



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTOS HISTOPATOLÓGICOS EN LA SUSTANCIA NIGRA POR
EXPOSICIÓN CRÓNICA A ATRAZINA**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:
MVZ ALEJANDRA KARINA MORA GUTIÉRREZ**

**TUTORA PRINCIPAL
DRA. VERÓNICA MIREYA RODRÍGUEZ CÓRDOVA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. WENDY PORTILLO MARTÍNEZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

**DRA. CLAUDIA GUADALUPE CASTILLO MARTIN DEL CAMPO
FACULTAD DE MEDICINA, UASLP**

JURIQUILLA, QUERÉTARO, ENERO, 2021.



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.

“Quien no conoce nada, no ama nada. Quien no puede hacer nada, no comprende nada. Quien nada comprende, nada vale. Pero quien comprende también ama, observa, ve... Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa, más grande es el amor...”

Paracelso

Dedicatoria

A mi mamá, Juana. Por todo lo que fue y lo que seguirá siendo en mi memoria.

Porqué me dio a la mejor mamá del mundo, Isabel.

Las amo.

Agradecimientos

A mi tutora y maestra, la Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova, que durante este camino siempre estuvo al pendiente de mi trabajo y me motivó a aprender cada día más y sin darse cuenta, cimentó mi pasión por la toxicología. Gracias por ser un ejemplo de vida y para mi vida; también por escuchar mis inquietudes y darme la oportunidad de desarrollarlas en el laboratorio. Gracias por cada consejo, por enseñarme tanto, por ser tan amable y comprensiva, por ser quien es.

A la Bióloga, María Soledad Mendoza Trejo, por su paciencia y comprensión, por escucharme, por compartir sus conocimientos conmigo, por enseñarme que, cuando tienes una habilidad, lo mejor que puedes hacer es compartirla con los demás.

A la Dra. Magdalena Giordano, por permitirme ser parte del equipo de trabajo en su laboratorio, por la confianza y por ser tan amable conmigo.

Al las Doctoras, Wendy Portillo Martínez y Claudia Guadalupe Castillo Martín del Campo, por el tiempo dedicado a mi trabajo de tesis, por sus comentarios, por motivarme y por hacer de cada tutorial un momento enriquecedor.

A mi jurado de examen, a la Dra. Gina Lorena Quirarte, al Dr. Jorge Humberto Limón Pacheco y a la Dra. Brenda Rocío Anguiano Serrano, por el tiempo dedicado a la lectura de mi tesis, por tan acertados comentarios y por contribuir con sus correcciones para la escritura de mi tesis.

A mi familia, que en la distancia me apoyó y creyó en mí; sobre todo a mi mamá, porque siempre tuvo las palabras adecuadas para apaciguar a mi corazón. A mi sobrina, Regina, por hacerme feliz cada vez que volvía a casa, por ser una de las motivaciones más grandes de mi vida y de mis ideales.

A Dulce, José, Elizabeth, Edna, Alonso y Enrique, por su compañía, por hacer del laboratorio un lugar al que siempre quería llegar, por su ayuda, sus enseñanzas, por las risas y la alegría que siempre los caracterizó.

Gracias, Dulce y José, por ser más que mis compañeros, mis amigos. Por sus consejos, su paciencia y su compañía, porque con nada en esta vida tendré con que pagarles el tiempo que estuvieron conmigo.

A mis amigos de vida, Claudia, Karen, Christian y Carlos, que en la distancia me motivaron, me escucharon y no me dejaron sola.

A Dios y a la vida, porque me han permitido descubrir un poco del misterio y de la maravilla que encierra el cerebro, les debo todo mi respeto y admiración.

A mis ratas, porque no me va a alcanzar la vida para agradecer por cada una de sus vidas. Nos encontraremos.

A todos los que en el camino contribuyeron en mi formación, a los que me motivaron y también a los que me desmotivaron, porque me han ayudado a crecer y a ser lo que soy ahora.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (N. de registro 718266) para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias (Neurobiología). Así como al Programa de Apoyo de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológicas UNAM- DGAPA-PAPIIT IN 208119 y proyecto CONACYT 251510 por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto de investigación.

Resumen

La atrazina es uno de los 10 plaguicidas más utilizados en la República Mexicana y se emplea para eliminar a la maleza que crece entre los cultivos. Se ha asociado con neurotoxicidad y se cree que el sistema dopaminérgico podría ser un posible blanco de sus efectos tóxicos. Por ello se evaluó el efecto de la administración crónica de atrazina en la morfología celular de la sustancia nigra (SN) y sus manifestaciones conductuales. Se usaron ratas macho Sprague-Dawley, que diariamente se alimentaron con 0 mg, 1 mg ó 10 mg de atrazina por kg de peso durante un año. La actividad locomotora fue registrada mensualmente durante todo el tratamiento y en el mes 10 se evaluó la coordinación motora con la barra de equilibrio y el rotorod. Al finalizar el tratamiento, los cerebros fueron procesados para realizar la tinción de Nissl y fluoro jade C (FJC), así como inmunohistoquímica para Iba1 y GFAP. Los hallazgos revelaron que, la atrazina (10 mg/kg de peso) disminuye el número de estereotipias del mes 3 al 12, sin alterar la actividad horizontal, vertical o de localización; la coordinación motora, no mostró cambios entre los grupos. La tinción de Nissl y FJC no revelaron alteraciones en la morfología celular o neurodegeneración, respectivamente; el conteo celular para Iba1 y GFAP no fue diferente entre los grupos evaluados. Estos resultados sugieren que la administración crónica de atrazina puede alterar el comportamiento estereotipado, pero no genera cambios en la morfología celular, neurodegeneración, inflamación o astrocitosis en la SN.

Abstract

Atrazine is one of the ten most used pesticides in the Mexican Republic, and it is used to eliminate the weeds that grow between crops. It has been associated with neurotoxicity, and it is believed that the dopaminergic system could be a possible target for its toxic effects. Therefore, the effect of atrazine's chronic administration on the cellular morphology of the substantia nigra (SN) and its behavioral manifestations was evaluated. Male Sprague-Dawley rats were used, which were fed 0 mg, 1 mg, or 10 mg of atrazine per kg of body weight daily for one year. Locomotor activity was recorded monthly throughout the treatment, motor coordination with the motor balance, and motor coordination were evaluated at month 10. At the end of the ATR treatment, brains were processed to perform the Nissl and fluoro jade C (FJC) staining and immunohistochemistry for Iba1 and GFAP in the substantia nigra. The findings revealed that atrazine (10 mg/kg of body weight) decreases the number of stereotypes from month 3 to 12 without altering the horizontal or vertical activity or localization parameters; motor coordination showed no changes between groups. Nissl and FJC staining did not reveal alterations in cell morphology or neurodegeneration, respectively; the cell count for Iba1 and GFAP was not different between the groups evaluated. These results suggest that chronic atrazine administration can alter stereotyped behavior but does not generate cell morphology changes, neurodegeneration, inflammation, or astrocytosis in the SN

Índice

	Página
Carátula	1
Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Resumen	6
Abstract	7
Índice	8
Índice de Figuras	10
Índice de Tablas	11
Abreviaturas	12
I. Introducción	14
II. Antecedentes	17
2.1 Atrazina	17
2.1.1 Propiedades fisicoquímicas	18
2.1.2 Mecanismo de acción	18
2.1.3 Biotransformación	19
2.1.4 Distribución	21
2.2 Efectos de la atrazina en seres humanos	22
2.3 Efectos generales de la atrazina en roedores	23
2.4 Efectos de la atrazina en el sistema nervioso central de los roedores	27
2.4.1 Efectos conductuales por exposición a atrazina	27
2.4.2 Efectos neuroquímicos por exposición a atrazina	27
2.4.3 Hallazgos histopatológicos por exposición a atrazina	28
2.4.4 Alteraciones de la neuroglia por exposición a atrazina	29
2.5 Sistema dopaminérgico	32
2.5.1 Síntesis de dopamina	32
2.5.2 Receptores dopaminérgicos	32
2.5.3 Vías dopaminérgicas	33
2.5.3.1 Vía nigroestriatal	33
2.5.3.2 Vía mesolímbica	34
2.5.4 Mesencéfalo	35
2.5.5 Sustancia nigra	36
2.5.5.1 Histología de la sustancia nigra	37
2.6 Neuroglia	41
2.6.1 Macrogliá	42
2.6.2 Microglia	43
III. Justificación	43
IV. Hipótesis	44
V. Objetivos	44
5.1 Objetivo general	44
5.2 Objetivos específicos	44
VI. Materiales y métodos	45
6.1 Modelo experimental	45
6.1.1 Administración crónica de atrazina	46

6.1.2 Preparación de alimento	46
6.2 Pruebas conductuales	47
6.2.1 Actividad locomotora espontánea	47
6.2.2 Barra de equilibrio	48
6.2.3 Rotorod	50
6.3 Histología	50
6.3.1 Tinción de Nissl	51
6.3.2 Tinción fluoro jade C	51
6.4 Inmunohistoquímica	52
6.4.1 Proteína adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (iba1)	52
6.4.2 Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	52
6.4.3 Conteo celular	53
6.5 Análisis Estadístico	53
VII. Resultados	54
7.1 Atrazina y actividad locomotora espontánea	54
7.2 Atrazina y coordinación motora	58
7.2.1 Barra de equilibrio	58
7.2.2 Rotorod	59
7.3 Histología de la sustancia nigra <i>post</i> administración de atrazina	60
7.3.1 Tinción de Nissl	60
7.3.2 Tinción fluoro jade C	61
7.4 Inmunohistoquímica	61
7.4.1 Proteína adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (iba1)	61
7.4.2 Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	62
VIII. Discusión	66
IX. Conclusiones	74
X. Perspectivas	74
Referencias	76
Apéndices	89

Índice de Figuras

	Página
Figura 1	Aplicación manual de plaguicidas sin equipo de protección personal. 15
Figura 2	Mezcla de plaguicidas por los trabajadores. 15
Figura 3	Niños en jornada laboral agrícola 16
Figura 4	Fórmula química de la atrazina (1-cloro-3-etilamino-5-isopropilamino-2,4,6-triazina). 17
Figura 5	Biotransformación de atrazina en mamíferos. 21
Figura 6	Síntesis de dopamina. 32
Figura 7	Vías dopaminérgicas. 35
Figura 8	Neuronas tipo compacta. 37
Figura 9	Neuronas tipo reticulata. 38
Figura 10	Neuronas tipo intermedio. 39
Figura 11	Neuronas tipo globular. 39
Figura 12	Distribución esquemática de los cuatro tipos neuronales en la sustancia nigra de la rata. 40
Figura 13	Células de la glía. 41
Figura 14	Estrategia experimental. 45
Figura 15	Barra de equilibrio. 49
Figura 16	Barra de equilibrio: error 49
Figura 17	Actividad horizontal. 55
Figura 18	Actividad vertical. 56
Figura 19	Episodios Estereotipados. 57
Figura 20	Distancia en el margen. 58
Figura 21	Barra de equilibrio (1 cm). 59
Figura 22	Rotorod. 60
Figura 23	Tinción de Nissl. 63
Figura 24	Conteo celular: Proteína adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (Iba). 64
Figura 25	Conteo celular: Proteína ácida fibrilar glial (GFAP). 65

Índice de tablas

		Página
Tabla 1	Clasificación toxicológica de los plaguicidas según la organización mundial de la salud (OMS).	16
Tabla 2	Propiedades fisicoquímicas de la atrazina.	18
Tabla 3	Efectos de la atrazina en roedores para experimentación.	26
Tabla 4	Efectos de la atrazina en el sistema nervioso central de roedores para experimentación.	31
Tabla 5	Clasificación de los receptores dopaminérgicos.	33
Tabla 6	Distribución rostrocaudal de los cuatro tipos neuronales en la sustancia nigra de la rata.	40

Abreviaturas

5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindoleacético
A	Adrenalina
Acc	Núcleo accumbens
AH	Actividad horizontal
AHV	Ácido homovanílico
ALE	Actividad locomotora espontánea
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANDEVA	Análisis de varianza
ANDEVAmr	Análisis de varianza de medidas repetidas
APVMA	Autoridad Australiana de Plaguicidas y Medicina Veterinaria
ATP	Adenosín trifosfato
ATR	Atrazina
ATR 10 mg	10 mg ATR/kg de peso
ATR 1 mg	1 mg ATR/kg de peso
ATV	Área tegmental ventral
AV	Actividad vertical
BH₄	Tetrahidrobiopterina
BHE	Barrera hematoencefálica
EE	Episodios estereotipados
EV	Episodios verticales
Cd	Núcleo caudado
CO₂	Dióxido de carbono
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CPF	Corteza prefrontal
RDD1	Receptor de dopamina D1
DA	Dopamina
DACT	Diaminoclorotriazina
DDC	DOPA descarboxilasa
DE	Desetilatrizina
DIP	Desisopropilatrazina
DL₅₀	Dosis letal 50
DM	Distancia en el margen
DT	Distancia total
EA	Enfermedad de Alzheimer
EEM	Error estándar de la media
EP	Enfermedad de Parkinson
EPP	Equipo de protección personal
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FAO	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura
FJC	Fluoro jade C
FSII	Fotosistema II
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GD	Giro dentando

GLA	Glufosinato de amonio
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLI	Glifosato
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
GPm	Globo pálido medial
GSH	Glutación
i	Efecto de interacción
IARC	Agencia internacional para la investigación sobre el cáncer
Iba1	Proteína adaptadora de unión a calcio ionizada 1
KPBS	Buffer salino de fosfato de potasio
LMP	Límite máximo permisible
LPE	Libres de patógenos específicos
MB	Maneb
MDA	Malondialdehído
mL	Mililitros
NA	Noradrenalina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NST	Núcleo subtalámico
NTS	Neurotransmisores
núm	Número
NVA	Núcleos talámicos ventral anterior
NVL	Núcleo ventral lateral
OIT	Organización internacional del trabajo
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Buffer salino de fosfatos
PFA 4%	Paraformaldehído al 4%
PKA	Proteína cinasa A
PQ	Paraquat
Pt	Putamen
SD	Sprague-Dawley
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SNpc	Sustancia nigra <i>pars compacta</i>
SNpr	Sustancia nigra <i>pars reticulata</i>
ss	Solución salina
T	Efecto de tratamiento
t	Efecto de tiempo
TH	Tirosina hidroxilasa
US EPA	Agencia de protección ambiental de Estados Unidos

I. Introducción

Los plaguicidas son compuestos químicos utilizados en la agricultura para el control de plantas o animales que pueden causar perjuicio o que interfieren en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos para animales y humanos [Organización Mundial de la Salud (OMS)/Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 2010], para controlar vectores que transmiten enfermedades como la malaria, el dengue, la leishmaniasis, las enfermedades de Chagas y Zika (van den Berg *et al.*, 2012; Kauffman y Kramer, 2017), para evitar la proliferación de malezas en jardines ornamentales y parques, impedir la proliferación de insectos, hongos y algas en equipos eléctricos, pinturas, alfombras, papel, cartón y empaques para alimento, siendo la agricultura, la que consume cerca del 85% de la producción mundial de plaguicidas (Wilson y Tisdell, 2001). Gracias a estas sustancias los seres humanos y también los animales, tienen acceso a alimentos agrícolas libres de plagas, que además pueden ser almacenados durante mucho más tiempo, disminuyendo el riesgo de infestación por insectos u hongos, evitando así, pérdidas masivas de alimento (Mostafalou y Abdollah, 2017).

Sin embargo, la exposición a plaguicidas puede ser muy peligrosa para los organismos vivos, ya que están diseñados para ser tóxicos; una de las principales vías de exposición es el medio ambiente, pues al asperjarlos llegan al suelo y pueden ser arrastrados por la lluvia, contaminando cuerpos de agua y a los organismos acuáticos que ahí residen, cabe resaltar que el consumo de esta agua es una fuente por la que pueden entrar a otros organismos. Además, la dispersión vía aérea de estos compuestos hace que se pongan en contacto directo con insectos, animales, frutas, verduras, semillas y es así como se incorporan en la cadena alimenticia.

Lamentablemente, el mayor riesgo lo presentan los trabajadores agrícolas, sus familias y las personas que viven cerca de las zonas asperjadas, las cuales se exponen a diferentes plaguicidas por periodos prolongados (Ortíz, Avila-Chávez y Torres, 2014), principalmente por contacto directo con los cultivos, manejo inseguro,



Figura 1. Aplicación manual de plaguicidas sin equipo de protección personal [modificada desde FAO/Organización Internacional del Trabajo (OIT), 2015].

así como prácticas inadecuadas de almacenamiento y eliminación, situación que se ve agravada por la falta de equipo de protección personal (EPP) cuando manejan estas sustancias y que se atribuye en primer lugar, a la falta de información (ver Figura 1 y 3).

En diversos estudios se reporta que, aunque los trabajadores conocen los riesgos para la salud por exposición a plaguicidas, no emplean EPP debido a que es incómodo, costoso o implica una pérdida de tiempo; además durante la jornada laboral, presentan hábitos operativos como comer, fumar, beber agua y alcohol, masticar palillos y chicles e incluso, utilizan la boca para eliminar las obstrucciones de las boquillas de los aspersores y mezclan plaguicidas con las manos desnudas (ver Figura 2), lo que aumenta significativamente su exposición (Afari-Sefa, Asare-Bediako, Kenyon y Micah, 2015; Okoffo, Mensah y Fosu-Mensah, 2016; Jallow, Awadh, Albaho, Devi y Thomas, 2017; Yarpuz-Bozdogan, 2018; Yadav, Kori, Thakur y Kumar, 2018; Mubushar, Aldosari, Baig, Alotaibi y Khan, 2019).

En México se emplean cerca de 30 plaguicidas considerados como altamente peligrosos, como la atrazina (ATR) que se encuentra entre los 10 más utilizados en la República Mexicana a pesar de estar prohibido en 37 países. Por ejemplo, en el Bajío de Guanajuato en el ciclo primavera-verano del año 2014, se estimó un total de 521.1 toneladas de ATR utilizadas solamente para la producción de sorgo de riego (Bejarano *et al.*, 2017).



Figura 2. Mezcla de plaguicidas por los trabajadores. Nótese la falta de equipo de protección personal y la presencia de niños en el área de trabajo. (modificada desde FAO/OIT, 2015).

La ATR se registró por primera vez para su comercialización desde el año 1958 (Hansen *et al.*, 2013) por el Corporativo Ciba-Geigy, después Novartis, hoy, Syngenta (Gammon, Aldous, Carr, Sanborn y Pfeifer 2005); desde entonces se ha empleado como un herbicida eficaz contra malezas y gramíneas de hoja ancha en los cultivos de maíz, sorgo y caña de azúcar y para el tratamiento de malezas en los caminos, silvicultura, huertos, jardines y para el control de algas (Vlaardingerboek *et al.*, 2009). En el año de 1975 la ATR comenzó a comercializarse en México (Hansen *et al.*, 2013) donde se emplea para proteger cultivos de maíz, piña, sorgo, caña de azúcar, entre otros [Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), 2010].



Figura 3. Niños en jornada laboral agrícola, sin equipo de protección personal y expuestos a la aplicación de plaguicidas a unos cuantos metros de distancia (modificada desde FAO/OIT, 2015).

Según la clasificación toxicológica para plaguicidas de la OMS, que se muestra en la Tabla 1, la ATR se ubica en la clase III, que incluye a plaguicidas ligeramente peligrosos, debido a que su dosis letal 50 en rata (DL₅₀) es superior a los 2000 mg/kg (OMS, 2010).

Tabla 1. Clasificación toxicológica de los plaguicidas según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Clase		DL ₅₀ para en rata (mg/kg de peso corporal)	
		Oral	Dermal
Ia	Extremadamente peligroso	< 5	< 50
Ib	Altamente peligroso	5 – 50	50 – 200
II	Moderadamente peligroso	50 – 2000	200 – 2000
III	Ligeramente peligroso	> 2000	> 2000
U	Peligro agudo poco probable	5000 o más	

Por otro lado, diferentes hojas de datos de seguridad para la ATR no ponen de manifiesto de manera fiable los efectos dañinos generados por el mal uso de este herbicida (Syngenta, 2010; Sifatec, 2015; Dow AgroSciences, 2016).

Lamentablemente la normatividad para el uso y distribución de plaguicidas en México no está actualizada, salvo algunas modificaciones que se han realizado a la norma más recientemente publicada (NOM – 232 – SSA1 – 2009), en la que se establecen los requisitos necesarios para el etiquetado de plaguicidas, sin hacer énfasis en ninguna familia química o específicamente en la ATR. Por otro lado, en el año 2017 surgió un proyecto de la Norma 127 de la Secretaria de Salud (PROY-NOM – 127 – SSA1 – 2017), en la que se establece el límite máximo permisible (LMP) de 102 tóxicos ambientales (parámetros) en el agua de uso y consumo humano, entre los que se incluye por primera vez a la ATR, con un LMP de 100 µg/L, sin embargo, hasta la fecha es incierta la aprobación de esta norma, por lo que se considera necesario seguir haciendo investigación mexicana de calidad, para estudiar sus posibles efectos tóxicos en la salud de animales humanos y no humanos, así como sus repercusiones al medio ambiente.

