazine on ovarian function in the rat. *Reproductive Toxicology*, volume 10, Issue 4, page 257-264.
- Cooper J. R. Bloom F.E. Roth R. H. (2003). *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, Oxford University Press: New York NY, USA, 2003.
- Cooper R. Stoker T. Tyrey L. Goldman J. McElroy W. (2000). Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicology Science*, volume 53 (2), page 297-307.
- Crittenden J. R. Lacey C. J. Lee T. Bowden H. A. Graybiel A. M. (2014). Severe drug-induced repetitive behaviors and striatal overexpression of VAcHT in ChAT-ChR2-EYFP BAC transgenic mice. *Frontiers in neural circuits*, volume 8, page 57.
- Cruz A. V. Mallet N. Magill P. J. Brown P. Averbeck B. B. (2011). Effects of dopamine depletion on information flow between the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Journal of neurophysiology*, volumen 106 (4), page 2012-2023.
- Curwin B. D. Hein M. J. Alavanja M. C. R. (2005). Urinary and hand wipe pesticide levels among farmers and nonfarmers in Iowa. *Journal of exposure Science & Environmental Epidemiology*, volume 15, page 500-508.
- Das P. C. McElroy W. K. Cooper R. L. (2000). Differential modulation of catecholamines by chlorotriazine herbicides in pheochromocytoma (PC12) cells *in vitro*. *Toxicology Science*, 2000, volume 56, page 324-331.
- Davies M. J. Forni L. G. Willson R. L. (1988). Vitamin E analogue Trolox C. E.s.r. and pulse-radiolysis studies of free-radical reactions. *The Biochemical journal*, volumen 255 (2), page 513 - 522.
- Dawson T. M. Ko H. S. Dawson V. L. (2010). Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron*, volume 66 (5), page 646 -661.
- Dawson T. M. & Dawson V. L. (2003). Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*, volume 302, page 819-822.
- Délye C. Dohoux A. Pernin F. Riggins C. W. Tranel P. J. (2000). The molecular basis of herbicide resistance. *Weed Science*, volume 36 (1), page 91 - 115.
- Depino A. M. Earl C. Kaczmarczyk E. Ferrari C. Besedovsky H. Del Rey A. Pitossi F. J. Oertel W. H. (2003). Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, volumen 18 (10), page 2731-2742.
- Dexter D. T. Jenner P. (2013). Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, volume 62, page 132-144.
- Díaz F. Garcia S. Padgett K. R. Moraes C. T. (2012). A defect in the mitochondrial complex III, but not complex IV, triggers early ROS-dependent damage in defined brain regions. *Human molecular genetics*, volume 21 (23), page 5066-5077.
- Díaz-Hung M. L. González F. M. E. Blanco L. L. (2015). Glutathione antioxidant system in the etiopathology of nigrostriatal dysfunction. *Journal Cuban Biomedicine*, volume 34 (2), page 168 -186.
- Dooley G. P. Prenni J. E. Prentiss P. L. Brian K. Cranmer B. K. Andersen M. E. Tessari J. D. (2006). Identification of a novel hemoglobin adduct in Sprague-Dawley rats exposed to atrazine. *Chemical Research in Toxicology*, volume 19 (5), page 692 - 700.
- Dooley G. P. Tjalkens R. B. Hanneman W. H. (2013). The atrazine metabolite diaminochlorotriazine suppresses LH release from murine L β T2 cells by suppressing GnRH-induced intracellular calcium transients. *Toxicology Research*, volume 2 (3), page 180 - 186.
- Doya K. (2000). Complementary roles of basal ganglia and cerebellum in learning and motor control. *Current Opinion in Neurobiology*, volume 10, Issue 6, 2000, pages 732-739.
- Dringen R. Gutterer J. M. Hirrlinger J. (2000). Glutathione metabolism in brain. *Progress in Neurobiology*, volume 62, Issue 6, page 649 - 671.
- Dringen R. Gutterer J. M. Hirrlinger J. (2000). Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European Journal Biochemistry*, volume 267, Issue 16, page 4912-4916.
- Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiology Reviews*, volume 82 (1), page 47-95.
- Dutheil F. Jacob A. Dauchy S. (2010). ABC transporters and cytochromes P450 in the human central nervous system: influence on brain pharmacokinetics and contribution to neurodegenerative disorders. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, volume 6 (10), page 1161 - 1174.

- Dutheil F. Beaune P. Lorient M-A. (2008). Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. In *Biochemical*, volume 90, Issue 3, page 426 - 436.
- Ekstrand M. I. Galter D. (2009). The MitoPark mouse – an animal model of Parkinson’s disease with impaired respiratory chain function in dopamine neurons. *Parkinsonism & Related Disorders*, volume 15, Supplement 3, page S185–S188.
- Elbaz A. Levecque C. Clavel J. Vidal J-S. Richard F. Amouyel P. Alperovitch A. Chartier-Harlin M-C. Tzourio C. (2004). *Annals of Neurology*, volume 55, Issue 3, page 430 - 434.
- Elbaz A. Clavel J. Rathouz P. J. Moisan F. Galanaud J. P. Delebotte B. Alperovitch A. Tzourio C. (2009). Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Annals of Neurology*, volume 66, Issue 4, page 494–504.
- Eldridge J. L. Wetzel L. T. Tyrey L. (1999). Estrous cycle patterns of Sprague-Dawley rats during acute and chronic atrazine administration. *Reproductive Toxicology*, volume 13, Issue 6, page 491-499.
- Esterbauer H. Schaur TR. Zollner J. H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology Medicine*, volume 11, page 81-128.
- Fahn S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, volume 991, Issue 1, page 1-14.
- Fan M. A. & Alexeeff G.V. (1999). Public health goal for atrazine in drinking water. Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency, page 2.
- Ferguson C. S. Tyndale R. F. (2011). Cytochromes P450 in the brain: Emerging evidence for biological significance. *Trends in Pharmacological Sciences*, volume 32 (12), page 708-714.
- Ferguson C. S. Miksys S. Palmour R. M. Tyndale R. F. (2013). Ethanol self-administration and nicotine treatment induce brain levels of CYP2B6 and CYP2E1 in African green monkeys. In *Neuropharmacology*, volume 72, page 74-81.
- Fernandes C. & File S, E. (1996). The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, volume 54, Issue 1, page 31-40.
- Ferrer I. (2011). Neuropathology and neurochemistry of nonmotor symptoms in Parkinson’s disease. *Parkinson’s Disease*, volume 2011, page 1 – 13.
- Ferreira C. A. Souza F. I. Melges A. P. Fonseca F. A. Solé D. Sarni R. O. (2014). Retinol, beta-carotene, oxidative stress, and metabolic syndrome components in obese asthmatic children. *Pediatric Allergy and Immunology*, volume 25, Issue 3, page 292-294.
- Filipov N. M. Stewart M. A. Carr R. L. Sistrunk S. C. (2007). Dopaminergic toxicity of the herbicide atrazine in rat striatal slices. *Toxicology*, volume 232 (1-2), page 68-78.
- Filomeni G. De Zio D. Cecconi F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*, volume 22 (3), page 377–388.
- Flores-Hernandez J. Hernandez S. Snyder G. L. Yan Z. Fienberg A. A. Moss S. J. Greengard P. James Surmeier J. (2000). D (1) dopamine receptor activation reduces GABA(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *Journal Neurophysiology*, volume 83 (5), page 2996-3004.
- Floyd R. A. (1991). Oxidative damage to behavior during aging. *Science*, volume 254, Issue 5038, page 1597-1597.
- Flynn J. M. & Melov S. (2013). SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, volume 62, page 4-12.
- Fraites M. J. P. Cooper R. L. Buckalew A. Jayaraman S. Mills L. Laws S. C. (2009). Characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to atrazine and metabolites in the female rat. *Toxicological Sciences*, volume 112, Issue 1, pages 88–99.
- Freichel C. Neumann M. Ballard T. Müller V. Woolley M. Ozmen L. (2007). Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in alpha-synuclein transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, volume 28, Issue 9, page 1421–1435.
- Fujiyama F. Sohn J. Nakano T. Furuta T. Nakamura K. C. Matsuda W. Kaneko T. (2011). Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: a single neuron-tracing study using a viral vector. *European Journal of Neuroscience*, volume 33, Issue 4, page 668-677
- Gammon D. W. Aldous C. Carr Jr W. C. Sanborn J. R. Pfeifer K. F. (2005). A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects. *Pest Management Science*, volume 61, Issue 4, page 331-355.
- Gao S. Wang Z. Zhang C. Jia L. Zhang Y. (2016). Oral exposure to atrazine induces oxidative stress and calcium homeostasis disruption in spleen of mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, volume 2016, page 1 - 9.
- Gaschler M. M. Stockwell B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, volume 482 (3), page 419-425.
- Genova M. L. Ventura B. Giuliano G. Bovina C. Formiggini G. Parenti Castelli G. Lenaz G. (2001). The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron–sulfur cluster N2. *FEBS Letters*, volume 505, Issue 3, page 364–368.

- Gerfen C. R. & Surmeier D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, volume 34, page 441-66.
- Gerlach M. Ben-Shachar D. Riederer P. Youdim M. B. (1994). Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *Journal of Neurochemistry*, volume 63, Issue 3, page 793-807.
- Gherzi-Egea J. F. Perrin R. Leininger-Muller B. Grassiot M. C. Jeandel C. Floquet J. Cuny G. Siest G. Minn A. (1993). Subcellular localization of cytochrome P450, and activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain. *Biochemical Pharmacology*, volume 45, Issue 3, page 647 - 658.
- Ghosh C. Gonzalez-Martinez J. Hossain M. Cucullo L. Fazio V. Janigro D. Marchi N. (2010). Pattern of P450 expression at the human blood-brain barrier: Roles of epileptic condition and laminar flow. *Epilepsia*, volume 51 (8), page 1408-1417.
- Ghosh C. Hossain M. Solanki J. Dadas A. N. Marchi N. Janigro D. (2016). Pathophysiological implications of neurovascular P450 in brain disorders. *Drug Discovery Today*, volume 21, Issue 10, page 1609-1619.
- Gilham D. E. Cairns W. Paine M. J. Modi S. Poulson R. Roberts G. C. Wolf C. R. (1997). Metabolism of MPTP by cytochrome P4502D6 and the demonstration of 2D6 mRNA in human fetal and adult brain by in situ hybridization. *Xenobiotica*, volume 27, page 111-125.
- Giusi G. Facciolo R. M. Alleva E. Belloni V. Fulgheri F. F. Santucci D. (2006). The endocrine disruptor atrazine accounts for a dimorphic somatostatinergic neuronal expression pattern in mice. *Toxicological Sciences*, volume 89, Issue 1, page 257-264.
- Glowinski J. Iversen L. L. (1966). Regional studies of catecholamines in rat brain. I. disposition of [3h] Norepinephrine [3h] Dopamine and [3h] Dopa in various regions of brain. *Journal Neurochemistry*, volume 13, Issue 8, page 655.
- Gómez-Chavarín M. Santos-Echeverría R. García-García M. Torner-Aguilar C. Báez-Saldaña A. (2014). Development of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *File of Neuroscience*, volume 19 (2), page 95 - 103.
- Gotardo M. Moraes L. Assis M. D. (2006). Metalloporphyrins as biomimetic models for cytochrome P-450 in the oxidation of atrazine. *Journal of Agricultura and Food Chemistry*, volume 54, Issue 26, page 10011-10018.
- González-Torres M. Betancourt-Rule M. Ortiz-Muñiz R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, volume 25, Issue 1, page 3 - 9.
- Graham D. R. & Sidhu A. (2010). Mice expressing the A53 T mutant form of human alpha-synuclein exhibit hyperactivity and reduced anxiety-like behavior. *Journal of Neuroscience Research*, volume 88 (8), page 1777 - 1783.
- Griboff J. Morales D. Bertrand L. Bonansea R-I. Monferrán M-G. Asis R. Wunderlin D. A. Amé M. V. (2014). Oxidative stress response induced by atrazine in *Palaemonetes argentinus*: The protective effect of vitamin E. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, volume 108, page 1-8
- Grattan D. R. (2015). 60 años de neuroendocrinología: El eje hipotálamo-prolactina. *The Journal of Endocrinology*, volume 226 (2), page 101-122.
- Grintzalis K. Zisimopoulos D. Grune T. Weber D. Georgiou C. D. (2013). Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides. *Free Radical Biology and Medicine*, volume 59, page 27-35.
- Guillén-Sans R. & Guzmán-Chozas M. (1998). The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A review, critical reviews in food science and nutrition, volume 38, page 315-350.
- Haber S. N. Fudge J. L. McFarland N. R. (2000). Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *The Journal of Neuroscience*, volume 20 (6), page 2369 - 2382.
- Halliwell B. & Gutteridge J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, volume 219 (1), page 1-14.
- Halliwell B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neuroscience*, volume 59, Issue 5, page 1609-1623.
- Halliwell B. Gutteridge J. M. (1999). *Free radicals in biology and medicine*, third edition. Midsomer Norton, Avon, England: Oxford University Press, volume 1, page 30 - 55.
- Hamilton R. W. Trickler W. J. Robinson B. L. Paule M. G. Ali S. F. (2012). Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on retinal dopaminergic system in mice. *Neuroscience Letters*, volume 515, Issue 2, page 107-110.
- Hansen A. Treviño-Quintanilla L. Márquez-Pacheco H. Villada-Canela M. González-Márquez L. Guillén-Garcés R. Hernández A. (2013). Atrazina: un herbicida polémico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, volumen 29, page 65-84.
- Harrison J. F. Hollensworth S. B. Spitz D. R. Copeland W. C. Wilson G. L. LeDoux S. P. (2005). Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Research*, volume 33 (14), page 4660-4671.

- Hascoët M. Bourin M. (1998). A new approach to the light/dark test procedure in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, volume 60, Issue 3, page 645-653.
- Hashimoto T. Hussien R. Cho H. S. Kaufer D. Brooks G. A. (2008). Evidence for the mitochondrial lactate oxidation complex in rat neurons: demonstration of an essential component of brain lactate shuttles. *PLoS ONE*, volume 3, Issue 8, p e2915.
- Hayes T. Haston K. Tsui M. Hoang A. Haefele C. Vonk A. (2002). Feminization of male frogs in the wild. *Nature Publishing Group*, volume 419, page 895-896.
- Hess F. D. (2000). Light-dependent herbicides: An Overview. *Weed Science*, volume 48 (2), page 160 - 170.
- Hernández-Romero M. C. Delgado-Cortés M. J. Sarmiento M. de P. Espinosa-Oliva A. M. Arguelles S. Bandez M. J. Villaran R. F. Maurino R. Santiago M. Venero J. L. Herrera A. J. Cano J. Machado A. (2012). Peripheral inflammation increases the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system. *Neurotoxicology*, volume 33, Issue 3, page 347–360.
- Hibi M. & Shimizu T. (2012). Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Developmental neurobiology*, volume 72, Issue 3, page 282-301.
- Hikosaka O. Nakahara H. Rand M. K. Sakai K. Lu X. Nakamura K. Miyachi S. Doya K. (1999). Parallel neural networks for learning sequential procedures, *Trends in Neurosciences*, volume 22, Issue 10, page 464 - 471.
- Hollensworth S. B. Shen C. Sim J. E. Spitz D. R. Wilson G. L. LeDoux S. P. (2000). Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, volume 28, Issue 8, page 1161 – 1174.
- Höglinger G. Alvarez-Fischer D. Arias-Carrión O. Djufri M. Windolph A. Keber U. Borta A. Ries V. Schwarting R. K. W. Scheller D. Oertel W. H. (2015). A new dopaminergic nigro-olfactory projection. *Acta Neuropathology*, volume 130, Issue 3, page 333-348.
- Hogg S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, volume 54 (1), page 21-30.
- Hossain M. Filipov N. M. (2008). Alteration of dopamine uptake into rat striatal vesicles and synaptosomes caused by an in vitro exposure to atrazine and some of its metabolites. *Toxicology*, volume 248, Issue 1, page 52-58.
- Hritcu L. Ciobica A. (2013). Intranigral lipopolysaccharide administration induced behavioral deficits and oxidative stress damage in laboratory rats: relevance for Parkinson's disease. *Behavior Brain Research*, volume 253, page 25–31.
- Hsu W. Kerppola T. K. Chen P. L. Curran T. Chen-Kiang S. (1994). Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Molecular and Cellular Biology*, volume 14 (1), page 268–276.
- Hsu M. Srinivas B. Kumar J. Subramanian R. Andersen J. (2005). Glutathione depletion resulting in selective mitochondrial complex I inhibition in dopaminergic cells is via an NO-mediated pathway not involving peroxynitrite: implications for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, volume 92, Issue 5, page 1091-1103.
- Huang P. Yang J. Ning J. Wang M. Song Q. (2015). Atrazine triggers DNA damage response and induces DNA double-strand breaks in MCF-10A cells. *International Journal of Molecular Sciences*, volume 16 (7), page 14353-14368.
- Huang D. Xu J. Wang J. Tong J. Bai X. Li H. Wang Z. Huang Y. Wu Y. Yu M. Huang F. (2017). Dynamic changes in the nigrostriatal pathway in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Parkinsons Disease*, volume 2017, page 7.
- Hwang O. (2013). Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, volume 3 (4), page 461 – 491.
- Hyun D. H. Lee M. Hattori N. Kubo S. Mizuno Y. Halliwell B. Jenner P. (2002). Effect of wild-type or mutant Parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *Journal Biology and Chemical*, volume 277, page 28572–28577.
- Ingram D. K. Weindruch R. Spangler E. L. Freeman J. R. Walford R. L. (1987). Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. *Journal of Gerontology*, volume 42 (1), pages 78–81.
- Ishii T. Yasuda K. Akatsuka A. Hino O. Hartman P. S. Ishii N. (2005). A Mutation in the SDHC gene of complex II increases oxidative stress. Resulting in Apoptosis and Tumorigenesis. *Cancer Research*, volume 65 (1), page 203-209.
- Itier J. M. Ibanez P. Mena M. A. Abbas N. Cohen-Salmon C. Bohme G. A. Laville M. Pratt J. Corti O. Pradier L. (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Human Molecular Genetics*, volume 12, Issue 18, page 2277–2291.
- Jellinger K. A. Paulus W. (1992). Clinico-pathological correlations in Parkinson's disease. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, volume 94, page 86-88.
- Jimenez-Martin J. Blanco-Lezcano L. González-Fraguela M. E. Díaz-Hung M. L. Serrano-Sánchez T. Almenares J. L. Francis-Turner L. (2015). Effect of neurotoxic lesion of pedunculo-pontine nucleus in nigral and striatal redox balance and motor performance in rats. *Neuroscience*, volume 289, page 300-314
- Jin Y. Zhang X. Shu L. Chen L. Sun L. Qian H. Liu W. Fu Z. (2010). Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). In *Chemosphere*, volume 78, Issue 7, page 846-852.