II. Antecedentes

2.1 Atrazina

Las s – triazinas como la ATR, son una familia de herbicidas sintéticos que se emplean generalmente durante el ciclo primavera – verano para el tratamiento de cultivos de maíz, sorgo, caña de azúcar, piña y nueces de macadamia, principalmente para el control de malezas y gramíneas de hoja ancha (Ross, Jones y Filipov 2009). La ATR puede ser asperjada en el suelo o en los cultivos en forma líquida, en polvo o granulada y una vez que es absorbida, actúa en los brotes y las hojas de las malezas inhibiendo la fotosíntesis (como se explicará más adelante).

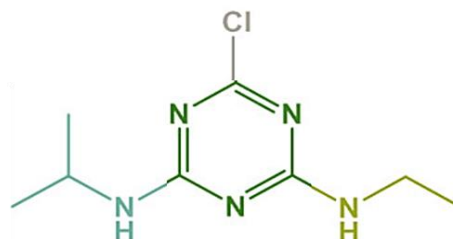


Figura 4. Fórmula química de la ATR (1 – cloro – 3 – etilamino – 5 – isopropilamino-2,4,6-triazina). Los grupos funcionales de la molécula se señalan en diferentes colores y se resaltan con los mismos en la fórmula química.

2.1.1 Propiedades fisicoquímicas

Las s – triazinas incluye un grupo de plaguicidas de naturaleza herbicida, que se utilizan ampliamente en la agricultura, siendo la ATR (1 – cloro – 3 – etilamino – 5 – isopropilamino – 2,4,6 – triazina) uno de los más utilizados y estudiados hasta el momento. Este grupo de plaguicidas se caracteriza por presentar un anillo hexamérico simétrico que consiste en átomos de carbono y nitrógeno (Figura 4). La ATR es un polvo blanco, inodoro, ligeramente soluble en agua, poco volátil, no reactivo ni flamable y que pertenece a la clase de las clorotriazinas; sus propiedades fisicoquímicas más relevantes se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la atrazina (Vlaardingerboek *et al.*, 2009; WHO, 2011)

Propiedad	Valor
Color	Blanco, incoloro
Apariencia	Polvo/cristal incoloro
Olor	Inodoro
Fórmula molecular	C ₈ H ₁₄ ClN ₅
Peso molecular	215.69 g/mol
Punto de fusión	175 –177 °C
Solubilidad en agua	30 mg/L a 20 °C
Densidad	1.18 g/cm ³ a 20 °C
Presión de vapor	40 × 10 ⁻⁶ Pa a 20 °C
Punto de inflamabilidad	No aplica
Constante de disociación	1.60, base débil
Log coeficiente de partición octanol/agua	2.61

2.1.2 Mecanismo de acción

La ATR es un plaguicida que por su acción biocida es clasificado como herbicida; actúa inhibiendo el fotosistema II (FSII) en los cloroplastos de las plantas, bloqueando el flujo de electrones, reduciendo la producción de adenosín trifosfato (ATP), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y la fijación de dióxido de carbono (CO₂). Sin embargo, la muerte de las plantas no se atribuye a la falta de energía, sino más bien a la acumulación de tripletes de clorofila (estado excitado de larga duración de clorofila) que interactúan con oxígeno molecular para formar oxígeno singlete (especie reactiva de oxígeno), resultado del bloqueo en la transferencia de electrones y que causa daño oxidativo severo a las

macromoléculas, destrucción de la membrana celular y con ello la muerte de la planta (Zhu, Patzoldt, Radwan, Tranel y Clough, 2009). Aunque la ATR es absorbida por todas las plantas, en aquellas que no son sensibles se degrada antes de generar algún efecto dañino. La selectividad de los herbicidas triazínicos, se basa principalmente en mecanismos de desintoxicación metabólica rápida en la mayoría de los cultivos, principalmente por modificaciones en la molécula del plaguicida, por su conjugación con glutatión, como en el caso de la planta del maíz, sorgo y caña de azúcar; la sustitución del cloro por un grupo hidroxilo que inactiva al herbicida, como en el caso del maíz o la eliminación de grupos alquilo, por ejemplo en el sorgo, entre otros mecanismos de tolerancia (Shukla y Devine, 2008).

2.1.3 Biotransformación

Estudios realizados en roedores y humanos han demostrado que la ATR se metaboliza principalmente en el hígado, por acción de las enzimas microsomales del citocromo P450 (CYP 450) (Lang, Rettie y Böcker, 1997; Hanioka, Jinno, Tanaka-Kagawa, Nishimura y Ando, 1999; Abel, Opp, Verlinde, Bammler y Eaton, 2004; Joo, Choi y Hodgson, 2010); en roedores se ha descrito que durante la biotransformación de Fase I la reacción metabólica dominante es la N – desalquilación (Abel *et al.*, 2004) y en ratas se ha determinado que CYP 1A1/w es la isoforma más importante en ésta y CYP 2B1/2 lo es para la hidroxilación del grupo isopropil (Hanioka *et al.*, 1999); por su parte, en humanos se sabe que CYP 1A2 y 3A4 son las isoenzimas principalmente involucradas en el metabolismo de este herbicida (Lang *et al.*, 1997; Joo *et al.*, 2010). En la biotransformación de Fase II, se ha demostrado que la ATR y sus metabolitos pueden conjugarse con GSH, para el caso de los hepatocitos de ratón por acción de la GST pi, específicamente por mGSTP1 – 1, sin embargo, los niveles de GST pi son bajos en el hígado de rata, por lo que muestra una baja conjugación de GSH con ATR. En humanos, se ha determinado que la conjugación con GSH se lleva a cabo por la GSTP1 – 1 humana, la cual del mismo modo que en la rata, se expresa en niveles bajos en el hígado, por lo que el metabolismo de la ATR por conjugación con GSH también es bajo (Abel *et al.*, 2004).

En ratas Sprague-Dawley (SD) se ha observado que después de la administración oral, la ATR se absorbe rápidamente por el tracto gastrointestinal y se elimina principalmente con la orina. Su metabolismo se basa en la desalquilación gradual (por medio de la desisopropil atrazina o desetilatrizina) hasta su metabolito principal, la diaminoclorotriazina (DACT). Experimentos realizados en otras cepas de ratas, evidencian que, la ATR también se absorbe casi por completo por el tracto gastrointestinal, que la vía principal de eliminación es la orina y que el anillo de triazina permanece sin modificaciones, del mismo modo que en la rata SD. En estudios del metabolismo de la ATR en ratas, se ha descrito que ésta se desalquila fácilmente para dar lugar a dos metabolitos monodealquilados, la desetilatrizina (DE) y la desisopropilatrazina (DIP), que también pueden desalquilarse, conjugarse con glutatión reducido o ser excretados. Una segunda desalquilación de estos metabolitos da lugar a un compuesto didealquilado, la DACT, considerado como el metabolito principal, que también puede ser excretada o conjugarse con glutatión. Es importante mencionar que estos conjugados contienen azufre y pueden ser metabolizados por una liasa de carbono – azufre para dar lugar a 2 – mercapto – s – triazina, que es excretada o metilada a 2 – metiltio – s – triazina, que también pueden ser excretada u oxidarse a S – óxidos. La ATR también puede ser metabolizada por la vía alterna de la oxidación de un carbono primario en su cadena lateral o la de sus metabolitos (DE o DIP) a un carboxilato, que da lugar a metabolitos que se excretan sin modificación adicional [Autoridad Australiana de Plaguicidas y Medicina Veterinaria (APVMA), 2004].

En seres humanos expuestos a ATR de manera ocupacional, los principales metabolitos en la orina de los trabajadores son DE, DIP y DACT, siendo este último, el detectado con mayor frecuencia (Ross *et al.*, 2009). En la Figura 5 se ejemplifica el metabolismo de la ATR en mamíferos.

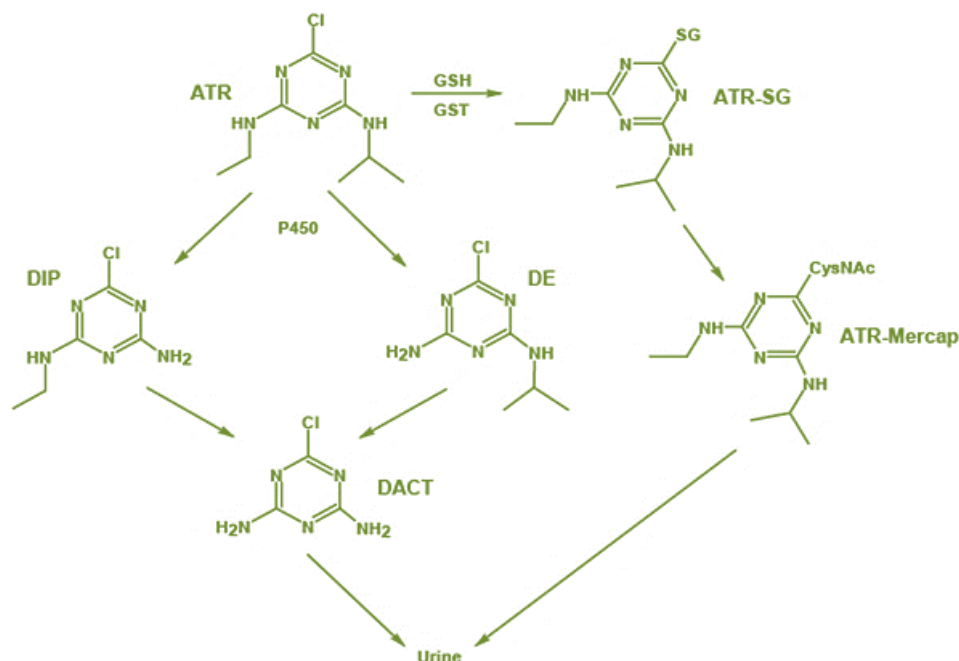


Figura 5. Biotransformación de ATR en mamíferos. ATR: Atrazina; GSH: Glutatión; GST: Glutatión – S – Transferasa; ATR – SG: Atrazina – Glutatión; P450: Citocromo P450; DIP: Desisopropilatrazina; DE: Desetilatrastazina; ATR-Mercap: Atrazina-Mercapturato; DACT: Diaminoclorotriazina (modificada de Ross *et al.*, 2009).

2.1.4 Distribución

En un estudio realizado en el año 2009 por Ross y colaboradores, se evaluó la distribución de ATR en diferentes tejidos y fluidos corporales; utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 que fueron administrados vía intragástrica con dosis únicas de 5, 25, 125 ó 250 mg ATR/kg de peso corporal y posteriormente se midieron las concentraciones del plaguicida en el hígado, el riñón, el cerebro, el bazo y el timo, así como en el plasma y la orina. Primeramente, los niveles en el plasma fueron bifásicos, es decir, hubo un pico máximo de ATR 1 y 12 h después de la administración, lo que se atribuye a una absorción de manera discontinua en el tracto gastrointestinal; a las 24 h los niveles de ATR disminuyeron y de manera concomitante los de DACT aumentaron de una forma dependiente de la dosis, además, DACT fue el metabolito más abundante en el plasma. En la orina DACT también fue el metabolito más abundante en las siguientes 72 h después de la administración, sin embargo, entre las 72 y 96 h después de la dosis los niveles de DACT fueron indetectables por el ensayo, por ello se concluyó que DACT se excreta

casi por completo en las siguientes 72 h después de la administración. El pico de ATR y DACT en hígado se alcanzó 4 h post administración, los niveles de DACT fueron dependientes de la dosis; mientras que la ATR alcanzó su concentración máxima en hígado 2 h después. Por su parte, en el riñón las concentraciones de DACT y ATR fueron más bajas que en el hígado, 4 h después de la administración. En el cerebro de todos los grupos administrados con el plaguicida se detectaron cantidades significativas de DACT y ATR 4 h post administración, alcanzando los niveles más altos (1 – 1.5 μM) entre la primera y segunda hora después de la dosis más alta, sin embargo, después de 12 h, los niveles de ATR estuvieron por debajo de 0.1 μM en todos los grupos, pero a las 24 h se detectaron nuevamente. En contraste, los niveles de DACT fueron altos significativamente (hasta de 50 μM) 2 h después de la administración en el cerebro de todos los animales administrados con las diferentes dosis de ATR. De la misma forma que en los demás órganos, las cantidades de DACT fueron dependientes de la dosis. En el bazo, los niveles máximos de ATR en las dosis bajas y altas, se detectaron 1 y 4 h después de la administración respectivamente; el metabolito más abundante fue DACT y su nivel máximo fue detectado 4 h post dosis. En cuanto al timo, las concentraciones de ATR fueron bajas en comparación con el bazo, sin embargo, las concentraciones de DACT fueron comparables con las de este mismo órgano, aunque en las dosis más altas los niveles de ATR y DACT estuvieron por debajo del límite de cuantificación 24 h después de la dosis (Ross *et al.*, 2009).

2.2 Efectos de la atrazina en seres humanos

Los efectos tóxicos de la ATR cobran importancia cuando se considera que es un xenobiótico al que se expone la población en general, por medio del agua y los alimentos, pero que puede tener un mayor impacto en los trabajadores del campo, sus familias y las personas que viven cerca de los campos de cultivo. Hasta la fecha, se ha demostrado que uno de los principales blancos de la ATR es el sistema endocrino, de hecho la Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (US EPA) ha clasificado a este plaguicida como disruptor endocrino, ya que se ha asociado con retraso del crecimiento intrauterino (Munger *et al.*, 1997), partos prematuros (Villanueva, Durand, Coutté, Chevrier y Cordier, 2005) y alteraciones en

los niveles de la enzima aromatasa (Sanderson, Letcher, Heneweer, Giesy y van den Berg, 2001; Sanderson, Boerma, Lansbergen y van den Berg, 2002; Lasserre *et al.*, 2005). Por su parte, la agencia internacional para la investigación sobre el cáncer (IARC) no considera a la ATR como potencial cancerígeno, debido a la falta de evidencia científica clara y precisa, aunque existen estudios epidemiológicos en los que se ha evaluado su posible relación con cáncer de próstata (MacLennan *et al.* 2002), linfoma no Hodgking (LNH) (De Roos *et al.*, 2003), cáncer de mama (Muir *et al.*, 2004) y con casos sugestivos de cáncer de pulmón, de vejiga, LNH y mieloma múltiple (Rusiecki *et al.*, 2004), sin embargo, hasta el momento no se consideran definitivos. La ATR también ha sido asociada con efectos genotóxicos (Zeljezic, Garaj-Vrhovac y Perkovic, 2006), y desde hace décadas, los herbicidas en general se han asociado con efectos neurotóxicos como con la enfermedad de Parkinson (EP) (Semchuk, Love y Lee, 1992; Butterfield, Valanis, Spencer, Lindeman y Nutt, 1993; Gorell, Johnson, Rybicki, Peterson y Richardson, 1998), la enfermedad de Alzheimer (EA) y problemas neuroconductuales (Balderrama-Carmona, Silva-Beltrán, Alvarez, Bante y Palacio, 2020) y aunque existen estudios epidemiológicos en los que se han evaluado estos efectos de manera general, hoy en día, las investigaciones sobre los efectos neurotóxicos de este plaguicida en humanos siguen siendo escasas, la única evidencia relacionada fue publicada por Abarikwu, Farombi y Pant (2011), quienes evaluaron sus efectos en células SH – SY5Y dopaminérgicas humanas en las que generó apoptosis y estrés oxidante.

2.3 Efectos generales de la atrazina en roedores

Estudios recientes han demostrado que la ATR puede tener diversos efectos tóxicos en el organismo de diferentes animales para experimentación, como en la rana *Xenopus laevis*, pez cebra, cerdo, codorniz, carpa y cabra (Hayes *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2017; Bautista *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Komsky-Elbaz *et al.*, 2019), por mencionar algunos, sin embargo, con la finalidad de acotar los hallazgos por la amplia literatura disponible y debido a que el modelo utilizado para los fines de este estudio es la rata, es que a continuación sólo se describen hallazgos realizados en roedores de laboratorio.

Los efectos de la ATR como disruptor endocrino han sido evidenciados desde hace años en diversos estudios, sin embargo en este trabajo se presenta una semblanza de hallazgos relevantes y recientes en torno a este tema, en los que por ejemplo, se ha comprobado que la ATR aumenta las concentraciones de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) en cultivos de células hipofisarias y células testiculares de Leydig, provocando la secreción de prolactina y andrógenos respectivamente, lo que indica que este herbicida actúa como un disruptor endocrino en células que secretan hormonas almacenadas en vesículas y de síntesis *de novo* (Kucka, Pogrmic-Majkic, Fa, Stojilkovic y Kovacevic, 2012); en ratas Wistar causa alteraciones testiculares persistentes que pueden ser irreversibles aún después del periodo de exposición (Martins-Santos *et al.*, 2017) y en los conductos eferentes de ratas de la misma estirpe, se observó que aumenta la expresión de la aromatasa, enzima clave para la producción de estrógenos y posible blanco de este plaguicida (Martins-Santos *et al.*, 2018); además genera alteraciones en los parámetros espermáticos de la laucha de campo (*Calomys laucha*), lo que puede reducir la capacidad reproductiva de estos roedores silvestres (Saalfeld *et al.*, 2018).

En cuanto a su potencial cancerígeno, la exposición crónica a ATR en ratones se asoció con linfoma de células plasmáticas y de tipo histiocítico (Donna, Betta, Robutti y Bellingeri, 1986); por su parte, en ratas SD hembra se cree que este herbicida puede estar asociado con un aumento en la incidencia de tumores mamarios (Wetzel *et al.*, 1994) y se sugirió que la exposición en general a las cloro – s – triazinas podría aumentar la probabilidad de presentar este tipo de neoplasias al elevar la prolactina sérica, consecuencia de la disminución de dopamina (DA), por un mecanismo posiblemente similar al que ejerce la reserpina, que reduce los niveles de DA en el cerebro al interrumpir la función de las vesículas de almacenamiento (O'Connor, Plowchalk, Van Pelt, Davis y Cook, 2000), sin embargo, las evidencias más actuales que datan del año 2011, mencionan que si bien, tras periodos crónicos de administración con ATR, ésta podría asociarse con adenocarcinomas y fibroadenomas de glándula mamaria, así como con tumores de hipófisis, al menos en ratas SD, no sería una prueba definitiva para determinar su poder carcinogénico, debido a que se sabe que las ratas hembra de esta estirpe

tienen altas tasas de antecedentes de tumores espontáneos de mama e hipófisis (Jowa y Howd, 2011); es por ello que, hasta la fecha no existen evidencias contundentes que demuestren una relación directa entre la exposición a ATR y cáncer.

En ratas Wistar se demostró que la ATR puede ser causa de genotoxicidad hepática tras una exposición a dosis repetidas (Campos-Pereira *et al.*, 2012); también se ha observado que genera daño al DNA en el bazo de ratones tratados durante 21 días con diferentes dosis y además, puede estar asociada con estrés oxidativo (Gao, Wang, Zhang, Jia y Zhang, 2016), como se reportó recientemente, en ratas SD una dosis de 50 mg ATR/kg durante 45 días consecutivos puede generar la acumulación o aumento de malondialdehído (MDA), un importante indicador de peroxidación lipídica, en conjunto con una disminución significativa de glutatión (GSH) en las neuronas de la sustancia nigra (SN) (Li, Li, Yao, Wu y Li, 2020); sólo por mencionar algunos de los muchos efectos ocasionados por la exposición a este plaguicida. En la Tabla 3 se detallan las condiciones experimentales para los estudios mencionados.

Tabla 3. Efectos de la atrazina en roedores para experimentación

Especie	Sexo	Dosis de ATR	Vía de administración	Duración	Tipo de estudio	Efecto	Fuente
Disruptor endocrino							
Rata	Hembra/Macho	10 - 50 µM	Medio de cultivo	30-60 min	<i>In vitro</i>	Aumenta concentraciones de AMPc en células hipofisarias de ratas hembra SD y células testiculares de Leydig de ratas macho Wistar, provocando la secreción de prolactina y andrógenos.	Kucka <i>et al.</i> (2012)
Rata	Macho	200 mg/kg	Intragástrica	7, 15 y 40 días	<i>In vivo</i>	Aumento transitorio del peso testicular, dilatación y atrofia de los túbulos seminíferos.	Martins-Santos <i>et al.</i> (2017)
Rata	Macho	200 mg/kg	Intragástrica	7, 15 y 45 días	<i>In vivo</i>	Dilatación luminal, reducción en la altura epitelial y alteraciones en la proliferación y apoptosis de las células epiteliales de los conductos eferentes. Aumento en la expresión de aromatasa.	Martins-Santos <i>et al.</i> (2018)
Ratón	Macho	0.1, 1, ó 10 mg/kg	Oral	21 días	<i>In vivo</i>	Reducción de la integridad de la membrana y funcionalidad mitocondrial de los espermatozoides.	Saalfeld <i>et al.</i> (2018)
Cancerígeno							
Ratón	Macho	0.26 mg/kg	Intraperitoneal	13 meses	<i>In vivo</i>	Linfoma de células plasmáticas y de tipo histiocítico.	Donna <i>et al.</i> (1986)
Rata	Hembra	10, 70, 200 ó 400 ppm	Oral	24 meses	<i>In vivo</i>	Aumento en la incidencia de tumores mamarios.	Wetzel <i>et al.</i> (1994)
Genotóxico							
Rata	Macho	400 mg/kg	Intragástrica	14 días	<i>In vivo</i>	Genotoxicidad hepática.	Campos-Pereira <i>et al.</i> (2012)
Ratón	Macho/Hembra	100, 200, ó 400 mg/kg	Intragástrica	21 días	<i>In vivo</i>	Daño al ADN en esplenocitos (aumento en la formación de la cola del cometa en el ADN ²⁺)	Gao <i>et al.</i> (2016)
Estrés oxidante							
Ratón	Macho/Hembra	100, 200, ó 400 mg/kg	Intragástrica	21 días	<i>In vivo</i>	Aumento en la expresión de genes para enzimas antioxidantes como HO-1 y Gpx1.	Gao <i>et al.</i> (2016)
Rata	Macho	50 mg/kg	Intragástrica	45 días	<i>In vivo</i>	Aumento de MDA y disminución de GSH en neuronas de la SN.	Li <i>et al.</i> (2020)

Debido a que el objeto del presente estudio es el tejido cerebral, la siguiente sección se ha destinado para describir detalladamente, algunos de los diferentes efectos tóxicos asociados a la administración de ATR en el SNC de roedores para experimentación.