- Jin Y. Lin X. Miao W. Wu T. Shen H. Chen S. Li Y. Pan Q. Fu Z. (2014). Chronic exposure of mice to environmental endocrine-disrupting chemicals disturbs their energy metabolism. *Toxicology Letters*, volume 225, Issue 3, pages 392-400.
- Jones D.P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, volume 295 (4), page C849 – C868.
- Jursinic P. Stemler A. (1983). Changes in [14C] Atrazine binding associated with the oxidation-reduction state of the secondary quinone acceptor of photosystem II. *Plant Physiology*, volume 73 (3), page 703-708.
- Kahle P. J. Waak J. Gasser T. (2009). DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free Radical Biology and Medicine*, volume 47 (10), page 1354–1361.
- Kállai V. Tóth A. Gálosi R. Péczely L. Ollmann T. Petykó Z. László K. Kállai J. Szabó I. Karádi Z. Lénárd L. (2017). The MAM-E17 schizophrenia rat model: Comprehensive behavioral analysis of pre-pubertal, pubertal and adult rats. *Behavioural Brain Research*, volume 332, page 75-83.
- Kalyanaraman B. (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology*, volume 1, Issue 1, page 244-257.
- Kandel E. R. Schwartz J. H. Jessell T. M. Agud Aparicio J. L. (2001). *Principles of neural science*, Fourth Edition, Madrid: McGraw-Hill Interamerican. Unit 2, chapter 15, page 282.
- Katagi T. (2010). Bioconcentration, bioaccumulation and metabolism of pesticides in aquatic organisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer, volume 204, page 1-132.
- Kawaguchi Y. Wilson C. J. Augood S. J. Emson P. C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences*, volume 18, Issue 12, page 527-535.
- Keisari Y. Braun L. Flescher E. (1983). The Oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli. *Immunobiology*, volume 165, Issue 1, page 78-89.
- Khan S. U. Foster T. S. Akhtar M. H. (1979). *In vitro* metabolism of a mixture of atrazine and simazine by the soluble fraction (105000g) from goose, pig and sheep liver-homogenates. *Pesticide Science*, volume 10, Issue 6, page 460-466.
- Kincaid A. E. Wilson C. J. (1996). Corticostriatal innervation of the patch and matrix in the rat neostriatum. *Journal of Comparative Neurology*, volume 374, Issue 4, page 578-592.
- Kirik D. Annett L. E. Burger C. Muzyczka N. Mandel R. J. Bjoklund A. (2003). Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Science of America*, volume 100 (5), page 2884–2889.
- Kristal B. S. Park B. K. Yu B. P. (1996). 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *Journal of Biological Chemistry*, volume 271, Issue 11, page 6033-6038.
- Koh S. Chung H. Xia H. Mahadevia A. Song Y. (2005). Environmental enrichment reverses the impaired exploratory behavior and altered gene expression induced by early-life seizures. *Journal of Child Neurology*, volumen 20 (10), page 796-802.
- Kozak W. Kluger M. J. Kozak A. Wachulec M. Dokladny K. (2000). Role of cytochrome P-450 in endogenous antipyresis. *American Journal of Physiology*, volume 279 (2), page 455-460.
- Kuhn H. Banthiya S. van Leyen K. (2015). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta*, volume 1851 (4), page 308-330.
- Kumazawa R. Tomiyama H. Li Y. Imamichi Y. Funayama M. Yoshino H. (2008). Mutation analysis of the PINK1 gene in 391 patients with Parkinson disease. *Arch. Neurology*, volume 65, page 802–808.
- Lambrea M. D. Russo D. Polticelli F. Scognamiglio V. Antonacci A. Zobnina V. Rea G. (2014). Structure/function/dynamics of photosystem II plastoquinone binding sites. *Current Protein & Peptide Science*, volume 15 (4), page 285-295.
- Lanciego J. L. Luquin N. Obeso J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, volume 2 (12), page a009621.
- Langston J. W. (2006). The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Annals of Neurology*, volume 59, Issue4, page 591–596.
- Laurindo F. R. M. Fernandes D. C. Santos C. X. C. (2008). Assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation products. *Methods in Enzymology*, Academic Press, volume 441, 2008, page 237-260
- Laws S. C. Hotchkiss M. Ferrell J. Jayaraman S. Mills L. Modic W. Tinfo N. Fraites M. Stoker T. Cooper R. (2009). Chlorotriazine herbicides and metabolites activate an ACTH-dependent release of corticosterone in male Wistar rats. *Toxicological Sciences*, volume 112, Issue 1, page 78-87.
- Lee M. O. & Am J. (1929). *Journal of Physiology*, volume 89, page 24.