2.4 Efectos de la atrazina en el sistema nervioso central de los roedores

La exposición a ATR y sus repercusiones en la salud del sistema nervioso central (SNC) han sido motivo de estudio durante muchos años, debido a que su naturaleza liposoluble le permite atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) (Foradori, Hanneman y Handa, 2009) generando efectos que aún siguen por descubrirse. En la Tabla 4 se presenta un resumen de los estudios que se describen a continuación.

2.4.1 Efectos conductuales por exposición a atrazina

En ratas SD la ATR se ha relacionado con hiperactividad asociada a la administración de dosis bajas (10 mg ATR/kg) durante un periodo de 12 meses (Bardullas, Giordano y Rodríguez, 2011; Chávez-Pichardo *et al.*, 2020) o hipoactividad cuando es administrada a dosis altas (100 mg ATR/kg) únicas o repetidas durante periodos cortos (Rodríguez *et al.*, 2013; Rodríguez, Mendoza-Trejo, Hernández-Plata y Giordano, 2017), aunque también, se asocia a hipoactividad cuando se administran 10 mg/ATR durante 6 meses (Walters, Lansdell, Lookingland y Baker, 2015); en ratones genera deficiencias en la memoria de reconocimiento (Lin, Dodd y Filipov, 2013), así como alteraciones en el aprendizaje y la memoria espacial (Li, Li, Bi, Ma y Li, 2018).

2.4.2 Efectos neuroquímicos por exposición a atrazina

En años recientes se ha comprobado que la ATR inhibe la captación de dopamina (DA) en vesículas sinápticas de sinaptosomas aislados de estriado de rata (Hossain y Filipov, 2008); además disminuye los niveles de la DA estriatal en las ratas a las que se les administró de manera crónica o con dosis repetidas (Bardullas *et al.*, 2011, Bardullas, Giordano y Rodríguez, 2013; Rodríguez *et al.*, 2013; Walters *et al.*, 2015); aunque después de 10 días de administración aumenta los niveles de DA,

ácido homovanílico (AHV) y ácido 5 – hidroxindoleacético (5-HIAA) en el estriado del ratón C57BL/6 (Lin *et al.*, 2013).

2.4.3 Hallazgos histopatológicos por exposición a atrazina

Hoy en día, las investigaciones en torno a los posibles efectos ocasionados en los tejidos de mamíferos por exposición a ATR han sido poco realizadas, siendo el tejido cerebral uno de los menos investigados hasta el momento; algunos estudios enfocados en la histopatología cerebral generada por la administración de diferentes dosis de ATR, se describen a continuación.

Una de las evidencias más antiguas en las que se demostró el efecto tóxico de este plaguicida en roedores, data del año de 1982, cuando Castano, Ferrario y Vizzotto, demostraron que la administración de 40 mg ATR/kg dos veces por semana durante 30 días, puede disminuir el grosor de las fibras desmielinizadas del nervio ciático en ratas de la estirpe SD.

Coban y Filipov (2007) emplearon ratones machos C57BL/6 para realizar la administración vía intragástrica de 25, 125 ó 250 mg/kg de ATR diariamente durante 14 días y demostraron que todas las dosis pueden generar una disminución de neuronas positivas a tirosina hidroxilasa (TH) en la sustancia nigra *pars compacta* (SNpc) después de 8 y 50 días de la última administración y que 5, 25, 125 ó 250 mg/kg de ATR durante el mismo periodo y bajo las mismas condiciones, generan una disminución en el número de neuronas TH positivas en el área tegmental ventral (ATV) después de 50 días de la última administración.

Además, también se ha demostrado que la administración de ATR a una dosis de 10 mg/kg durante un año, puede generar una disminución en el número de neuronas TH positivas en la SNpc (Bardullas *et al.*, 2013).

A su vez, la administración de 10, 50 ó 100 mg ATR/kg durante 3 meses, genera cambios neurodegenerativos en el estriado de rata, que se manifiestan con ensanchamiento de la cisterna perinuclear, marginación de la cromatina, cariólisis, condensación de cromatina, degeneración vacuolar y autofagia mitocondrial (Song, Li, Wu, Zhang y Li, 2015).

Además de causar alteraciones en el aprendizaje y la memoria espacial, la ATR administrada a dosis de 10 ó 100 mg/kg durante 30 días, puede modificar la ultraestructura del hipocampo, generando infiltración de citoplasma en las mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico, degeneración vacuolar mitocondrial y gránulos condensados de cromatina en el núcleo. Además, en el mismo estudio se demostró que este plaguicida genera una disminución estadísticamente significativa de células positivas al receptor de DA D1 (RDD1) en el giro dentado (GD) en comparación con el grupo control (Li *et al.*, 2018). En un estudio más reciente realizado por el mismo grupo de investigación, se demostró que la administración de 50 mg ATR/kg durante 45 días consecutivos puede generar degeneración nuclear y mitocondrial de las células del estriado de rata, que se manifiesta con hinchazón y degeneración vacuolar mitocondrial, membrana nuclear difusa y gránulos de cromatina concentrada (Li *et al.*, 2020).

En la Tabla 4 se presentan más detalles y condiciones experimentales para los estudios antes descritos.

2.4.4 Alteraciones de la neuroglia por exposición a atrazina

Hasta el momento se ha encontrado poca evidencia del efecto de la ATR en la homeostasis de la glía y a pesar de que, los hallazgos anteriormente descritos sugieren que este plaguicida es capaz de inducir cambios histopatológicos en las neuronas, poco se ha estudiado acerca de los efectos tóxicos de este herbicida sobre la neuroglia, implicada en enfermedades neurodegenerativas y lesiones cerebrales.

En el año 2015, Zhang, Ma y Li, realizaron un curso temporal, en el que determinaron los efectos de la administración de 25, 50 ó 100 mg ATR/kg durante 14 días consecutivos en ratas SD, estudiaron la morfología de la microglía residente de la SN y observaron que los efectos de este plaguicida pueden ser dependientes del tiempo y de la dosis, ya que, las dosis altas administradas durante tiempos prolongados, mostraron que las células microgliales presentaron un fenotipo activado con cuerpos celulares esféricos y pequeños, procesos celulares

engrosados y marcaje positivo a ED – 1 (anticuerpo contra CD68, un antígeno que se expresa en macrófagos y se utiliza para marcar microglía fagocítica).

Por otro lado, en el año 2018, Li y colaboradores evaluaron *in vitro* el efecto tóxico del herbicida paraquat (PQ) en astrocitos humanos y determinaron que éste aumenta la expresión del marcador de astrogliosis, la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), lo que indica que el PQ podría contribuir en la activación de los astrocitos y en la astrogliosis, como se observa en diversas condiciones patológicas cerebrales (Li *et al.*, 2018). Lo que sugiere la posibilidad de que la ATR al ser un herbicida, también pueda participar en la activación de estas células.

Según las evidencias anteriores, es necesario tener en cuenta que muchos de los efectos de la ATR a nivel de SNC están asociados con el sistema dopaminérgico, sugiriéndolo como posible blanco de los efectos tóxicos de este plaguicida, siendo el tejido de la SN el objeto del presente estudio, por lo que, a continuación, se hace una pequeña semblanza del sistema dopaminérgico.

Tabla 4. Efectos de la atrazina en el sistema nervioso central de roedores para experimentación

Especie	Sexo	Dosis de ATR	Vía de administración	Duración	Efecto	Fuente
Efectos conductuales						
Rata	Macho	10 mg/kg	Oral	1 año	Hiperactividad; disminución en la coordinación motora.	Bardullas <i>et al.</i> (2011)
Rata	Macho	100 mg/kg	Intraperitoneal	14 días	Hipoactividad que se manifestó con menor distancia recorrida total, menor actividad vertical, horizontal o estereotipias.	Rodríguez <i>et al.</i> (2013)
Ratón	Macho	5, 25, 125 ó 250 mg/kg	Oral	10 días	Hipoactividad; rendimiento deteriorado en prueba de reconocimiento de nuevo objeto.	Lin <i>et al.</i> (2013)
Rata	Macho	100 µg ó 10 mg/kg	Placentaria, lactancia, Intragástrica	Gestacional; lactancia; 6 meses.	Actividad horizontal disminuida; ansiedad (prueba de caja luz-oscuridad).	Walters <i>et al.</i> (2015)
Rata	Macho	100 mg/kg	Intraperitoneal	Única inyección	Hipoactividad que se manifestó con disminución de la distancia total recorrida y actividad vertical.	Rodríguez <i>et al.</i> (2017)
Rata	Macho	10 ó 100 mg/kg	Intragástrica	30 días	Alteraciones en memoria espacial (disminución del número de cruces y tiempo de permanencia en el cuadrante en Laberinto Acuático de Morris).	Li <i>et al.</i> (2018)
Efectos neuroquímicos						
Rata	Macho	10 mg/kg	Oral	1 año	Disminución de la DA estriatal.	Bardullas <i>et al.</i> (2011, 2013)
Ratón	Macho	5, 25, 125 ó 250 mg/kg	Intragástrica	14 días	Aumento estriatal de DA, HVA y 5-HIAA	Lin <i>et al.</i> (2013)
Rata	Macho	100 µg ó 10 mg/kg	Placentaria, lactancia, Intragástrica	21 días (gestacional)	Disminución en los niveles de DA y DOPAC estriatal.	Walters <i>et al.</i> (2015)
Rata	Macho	100 mg/kg	Intraperitoneal	14 días	Disminución en los niveles estriatales de DA, DOPAC, y HVA.	Rodríguez <i>et al.</i> (2013)
Efectos histológicos						
Rata	Macho	20 ó 40 mg/kg	Intraperitoneal	30 días	Disminución del grosor de las fibras desmielinizadas del nervio ciático.	Castano <i>et al.</i> (1982)
Ratón	Macho	5, 25, 125 ó 250 mg/kg	Intragástrica	14 días	Disminución del número de neuronas TH + en la SNpc y en el ATV.	Coban y Filipov (2007)
Rata	Macho	10 mg/kg	Oral	1 año	Disminución del número de neuronas TH + en la SNpc.	Bardullas <i>et al.</i> (2013)
Rata	Macho	10, 50 ó 100 mg/kg	Intragástrica	3 meses	Neurodegeneración en el núcleo estriado	Song <i>et al.</i> (2015)
Rata	Macho	25, 50 ó 100 mg/kg	Intraperitoneal	14 días	Activación de la microglía residente de la SN, en las dosis más altas y tiempos de administración prolongados.	Zhang <i>et al.</i> (2015)
Rata	Macho	10 ó 100 mg/kg	Intragástrica	30 días	Modificación de la ultraestructura hipocampal; disminución de células del GD + al receptor de dopamina D1.	Li <i>et al.</i> (2018)
Rata	Macho	50 mg/kg	Intragástrica	45 días	Degeneración nuclear y mitocondrial de las células del estriado (hinchazón y degeneración vacuolar mitocondrial, membrana nuclear difusa, gránulos de cromatina concentrada).	Li <i>et al.</i> (2020)

2.5 Sistema dopaminérgico

2.5.1 Síntesis de dopamina

Las catecolaminas como la DA, la adrenalina (A) y la noradrenalina (NA) son moléculas formadas por un grupo catecol y una cadena de etilamina o sus derivados, estas actúan como neurotransmisores (NTS) en el sistema nervioso de los mamíferos, siendo la DA uno de los NTS más importantes a nivel cerebral. La síntesis de DA se lleva a cabo en las terminales nerviosas en las que existen las enzimas TH y DOPA descarboxilasa (DDC). La hidroxilación de la L – tirosina es un punto de regulación para la síntesis de catecolaminas en el SNC, en consecuencia, la TH se considera como la enzima limitante para la síntesis de la

DA, la A y la NA. La TH está presente principalmente en el citosol de las terminales catecolaminérgicas, es una oxidasa, que tiene por sustratos a la L – tirosina y al oxígeno y utiliza a tetrahidrobiopterina (BH₄) y hierro como cofactores, adicionando un grupo hidroxilo a la L – tirosina para formar L – DOPA; después la DDC, una enzima dependiente de piridoxina, cataliza la eliminación del grupo carboxilo desde la L – DOPA para formar DA, como se muestra en la Figura 6. La DA se sintetiza principalmente en las neuronas de la SN del mesencéfalo (MC) ventral, que proyecta hacia el núcleo caudado (Cd) y el putamen (Pt) y en el ATV, que envía aferencias hacia el núcleo accumbens (Acc) (Brady, Siegel, Albers y Price, 2005).

2.5.2 Receptores dopaminérgicos

Existen cinco subtipos de receptores para DA (D1 – D5), los cuales forman parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, que se caracterizan por poseer siete dominios transmembrana, son hidrófobos y presentan un extremo amino extracelular y un carboxilo intracelular.

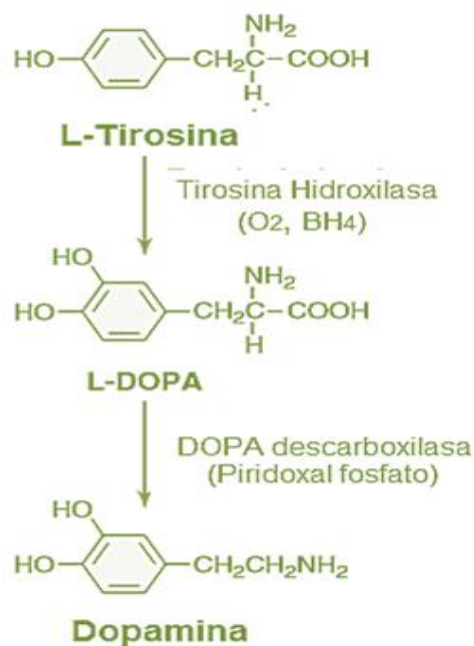


Figura 6. Síntesis de dopamina. BH₄: tetrahidrobiopterina (modificada de Brady, Siegel, Albers y Price, 2005).

Los receptores dopaminérgicos han sido clasificados según su afinidad farmacológica a diferentes drogas y por el tipo de subunidad α de la proteína G a la que están acoplados, así se tienen dos clasificaciones: los similares a D1, que incluye a los subtipos D1 y D5 y que tiene una alta afinidad a las benzodiazepinas y están acoplados a una proteína G α_s , lo que promueve la estimulación de la adenilato ciclasa, aumentando la producción de AMP_c y con ello la activación de la proteína cinasa A (PKA) y los receptores de tipo D2, que incluye a los subtipos D2, D3 y D4, que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa a través de una G α_i (para más detalles ver Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación y distribución de los receptores dopaminérgicos

	Similares a D1		Similares a D2		
Subtipo de receptor	D1	D5	D2	D3	D4
Efecto de activación	↑ AMP _c	↑ AMP _c	↓ AMP _c	↓ AMP _c	↓ AMP _c
Distribución	Caudado / putamen, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, corteza cerebral.	Hipocampo, hipotálamo, corteza cerebral.	Caudado / putamen, núcleo accumbens, mesencéfalo.	Tubérculo olfatorio, hipotálamo.	Corteza frontal, médula, mesencéfalo, núcleo accumbens.

2.5.3 Vías dopaminérgicas

2.5.3.1 Vía nigroestriatal

Los ganglios basales (estriado, globo pálido, SN y núcleo subtalámico) son núcleos de somas neuronales bien definidos, tanto en su forma anatómica como funcional y que se localizan en la profundidad del telencéfalo, diencefalo y MC. En el modelo clásico del funcionamiento de los ganglios basales, pueden categorizarse como: núcleos de entrada (estriado), núcleos de salida, globo pálido interno (GPi) y sustancia nigra *pars reticulata* (SNpr) y núcleos intrínsecos, globo pálido externo (GPe) y núcleo subtalámico (NST). El estriado recibe aferencias excitatorias glutamatérgicas, provenientes de la corteza motora primaria, motora suplementaria, pre – motora, somatosensorial y de los campos oculares frontales; tales aferencias

hacen sinapsis con las neuronas espinosas medianas del estriado, las cuales proyectan con los núcleos de salida e intrínsecos a través del NT ácido γ – aminobutírico (GABA). Basalmente los núcleos de salida (GPi y SNpr) se encuentran inhibiendo a los núcleos talámicos ventral anterior (NVA) y al ventral lateral (NVL) por medio de GABA, por lo que, el tálamo es incapaz de excitar a la corteza y, por lo tanto, al movimiento (Ospina-García, Pérez-Lohman, Vargas-Jaramillo, Cervantes-Arriaga y Rodríguez-Violante, 2017).

Vía directa

Cuando se planea un movimiento de forma voluntaria, la corteza envía esta información al núcleo estriado y es así como las neuronas espinosas medianas de la vía directa inhiben al GPi y a la SNpr, que de manera basal inhiben al tálamo, desinhibiéndolo y, por lo tanto, éste puede excitar a la corteza, para que finalmente se ejecute el movimiento por la vía corticoespinal (Ospina-García *et al.*, 2017).

Vía indirecta

Las neuronas espinosas medianas de la vía indirecta envían aferencias al GPe, que de manera tónica inhibe al NST, sin embargo, una vez que se desinhibe, sus aferencias excitatorias al GPi y a la SNpr se activan, generando una mayor inhibición sobre el tálamo, lo que da como resultado, la inhibición de los movimientos antagónicos al deseado. Ambas vías están facilitadas por la DA, la cual está presente en las neuronas de la SNpc. Las neuronas espinosas medianas del estriado expresan receptores dopaminérgicos de tipo D1, que cuando son ocupados por DA promueven la función de la vía directa. Por otro lado, las neuronas espinosas medianas de la vía indirecta expresan receptores de tipo D2, que al unirse a DA inhiben a la vía indirecta, siendo el resultado neto de la DA, la facilitación del movimiento (Ospina-García *et al.*, 2017).

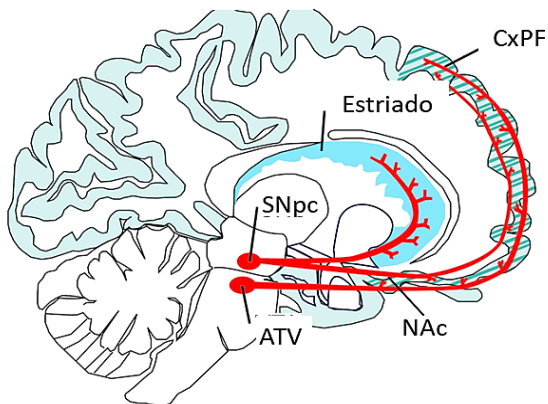
2.5.3.2 Vía Mesolímbica

La vía mesolímbica es considerada un componente clave del circuito de recompensa. Esta vía se origina con los somas de neuronas dopaminérgicas del ATV, que envían sus proyecciones principalmente al Acc, ubicado en el estriado

ventral, sin embargo, también existen aferencias hacia la amígdala, el núcleo del lecho de la estría terminal, el área septal lateral y el hipotálamo lateral, por lo que, la experiencia de la recompensa es concomitante con la activación de la vía dopaminérgica mesolímbica. El ATV también tiene aferencias que proyectan hacia determinadas regiones de la corteza prefrontal (CPF), como la corteza orbitofrontal y el cíngulo anterior (vía mesocortical) (Adinoff, 2004).

En la Figura 7 se presentan las principales proyecciones de las vías dopaminérgicas más importantes en el cerebro humano y el murino.

Primate (humano)



Rata

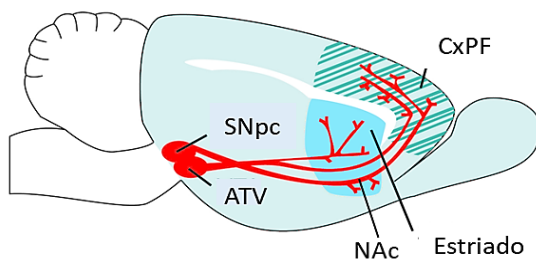


Figura 7. Vías dopaminérgicas. Las vías dopaminérgicas más importantes del cerebro mamífero son las que proyectan desde la sustancia nigra *pars compacta* (SNpc) hacia el cuerpo estriado (vía nigroestriatal) y aquellas que mandan sus aferencias desde el área tegmental ventral (ATV) principalmente hacia el núcleo accumbens (Acc) (vía mesolímbica). El ATV también tiene proyecciones hacia áreas de la corteza prefrontal (CPF), como la corteza orbitofrontal y el cíngulo anterior (vía mesocortical). En la imagen se observa la comparación anatómica de las vías entre el primate humano y la rata. Las proyecciones dopaminérgicas se observan en color rojo (modificada de Puig, Rose, Schmidt y Freund, 2014).