- Lee F. J. S. Liu F. Pristupa Z. B. Niznik H. B. (2001). Direct binding and functional coupling of α -synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J.* volume 15, page 916–926.
- Lee J. Kosaras B. Del Signore S. J. Cormier K. Mckee A. Ratan R. R. Kowall N. W. Ryu H. (2011). Modulation of lipid peroxidation and mitochondrial function improves neuropathology in Huntington's disease mice. *Acta Neuropathology*, volume 121 (4), page 487-498.
- Lei W. Jiao Y. Del mar N. Reiner A. (2004). Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal. Projection Neurons in Rats. *Journal of Neuroscience*, volume 24 (38), page 8289-8299.
- Leisman G. Braun-Benjamin O. Melillo R. (2014). Cognitive-motor interactions of the basal ganglia in development. *Frontiers in Systems Neuroscience*, volume, page 8-16.
- Lester H. A. Mager S. M. Quick W. Corey J. L. (1994). Permeation properties of neurotransmitter transporters. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, volume 34 (1), page 219-249.
- Lewis M. M. Du G. Sen S. Kawaguchi A. Truong Y. Lee S. Mailman R. B. Huang X. (2011). Differential involvement of striato- and cerebello-thalamo-cortical pathways in tremor-and akinetic/rigid-predominant Parkinson's disease. *Neuroscience*, volume 177, page 219 - 249.
- Li X. Sapp E. Valencia A. Kegel K. B. Qin Z. H. Alexander J. Masso N. Reeves P. Ritch J. J. Zeitlin S. Aronin N. Difiglia M. (2008). A function of huntingtin in guanine nucleotide exchange on Rab11. *Neuroreport*, volume 19 (16), page 1643-1647.
- Li Y. Sun Y. Yang J. Wu Y. Yu J. Li B. (2014). Age-dependent dopaminergic dysfunction following fetal exposure to atrazine in Sprague-Dawley rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, volume 37, Issue 3, page 1275-1282.
- Li Y. S. He Xe. Ma Kun. Wu Y. Li B.X. (2015). The effect of exposure to atrazine on dopaminergic development in pubertal male Sprague-Dawley rats. *Birth Defects Research (Part B)*, volume 104, Issue 5, page 184-189.
- Li X. N. Ma L. Y. Ji H. Qin Y. H. Jin S. S. Xu L. X. (2018). Resveratrol protects against oxidative stress by activating the Keap-1 / Nrf2 antioxidant defense system in obese-asthmatic rats. *Experimental and therapeutic medicine*, volume 16 (6), page 4339-4348.
- Lim S. Young Ahn S. Song I. C. Chung M. H. Jang H. C. Park K. S. Lee K. Pak Y. K. Lee H. Y (2009). Chronic exposure to the herbicide, atrazine, causes mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *Climate Change and Health*, volume 4, Issue 4, page e5186.
- Lin Z. Fisher J. W. Ross M. K. Filipov N. M. (2011). A physiologically based pharmacokinetic model for atrazine and its main metabolites in the adult male C57BL/6 mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, volume 251, Issue 1, page 16-31.
- Lin Z. Dodd C. A. Filipov N. M. (2013). Differentiation state-dependent effects of in vitro exposure to atrazine or its metabolite diaminochlorotriazine in a dopaminergic cell line. *Life Sciences*, volume 92, Issue 1, page 81-90.
- Lin J. Zhao H-S. Qin L. Li X-N. Zhang C. Xia J. Li J. L. (2018). Atrazine triggers mitochondrial dysfunction and oxidative stress in quail (*Coturnix C. coturnix*) cerebrum via activating xenobiotic-sensing nuclear receptors and modulating Cytochrome P450 Systems. *Journal Agriculture of Food and Chemical*, volume 85, Issue 25, page 6402 – 6413.
- Lubrini G. Martín-Montes A. Díez-Ascaso O. Díez-Tejedor E. (2018). Brain disease, connectivity, plasticity and cognitive therapy: A neurological view of mental disorders. *Neurología*, volume 33, Issue 3, page 187-191.
- Luna-Moreno D. Vázquez-Martínez O. Báez-Ruiz A. Ramírez J. Díaz-Muñoz M. (2007). Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic subcellular fractions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, volume 146, Issue 4, page 632-643.
- Luo W. Cao J. Li J. He W, (2008). Adipose tissue-specific PPAR γ deficiency increases resistance to oxidative stress. *Experimental Gerontology*, volume 43, Issue 3, 2008, page 154-163.
- Lushchak V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Mini-review. *Chemico-Biological Interactions*, volume 224, page 164-175.
- Macpherson A. N. Telfer A. Barber J. Truscott T. G. (1993). Direct-detection of singlet oxygen from isolated photosystem-II reaction centers. *Biochemical Biophys Acta - Bioenergetics*, volume 1143, Issue 3, page 301-309.
- McMullin T. Brzezicki J. Cranmer B. Tessari J. Andersen M. (2003). Pharmacokinetic modeling of disposition and time-course studies with C14-atrazine. *Journal Toxicology Environmental Health*, volume 66 (10), page 941-964.
- Mann A. Miksys S. Gaedigk A. Kish S. J. Mash D. C. Tyndale R. F. (2012). The neuroprotective enzyme CYP2D6 increases in the brain with age and is lower in Parkinson's disease patients. *Neurobiology of Aging*, volume 33, Issue 9, page 2160-2171.
- Mañon Rossi W. Garrido G. Nuñez Sellés A. J. (2016). Biomarkers of oxidative stress in antioxidant therapy. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, volume 4 (2), page 62-83.
- Marnett L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenes*, volume 424 (1-2), page 83-95.

- Martin J. Shipitalo Lloyd B. Owens. (2003). Atrazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine in surface runoff from conservation tilled watersheds. *Environmental Science & Technology*, volume 37 (5), page 944-950.
- Martínez-Sámano J. Torres-Durán P. V. Juárez-Oropeza M. A. (2011). Glutathione and its association with neurodegenerative diseases, schizophrenia, aging and cerebral ischemia. *REB*, volume 30 (2), page 56-67.
- Márquez-Ramos J. A. Hernández-Plata I. Díaz-Muñoz M. Rodríguez V. M. (2017). The hypoactivity associated with the repeated exposure to atrazine is related to decreases in the specific binding to D1-DA receptors in the striatum of rats. *Journal of Toxicology*, volume 2017; page 1 - 9.
- Matsuda W. Furuta T. Nakamura K. C. Hioki H. Fujiyama F. Arai R. Kaneko T. (2009). Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *The Journal of Neuroscience*, volume 29 (2), page 444-453.
- McCann S. J. Pond S. James K. M. Le Couteur D. G. (1997). The association between polymorphisms in the cytochrome P-450 2D6 gene and Parkinson's disease: a case-control study and meta-analysis. *Journal of the Neurological Sciences*, volume 153, Issue 1, page 50-53.
- Mcelvoy J. A. Gangnon R. E. Newcomb P. A. Kanarek M. S. Anderson H. A. Brook J. V. Trentham-Diets A. M. Y. Remington P. L. (2006). Risk of breast cancer for women living in rural areas from adult exposure to atrazine from well water in Wisconsin. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, volume 17, page 207-214.
- Mcintosh T. Yu T. Gennarelli T. A. (1994). Alterations in regional brain catecholamine concentrations after experimental brain injury in the rat. *Journal of Neurochemistry*, volume 63, Issue 4, page 1426-143.
- Mendaš G. Vuletić M. Galić N. Drevenkar V. (2012). Urinary metabolites as biomarkers of human exposure to atrazine: Atrazine mercapturate in agricultural workers. *Toxicology Letters*, volume 210, Issue 2, page 174-181.
- Meredith G. E. & Kang U. J. (2006). Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. *Movement Disorders*, volume 21, Issue 10, page 1595-606.
- Michel P. P. Hirsch E. C. Hunot S. (2016). Understanding dopaminergic cell death pathways in Parkinson disease. *Neuron*, volume 90, Issue 4, page 675-691.
- Miklossy J. Doudet D. D. Schwab C. Yu S. McGeer E. G. McGeer P. L. (2006). Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. *Experimental Neurology*, volume 197, Issue 2, page 275-283.
- Miksys S. Hoffmann E. Tyndale R. F. (2000). Regional and cellular induction of nicotine-metabolizing CYP2B1 in rat brain by chronic nicotine treatment. In *Biochemical Pharmacology*, volume 59, Issue 12, page 1501-1511.
- Miksys S. Tyndale R. F. (2013). 2011 CCNP Heinz Lehmann Award paper: Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain. *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN*, volume 38 (3), page 152-163.
- Miller. E. Morel A. Saso L. Saluk J. (2014). Isoprostanes and neuroprostanes as biomarkers of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, volume 2014, page 10.
- Mimica-Dukic N. Simin N. Svircev E. Orcic D, Beara I. Lesjak M. Bozin B. (2012). The effect of plant secondary metabolites on lipid peroxidation and eicosanoid pathway. *Open Access*, chapter thirth, page 193-210.
- Mizoguchi K. Yuzurihara M. Ishige A. Sasaki H. Tabira T, (2002). Chronic stress impairs rotarod performance in rats: implications for depressive state. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, volume 71, Issues 1-2, page 79-84.
- Mizuno Y. Hattori N. Kubo S. Sato S. Nishioka K. Hatano T. Tomiyama H. Funayama M. Machida Y. Mochizuki H. (2008). Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, volume 363, page 2215-2227.
- Montgomery K C. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, volume 48 (4), page 254-260.
- Morel P. Tallineau C. Pontcharraud R. Piriou A. Huguet F. (1998). Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochemistry International*, volume 33 (6), page 531-540.
- Mori F. Okada K. Nomura T. Kobayashi Y. (2016). The pedunculopontine tegmental nucleus as a motor and cognitive interface between the cerebellum and basal ganglia. *Frontiers in Neuroanatomy*, volume 10, page 101 - 109.
- Mu L. Sobotka S. Chen J. Su H. Sanders I. Adler C. H. Shill H. A. Caviness J. N. Samanta J. E. Beach T. G. (2013). Alpha-synuclein pathology and axonal degeneration of the peripheral motor nerves innervating pharyngeal muscles in Parkinson disease. *Journal Neuropathology Experimental Neurology*, volumen 72 (2), page 119-129.
- Nakka S. Godar A. S. Thompson C. R. Peterson D. E. Jugulam M. (2017). Rapid detoxification via glutathione S-transferase (GST) conjugation confers a high level of atrazine resistance in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Pest Management Science*, volume 73, Issue 11, page 2236-2243.
- Narotsky M. G. Best D. S. Guidici D. L. Cooper R. L. (2000). Strain comparisons of atrazine-induced pregnancy loss in the rat. *Reproductive Toxicology*, volume 15, Issue 1, page 61-69.

- Nekhaeva E. Bodyak N. D. Kraytsberg Y. McGrath S. B. Van Orsouw N. Pluzhnikov A. Wei J. Y. Vijg J. Khrapko K. (2002). Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volume 99 (8), page 5521 – 5526.
- Nigam S. Schewe T. (2000). Phospholipase A2s and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology*, volume 1488 (1-2), page 167-181
- Niki E. (2014). Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, volume 1840, Issue 2, page 809-817.
- Nissbrandt H. Bergquist F. Jonason J. Engberg G. (2001). Inhibition of cytochrome P450 2E1 induces an increase in extracellular dopamine in rat substantia nigra: A new metabolic pathway? *Synapse*, volume 40, Issue 4, page 294-301.
- Nwani C. D. Lakra W. S. Nagpure N. S. Kumar R. Kushwaha B. Srivastava S. K. (2010). Toxicity of the herbicide atrazine: Effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa Punctatus (Bloch)*. *International Journal of Environmental research and Public Health*, volume 7 (8), page 3298 - 3312.
- Ochoa-Acuña H. Frankenberger J. Hahn L. Carbajo C. (2009). Drinking-water herbicide exposure in Indiana and prevalence of small-for-gestational-age and preterm delivery. *Environmental Health Perspectives*, volume 117 (10), page 619-1624.
- Ogata M. Akita H. Ishibashi H. (2019). Behavioral responses to anxiogenic tasks in young adult rats with neonatal dopamine depletion. *Physiology & Behavior*, volume 204, page 10-19.
- Orme S. Kegley S. (2004). PAN Pesticide database. Red de acción de pesticidas; San Francisco, CA, EE. UU. 2004.
- Pamplona R. Portero-Otin M. Sanz A. Requena J. Gustavo Barja G. (2004). Modification of the longevity-related degree of fatty acid unsaturation modulates oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in liver and brain. *Experimental Gerontology*, volume 39, Issue 5, pages 725-733.
- Pan Y. Berman Y. Haberny S. Meller E. Carr K. D. (2006). Synthesis, protein levels, activity and phosphorylation state of tyrosine hydroxylase in mesoaccumbens and nigrostriatal dopamine pathways of chronically food-restricted rats. *Brain Research*, volume 1122 (1), page 135-142.
- Park J. Kim S. Y. Cha G. H. Lee S. B. Kim S. Chung J. (2005). Drosophila DJ-1 mutant show oxidative stress-sensitive locomotor dysfunction. *Gene*, volume 361, page 133-139.
- Pedersen W. A. Fu W. Keller J. N. Markesbery W. R. Appel S. Smith R. G. Kasarskis E. Mattson M. P. (1998). Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Annual Neurology*, volume 44 (5), page 819-824.
- Percheron G. François C. Talbi B. Yelnik J. Fénelon G. (1996). The primate motor thalamus. *Brain Research Reviews*, volume 22, Issue 2, page 93-181
- Picazio S. Koch G. (2015). Is motor inhibition mediated by cerebello-cortical interactions? *The Cerebellum*, volume 14, Issue 1, page 47-49.
- Prensa L. Giménez-Amaya J. M. Parent A. (1999). Chemical heterogeneity of the striosomal compartment in the human striatum. *Journal of Comparative Neurology*, volume 413, Issue 4, page 603-618.
- Polanco L. A. Vargas C. Góngora I. M. E. (2011). Animal models: A review from three tests used in anxiety. *Suma Psicológica*, volume 18 (2), page 99-110
- Powles S. B. Yu Q. (2010). Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual Plant Biology*, volume 61, Issue 1, page 317-347.
- Pruett S. B. Fan R. Zheng Q. Myers P. Hébert P. (2003). Modeling and predicting immunological effects of chemical stressors: Characterization of a quantitative biomarker for immunological changes caused by atrazine and ethanol. *Toxicological Sciences*, volume 75, Issue 2, page 343-354.
- Qin L. Du Z-H. Zhu S-Y. Li X-N. Li N. Guo J-A. Li J-L. Zhang Y. (2015). Atrazine triggers developmental abnormality of ovary and oviduct in quails (*Coturnix Coturnix coturnix*) via disruption of hypothalamo-pituitary-ovarian axis. *Environmental Pollution*, volume 207, page 299-307.
- Quinn L. P. Perren M. J. Brackenborough K. T. Woodhams P. L. Vidgeon-Hart M. Chapman H. Pangalos M. N. Upton N. Virley D. J. (2007). A beam-walking apparatus to assess behavioural impairments in MPTP-treated mice: Pharmacological validation with R- (-)-deprenyl. *Journal of Neuroscience Methods*, volume 164, Issue 1, pages 43-49.
- Raju D. V. Shah D. J. Wright T. M. Hall R. A. Smith Y. (2006). Differential synaptology of vGluT2-containing thalamostriatal afferents between the patch and matrix compartments in rats. *Journal of Comparative Neurology*, volume 499 (2), page 231-243.
- Ramos-Moreno T. Castillo C. G. Martinez-Serrano A. (2012). Long term behavioral effects of functional dopaminergic neurons generated from human neuralstem cells in the rat 6-OH-dA Parkinson's disease model. Effects of the forcedexpression of BCL-X(L). *Behavioural Brain Research*, volume 232, Issue 1, page 225-232.

- Rau V. Fanselow M. S. (2009). Exposure to a stressor produces a long-lasting enhancement of fear learning in rats. *Stress*, volume 12 (2), page 125-133.
- Rauchová H. Vokurková M. Koudelová J. (2012). Hypoxia-induced lipid peroxidation in the brain during postnatal ontogenesis. *Physiological Research*, volume 61, page S89-S101.
- Reed T. T. (2011). Lipid peroxidation and neurodegenerative disease, In *Free Radical Biology and Medicine*, volume 51, Issue 7, page 1302-1319.
- Rice M. E. Patel J. C. Cragg S. J. (2011). Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience*, volume 198, page 112-37.
- Reis A. Spickett C. M. (2012). Chemistry of phospholipid oxidation, In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, volume 1818, Issue 10, page 2374-2387.
- Riederer P. Sofic E. Rausch W. D. Schmidt B. Reynolds G. P. Jellinger K. Youdim M. B. (1989). Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *Journal Neurochemistry*, volume 52, Issue 2, page 515–520.
- Rivero-Ríos P. Gómez-Suaga P. Fernández E. Hilfiker S. (2014). Upstream deregulation of calcium signaling in Parkinson's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, volume 7, page 1 - 53.
- Rodgers R. J. Cao B. J. Dalvi A. Holmes A. (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, volumen 30 (3), page 289-304.
- Rodríguez V. M, Jiménez-Capdeville M. E. Giordano M. (2003). The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicology Letters*, volume 145, Issue 1, page 1-18.
- Rodríguez V. M. Limón-Pacheco J. H. Mendoza-Trejo M. S. González-Gallardo A. Hernández-Plata I. Giordano M. (2013). Repeated exposure to the herbicide atrazine alters locomotor activity and the nigrostriatal dopaminergic system of the albino rat. *Neurotoxicology*, volume 34, page 82-94.
- Rodríguez V. M. Mendoza-Trejo M. S. Hernandez-Plata I. Giordano M. (2017). Behavioral effects and neuroanatomical targets of acute atrazine exposure in the male Sprague-Dawley rat. *NeuroToxicology*, volume 58, page 161-170.
- Rommelfanger K. S. Wichmann T. (2010). Extrastriatal dopaminergic circuits of the basal ganglia. *Frontiers in Neuroanatomy*, volume 4, page 139 - 149.
- Rong M. Kaundun S. S. Tranel P. T. Riggins C. W. McGinness D. L. Hager A. G. Hawkes T. Riechers D. E. (2013). Distinct detoxification mechanisms confer resistance to mesotrione and atrazine in a population of waterhemp. *Plant Physiology*, volume 163 (1), page 363-377.
- Ross M. K. Jones N. T. L. Filipov M. (2009). Disposition of the herbicide 2-Chloro-4-(ethylamino)-6- (isopropylamino)-s-triazine (atrazine) and its major. Metabolites in mice: A liquid chromatography/mass spectrometry analysis of urine, plasma, and tissue levels. *Drug metabolism and disposition. Drug Metabolism and Disposition: The Biological fate of Chemicals*, volume 37(4), page 776–786.
- Rustin P. & Rötig A. (2002). Inborn errors of complex II – Unusual human mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, volume 1553, Issues 1–2, pages 117-122.
- Sandhu S. K. & Kaur G. (2003). Mitochondrial electron transport chain complexes in aging rat brain and lymphocytes. *Biogerontology*, volume 4, Issue 1, page 19-29.
- Sarkar S. Mukherjee S. Chattopadhyay A. Bhattacharya S. (2014). Low dose of arsenic trioxide triggers oxidative stress in zebrafish brain: Expression of antioxidant genes. *Ecotoxicology and Environmental safety*, volume 107, page 1 – 8.
- Savitz D. A. Arbuckle T. Kaczor D. Curtis K. M. (1997). Male pesticide exposure and pregnancy outcome. *American Journal of Epidemiology*. volume 146 (12), page 1025-1036.
- Schapira A. H. (2008). Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurology*, volume 7, page 97 - 109.
- Scopes, R.K. Smith, J.A. (2001). Chapter 10. Analysis of proteins. En Ausebel, F. M. *Current protocols in molecular biology*. New York: J. Wiley, 2001.
- Shafer T. J. Rwad T. Meacham C. A. Cooper R. L. (1999). Effects of the chlorotriazine herbicide, cyanazine, on GABA A receptors in cortical tissue from rat brain. *Toxicology*. volume 142, Issue 1, page 57-68.
- Shahid M. Rodger I. W. (1989). Chronotropic and inotropic actions of amrinone, carbazeran and isobutylmethyl xanthine: Role of phosphodiesterase inhibition. *British Journal of Pharmacology*, volume 98, Issue 1, page 291-301.
- Shen D. Dalton T. P. Nebert D.W. Shertzer G. H. (2005). Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *The journal of biological chemistry*, volume. 280, Issue 8, page 25305–25312.
- Silva J. P. Coutinho O. P. (2010). Free radicals in the regulation of damage and cell death basic mechanisms and prevention. *Drug Discoveries & Therapeutics*, volume 4 (3), page 144-167.
- Simpkins J. W. Swenb erg J. A. Weiss. N. Brusick D. Eldridge J. C. Stevens J. T. Breckenridge C. B. (2011). Atrazine and breast cancer: A framework assessment of the toxicological and epidemiological evidence. *Toxicological Sciences*, volume 123 (2), page 441-459.
- Sinaceur J. Ribiere C. Sabourault D. Nordmann R. (1985). Superoxide formation in liver mitochondria during ethanol intoxication. Possible role in alcohol hepatotoxicity. *Free radicals in liver injury*. IRL Press Oxford. page 175-177.