2.5.4 Mesencéfalo

El MC o cerebro medio es una estructura que forma parte del tallo cerebral, presenta una región ventral (tegmento) y una dorsal (techo), delimitada por el acueducto mesencefálico. La porción dorsal o techo está formada en gran parte por los colículos superiores e inferiores (tubérculos cuadrigéminos), mientras que la región ventral está delimitada por las fibras del pie peduncular. En la porción caudal, el colículo inferior forma parte de la proyección auditiva ascendente, mientras que el

colículo superior de la región rostral forma parte del sistema visual. El acueducto mesencefálico está localizado ventral a los colículos, discurre a lo largo del MC y está rodeado por la sustancia gris periacueductal. A nivel del colículo inferior, la región central del tegmento presenta los pedúnculos cerebelosos superiores originados en el cerebelo; por su parte, a nivel del colículo superior, la porción central del tegmento está ocupada por el núcleo rojo. En la porción más ventral del tegmento mesencefálico se encuentra la SN, que se divide en una porción compacta, compuesta por neuronas pigmentadas que contienen neuromelanina (pigmento de naturaleza antioxidante que se forma durante la síntesis de DA) y que sintetizan DA, las cuales proyectan hacia el Cd y el Pt (vía nigroestriatal); la otra porción no pigmentada, se conoce como reticular y se considera homóloga al globo pálido medial (GPm). En la región ventral a la SN se encuentra el pie peduncular, compuesto totalmente por fibras descendentes corticales (corticonucleares bulbares, corticoespinales y corticopontinas), que provienen de los hemisferios cerebrales. En el MC ventral también se encuentra el ATV, limitada rostralmente por los cuerpos mamilares del hipotálamo, dorsolateralmente por el núcleo rojo, caudalmente por la protuberancia y lateralmente por la SN; el ATV tiene diversas proyecciones a estructuras corticales y subcorticales, que constituyen a la vía mesolímbica (Crossman, Neary y Frpc, 2007).

2.5.5 Sustancia nigra

La SN es una estructura dopaminérgica del MC ventral de los mamíferos (incluida la rata), que está involucrada en la modulación de los movimientos y en funciones asociadas con la recompensa como parte del circuito de los ganglios basales, un grupo de núcleos subcorticales interconectados, siendo la SN la entrada principal en el circuito y por ello, un elemento esencial para estas funciones. Así pues, cuando uno de estos núcleos subcorticales sufre algún daño, como en la neurodegeneración asociada a la EP, pueden producirse diversas afecciones neurológicas. La SN ha sido subdividida morfológica y funcionalmente en dos regiones principales: *pars compacta* y *pars reticulata*, en donde, según su naturaleza neuroquímica se han identificado dos tipos de neuronas: 1)

dopaminérgicas, que se encuentran principalmente en la SNpc, que se caracteriza por ser una zona densa de neuronas que forman la parte dorsal de la SN y que envían sus proyecciones al cuerpo estriado, al putamen y a los núcleos caudados y 2) GABAérgicas, que se localizan principalmente en la SNpr y proyectan principalmente al tálamo, al colículo superior y al núcleo pedunculopontino (Sonne y Beato, 2018).

2.5.5.1 Histología de la sustancia nigra

Con base en sus características citológicas, Poirier, Giguère y Marchand (1983) identificaron cuatro tipos diferentes de neuronas en la SN de la rata: compactas, reticulatas, intermedias y globulares, las cuales se describen a continuación.

Neuronas tipo compacta: la forma de este tipo de neuronas es muy diversa, desde triangular, fusiforme, piramidal, poligonal, ovoide o con una apariencia "regordeta". Poseen gran cantidad de sustancia de Nissl distribuida irregularmente, en forma de parches, remolinos o senderos en todo el citoplasma neuronal y a veces en la parte proximal de las dendritas gruesas. Los cuerpos de Nissl no se observan bien delimitados o definidos y generalmente se ubican en dos polos del núcleo ovalado, o en tres en el caso de las neuronas triangulares, aunque también pueden disponerse como condensaciones en forma de cono (la base situada sobre la membrana nuclear) o placa, los cuales están teñidos intensamente y que pueden observarse en la parte proximal de las dendritas. En el citoplasma, la sustancia de Nissl puede organizarse en forma de hebras fuertemente cromófilas que contrastan con el citoplasma claro. El núcleo de estas neuronas es

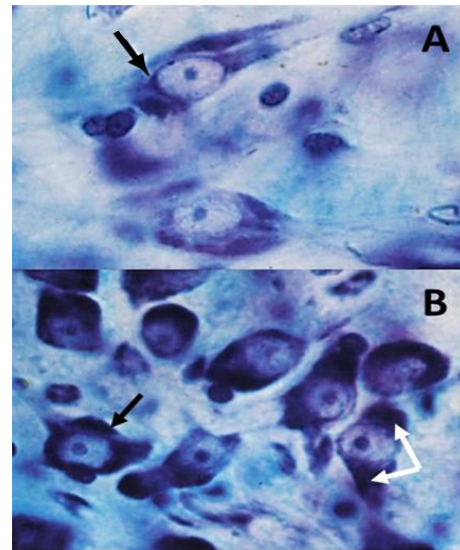


Figura 8. Neuronas tipo compacta. Sustancia nigra de rata teñida con cresil violeta (100x). En A, la flecha indica la disposición en forma de cono (base situada en la membrana nuclear) de la sustancia de Nissl. En B, se observan neuronas con la sustancia de Nissl intensamente teñida, ubicada en dos polos (flechas blancas) o alrededor de la membrana nuclear (flecha negra) (modificada de Poirier *et al.*, 1983).

relativamente grande y pálido, se ubica excéntricamente en el soma, tan cerca de la membrana celular que ésta puede llegar a abultarse, además presenta un solo nucleolo oscuro, también situado excéntricamente. En neuronas alargadas o fusiformes el núcleo puede presentar forma ovalada y ubicarse en el centro. La cromatina nuclear suele estar estrechamente relacionada a la membrana nuclear o en forma de elementos largos cromófilos y fibrosos extendidos a través del núcleo. El diámetro de estas neuronas oscila en 17.2 μm . En la Figura 8 se presentan dos microfotografías en las que se observan este tipo de células.

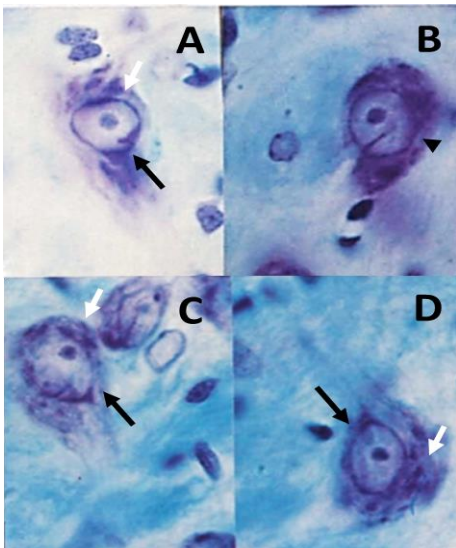


Figura 9. Neuronas tipo reticulata. Sustancia nigra de rata teñida con cresil violeta (100x). En A, B y D se observan los cuerpos de Nissl bien definidos, que dan el aspecto atigrado característico de este tipo celular (flechas blancas) y la sustancia de Nissl dispuesta en forma de cono (flechas negras). En B, se presenta una neurona con núcleo central, nucleolo prominente y con gran cantidad de sustancia de Nissl dispuesta alrededor del núcleo (punta de flecha) (modificada de Poirier *et al.*, 1983).

Neuronas tipo reticulata: suelen ser multipolares, triangulares u ovoides; éstas contienen gran cantidad de sustancia de Nissl (no se observa tan oscura como en las neuronas compactas), que se distribuye principalmente alrededor del núcleo y que constituye cuerpos de Nissl bien definidos que dan un aspecto atigrado, típico de estas neuronas. La sustancia de Nissl tiene forma de cono y se condensa por toda la membrana nuclear. El núcleo, generalmente se ubica en el centro, con un único nucleolo prominente y grupos de cromatina. Las dendritas gruesas de estas neuronas no contienen cuerpos de Nissl. El tamaño de estas células es superior al de las compactas, siendo de 20 μm aproximadamente. En la Figura 9 se presentan ejemplos de este tipo de neuronas.

Neuronas tipo intermedio: son de forma alargada, triangular, fusiforme o raramente, poligonal; su citoplasma es comúnmente cromático con parches más oscuros. Sus procesos son delgados; su núcleo es normalmente ovalado, oscuro (más que el de las neuronas compactas y reticulatas) y se ubica excéntricamente. Su diámetro medio oscila en 16 μm , es decir, son más pequeñas que los otros dos tipos neuronales antes descritos. En la Figura 10 se pueden observar algunas de las características morfológicas estas células neuronales.

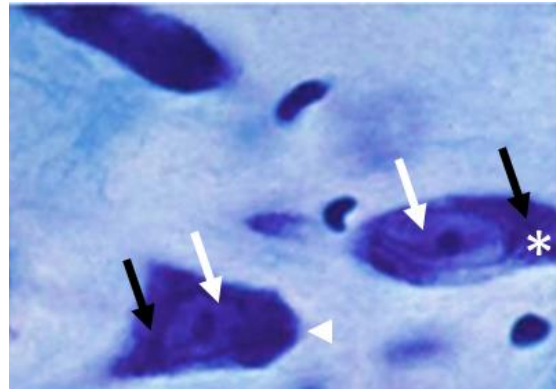


Figura 10. Neuronas tipo intermedio. Sustancia nigra de rata teñida con cresil violeta (100x). Se observan neuronas con núcleo (flechas blancas) y citoplasma (flechas negras) intensamente teñidos. La punta de flecha señala una neurona con forma poligonal y el asterisco una con forma alargada (modificada de Poirier *et al.*, 1983).

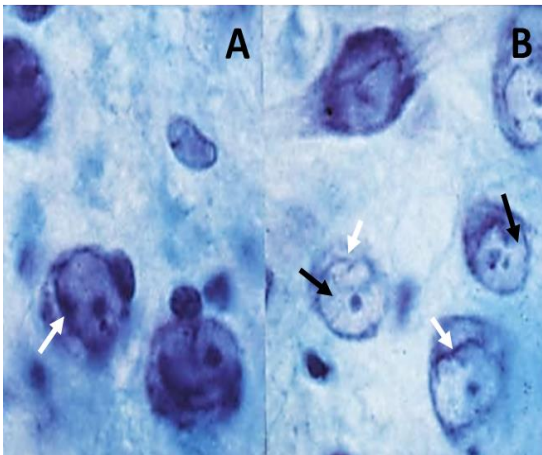


Figura 11. Neuronas tipo globular. Sustancia nigra de rata teñida con cresil violeta (100x). Se observan neuronas cromáticas (A) y acromáticas (B) con núcleo ligeramente teñido (flechas negras) y escaso citoplasma. En este tipo neuronal es normal observar pliegues en la membrana celular (flechas blancas) (modificada de Poirier *et al.*, 1983).

Neuronas tipo globular. Estas células presentan un núcleo claro rodeado por una cantidad muy pequeña de citoplasma ligeramente teñido (acromáticas). La membrana nuclear, así como la cromatina nuclear pueden presentar pliegues. Específicamente en la rata, la SN presenta también neuronas globulares ligeramente cromáticas. En general, el tamaño promedio de este tipo neuronal es de 12.1 μm . La Figura 11 muestra ejemplos de neuronas de tipo globular.

La distribución de los diferentes tipos celulares a lo largo de la sustancia nigra varía de acuerdo con la región de corte a lo largo del núcleo, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Distribución rostrocaudal de los cuatro tipos neuronales en la sustancia nigra de la rata (modificado de Poirier *et al.*, 1983)

Distribución rostrocaudal de los cuatro tipos de neuronas en la sustancia nigra de la rata				
	Compacta	Reticulata	Intermedia	Globular
Cuarto rostral	26%	22%	9%	9%
Segundo cuarto	48%	48%	40%	25%
Tercer cuarto	18%	25%	35%	48%
Cuarto caudal	8%	5%	16%	18%

Cabe mencionar que, de los cuatro tipos neuronales, el compacta es el más abundante en la sustancia nigra (44%), seguido del globular (28%), reticulata (14%) e intermedio (14%).

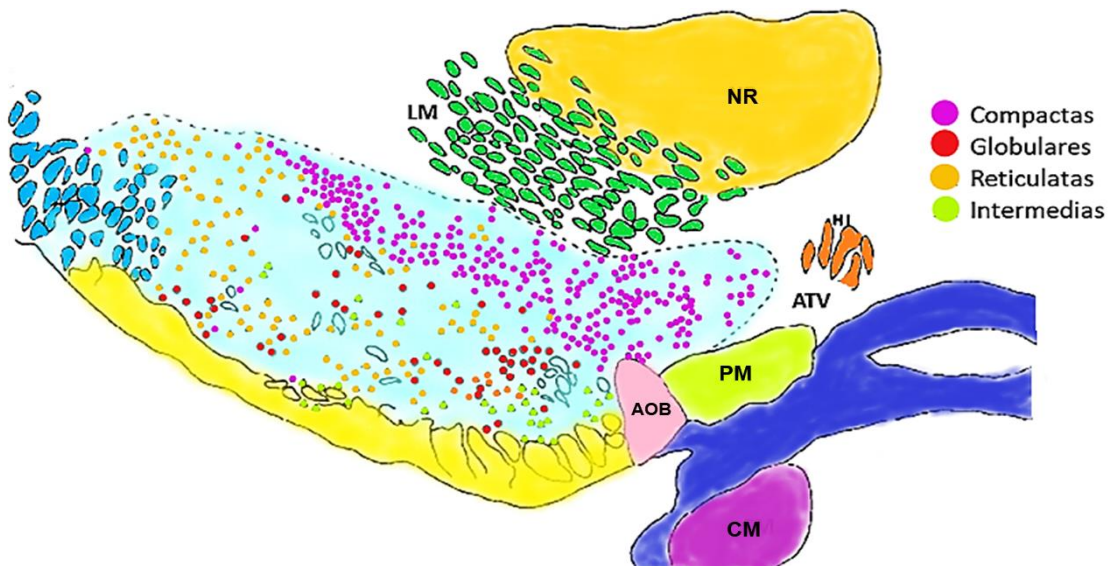


Figura 12. Distribución esquemática de los cuatro tipos neuronales en la sustancia nigra de la rata. AOB: núcleo del tracto óptico accesorio; ATV: área tegmental ventral; CM: cuerpo mamilar; HI: tracto habenulo – interpeduncular; LM: lemnisco medial; NR: núcleo rojo; PM: pedúnculo mamilar (modificada de Poirier *et al.*, 1983).

Debido a que, en la SN no solamente existen poblaciones de neuronas, se considera necesario destinar una sección a las células de la neuroglia, ya que éstas

participan de manera activa con las neuronas y su homeostasis también podría verse afectada como consecuencia de la exposición a algún tóxico ambiental.

2.6 Neuroglia

Anterior a lo que se pensó durante muchos años, hoy las células gliales no son conocidas sólo por proporcionar una fuente de soporte a las neuronas en el cerebro y en la médula espinal, sino más bien, se les reconoce un papel importante en la fisiología, metabolismo y desarrollo del cerebro e incluso, se sabe que están involucradas en enfermedades neurológicas. Actualmente, diversos estudios han demostrado que estas células controlan la formación de sinapsis, pueden responder a estímulos sensoriales

(con aumentos relevantes de calcio intracelular) (Schummers, Yu y Sur, 2008), además de estar acopladas metabólicamente a las neuronas y proporcionarles lactato como fuente de energía e incluso, pueden ofrecer apoyo metabólico a los axones, permitiendo una transmisión nerviosa adecuada, ya que también participan en la mielinización de los mismos, mantienen la homeostasis de algunos iones como el potasio (K^+) y están involucradas en la recaptación de NTS (Waxman, 2010; Herculano-Houzel, 2014), sin dejar de lado sus importantes funciones inmunológicas, como la regulación de la neuroinflamación, detectan e integran señales de daño neuronal, liberan citocinas y quimiocinas, atraen células inmunitarias y proliferan en los sitios de daño neuronal (Dong y Benveniste, 2001; Xu, Lu, Shao, Zhang y Zhang, 2020), entre otras. De manera general las células gliales se clasifican en dos grandes grupos, la macroglia que incluye a los astrocitos, oligodendrocitos y células endodimales y la microglia (Dong y Benveniste, 2001).

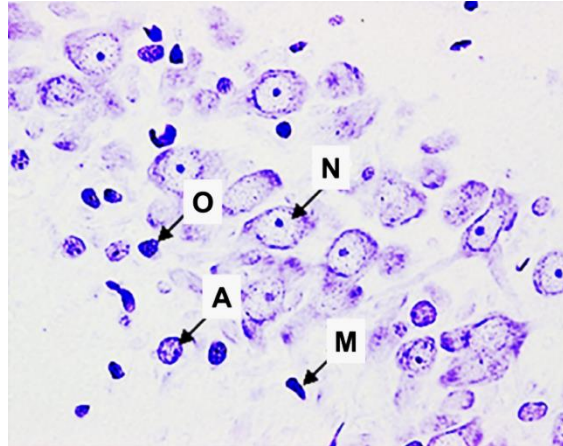


Figura 13. Células de la glía. Tinción cresil violeta (40x). Poblaciones celulares en el hipocampo de rata. N: neuronas, A: astrocitos, M: microglia, O: oligodendrocitos (modificada de Zhu, Liu, Zou y Torbey, 2015).

2.6.1 Macrogliá

La macrogliá incluye a los astrocitos y oligodendrocitos, los cuales, a diferencia de las neuronas tienen la capacidad de proliferar bajo ciertas condiciones.

Astrocitos: son células que tienen funciones muy diversas en el SNC, forman parte de la BHE y además contribuyen en el mantenimiento de la integridad de la misma (debido a que liberan factores solubles que inducen la formación de uniones estrechas entre las células endoteliales) (Rubin y Staddon, 1999), la absorción y el reciclaje de glutamato y GABA, el mantenimiento del medio iónico extracelular (a través de la absorción de iones K^+ liberados durante la actividad neuronal), así como soporte metabólico neuronal, proveen de apoyo estructural al tejido nervioso y guían la migración neuronal durante el desarrollo (Garman, 2010; Waxman, 2010), aunque una de las funciones más relevantes es que proliferan (astrocitos) cuando el tejido ha sido dañado, para contribuir en la supervivencia neuronal, por medio de la producción de factores de crecimiento y neurotrofinas, o bien, esta proliferación también puede ser responsable de la formación de cicatrices gliales (Dong y Benveniste, 2001). Para cumplir con las funciones más importantes, los astrocitos proyectan sus prolongaciones citoplasmáticas hacia la superficie membranal de las neuronas (soma, axones, dendritas y sinapsis) y rodean los vasos sanguíneos, también recubren la superficie del cerebro y médula espinal, por debajo de la piamadre. Los astrocitos a su vez han sido clasificados como: *protoplásmicos* y *fibrosos*; los primeros presentan proyecciones citoplasmáticas que se ramifican y están ubicados en las regiones de la sustancia gris y por su parte, los *fibrosos* tienen proyecciones que rara vez se ramifican y que al contrario de los protoplásmicos se localizan en la sustancia blanca. En la sustancia gris los núcleos de estas células se ubican muy cerca de las neuronas, pero pueden encontrarse en cualquier lugar del neuropilo. Los núcleos de los astrocitos generalmente tienen patrones de cromatina pálida, finamente granular y nucleolos relativamente pequeños o indistintos, sin embargo, en procesos de astrocitosis reactiva el citoplasma suele ser más prominente, el núcleo se observa más grande y generalmente tiene una

posición excéntrica y ocasionalmente pueden aparecer binucleados (Garman, 2010; Waxman, 2010).

Oligodendrocitos: se encuentran principalmente en la sustancia blanca y forman vainas de mielina compacta que pueden rodear a los axones de varias neuronas al mismo tiempo, a diferencia de sus homólogos, las células de Schwann que en el sistema nervioso periférico (SNP) forman una vaina de mielina que envuelve únicamente a un axón a la vez (Waxman, 2010). En la sustancia blanca están dispuestos en filas lineales entre las fibras nerviosas, mientras que, en la sustancia gris se ubican en la proximidad del soma neuronal, conocidos como "células satélites", aunque cabe mencionar que el número de células asociadas a las neuronas variará de una región cerebral a otra (Garman, 2010; Waxman, 2010).

2.6.2 Microglia

La microglia es un grupo de células inmunocompetentes y fagocíticas del sistema nervioso, que además participan en la poda sináptica durante el desarrollo y en la modulación de las sinapsis en condiciones de normales y patológicas. Se caracterizan por poseer núcleos alargados o en "forma de cigarro", compuestos principalmente de heterocromatina y que pueden ser confundidos con núcleos de células endoteliales. Las células de la microglía actúan como centinelas que detectan y fagocitan a los invasores, como las bacterias. Cuando existe una lesión o infección en la médula espinal o en el cerebro, estas células se activan y migran para retirar los desechos celulares y aunque se encuentran de manera habitual en el SNC, cuando existe un daño pueden ingresar a través de los vasos sanguíneos (Garman, 2010; Waxman, 2010; Jäkel y Dimou, 2017).