- Singh B. Pandey S. Yadav S. K. Verma R. Singh S. P. Mahdi A. A. (2017). Role of ethanolic extract of *Bacopa monnieri* against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) induced mice model via inhibition of apoptotic pathways of dopaminergic neurons. In *Brain Research Bulletin*, volume 2017, page 120 -128.
- Song Y. Zhu L. S. Xie H. Wang J. Wang J. H. Liu W. Dong X. L. (2009). Effects of atrazine on DNA damage and antioxidative enzymes in *Vicia faba*. *Environmental Toxicology Chemical*, volume 28 (5), page 1055-1062.
- Sonta T. Inoguchi T. Tsubouchi H. Sekiguchi N. Kobayashi K. Matsumoto S. Utsumi H. Nawata H. (2004). Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. *Free Radical Biology and Medicine*, volume 37 (1), page 115-115.
- De Souza M. L. Wackett L. P. Boundy-Mills K. L. Mandelbaum R. T. Sadowsky M. J. (1995). Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 61 (9), page 3373-3378.
- Stoker T. E. Cooper R. L. (2007). Distribution of ¹⁴C-atrazine following an acute lactational exposure in the Wistar rat. *Reproductive Toxicology*, volume 23, Issue 4, page 607-610.
- St-Pierre J. Buckingham J. A. Roebuck S. J. Brand M. D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Metabolism and bioenergetics. Journal Biology and Chemistry*, volume 277, page 44784-44791.
- Sun F. Huo X. Zhai Y. Wang A. Xu J. Su D. Bartlam M. Rao Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, volume 121, pages 1043-1057.
- Sun Y. Li Y. S. Yang W. J. Yu J. Wu Y. P. Li B. X. (2014). Exposure to atrazine during gestation and lactation periods: Toxicity effects on dopaminergic neurons in offspring by downregulation of Nurr1 and VMAT2. *Journal Molecular Science*, volume 15 (2), page 2811-2825.
- Sun Y. N. Wang T. Wang Y. Han L. N. Li L. B. Zhang Y. M. Liu J. (2015). Activation of 5-HT 1A receptors in the medial subdivision of the central nucleus of the amygdala produces anxiolytic effects in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, volume 95, page 181-191.
- Sun Y. Li Y-S Li B. Ma K. Li B-Y. (2017). A study of the age-related effects of lactational atrazine exposure. *Reproductive Toxicology*, volume 69, page 230-241.
- Sweis B. M. Bachour S. P. Brekke J. A. Gewirtz J. C. Sadeghi-Bazargani H. Hevesi M. Divani A. F. (2016). A modified beam-walking apparatus for assessment of anxiety in a rodent model of blast traumatic brain injury. *Behavioural Brain Research*, volume 296, page 149-156.
- Swerdlow N. R. Krupin A. S. Bongiovanni M. J. Shoemaker J. M. Goins J. C. Hammer R. P. Jr. (2006). Heritable differences in the dopaminergic regulation of behavior in rats: Relationship to D2-like receptor G-protein function. *Neuropsychopharmacología*, volume 31 (4), page 721 - 729.
- Taylor E. R. Hurrell F. Shannon R. J. Lin T-K. Hirst J. Murphy M. P. (2003). Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *Metabolism and Bioenergetics. Journal Biology and Chemistry*, volume 278, page 19603-19619.
- Taymans J. M. Va de Haute C. Baekelandt V. (2006). Distribution of PINK1 and LRRK2 in rat and mouse brain. *Journal Neurochemical*, volume 93, page 951-961.
- Tejada J. Bosco G. G. Morato S. Roque A. C. (2009). Characterization of rat behavior in the elevated plus-maze using a directed graph. *Journal of Neuroscience Methods*, volume 184, Issue 2, page 251-255.
- Thiruchelvam M. Richfield E. K. Baggs R. B. Tank A. W. Cory-Slechta D. A. (2000). The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb. *The Journal of Neuroscience*, volume 20 (24), page 9207-9214.
- Thomas J. A. Poland B. Honzatko R. (1995). Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Biochemical Biophys*, volume 319, page 1-9.
- Thornton R. (2002). Caloric restriction: can we extrapolate from animals to humans? *Food and Chemical Toxicology*, volume 40, Issue 6, pages 743-746.
- Timchalk C. Dryzga M. D. Langvardt P. W. Kastl P. E. Osborne D. W. (1999). Determination of the effect of tridiphan on the pharmacokinetics of [¹⁴C]-atrazine following oral administration to male fischer 344 rats. *Toxicology*, volume 61, Issue 1, page 27-40.
- Urakawa S. Hida H. Masuda T. Misumi S. Kim T. S. Nishino H. (2007). Environmental enrichment brings a beneficial effect on beam walking and enhances the migration of doublecortin-positive cells following striatal lesions in rats. *Neuroscience*, volume 144, page 920-933.
- Valavanidis A. Vlahogianni T. Dassenakis M. Scoullou M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants *Ecotoxicol. Environmental*, volumen 64 (2), page 178-189.

- Valko M. Leibfritz D. Moncola J. Cronin M. T. D. Mazura M. Telser J. (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, volume 39, page 44-84.
- Voiculescu M. Ghiță I. Segărceanu A. Fulga I. Coman O. (2014). Molecular and pharmacodynamic interactions between caffeine and dopaminergic system. *Journal of Medicine and Life*, volume 7 (4), page 30 - 38.
- Vonberg D. Vanderborcht J. Cremer N. Pütz T. Herbst M. Vereecken H. (2014). 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. *Water Research*, volume 50, page 294-306.
- Walters J. L. Lansdell T. A. Lookingland K. J. Baker L. E. (2015). The effects of gestational and chronic atrazine exposure on motor behaviors and striatal dopamine in male Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, volume 289, 2015, pages 185-192.
- Weiss B. Clarkson T. C. Simon W. (2002). Silent latency periods in methylmercury poisoning and in neurodegenerative disease. *Environmental Health Perspectives*, volume 110, page 851-854.
- West M. O. Carelli R. M. Pomerantz M. Cohen S. M. Gardner J. P. Chapin J. K. Woodward D. J. (1990). A region in the dorsolateral striatum of the rat exhibiting single-unit correlations with specific locomotor limb movements. *Journal of Neurophysiology*, volume 64, page 1233 – 1246.
- Wirbisky S. E. Weber G. J. Sepúlveda M. S. Xiao C. Cannon J. R. Freeman J. L. (2015). Developmental origins of neurotransmitter and transcriptome alterations in adult female zebrafish exposed to atrazine during embryogenesis. *Toxicology*, volume 333, page 156-167.
- Wright R. O. Baccarelli A. (2007). Metals and neurotoxicology. *The Journal of Nutrition*, volume 137, Issue 12, page 2809-2813.
- Xia J. Qin L. Du Z-H. Lin J. Li X-N. Li J-L. (2017). Performance of a novel atrazine-induced cerebellar toxicity in quail (*Coturnix C. coturnix*): Activating PXR/CAR pathway responses and disrupting cytochrome P450 homeostasis. *Chemosphere*, volume 171, page 259-264,
- Yamano T. Morita S. (1995). Effects of pesticides on isolated rat hepatocytes, mitochondria, and microsomes II. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, volume 28, page 1-7.
- Yin H. H. & Knowton B. J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature reviews Neuroscience*, volume 7, page 464-476.
- Yu J. Li X. Yang J. (2015). Effects of simazine exposure on neuronal development-related factors in MN9D cells. *Medical Science monitoring*, volume 22, page 2831-2838.
- Zhang B. Bailey W. M. McVicar A. L. Gensel J. C. (2016). Age increases reactive oxygen species production in macrophages and potentiates oxidative damage after spinal cord injury. *Neurobiology of Aging*, volume 47, page 157-167.
- Zhang X-F. Zhang C-H. Zheng J. Li L-X. Geng T-Q. Zhang Y. (2018) Potential biomarkers for monitoring the toxicity of long-term exposure to atrazine in rat by metabolomic analysis, *Xenobiotica*, 48:3, 241-249.
- Zhao H. Kalivendi S. Zhang H. Joseph J. Nithipatikom K. Vasquez-Vivar J. Kalyanaraman B. (2003). Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radical Biology*, volume 34, page 1359-1368.
- Zecca L. Zucca F. A. Wilms H. Sulzer D. (2003). Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends in Neurosciences*, volume 26, Issue 11, page 578-580.
- Zecca L. Wilms H. Geik S. Claasen J-H. Brandenburg L-O. Holzknacht C. (2008). Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuroscience*, volume 116, Issue 1, page 47-55.
- Zielke H. R. Zielke C. L. Baab P. J. (2009). Direct measurement of oxidative metabolism in the living brain by microdialysis: a review. *Journal of Neurochemistry*, volume 109, page 24-29.
- Zielonka J. Zhao H. Xu Y. Kalyanaraman B. (2005). Mechanistic similarities between oxidation of hydroethidine by Fremy's salt and superoxide: Stopped-flow optical and EPR studies. In *Free Radical Biology and Medicine*, volume 39, Issue 7, page 853-863.
- Zhou K. Khokhar J. Y. Zhao B. Tyndale R. F. (2013). First demonstration that brain CYP2D-mediated opiate metabolic activation alters analgesia *in vivo*. In *Biochemical Pharmacology*, volume 85, Issue 12, page 1848-1855.

18. Índice de figuras

	Página
Figura 1: Biotransformación de ATR en estudios <i>in vitro</i>	5
Figura 2: Localización de las principales vías dopaminérgicas en el SNC de rata.....	15
Figura 3: Reacciones productoras de radicales libres en la lipoperoxidación.....	19
Figura 4: Reacción en cadena del proceso de peroxidación lipídica.....	22
Figura 5: Metabolismo oxidativo.....	25
Figura 6: Mecanismo de la reacción entre el MDA y TBARs.....	26
Figura 7: Método experimental.....	30
Figura 8: Caja de registro de actividad locomotora espontánea.....	31
Figura 9: Rotarod IITC 755.....	33
Figura 10. Barra de equilibrio.....	34
Figura 11: Laberinto elevado en cruz.....	35
Figura 12: Registro del peso corporal.....	40
Figura 13: Registro del índice ce Lee.....	41
Figura 14. Actividad vertical.....	43
Figura 15. Diagrama que muestra el efecto de atrazina sobre las variables de la actividad locomotora espontánea en los 12 meses de tratamiento.....	45
Figura 16. Actividad vertical en el protocolo de 24 horas.....	46
Figura 17. Número de estereotipias en el protocolo de 24 horas.....	47
Figura 18. Tiempo de movimiento en el protocolo de 24 horas.....	48
Figura 19. Tiempo de permanencia de los roedores en los brazos abiertos y cerrados.....	50
Figura 20. Número de trayectos de los roedores en los brazos abiertos y cerrados.....	51
Figura 21. Número de errores y tiempo de recorrido en el protocolo de barra de equilibrio.....	53
Figura 22. Tiempo de permanencia sobre el cilindro.....	54
Figura 23. Formación de dienos conjugados en las diferentes regiones cerebrales.....	55
Figura 24. Formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	56
Tabla 1. Tabla de valores de F, para las diferentes variables de la actividad locomotora primer hora.....	43
Tabla 2. Tabla de valores de F, para las diferentes variables de la actividad locomotora global.....	43
Tabla 3. Tabla de parámetros del protocolo de barra de equilibrio.....	52
Anexo 1. Tabla de F's en el protocolo de 24 horas.....	91