III. Justificación

Las alteraciones histológicas en mamíferos generadas por la administración crónica de ATR aún no han sido del todo estudiadas y aunque existen reportes de hallazgos histopatológicos en diferentes tejidos por exposición aguda o subcrónica en diferentes especies animales, los efectos en el tejido cerebral después de un

periodo de administración crónica siguen siendo los menos estudiados, por ello se consideró necesario emplear técnicas que proporcionarán información completa acerca de la posible inflamación, astrocitosis, neurodegeneración o cambios morfológicos en el tejido cerebral de la rata SD, específicamente en la SN y su posible correlación con alteraciones en la actividad locomotora, debido a que, como se mencionó con anterioridad y con base en la literatura, el sistema dopaminérgico apunta como posible blanco de los efectos tóxicos de la ATR.

IV. Hipótesis

Hipótesis 1

La exposición crónica a ATR genera cambios en la morfología celular, neurodegeneración, inflamación o astrocitosis en la SN de la rata albina SD.

Hipótesis 2

La exposición crónica a ATR genera alteraciones locomotoras en la rata albina SD.

V. Objetivos

5.1 Objetivo general

Identificar cambios histopatológicos en la SN tras la exposición crónica a ATR y su posible correlación con alteraciones en la coordinación motora y en la actividad locomotora espontánea de la rata albina SD.

5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1 Evaluar la actividad locomotora espontánea y la coordinación motora para identificar posibles alteraciones durante el periodo de administración con ATR.
- 5.2.2 Examinar e identificar alteraciones histopatológicas en la SN tras un periodo de administración crónica empleando la tinción de Nissl.
- 5.2.3 Identificar y cuantificar células en proceso de neurodegeneración en la SN, mediante el uso del marcador fluoro jade C.

5.2.4 Examinar la SN mediante técnicas inmunohistoquímicas, con la finalidad de identificar alteraciones en el número de microglías y/o astrocitos en áreas con posible daño celular.

VI. Materiales y métodos

En la Figura 14 se resume la estrategia experimental utilizada, en donde se presentan los procedimientos experimentales y los tiempos de evaluación o realización para cada uno de ellos, los cuales se describen con detalle a lo largo de esta sección.

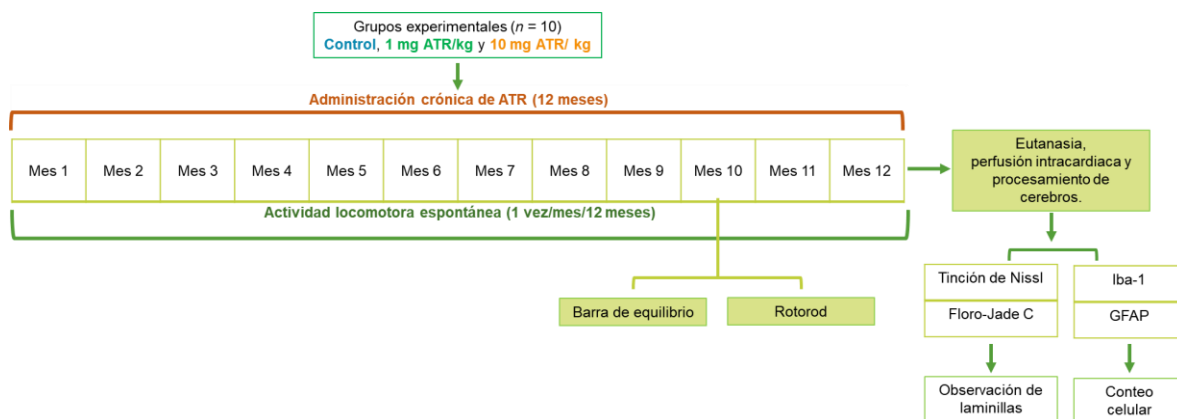


Figura 14. Estrategia experimental. ATR: atrazina; Iba1: proteína adaptadora de unión a calcio ionizada 1; GFAP: proteína ácida fibrilar glial.

6.1 Modelo experimental

Se emplearon ratas de la estirpe Hds: SD de 20 – 22 días de edad, machos, de 35 a 50 gramos de peso, libres de patógenos específicos (LPE), provenientes de la Barrera Envigo No. 650 de la Ciudad de México (Centro UNAM – Envigo). Los animales fueron pesados semanalmente; inicialmente, su peso se llevó hasta los 300 ± 10 gramos y así se mantuvieron a lo largo de todo el periodo experimental, con la finalidad de controlar su peso y con ello la dosis y la cantidad de alimento administrada.

Los animales fueron alojados de manera individual en cajas de acrílico, en un cuarto con las siguientes condiciones, fotoperiodo invertido (12 h luz/12 h oscuridad), a una temperatura de 18 a 21 °C, con 15 a 18 recambios de aire por hora.

Se emplearon 30 ratas que fueron asignadas al azar en 3 grupos experimentales: grupo control (Ctrl), grupo 1 mg ATR/kg de peso (1 mg ATR) y grupo 10 mg ATR/kg de peso (10 mg ATR), con una *n* igual a 10 cada uno (los detalles de la administración se presentan más adelante).

Los animales fueron alimentados diariamente con una única ración (alimentación restringida, para favorecer que se terminaran diariamente el alimento intoxicado), proporcionada con base a su peso corporal y en función al grupo experimental al que pertenecían, como se explicará más adelante. El agua se ofreció *ad libitum*.

Todos los procedimientos de manejo y experimentación se hicieron bajo los estándares establecidos en la NOM – 062 – ZOO – 1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” y la Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook (NIH Publicación 80 – 23, Bethesda, MD, USA, 1996); además, el proyecto experimental fue aprobado por el comité interno para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) del Instituto de Neurobiología, UNAM (protocolo núm. 21).

6.1.1 Administración crónica de ATR

Los animales fueron alimentados diariamente a la misma hora (15:00 h) durante un periodo de 12 meses. El grupo control se alimentó con pellets de la marca comercial LabDiet 5001, el grupo 1 mg ATR y 10 mg ATR con alimento que se hizo a base de pellets LabDiet 5001 con una concentración de 30 ó 300 mg de ATR por kilogramo de peso, respectivamente.

6.1.2 Preparación de alimento

De manera semanal, se pesó un kilogramo de pellets (Rodent LabDiet 5001) que se dejó remojando en agua desionizada durante una noche. Al día siguiente los pellets se homogenizaron con 30 ó 300 mg de ATR (A1650; TCI America, Portland, OR, USA) por kilogramo de alimento, así se administró a los animales con 1 ó 10

mg de ATR por kilogramo de peso vivo, respectivamente. Después de que se homogenizó el alimento húmedo con ATR, se hicieron galletas que se secaron en un horno a 80 °C durante una noche, cabe mencionar que la temperatura de degradación de la ATR es de 250 °C (Stojanovic, Hutto, Kennedy y Shuman, 1972). Al día siguiente se dejaron enfriar y se mantuvieron en cajas herméticas hasta su uso.

6.2 Pruebas conductuales

6.2.1 Actividad locomotora espontánea

La actividad locomotora espontánea (ALE) también conocida como campo abierto, se evaluó durante un periodo de 12 meses. Una vez al mes las ratas se colocaron de manera individual en cámaras automatizadas de actividad locomotora [Digiscan Animal Activity Monitors, Accusan Inc. (Columbus, Ohio, USA)]; cada cámara consistió en una caja de acrílico transparente, de 40 x 40 x 30 cm, equipada con rayos infrarrojos verticales y horizontales activados por el movimiento de los animales. Cada registro duró 25 horas, la primera se consideró como un periodo de exploración del nuevo ambiente. Durante el registro se proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

Las variables que se midieron se consideraron como una aproximación conductual de la actividad horizontal [distancia total (DT), actividad horizontal (AH)] y vertical [actividad vertical (AV) y episodios verticales (EV)], así como de parámetros de localización [distancia en el margen (DM)] y comportamiento estereotipado [episodios estereotipados (EE)]. Las variables que se evaluaron se definen a continuación.

- Distancia total: distancia en centímetros que recorrió el animal durante un periodo de 25 h.
- Actividad horizontal: número total de interrupciones al sensor horizontal que realizó el animal durante un periodo de 25 h.
- Actividad vertical: número total de interrupciones al sensor vertical que realizó el animal durante un periodo de 25 h.

- Episodios verticales: número total de episodios en los que el animal se incorporó en dos patas o interrumpió el sensor vertical durante un periodo de 25 h. Entre cada episodio debió haber un lapso de por lo menos 1 s.
- Distancia en el margen: distancia en centímetros que recorrió el animal en el perímetro de la caja durante un periodo de 25 h.
- Episodios estereotipados: número total de episodios en los que el animal interrumpió el mismo sensor durante un periodo de 25 h. Cada movimiento debió durar 1 s o más para separarlo del siguiente.

6.2.2 Barra de equilibrio

La barra de equilibrio es una prueba en la que se evalúa la coordinación motora y el balance de los roedores cuando caminan sobre una barra elevada que cuenta con una plataforma de escape en uno de los extremos, donde se mide el número de errores y pasos que realizan los animales o el tiempo que tardan en llegar de un extremo a otro; se considera una prueba muy sensible y efectiva ante pequeños cambios en los niveles de DA cerebral (Mann y Chesselet, 2015).

La prueba se realizó en el mes 10 de administración y para ésta se emplearon dos barras de madera con superficie plana, las cuales se colocaron a 75 cm de altura con respecto al piso; la primera barra se utilizó para la fase de entrenamiento (1.70 cm de largo x 7 cm de ancho x 2 cm de grosor) y la segunda para la prueba (1.70 cm de largo x 7 cm de ancho x 1 cm de grosor), en uno de los extremos se colocó una caja negra que sirvió como plataforma de escape. Las barras fueron marcadas en cuatro puntos 20, 80, 120 y 150 cm de distancia de la plataforma de escape.

Esta prueba se realizó durante tres días consecutivos. En el día 1 se llevó a cabo el entrenamiento, en el que cada una de las ratas fue obligada a caminar sobre la barra de dos centímetros de ancho, desde las cuatro posibles distancias de partida con respecto a la plataforma y se registró el tiempo de latencia que tardó cada animal en llegar a la misma. En el día 2 y 3 se realizó la fase de prueba; en el día 2, las ratas se colocaron nuevamente en la barra de dos centímetros y se liberaron solamente desde dos distancias 20 y 150 cm y las latencias de llegada fueron

registradas. En el día 3 se realizó la prueba final, para esta se empleó la barra de 1 cm de ancho, donde se colocó a cada animal únicamente a 20 y 150 cm de distancia de la plataforma, se registraron las latencias de llegada, además, las sesiones fueron videograbadas para después contar los errores cometidos por cada animal en cada trayecto. En la Figura 15 se esquematizan las condiciones de la barra empleada.

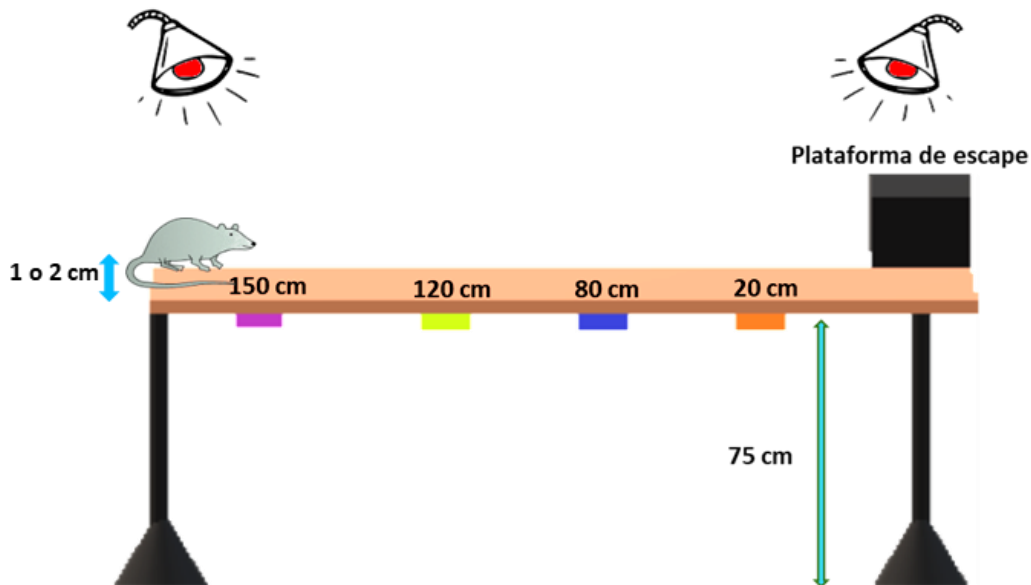
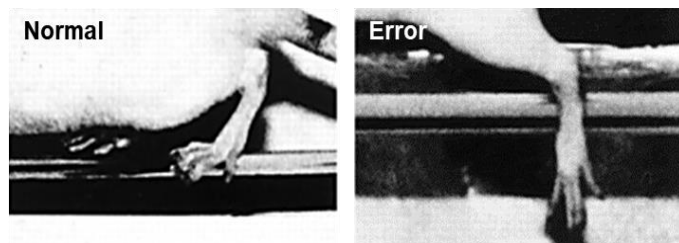


Figura 15. Barra de equilibrio. Se ejemplifican las condiciones de medidas y la ubicación espacial de los componentes de la barra de equilibrio.

La prueba se realizó bajo condiciones de absoluto silencio, en oscuridad, con la iluminación de dos lámparas de luz roja que se colocaron en cada extremo de la barra. Además, entre cada ensayo la barra se limpió con ácido acético al 1% para eliminar olores, restos de orina y excremento de los animales. Un error fue definido como la falla que presentó el animal para agarrarse de la barra con cualquiera de sus extremidades traseras (ver Figura 16).

Figura 16. Barra de equilibrio: error. Representación gráfica de la posición normal de la pata trasera de una rata sobre la barra de equilibrio (izquierda) y un error cometido al caminar sobre la misma (derecha) (modificada de Helgren *et al.*, 1997).



6.2.3 Rotorod

El rotorod es una prueba altamente sensible, que es muy utilizada para evaluar la coordinación motora y el balance, en la cual se mide la latencia y aceleración de caída y la distancia recorrida sobre un cilindro giratorio, durante un periodo de tiempo determinado (Mann y Chesselet, 2015).

En el mes 10, después de la prueba en la barra de equilibrio, se realizó la evaluación de la coordinación motora en el rotorod (IITC 755 ROTO – ROD), un aparato que consistió en 5 cilindros de 3.75” de diámetro, con superficie rugosa, que permitió al animal agarrarse de los mismos. En este aparato los cilindros giraban gracias a un motor y una vez que el animal cayó, el aparato proporcionó el tiempo de caída, la velocidad del cilindro en revoluciones por min (rpm), así como la distancia recorrida.

La prueba se realizó durante un periodo de 8 días. En el día 1 se habituó a cada uno de los animales al aparato, para esto, cada uno fue colocado en uno de los rodillos en estática durante 120 s. Del día 2 al 4 se realizó la fase de entrenamiento, para este los animales hicieron dos ensayos al día, con la finalidad de que terminarán la prueba por lo menos una vez (de no ser así, fueron descartados); las condiciones del rotorod para esta fase fueron: aceleración inicial de 4 rpm que aumentó gradualmente hasta 20 rpm en un tiempo de 60 s. Del día 5 al 8 se realizó la fase de prueba, en la que los animales realizaron una sesión diaria, la aceleración aumentó desde 10 rpm iniciales hasta 45 rpm en un tiempo de evaluación de 240 s. En cada una de las sesiones se registró la latencia de caída y las rpm alcanzadas por cada animal.

Como en la prueba conductual anterior, los ensayos se realizaron en condiciones de oscuridad, con luz roja y en absoluto silencio. Además, el equipo fue limpiado con ácido acético entre cada ensayo, para eliminar olores y restos de orina y excremento.

6.3 Histología

Veinticuatro horas después de la última administración de alimento con ATR, se indujo anestesia profunda a cada uno de los animales con una dosis de 150 mg/kg

de pentobarbital sódico vía intraperitoneal. Inmediatamente después se realizó el lavado de los tejidos vía intracardiaca con 250 mL de solución salina (ss) y posteriormente la fijación con 250 mL de paraformaldehído al 4 % (PFA 4 %), diluido en un buffer de fosfatos 100 mM con pH de 7.4. Después de la perfusión los cerebros fueron extraídos y se fijaron durante una noche en 25 mL de PFA al 4 %; posteriormente se colocaron en sacarosa al 30 % durante 48 horas, con la finalidad de crioproteger el tejido cerebral. Luego fueron congelados instantáneamente con isopentano y se almacenaron a - 80 °C hasta su uso para seccionar. Finalmente se utilizó un criostato a una temperatura que osciló entre los - 18 °C a - 21 °C y se cortaron 6 series de secciones coronales de 30 µm de grosor a la altura del MC (Bregma - 5.20 mm a Bregma - 6.04 mm) para después observar la SN. Los cortes se conservaron en PBS (buffer salino de fosfatos) a 4 °C para la tinción de Nissl o en pozos con solución crioprotectora anticongelante (1% polivinilpirrolidona, 30 % sacarosa, 30 % etilenglicol, 50 % de amortiguador Tris - Salina 0.05M) a - 20 °C para la inmunohistoquímica y fluoro jade C (FJC).

6.3.1 Tinción de Nissl

Los cortes se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados y se dejaron secar de 3 a 5 días para que se adhirieran perfectamente bien. Posteriormente, los portaobjetos fueron embebidos en las siguientes soluciones, en el orden que indica la tabla del Apéndice A.

Finalmente, los tejidos se cubrieron con el medio de montaje, permount (Fisher Chemica, 15832544, NH, USA) y después se observaron con un microscopio óptico (Leica Microsystems) en el objetivo 40x y 100x y se realizaron las observaciones correspondientes.

6.3.2 Tinción fluoro jade C

Los cortes obtenidos en el criostato se montaron sobre portaobjetos previamente gelatinizados un día antes de realizar la tinción. Al día siguiente, los cortes se secaron a 55 °C durante 30 min y después se embebieron en las soluciones que indica la tabla del Apéndice B.

Después se secaron a 55 °C durante 30 min y finalmente fueron aclarados con xilol durante 5 min y se montaron con el medio Aqua – Mount (Thermo Fisher Scientific, 41799 – 008, MA, USA). Para evitar falsos negativos al realizar la tinción, se montó un corte coronal del cerebro de una rata SD positivo para neurodegeneración (uno por animal), específicamente lesionado en el hipocampo izquierdo (Anteroposterior – 3.8; Lateromedial + 2; Dorsoventral – 3.4) con ácido kaínico (5 nmol/μL), ya que está bien caracterizado que las lesiones con esta toxina pueden ser evidenciadas fácilmente con fluoro jade (Miltiadous, Stamatakis y Stylianopoulou, 2010).

6.4 Inmunohistoquímica

Se realizó inmunohistoquímica para dos de las poblaciones residentes de glía en la SN, microglia y astrocitos.

6.4.1 Proteína adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (Iba1)

La proteína adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (Iba1), es una molécula del citoesqueleto que se une a actina de 17 kDa, la cual se expresa específicamente en microglía y macrófagos, que se emplea como un marcador de microglia en el SNC (Hopperton, Mohammad, Trépanier, Giuliano y Bazinet, 2018); esta proteína participa en la reticulación de actina implicada en la membrana, esencial para los cambios morfológicos de microglia ramificada quiescente a microglia ameboides activada, por lo que, la activación microglial va acompañada de una mayor expresión de Iba1 (Gheorghe *et al.*, 2020; Hovens, Nyakas, y Schoemaker, 2014). En nuestro estudio se empleó el anticuerpo anti Iba1 (GeneTex, GTX100042, CA, USA) como marcador de inflamación en la SN, debido a que las células microgliales están principalmente involucradas en este proceso (Jeong, Ji, Min y Joe, 2013).

6.4.2 Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

GFAP es una proteína estructural del citoesqueleto, presente en los filamentos intermedios de los astrocitos, la cual, es fundamental para mantener su resistencia mecánica. Cuando existe algún daño en el tejido cerebral los astrocitos se activan, sus prolongaciones citoplasmáticas se vuelven largas y gruesas (hipertrofia), aumenta la expresión de GFAP (fundamental para mantener esta estructura) y

proliferan, dando lugar a un proceso llamado “astrocitos reactiva”. Es importante destacar que, el aumento en la expresión de GFAP es característico de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Yang y Wang, 2015). Para nuestro estudio se empleó el anticuerpo contra GFAP (Dako, Z0334), para identificar el reclutamiento de astrocitos (astrocitos, también conocida como astrogliosis) en áreas de la SN con posible daño.

En el Apéndice C se presentan los pasos que se siguieron para realizar la técnica inmunohistoquímica, que sólo difirió por los anticuerpos primarios que se utilizaron, ya sea Iba1 o GFAP. Primero los tejidos se retiraron de la solución crioprotectora, se colocaron en pozos y se siguió la secuencia de pasos que se enumeran en el Apéndice C.