19. Anexo

Primer mes	AE	AH	DC	DT	DEM	NE	AV	TC	TEM	TM
Primer mes										
Tratamiento	(2, 27) = 0.144	(2, 27) = 0.207	(2, 27) = 0.207	(2, 27) = 0.277	(2, 27) = 0.783	(2, 27) = 1.023	(2, 27) = 0.964	(2, 27) = 1.160	(2, 27) = 0.025	(2, 27) = 1.041
Tiempo	(23, 621) = 2.295	(23, 621) = 9.022 *	(23, 621) = 7.029 *	(23, 621) = 10.248 *	(23, 621) = 10.407 *	(23, 621) = 7.116 *	(23, 621) = 9.657 *	(23, 621) = 1.522	(23, 621) = 1.656	(23, 621) = 9.619 *
Interacción	(46, 621) = 0.786	(46, 621) = 0.640	(46, 621) = 0.941	(46, 621) = 0.573	(46, 621) = 1.490	(46, 621) = 0.700	(46, 621) = 0.493	(46, 621) = 0.855	(46, 621) = 0.885	(46, 621) = 0.818
Segundo mes										
Tratamiento	(2, 27) = 2.774	(2, 27) = 0.851	(2, 27) = 0.177	(2, 27) = 0.880	(2, 27) = 1.101	(2, 27) = 2.128	(2, 27) = 0.906	(2, 27) = 1.396	(2, 27) = 1.425	(2, 27) = 1.549
Tiempo	(23, 621) = 5.637 *	(23, 621) = 8.447 *	(23, 621) = 6.841 *	(23, 621) = 9.116 *	(23, 621) = 8.753 *	(23, 621) = 6.771 *	(23, 621) = 6.373 *	(23, 621) = 0.646	(23, 621) = 0.633	(23, 621) = 7.538 *
Interacción	(46, 621) = 1.043	(46, 621) = 0.735	(46, 621) = 0.679	(46, 621) = 0.643	(46, 621) = 0.683	(46, 621) = 0.929	(46, 621) = 0.751	(46, 621) = 1.032	(46, 621) = 1.014	(46, 621) = 0.887
Tercer mes										
Tratamiento	(2, 27) = 0.744	(2, 27) = 1.059	(2, 27) = 0.050	(2, 27) = 1.264	(2, 27) = 3.750	(2, 27) = 0.716	(2, 27) = 3.780	(2, 27) = 0.196	(2, 27) = 0.164	(2, 27) = 1.742
Tiempo	(23, 621) = 12.399 *	(23, 621) = 18.917 *	(23, 621) = 14.962 *	(23, 621) = 15.988 *	(23, 621) = 12.874 *	(23, 621) = 14.874 *	(23, 621) = 15.047 *	(23, 621) = 3.374	(23, 621) = 3.758	(23, 621) = 15.983 *
Interacción	(46, 621) = 0.537	(46, 621) = 0.505	(46, 621) = 0.671	(46, 621) = 0.653	(46, 621) = 0.580	(46, 621) = 0.480	(46, 621) = 1.000	(46, 621) = 0.742	(46, 621) = 0.749	(46, 621) = 0.847
Cuarto mes										
Tratamiento	(2, 27) = 6.405 *	(2, 27) = 6.566 *	(2, 27) = 3.673	(2, 27) = 2.138	(2, 27) = 0.983	(2, 27) = 7.009 *	(2, 27) = 7.874 *	(2, 27) = 1.010	(2, 27) = 1.024	(2, 27) = 9.234 *
Tiempo	(23, 621) = 11.112 *	(23, 621) = 17.510 *	(23, 621) = 15.534 *	(23, 621) = 15.122 *	(23, 621) = 10.460 *	(23, 621) = 13.270 *	(23, 621) = 17.307 *	(23, 621) = 3.789	(23, 621) = 4.103	(23, 621) = 15.454 *
Interacción	(46, 621) = 1.042	(46, 621) = 0.918	(46, 621) = 0.823	(46, 621) = 0.876	(46, 621) = 1.002	(46, 621) = 1.127	(46, 621) = 0.880	(46, 621) = 0.915	(46, 621) = 0.904	(46, 621) = 1.069
Quinto mes										
Tratamiento	(2, 27) = 0.239	(2, 27) = 1.053	(2, 27) = 0.397	(2, 27) = 0.669	(2, 27) = 0.518	(2, 27) = 0.671	(2, 27) = 3.115	(2, 27) = 1.237	(2, 27) = 1.249	(2, 27) = 1.998
Tiempo	(23, 621) = 15.779 *	(23, 621) = 32.409 *	(23, 621) = 31.169 *	(23, 621) = 29.156 *	(23, 621) = 17.621 *	(23, 621) = 20.442 *	(23, 621) = 29.938 *	(23, 621) = 3.662	(23, 621) = 3.764	(23, 621) = 7.285 *
Interacción	(46, 621) = 1.327	(46, 621) = 1.088	(46, 621) = 0.727	(46, 621) = 0.973	(46, 621) = 1.171	(46, 621) = 1.169	(46, 621) = 1.592	(46, 621) = 0.910	(46, 621) = 0.907	(46, 621) = 0.599
Sexto mes										
Tratamiento	(2, 27) = 2.886	(2, 27) = 2.235	(2, 27) = 1.334	(2, 27) = 2.292	(2, 27) = 1.558	(2, 27) = 4.032	(2, 27) = 2.546	(2, 27) = 1.519	(2, 27) = 1.532	(2, 27) = 5.004 *
Tiempo	(23, 621) = 20.516 *	(23, 621) = 29.783 *	(23, 621) = 28.832 *	(23, 621) = 24.636 *	(23, 621) = 13.916 *	(23, 621) = 23.504 *	(23, 621) = 34.035 *	(23, 621) = 10.142 *	(23, 621) = 10.507 *	(23, 621) = 26.204 *
Interacción	(46, 621) = 1.115	(46, 621) = 1.280	(46, 621) = 1.455	(46, 621) = 1.277	(46, 621) = 0.852	(46, 621) = 1.191	(46, 621) = 1.752	(46, 621) = 1.079	(46, 621) = 1.085	(46, 621) = 1.340
Séptimo mes										
Tratamiento	(2, 27) = 0.988	(2, 27) = 0.965	(2, 27) = 1.716	(2, 27) = 2.130	(2, 27) = 1.187	(2, 27) = 1.307	(2, 27) = 2.024	(2, 27) = 1.164	(2, 27) = 1.188	(2, 27) = 0.109
Tiempo	(23, 621) = 13.659 *	(23, 621) = 21.774 *	(23, 621) = 17.067 *	(23, 621) = 17.890 *	(23, 621) = 11.852 *	(23, 621) = 14.126 *	(23, 621) = 24.181 *	(23, 621) = 12.159 *	(23, 621) = 10.501 *	(23, 621) = 16.716 *
Interacción	(46, 621) = 0.929	(46, 621) = 0.803	(46, 621) = 0.674	(46, 621) = 0.715	(46, 621) = 0.812	(46, 621) = 1.132	(46, 621) = 1.067	(46, 621) = 1.083	(46, 621) = 1.604	(46, 621) = 0.880
Octavo mes										
Tratamiento	(2, 27) = 0.801	(2, 27) = 0.561	(2, 27) = 1.279	(2, 27) = 0.882	(2, 27) = 0.612	(2, 27) = 2.452	(2, 27) = 1.787	(2, 27) = 2.058	(2, 27) = 2.089	(2, 27) = 1.876
Tiempo	(23, 621) = 14.789 *	(23, 621) = 26.331 *	(23, 621) = 15.669 *	(23, 621) = 17.470 *	(23, 621) = 13.577 *	(23, 621) = 20.698 *	(23, 621) = 21.766 *	(23, 621) = 6.188 *	(23, 621) = 7.027 *	(23, 621) = 26.412 *
Interacción	(46, 621) = 1.028	(46, 621) = 0.865	(46, 621) = 0.929	(46, 621) = 0.831	(46, 621) = 0.654	(46, 621) = 1.029	(46, 621) = 0.844	(46, 621) = 1.084	(46, 621) = 1.051	(46, 621) = 0.922
Noveno mes										
Tratamiento	(2, 27) = 2.507	(2, 27) = 0.514	(2, 27) = 0.230	(2, 27) = 0.410	(2, 27) = 1.177	(2, 27) = 0.919	(2, 27) = 1.528	(2, 27) = 0.065	(2, 27) = 0.065	(2, 27) = 0.960
Tiempo	(23, 621) = 7.478 *	(23, 621) = 37.744 *	(23, 621) = 29.737 *	(23, 621) = 30.673 *	(23, 621) = 20.492 *	(23, 621) = 26.694 *	(23, 621) = 34.631 *	(23, 621) = 7.827 *	(23, 621) = 8.051 *	(23, 621) = 32.234 *
Interacción	(46, 621) = 1.107	(46, 621) = 0.786	(46, 621) = 0.660	(46, 621) = 0.749	(46, 621) = 0.906	(46, 621) = 0.782	(46, 621) = 0.782	(46, 621) = 0.885	(46, 621) = 0.891	(46, 621) = 0.744
Décimo mes										
Tratamiento										
Tiempo										
Interacción										
Décimo primer mes										
Tratamiento	(2, 27) = 0.181	(2, 27) = 3.032	(2, 27) = 1.158	(2, 27) = 0.771	(2, 27) = 0.462	(2, 27) = 3.381	(2, 27) = 18.121 *	(2, 27) = 1.268	(2, 27) = 1.289	(2, 27) = 7.034 *
Tiempo	(23, 621) = 15.833 *	(23, 621) = 34.165 *	(23, 621) = 26.652 *	(23, 621) = 25.855 *	(23, 621) = 16.701 *	(23, 621) = 25.012 *	(23, 621) = 27.563 *	(23, 621) = 10.895 *	(23, 621) = 11.161 *	(23, 621) = 29.908 *
Interacción	(46, 621) = 0.832	(46, 621) = 1.016	(46, 621) = 0.976	(46, 621) = 0.933	(46, 621) = 0.849	(46, 621) = 0.875	(46, 621) = 2.288	(46, 621) = 0.933	(46, 621) = 0.946	(46, 621) = 1.110
Décimo segundo mes										
Tratamiento	(2, 27) = 0.070	(2, 27) = 0.617	(2, 27) = 0.130	(2, 27) = 0.664	(2, 27) = 2.929	(2, 27) = 0.268	(2, 27) = 6.866 *	(2, 27) = 3.793	(2, 27) = 3.833	(2, 27) = 0.469
Tiempo	(23, 621) = 19.301 *	(23, 621) = 31.270 *	(23, 621) = 20.518 *	(23, 621) = 23.203 *	(23, 621) = 17.426 *	(23, 621) = 24.280 *	(23, 621) = 27.078 *	(23, 621) = 6.414 *	(23, 621) = 6.840 *	(23, 621) = 26.456 *
Interacción	(46, 621) = 0.886	(46, 621) = 0.689	(46, 621) = 0.711	(46, 621) = 0.746	(46, 621) = 0.833	(46, 621) = 0.758	(46, 621) = 1.092	(46, 621) = 1.076	(46, 621) = 0.933	(46, 621) = 0.748

Anexo 1. Tabla de valores de Fs del protocolo de 24 horas. La tabla muestra los valores de Fs para cada una de las variables analizadas. Abreviaturas: Actividad estereotipada (AE), Actividad horizontal (AH), distancia al centro (DC), distancia en el margen (DMM), distancia total (DT), número de estereotipias (NE), actividad vertical (AV), tiempo en el centro (TC), tiempo en el margen (TMM) y tiempo de movimiento (TM). $p < 0.05$, cada asterisco (*) representa diferencia significativa entre grupos.