6.4.3 Conteo celular

Para el conteo celular se tomaron microfotografías en el objetivo 10x en el rango de coordenadas estereotáxicas antes mencionado, para evaluar la sustancia nigra *pars compacta* y la sustancia nigra *pars reticulata* de la SN del hemisferio derecho de 5 ó 6 animales por grupo experimental. Se realizó el conteo total a 100 aumentos, de células positivas a Iba1 o GFAP en cada una de las regiones de estudio; para facilitar dicho conteo se utilizó el programa Image J 1.53c para convertir cada imagen a la escala de los grises (16 bit) y después se realizó un ajuste de contraste con la finalidad de disminuir el fondo y resaltar los núcleos celulares; finalmente cada imagen fue contada por dos observadores ciegos al grupo de tratamiento.

6.5 Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico StatView Versión 5.0 para el análisis de datos. Para la actividad locomotora espontánea, se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas (ANDEVAmr) para cada variable de interés y cuando en este primer análisis se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía seguido de un *post hoc* LSD – Fisher. Los datos obtenidos de la barra de equilibrio fueron analizados con la prueba ANDEVA de una vía seguida de un *post hoc* LSD – Fisher (Errores y tiempo 150 cm) o con una prueba de Kruskal – Wallis (tiempo y errores 20 cm) según el caso.

Para el rotorod se empleó la prueba ANDEVAmr. Los conteos celulares se analizaron con una prueba de Kruskal – Wallis. Los resultados fueron considerados como estadísticamente significativos cuando el valor de p fue menor a 0.05.

VII. Resultados

7.1 Atrazina y actividad locomotora espontánea

Para la ALE se analizaron los datos de 10 de los 12 meses que duró el tratamiento con ATR, ya que los meses 6 y 7 no fueron considerados debido a fallas técnicas en las cajas de registro de actividad locomotora, lo que además comprometía la confiabilidad de los datos arrojados para estos meses. A continuación, se presentan los resultados con sus respectivas gráficas de las 6 variables evaluadas.

Para determinar el estado de la actividad horizontal de los animales, se analizaron los datos correspondientes a la DT y la AH. El análisis estadístico para la DT arrojó diferencias significativas sólo para el efecto de tiempo [efecto de tratamiento, efecto de tiempo y efecto de interacción (T, t, i)] durante la primera h de exploración (T: $F_{(2, 23)} = 1.147$, $p = 0.3350$; t: $F_{(2, 9)} = 9.310$, $p = <0.0001$; i: $F_{(2, 18)} = 0.685$, $p = 0.8241$; $n = 8 - 9$) y para el registro de 24 h (T: $F_{(2, 23)} = 0.347$, $p = 0.7103$; t: $F_{(2, 9)} = 5.620$, $p = <0.0001$; i: $F_{(2, 18)} = 0.587$, $p = 0.9069$; $n = 8 - 9$), conforme transcurrió el año de tratamiento con ATR. Los datos de la AH se comportaron de manera similar, hubo efectos significativos sólo en la categoría de tiempo, tanto en la exploración (T: $F_{(2, 23)} = 1.520$, $p = 0.2398$; t: $F_{(2, 9)} = 46.398$, $p = <0.0001$; i: $F_{(2, 18)} = 0.760$, $p = 0.7449$; $n = 8 - 9$), así como, durante el registro de 24 h (T: $F_{(2, 23)} = 1.889$, $p = 0.1740$; t: $F_{(2, 23)} = 3.824$, $p = 0.0002$; i: $F_{(2, 23)} = 0.531$, $p = 0.9411$; $n = 8 - 9$). En la Figura 17 se representan los resultados descritos.

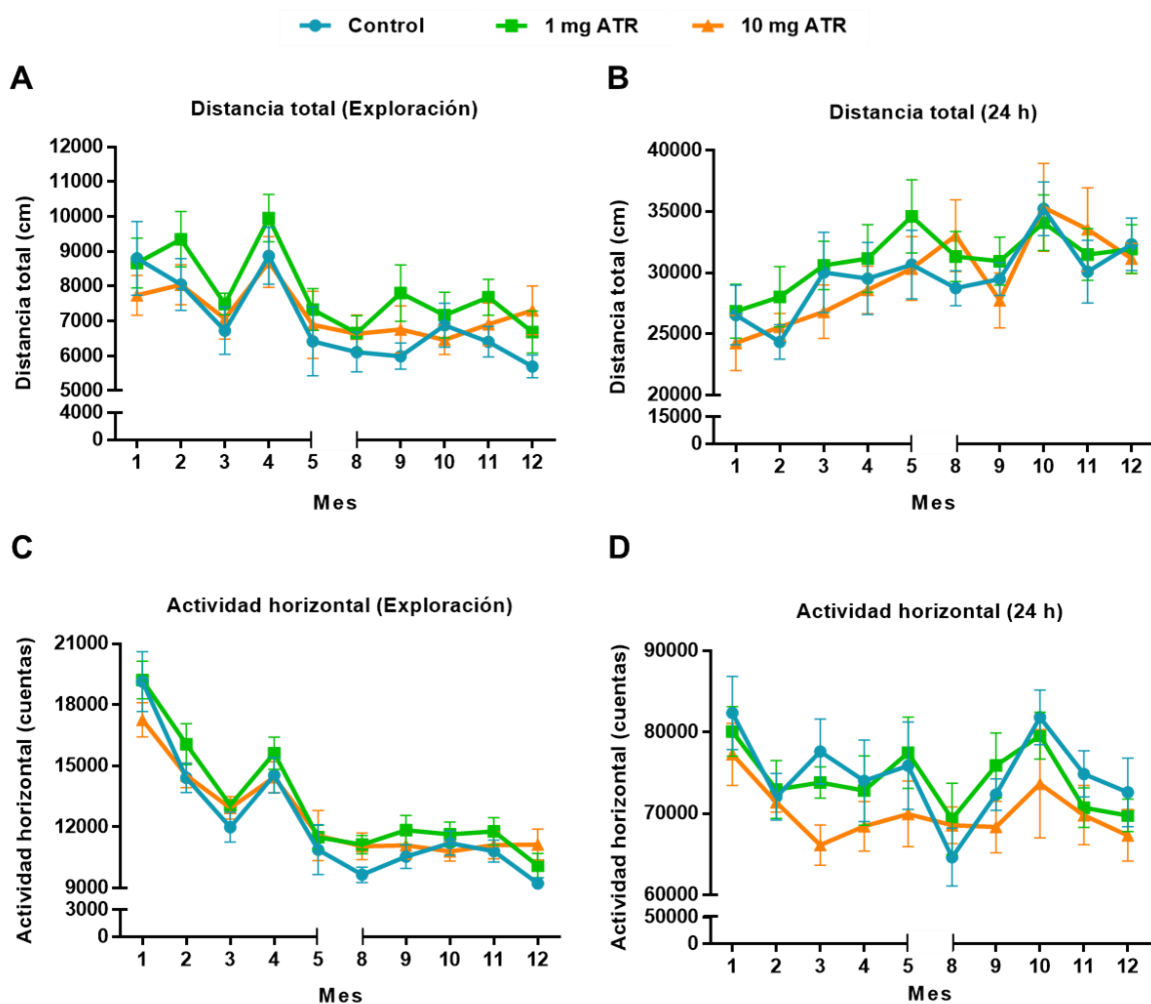


Figura 17. Actividad horizontal. La distancia total recorrida durante la exploración (A) y el registro de 24 h (B) de los animales a los que se les administró 1 ó 10 mg de ATR, no fue diferente del grupo control en ninguno de los 10 meses analizados. Por su parte, la actividad horizontal tampoco fue afectada durante la exploración (C), ni durante el registro de 24 h (D) a lo largo del periodo de tratamiento con ATR ($n = 8 - 9$). Media de grupo \pm EEM.

Para evaluar la actividad vertical se analizaron las variables AV y EV; se observó un efecto de tiempo estadísticamente significativo para la variable de AV durante la exploración, (T: $F_{(2, 20)} = 2.105$, $p = 0.1480$; t: $F_{(2, 9)} = 41.680$, $p = <0.0001$; i: $F_{(2, 18)} = 0.540$, $p = 0.9355$; $n = 7 - 8$), del mismo modo que, en el periodo de 24 h a lo largo de los 10 meses evaluados (T: $F_{(2, 20)} = 0.810$, $p = 0.4590$; t: $F_{(2, 9)} = 10.170$, $p = <0.0001$; i: $F_{(2, 18)} = 0.830$, $p = 0.6634$; $n = 7 - 8$). Para los EV, el periodo de exploración también mostró efecto de tiempo (T: $F_{(2, 20)} = 0.387$, $p = 0.6842$; t: $F_{(2, 9)} = 3.473$, $p = 0.0006$; i: $F_{(2, 18)} = 1.034$, $p = 0.4241$; $n = 7 - 8$) y en los resultados

obtenidos para el registro de 24 h la prueba ANDEVAmr detectó el mismo efecto (T: $F_{(2, 20)} = 0.032$, $p = 0.9685$; t: $F_{(2, 9)} = 3.650$, $p = 0.0003$; i: $F_{(2, 18)} = 0.030$, $p = >0.9999$; $n = 7 - 8$). Para la actividad vertical en general, no se observaron efectos de tratamiento o interacción para ninguna de las 2 variables analizadas. La representación de estos resultados se presenta en la Figura 18.

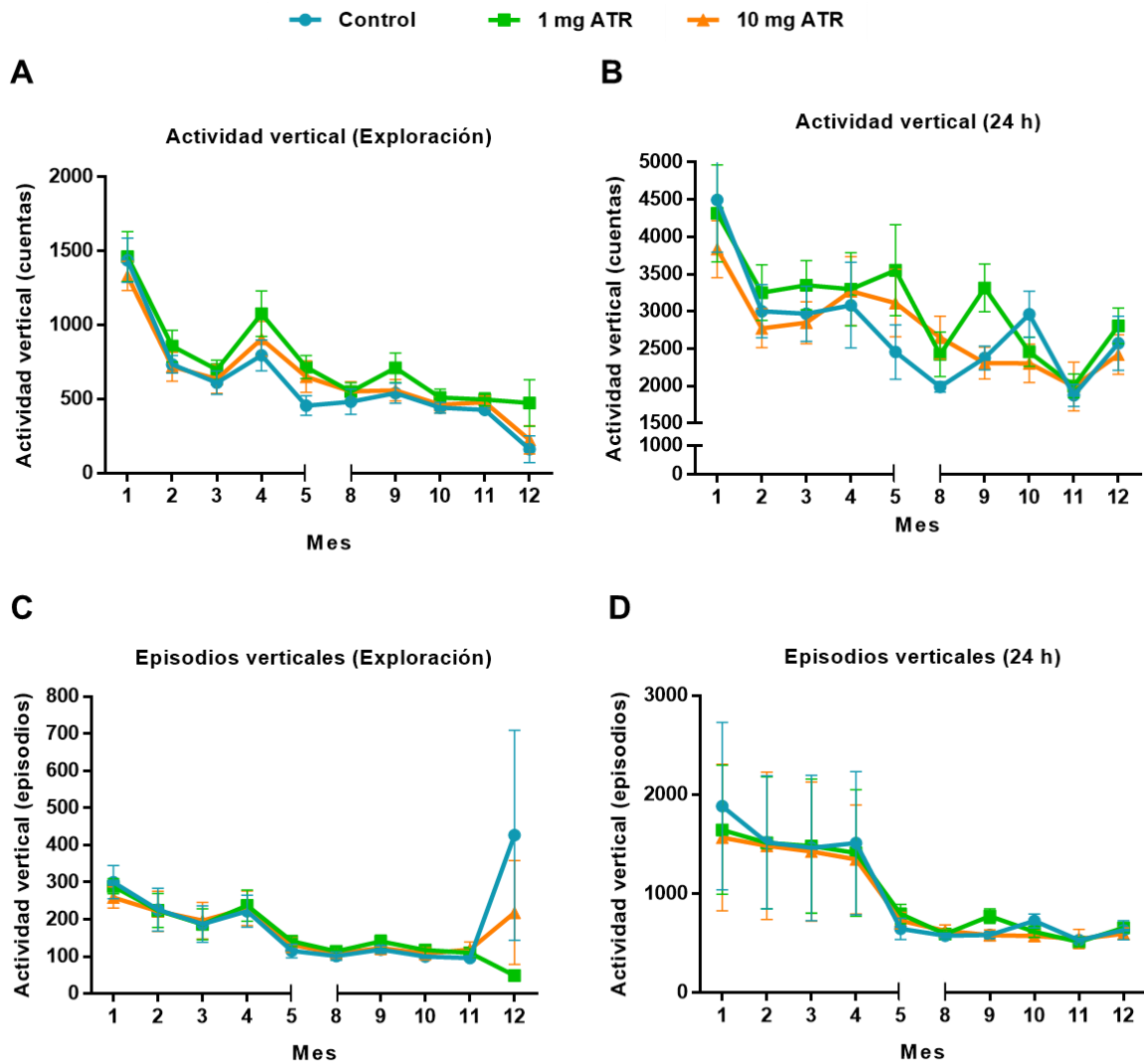


Figura 18. Actividad vertical. La actividad vertical durante la exploración (A) y el registro de 24 h (B) de los animales a los que se les administró 1 ó 10 mg de ATR, no fue diferente del control en ninguno de los 10 meses analizados. Por su parte, el número de episodios verticales tampoco fue estadísticamente diferente entre los grupos durante la exploración (C) ni durante el registro de 24 h (D) a lo largo del periodo de tratamiento con ATR ($n = 7 - 8$). Media de grupo \pm EEM.

En la variable EE se observó un efecto de tiempo durante exploración a lo largo del tratamiento (T: $F_{(2, 23)} = 1.281$, $p = 0.2967$; t: $F_{(2, 9)} = 12.830$, $p = <0.0001$; i: $F_{(2, 18)} = 0.497$, $p = 0.9577$; $n = 8 - 9$). Para el registro de 24 h, la prueba ANDEVA_{Mr} detectó efecto de tiempo y tratamiento (T: $F_{(2, 23)} = 12.066$, $p = 0.0003$; t: $F_{(2, 9)} = 14.049$, $p = <0.0001$; i: $F_{(2, 18)} = 0.662$, $p = 0.8462$; $n = 8 - 9$), por ello se realizó la prueba ANDEVA de una vía seguida de un *post hoc* LSD – Fisher y se obtuvo que, en los meses 3, 4, 5, 10 y 11 ($p = <0.0001$; 0.0169; 0.0132; 0.0176 y 0.0120, respectivamente) el grupo 10 mg ATR, realizó significativamente menos EE comparado con el grupo control, mientras que en el mes 9 y 12 ($p = 0.0768$ y 0.0787, respectivamente) hubo una tendencia a la baja en el número de EE realizados por el mismo grupo. En el mes 3 se detectó una disminución significativa en el número de EE, realizados por los animales del grupo 1 mg ATR cuando se les comparó con el grupo control ($p = 0.0061$). Las gráficas para esta variable se presentan en la Figura 19.

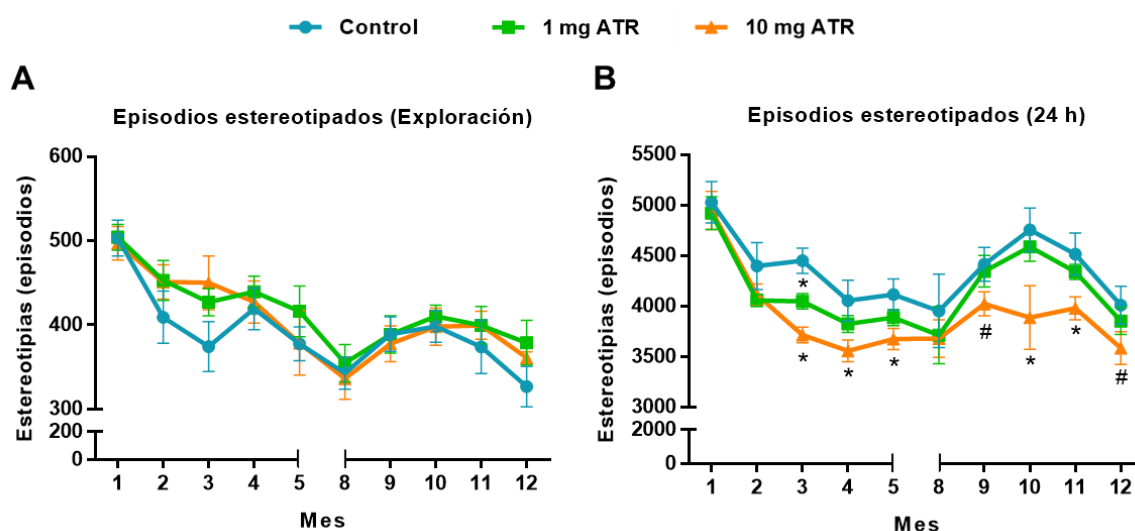


Figura 19. Episodios estereotipados. El número de episodios estereotipados de los animales de los grupos 1 ó 10 mg ATR, no fue diferente al control durante la exploración (A) en ninguno de los 10 meses analizados; mientras que, el registro de 24 h (B) durante los meses 3, 4, 5, 10 y 11 el grupo 10 mg ATR realizó un número de episodios estereotipados menor y estadísticamente significativo comparado con el grupo control. En el mes 3, hubo una disminución significativa del número de episodios estereotipados en los animales del grupo 1 mg ATR, comportamiento que no se repitió a lo largo del periodo de tratamiento ($n = 8 - 9$). Media de grupo \pm EEM; $p < 0.05$ *; $p < 0.1$ #.

Finalmente, se analizaron los datos para una variable de localización, en este caso DM; se realizó la prueba ANDEVAmr que sólo detectó efecto de tiempo tanto en la primera hora (T: $F_{(2, 23)} = 0.844$, $p = 0.4427$; t: $F_{(2, 9)} = 19.749$, $p = <0.0001$; i: $F_{(2, 18)} = 0.869$, $p = 0.6164$; $n = 8 - 9$), así como en el registro de 24 h (T: $F_{(2, 23)} = 0.869$, $p = 0.4328$; t: $F_{(2, 9)} = 2.875$, $p = 0.0032$; i: $F_{(2, 18)} = 0.467$, $p = 0.9691$; $n = 8 - 9$). En la Figura 20 se presentan las gráficas para esta variable.

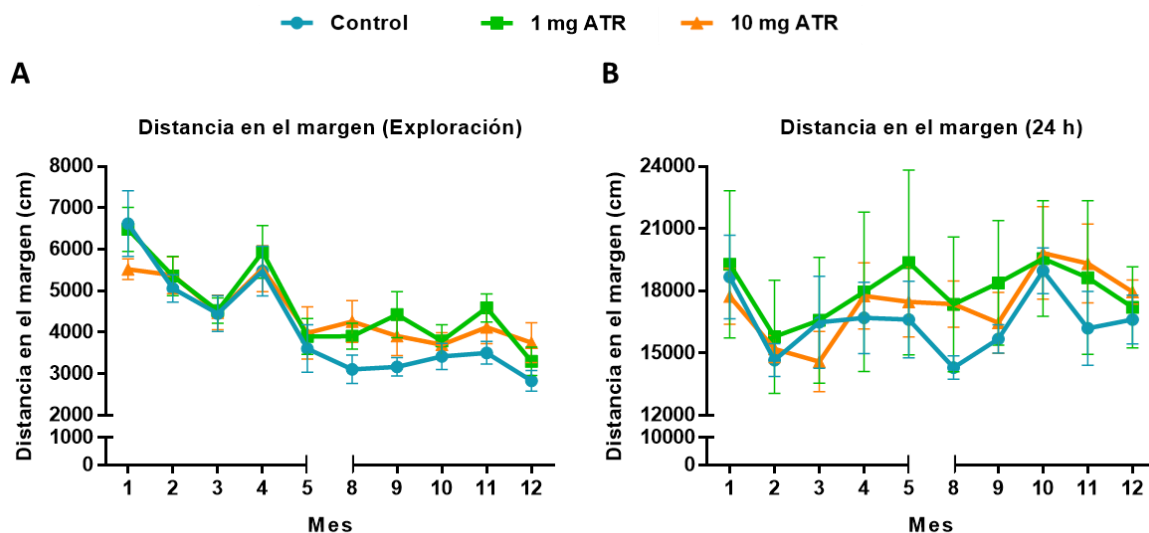


Figura 20. Distancia en el margen. La distancia en el margen, recorrida por los animales durante la exploración (A) y el registro de 24 h (B) no fue diferente entre grupos en ninguno de los 10 meses analizados ($n = 8 - 9$). Media de grupo \pm EEM.

7.2 Atrazina y coordinación motora

7.2.1 Barra de equilibrio

El análisis de datos de la barra de equilibrio no arrojó resultados estadísticamente significativos entre los grupos evaluados. En la Figura 21 se pueden observar las medianas y los rangos intercuartil para el tiempo y el número de errores (A y B, respectivamente) que cometieron los animales de cada grupo, cuando fueron liberados desde la distancia de 20 cm de la plataforma, no se obtuvieron diferencias entre grupos (tiempo: [$H = (2, N = 30) = 2.294$, $p = 0.3301$]; errores: [$H = (2, N = 30) = 2.312$, $p = 0.3948$]. En C y D de la misma Figura se pueden observar los resultados que se obtuvieron a partir de una distancia de 150 cm de la plataforma de escape, las pruebas estadísticas no arrojaron diferencias en el tiempo de latencia de llegada

a la plataforma o en el número de errores cometidos por los animales que fueron administrados con ATR en comparación con los controles (tiempo: $F_{(2, 27)} = 0.087$, $p = 0.9172$, $n = 10$; errores: $F_{(2, 27)} = 2.342$, $p = 0.1154$, $n = 10$).

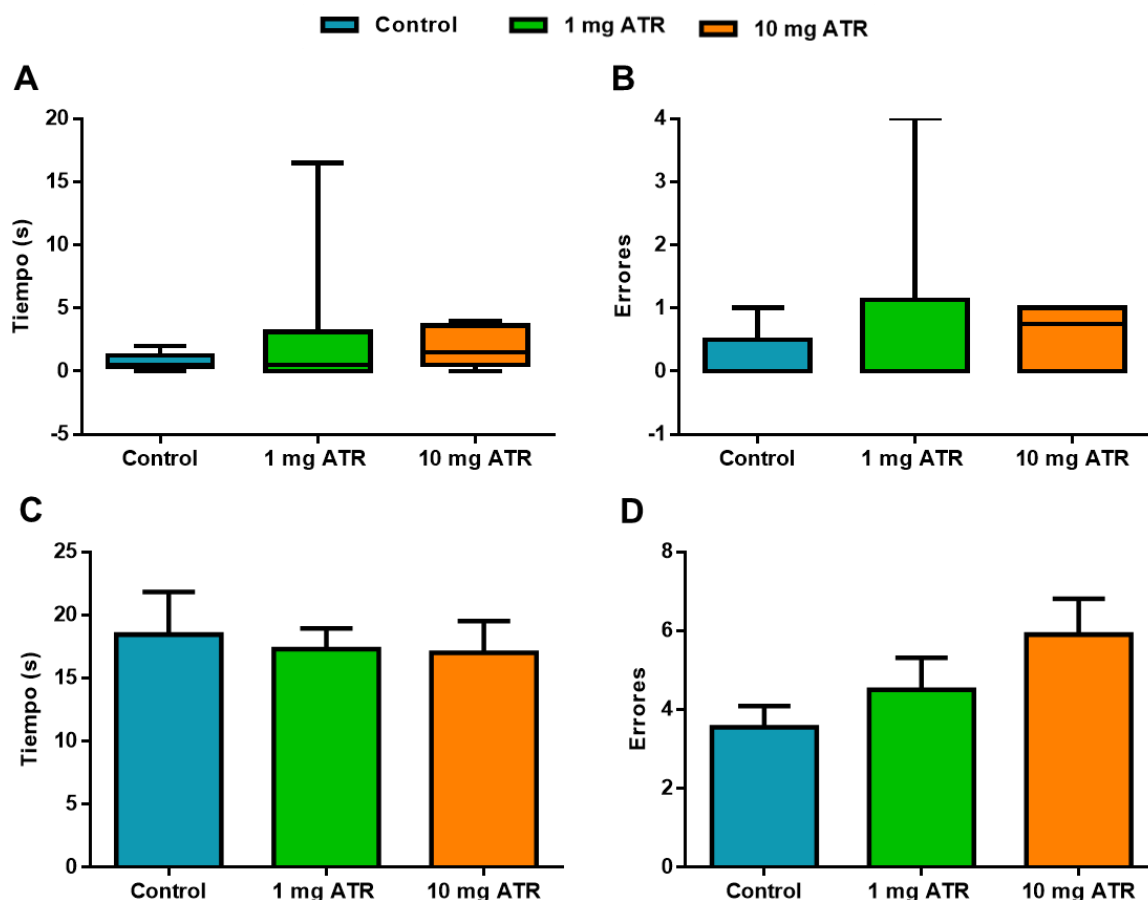


Figura 21. Barra de equilibrio (1 cm). En A y B se presentan las medianas y los rangos intercuartil para el tiempo y el número de errores de los animales que fueron liberados a 20 cm de distancia de la plataforma, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos. En C y D, se presentan el tiempo y los errores promedio (respectivamente) de cada grupo experimental cuando los animales fueron liberados a una distancia de 150 cm de la plataforma, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados; media de grupo \pm EEM ($n = 10$).

7.2.2 Rotorod

La latencia de caída en el rotorod no arrojó diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguno de los días de la prueba (T: $F_{(2, 27)} = 0.629$, $p = 0.5406$; t: $F_{(2, 27)} = 1.250$, $p = 0.2971$; i: $F_{(2, 27)} = 0.574$, $p = 0.7498$; $n = 10$), como puede observarse en la Figura 22.

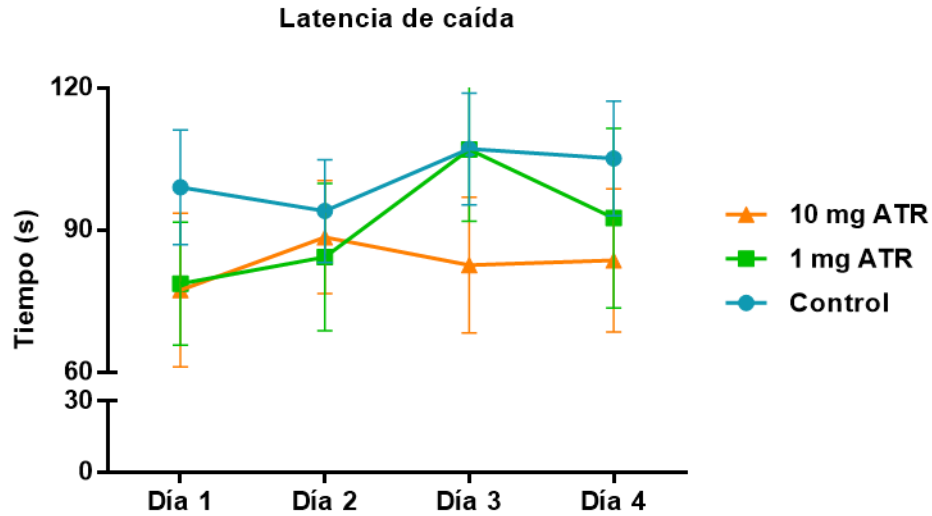


Figura 22. Rotorod. Latencia de caída en segundos de los animales durante la prueba del rotorod. En la gráfica se presentan los 4 días que corresponden a las sesiones de prueba; no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados ($n = 10$). Media de grupo \pm EEM.

7.3 Histología de la sustancia negra *post* administración de atrazina

7.3.1 Tinción de Nissl

Para conocer la integridad de la SN después del periodo de administración con ATR, se hizo una revisión de esta región a partir de los cortes teñidos con violeta de cresilo, para tener un panorama general de los posibles hallazgos histopatológicos y su posible relación con las inmunohistoquímicas posteriores.

De manera general, en los 3 grupos evaluados las células presentaron una apariencia normal, en algunos casos (principalmente en la SNpc) se observaron organizadas en forma de plastas que hicieron imposible distinguir una célula de otra, lo que se atribuyó principalmente al grosor del corte; en algunos cortes las células no tuvieron bordes bien definidos o presentaron una apariencia difuminada, aunque en sitios con menor densidad neuronal fue posible distinguir los cuatro tipos celulares (compactas, reticulares, intermedias y globulares). En algunos casos resultó difícil distinguir la sustancia nigra *pars compacta* de la sustancia nigra *pars reticulata*, debido a que, se apreció una densidad menor de neuronas que facilitarían o delimitarían la regionalización del núcleo.

Un hallazgo particular fue la presencia de astrocitos hinchados, con núcleo pálido en el centro y/o marginación de la heterocromatina (Figura 23), es decir, apariencia de astrocitos Alzheimer tipo II, comunes en la encefalopatía hepática e intoxicaciones por manganeso (Hazell, Normandin, Norenberg, Kennedy y Yi, 2006); cabe mencionar que se observaron en animales de los 3 grupos experimentales, por lo que, el hallazgo no se consideró de relevancia histopatológica. Se observaron células con apariencia picnótica en animales de los 3 grupos experimentales, pero sin ninguna relevancia cualitativa entre los tratamientos.

7.3.2 Fluoro jade C

Los cortes cerebrales de tres ratas de cada grupo experimental fueron teñidos con FJC, como se explicó previamente en el apartado de materiales y métodos. No se observaron células fluorescentes teñidas con FJC que sugirieran un proceso de neurodegeneración en la SN de ninguna de las ratas de los tres grupos experimentales evaluados; la posibilidad de falsos negativos fue descartada con los controles de daño, en los que se obtuvo tinción positiva en las neuronas piramidales del *hilus* del hipocampo, debido a la lesión ocasionada por la inyección de ácido kaínico (resultados no mostrados).

7.4 Inmunohistoquímica

7.4.1 Proteína adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (Iba1)

Se realizó el conteo de células positivas a Iba1 en la SN (Bregma – 5.20 mm hasta Bregma – 6.04 mm) de 5 ó 6 ratas por cada grupo experimental. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de células positivas a Iba1 en la sustancia nigra *pars compacta* [$H = (2, N = 17) = 0.6261, p = 0.938$], ni en la sustancia nigra *pars reticulata* [$H = (2, N = 17) = 0.705, p = 0.7031$] de los animales tratados con ATR cuando fueron comparados con los controles. En la Figura 24 se presenta una microfotografía representativa de la celularidad de la SN de cada grupo experimental al momento de realizar el conteo y además se presentan los resultados obtenidos del conteo celular para esta inmunohistoquímica.

7.4.2 Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

Los resultados con respecto al conteo celular para esta inmunohistoquímica fueron obtenidos con 5 ó 6 animales según el grupo experimental y bajo las condiciones antes mencionadas para Iba1. Los datos generados no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales que fueron administrados con 1 ó 10 mg de ATR y los controles, tanto para la sustancia nigra *pars compacta* [$H = (2, N = 17) = 0.641, p = 0.7260$] como para la sustancia nigra *pars reticulata* [$H = (2, N = 17) = 0.129, p = 0.9373$]. En la Figura 25 se presentan las imágenes y las gráficas correspondientes a este experimento.

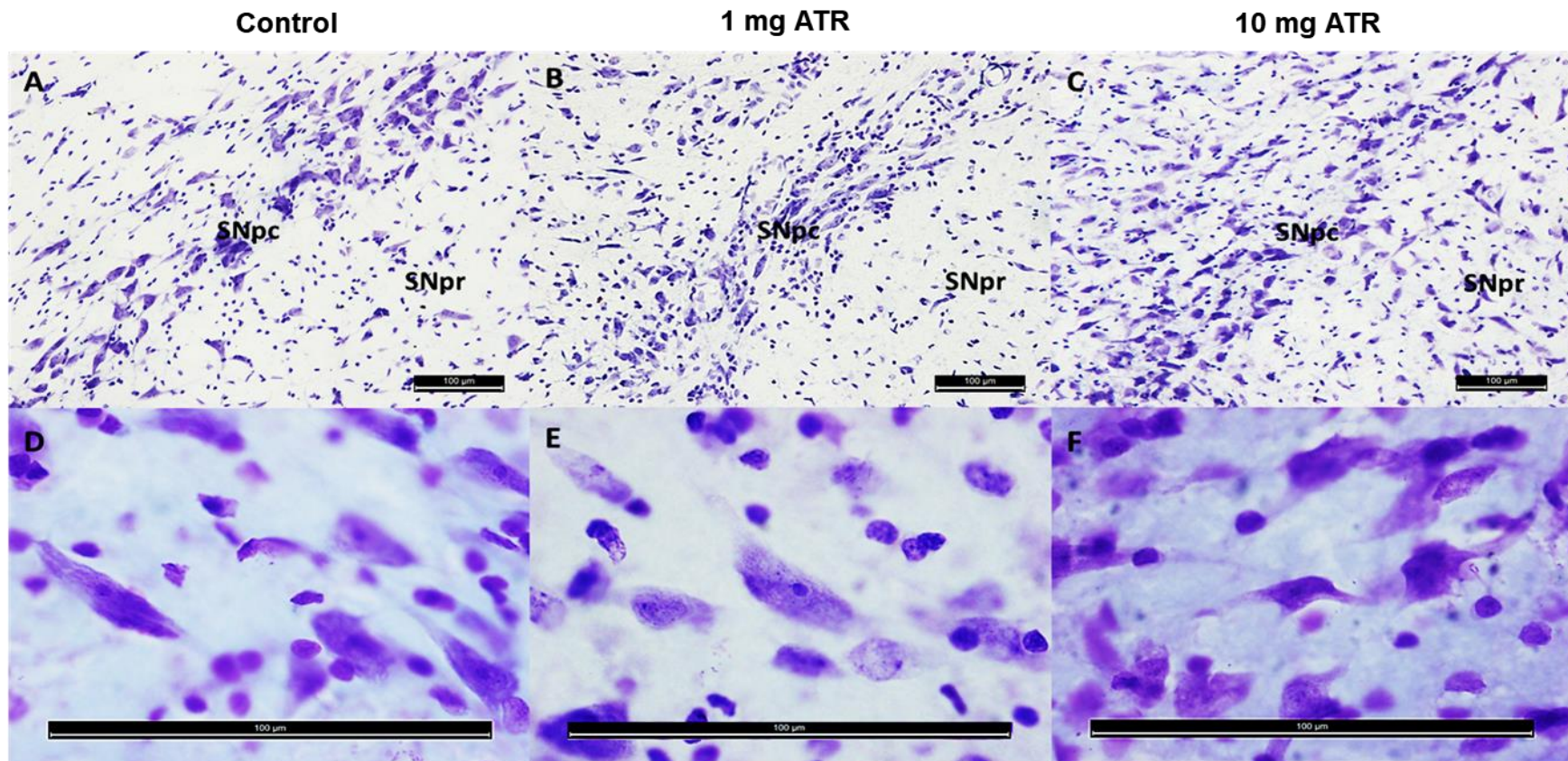
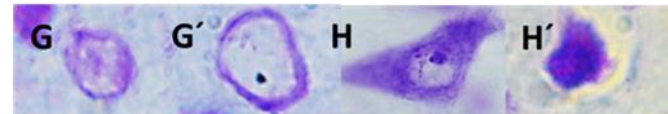


Figura 23. Tinción de Nissl. Microfotografías representativas vistas en el objetivo 20x (A – C) y 100x (D – F) teñidas con cresil violeta. La apariencia de la mayoría de las células de la SN fue normal, los bordes se observaron bien definidos, con núcleo céntrico y nucleolos prominentes. En G se observa un astrocito normal y en G' un astrocito con apariencia Alzheimer tipo II, que se caracteriza por presentar un núcleo pálido central, heterocromatina marginal e hinchazón. En H se presenta una célula normal y en H' una neurona con apariencia picnótica; los hallazgos histopatológicos se repitieron en los 3 grupos experimentales, por lo que, no se consideran asociados a la administración de ATR ($n = 6 - 7$).



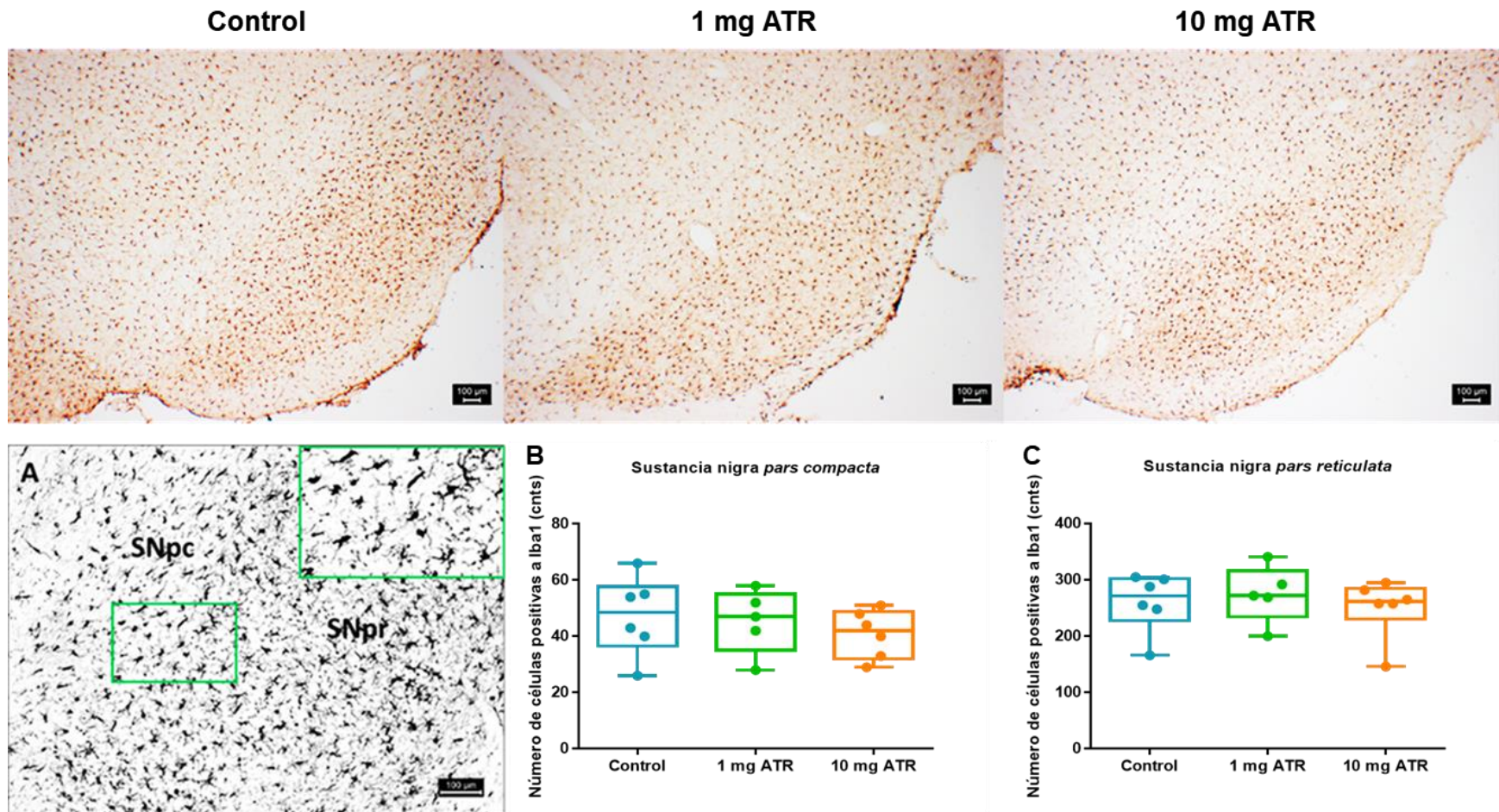


Figura 24. Conteo celular: Proteína adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (Iba1). Microfotografías representativas vistas en el objetivo 4x de la SN de una rata control, 1 mg ATR y 10 mg ATR (serie superior de izquierda a derecha) en las que se observa la celularidad representativa para cada grupo experimental. A, corresponde a una microfotografía en escala de grises de la misma región, observada en el objetivo 10x; en el acercamiento se presenta un ejemplo de núcleos que fueron tomados como buenos para el conteo celular, los cuales debían tener un núcleo negro prominente y proyecciones radiales bien definidas. B y C corresponden al conteo celular de la sustancia nigra *pars compacta* y sustancia nigra *pars reticulata* (respectivamente) donde se presentan las medianas y los rangos intercuartiles y como puede observarse, el número de células no fue estadísticamente diferente entre los grupos evaluados ($n = 5 - 6$).

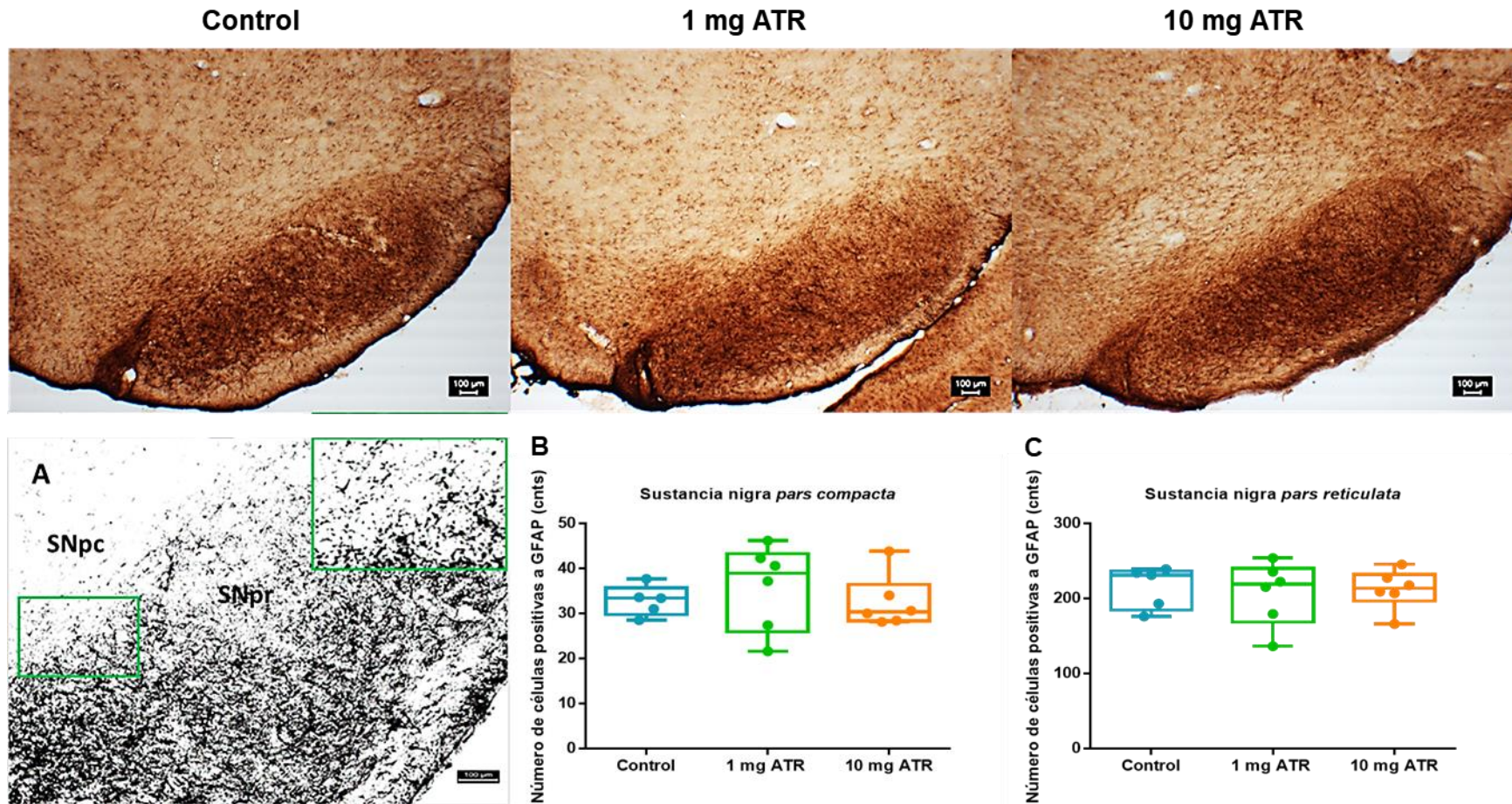


Figura 25. Conteo celular: Proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Microfotografías representativas vistas en el objetivo 4x de la SN de una rata control, 1 mg ATR y 10 mg ATR (serie superior de izquierda a derecha) en las que se observa la celularidad representativa para cada grupo experimental. A, corresponde a una microfotografía en escala de grises de la misma región, observada en el objetivo 10x; en el acercamiento se presenta un ejemplo de núcleos que fueron tomados como buenos para el conteo celular, los cuales debían tener un núcleo negro y proyecciones radiales bien definidas. B y C corresponden al conteo celular de la sustancia nigra *pars compacta* y sustancia nigra *pars reticulata* (respectivamente) donde se presentan las medianas y los rangos intercuartiles y como puede observarse, el número de células no fue estadísticamente diferente entre los grupos evaluados ($n = 5 - 6$).

VIII. Discusión

Hasta el momento, se cree que el sistema dopaminérgico podría ser uno de los posibles blancos de la toxicidad ocasionada por ATR (Coban y Filipov, 2007; Bardullas *et al.*, 2011; Bardullas *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015; Walters *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020) porque ésta podría figurar como responsable de algunos de los efectos conductuales observados en animales de experimentación expuestos a este herbicida y que además presentan alteraciones en los núcleos cerebrales involucrados en estas vías.

Por ejemplo, se ha reportado que en ratas SD la administración de 10 mg ATR/kg durante un año puede estar asociada con hiperactividad, que en el mes 12 de tratamiento se manifiesta con un aumento significativo de la AH, la DT y el número de estereotipias (Bardullas *et al.*, 2011) o bien, con un aumento en la AV (Chávez-Pichardo *et al.*, 2020) en los animales intoxicados con respecto a los controles, efecto que no coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, pues no se observó hiperactividad en ninguna de las variables evaluadas, sino por el contrario, los animales a los que se les administró con 10 mg ATR/kg realizaron un número de EE significativamente menor desde el mes 3 y hasta el mes 12 de tratamiento, este hallazgo podría ser similar al reportado por Walters y colaboradores (2015), que demostraron que el número de estereotipias podría tener una tendencia a la baja en ratas SD que fueron administradas con 10 mg ATR/kg, durante un periodo que involucraría la gestación, lactancia y 6 meses *post* destete, es decir, después de 7 meses y medio de exposición, aproximadamente.

Ahora bien, la disminución significativa en el número de EE podría ser explicada de la siguiente manera, se sabe que el acicalamiento o autocuidado es una conducta en la que los roedores ocupan cerca del 30 – 50 % de su tiempo despiertos (Bolles, 1960; Spruijt, Van Hooff y Gispen, 1992), la cual se caracteriza por su progresión cefalocaudal y por poseer un alto nivel de complejidad y organización; en roedores maduros consiste en patrones específicos y altamente estereotipados de movimientos secuenciales, que del mismo modo que los patrones de acción fija, es

altamente estereotipada en su orden y una vez iniciada, se completa sin retroalimentación sensorial (Kalueff *et al.*, 2016), dicha secuencia de movimientos es conocida como cadena sintáctica de acicalamiento (Kalueff, Aldridge, LaPorte, Murphy y Tuohimaa, 2007; Wu *et al.*, 2019). Hoy en día se sabe que, el estriado, la SN y sus proyecciones dopaminérgicas son muy importantes para la cadena sintáctica de acicalamiento y que los ganglios basales podrían ser los mecanismos neurales para el control de la estereotipia de patrones secuenciales complejos, ya que las lesiones en la vía nigroestriatal hacen que los animales pierdan su capacidad para completar las secuencias hasta el final de la cadena sintáctica (Pelosi, Girault y Hervé, 2015; Kalueff *et al.*, 2016), como prueba de ello, ratas con lesiones en el estriado o descerebradas a nivel mesencefálico completan o terminan sólo el 50 % de las cadenas sintácticas (Kalueff *et al.*, 2016) y específicamente, cuando las neuronas dopaminérgicas de la SN se lesionan con 6-hidroxidopamina (6 – OHDA) se altera la finalización de los patrones secuenciados de acicalamiento y disminuyen los niveles de DA estriatal (Berridge, 1989), por otro lado, al lesionar el haz del prosencéfalo medial con la misma toxina, el efecto conductual es el mismo y además, los niveles de la enzima TH disminuyen de manera significativa en los animales lesionados con 6 – OHDA (Pelosi *et al.*, 2015); por el contrario, los ratones mutantes hiperdopaminérgicos muestran cadenas de acicalamiento sintáctico más estereotipadas y predecibles (Berridge, Aldridge, Houchard y Zhuang, 2005). Por lo tanto, nuestros resultados podrían sugerir que, el conteo de EE sería menor en los animales del grupo 10 mg ATR debido a una posible alteración en el sistema dopaminérgico, posiblemente detectada a nivel neuroquímico (no realizado en este estudio), ya que se ha reportado que la ATR puede disminuir los niveles de DA estriatal (Bardullas *et al.*, 2011, 2013; Rodríguez *et al.*, 2013; Walters *et al.*, 2015), como consecuencia de la posible inhibición del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT – 2), aumentando las concentraciones de DA en el citoplasma y con ello, favoreciendo la oxidación de la misma, la producción de radicales libres y finalmente la muerte neuronal (Hossain y Filipov, 2008), lo que podría manifestarse con una disminución en el conteo de EE, debido a alteraciones en la señalización de las vías dopaminérgicas involucradas en la conducta de

acicalamiento. Cabe mencionar que, a la inspección física los animales intoxicados no mostraron pelaje hirsuto o descuidado, en apariencia se observaron igual que los controles, por lo que, se cree que la disminución en el conteo de EE podría ser una manifestación inicial y sutil de la toxicidad generada por ATR, que no fue lo suficientemente intensa para alterar de manera visible el estado físico de los animales y tampoco otras variables evaluadas en el campo abierto.

Después de 10 meses de administración con ATR la coordinación motora no se alteró, aunque Walters y colaboradores (2015) reportaron que la administración de 10 mg ATR/kg durante un periodo que comprende la gestación, lactancia y 5 meses adicionales, sí puede aumentar el número de errores cometidos por las ratas intoxicadas al realizar la prueba en la barra de equilibrio; del mismo modo que el herbicida PQ (10 mg/kg/1 vez por semana/mes) que, además se asocia con un aumento en la latencia de llegada a la plataforma en las ratas intoxicadas al realizar la misma prueba (Huang *et al.*, 2016). Por su parte, aunque en el presente estudio la coordinación motora no se alteró cuando fue evaluada con el rotorod en el mes 10, se ha reportado que la administración de 10 mg ATR/kg durante 10 meses, sí puede disminuir la latencia de caída en los animales intoxicados con ATR (Bardullas *et al.*, 2011, 2013), además otros herbicidas como el PQ y el glifosato (GLI), se han asociado al mismo efecto, cuando son administrados a ratas o ratones a diferentes dosis y durante distintos periodos de tiempo (Zhao *et al.*, 2017; Ishola, Akinyede, Adeluwa y Micah, 2018; Mirshekar, Miri y Shahraki, 2020; Ait-Bali *et al.*, 2020). Debido a que, en la literatura se han reportado cambios en las habilidades de coordinación motora en los animales tras la administración de herbicidas, realizar otras pruebas que evalúen la coordinación motora fina podrían ser útiles para detectar alteraciones más sutiles en los animales intoxicados con ATR, como la prueba de eliminación de adhesivos, así como la tarea de alcance de pellet (Mann y Chesselet, 2015) que además en ambos casos, se pueden utilizar para evaluar la integridad de la vía nigroestriatal (Schaar, Brenneman y Savitz, 2010; Plowman y Kleim, 2011).

El hecho de que no se hayan observado efectos en la ALE y en la coordinación motora, que concuerden con los hallazgos previos en la literatura, no descarta el potencial efecto tóxico de la ATR, ya que se debe tomar en cuenta que los animales suelen tener respuestas diferentes ante los xenobióticos y que su susceptibilidad está directamente relacionada con factores externos (temperatura, humedad, luz y hora del día) e intrínsecos (sexo, el estrés, la edad, la enfermedad, el estado fisiológico), que incluyen variaciones biológicas entre especies, cepas y animales (Gad, 2006); en este contexto, la cepa SD, es producida bajo un régimen de apareamiento aleatorio pero controlado, en el que se evita la cópula con parientes cercanos, lo que resulta en animales con características uniformes, pero genéticamente distintos uno de otro, como en otras cepas de “colonia cerrada” (Ej. Wistar y Long Evans), es por ello que, un control adecuado de la reproducción es fundamental para asegurar la uniformidad genética de los animales, aunque la probabilidad de que las colonias pierdan su estabilidad genética es alta, debido a la manipulación artificial realizada por los humanos. Por su parte, las cepas de “colonia cerrada” se utilizan comúnmente en toxicología porque suelen ser análogas a la variabilidad genética de las poblaciones humanas, sin embargo, presentan una variabilidad fenotípica alta, por lo que se requieren muestras grandes para generar resultados estadísticos precisos (Haschek, Rousseaux, Wallig, Bolon y Ochoa, 2013; Kato, 2000), pero a pesar de esto, los datos obtenidos a partir de este tipo de animales son más representativos de lo que sucede de manera común en una población, y en este caso, se propone que los animales utilizados para estos experimentos pudieron ser más resistentes a los efectos generados por la ATR.

Desde hace años, la ATR se ha asociado con hallazgos histopatológicos en el tejido nervioso de ratas y ratones, cuando es administrada a diferentes dosis y durante periodos de tiempo variables (Castano *et al.*, 1982; Coban y Filipov, 2007; Bardullas *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020;); por ello, en el presente estudio se empleó la tinción de Nissl para la evaluación de la morfología neuronal, sin embargo, nuestros resultados indican que la administración de ATR durante 12 meses no estaría asociada con alteraciones importantes en la morfología de las neuronas de la SN, en contraste con los principales hallazgos en

la literatura, entre los que destaca la disminución en el número de neuronas positivas a TH en la SN de ratas SD después de 12 meses de administración (Bardullas *et al.*, 2013), como también se ha reportado en ratones C57BL/6 administrados con diferentes dosis de ATR pero por un periodo de 14 días (Coban y Filipov, 2007), así como degeneración neuronal en el cuerpo estriado de ratas SD después de la administración de ATR durante 45 días o 3 meses (Song *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020;).

Como se presentó en la sección de resultados, con una $n = 3$ por grupo, no se observaron células positivas a FJC en ninguno de los 3 grupos experimentales evaluados después de 12 meses de administración con ATR. Anteriormente, se ha reportado el uso de esta tinción en la rata Zitter (Ehara y Ueda, 2009), una mutante autosómica recesiva que se utiliza como modelo crónico para estudiar la muerte neuronal causada por estrés oxidativo en la SN (Ueda *et al.*, 2005) (mecanismo de muerte que podría ser similar al atribuido a la ATR y su posible acción al inhibir el VMAT – 2, como se mencionó anteriormente) y se observó que en el mes 2 de vida, la marca positiva a FJC se localizó en las terminales dopaminérgicas estriatales, sin evidencia positiva para la SN, por el contrario, en el mes 4 la neurodegeneración ya fue evidente en esta última región y coincidió con una disminución importante de la inmunorreactividad a TH; mientras que, en el mes 12 las células positivas a TH fueron prácticamente nulas, por lo que, se observó un escaso marcaje con FJC en la SN (Ehara y Ueda, 2009). Una aproximación más cercana a nuestros resultados sería la realizada por Cicchetti y colaboradores en el 2005, quienes evaluaron el efecto de la mezcla del fungicida maneb (MB) y el herbicida PQ (30 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente) durante 4 semanas en ratas SD de 2 meses de edad, las cuales no presentaron evidencia de neurodegeneración en la SNpc utilizando la misma tinción como marcador de daño (Cicchetti *et al.*, 2005); por su parte, la administración de dos inyecciones intraperitoneales de los mismos plaguicidas, en la misma dosis y estirpe de rata, pero en animales de 6 meses de edad, tampoco evidenció la presencia de células fluorescentes positivas a neurodegeneración en la SNpc (Saint-Pierre, Tremblay, Sik, Gross y Cicchetti, 2006); ahora bien, con respecto a estos hallazgos, Cicchetti y colaboradores, plantearon en su estudio que

el marcaje de las neuronas con fluoro jade, podría depender del momento en el que se aplicó la eutanasia a los animales y consideraron que la falta de tinción para este fluoróforo en la SNpc podría indicar un curso indolente de tiempo para neurodegeneración en respuesta a PQ/MB; cabe mencionar que, en ambos estudios se realizó el conteo de neuronas dopaminérgicas usando inmunohistoquímica para TH y en los 2 casos hubo una disminución significativa de estas neuronas en la SNpc de los animales tratados con estos plaguicidas, como también sucede cuando se administran 10 mg de ATR durante un año (Bardullas *et al.*, 2013), por lo tanto, con base en nuestros resultados se propone que, los efectos en la integridad neuronal generados por este herbicida, podrían ser difícilmente detectados a los 12 meses, debido a una posible degeneración neuronal temprana, es decir, entre el segundo y cuarto mes de tratamiento, como se observa en la rata mutante Zitter o en ratones de la cepa Swiss administrados con la misma mezcla y dosis (mencionada anteriormente) de los plaguicidas PQ y MB durante 9 semanas (tiempo de tratamiento y eutanasia más prolongados que en los estudios hechos con ratas) en los que se reporta un aumento en el conteo de neuronas positivas a fluoro jade en la SN (Singhal, Srivastava, Patel, Jain y Singh, 2011); es por ello que, se considera como una posibilidad, realizar un curso temporal de los cambios morfológicos de las neuronas de la SN a lo largo de los 12 meses que dura el tratamiento con ATR y de esta manera conocer el momento en el que se presenta el marcaje con fluoro jade asociado a degeneración neuronal.

El conteo celular para Iba1 indica que la ATR no altera el número de microglías en la SN de la rata SD, aunque se ha reportado que la administración de 25, 50 ó 100 mg de ATR/kg durante 14 días, puede generar un aumento en el número de microglías reactivas en la SN de ratas de la misma estirpe, desde el día 2 y hasta el 14 de tratamiento (Zhang *et al.*, 2015) y a pesar de que en el presente estudio no se contó por si sola la microglía reactiva, tampoco se detectó un aumento en la cantidad de células positivas a Iba1 en este núcleo, ya que se sabe que plaguicidas como el glifosato y el clorpirifos pueden aumentar la expresión de Iba1 en regiones cerebrales como el hipocampo y la corteza prefrontal (Voorhees *et al.*, 2019; Ait-Bali *et al.*, 2020); aunque es necesario mencionar que en el estudio de Zhang y

colaboradores, el efecto puede ser consecuencia de las altas dosis de ATR, administradas durante un espacio corto de tiempo y fue mayor en las dosis más altas y en los periodos más prolongados de exposición. Por otro lado, se ha demostrado que la restricción calórica y el ayuno prologado inducen una respuesta de estrés leve en las células cerebrales, que activa mecanismos de compensación que favorecen la producción de factores neurotróficos y proteínas antioxidantes (Martin, Mattson y Maudsley, 2006), incluso se ha reportado que la restricción alimenticia puede favorecer la activación de la microglía para la producción moderada de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de factor de necrosis tumoral α (FNT – α), que en conjunto con la acción de los antioxidantes intrínsecos podrían tener un efecto preventivo neuroprotector (Kraig *et al.*, 2010), estos antecedentes son importantes, debido a que, los animales que se emplearon para la presente investigación estuvieron bajo un régimen de restricción alimenticia que pudo favorecer los mecanismos de compensación en las células cerebrales.

Existe evidencia de que la administración del herbicida glufosinato de amonio (GLA) puede aumentar la expresión de GFAP en varias regiones del cerebro (estriado, hipocampo y en la corteza visual, motora y somatosensorial) del ratón C57BL/6, cuando es administrado a dosis de 2.5, 5 ó 10 mg/kg de peso durante 10 semanas (Meme *et al.*, 2009), de la misma forma que el herbicida PQ, que en dosis de 10 mg/kg durante 5 semanas también puede aumentar la expresión de esta proteína en el mesencéfalo de ratas Long Evans (Somayajulu, 2009), así como, en estudios *in vitro* en donde se ha demostrado que este mismo plaguicida aumenta la expresión de GFAP en astrocitos humanos (Li, Zheng y Zhang, 2018); en este contexto, en la presente investigación se esperaba que la administración de ATR pudiese tener un efecto similar, generando astrocitosis en la SN de la rata SD, sin embargo, no fue así, una de las razones podría ser que las lesiones generadas por químicos al igual que los trastornos neurodegenerativos, así como la axotomía, causan un tipo de astrocitosis denominada isomórfica (Aschner y Costa, 2004; He, Liu y Chen, 2020), que se caracteriza por hipertrofia astrocítica y ligera proliferación de astrocitos que imitan la arquitectura normal del tejido, sin formar una cicatriz clara (Fernaud-Espinosa, Nieto-Sampedro y Bovolenta, 1993), evento que pudo presentarse en los

primeros meses de tratamiento con ATR y que posiblemente revirtió a la normalidad, pues se sabe que la astrocitosis isomórfica es reversible con el paso del tiempo (Verkhatsky, Rodríguez y Parpura, 2013; He *et al.*, 2020). Hasta el momento no se ha encontrado evidencia de los efectos de la ATR en esta población celular, por lo tanto, nuestros resultados a pesar de no ser los esperados, serían los primeros en la literatura en presentar datos con respecto a la administración crónica de ATR y la evaluación de sus efectos en el número de astrocitos en esta región. Por su parte, se ha demostrado que la exposición a sustancias tóxicas puede aumentar la expresión de GFAP y que los astrocitos presentan una respuesta bifásica, que se manifiesta con una expresión inicial aumentada de esta proteína cuando los astrocitos se exponen a dosis bajas de diferentes sustancias tóxicas, seguida de una respuesta inhibitoria a dosis más altas, en la que la expresión de GFAP disminuye, incluso por debajo del control (Cookson, McClean y Pentreatk, 1995).

Nuestros resultados indican que la ATR no altera el número de células positivas a Iba1 ni a GFAP y se cree que, del mismo modo que con la tinción cresil violeta y FJC, esto podría estar asociado a una muerte neuronal presente en los primeros meses de exposición y posiblemente, en conjunto con la proliferación de la microglía y de los astrocitos. Es importante mencionar que, anteriormente se reportó que 2 h después de la administración de 250 mg/ATR a ratones C57BL/6, los niveles de ATR detectados en el cerebro apenas alcanzaron 1 – 1.5 μM (Ross *et al.*, 2009), por lo que las dosis efectivas, derivadas de las que se utilizaron en el presente estudio, podrían ser demasiado bajas para generar un daño histopatológico severo o bien, generar un daño de leve a moderado que revirtió a la normalidad con el paso del tiempo, debido a los posibles mecanismos compensatorios antes mencionados.

Hasta el momento, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la administración de ATR a dosis bajas durante un periodo crónico de 12 meses, no está asociada a hallazgos histopatológicos o alteraciones cuantitativas en las poblaciones de microglía y/o astrocitos de la SN, lo que coincide con la ausencia de alteraciones en la coordinación motora, actividad horizontal y vertical de las ratas

intoxicadas, sin embargo, podría estar involucrada con afecciones del comportamiento estereotipado, como la cadena sintáctica de acicalamiento, lo que sugiere una manifestación inicial y leve de los posibles efectos de la ATR en el sistema dopaminérgico y se sugiere que, las alteraciones en el comportamiento estereotipado asociadas a la ATR deben seguir siendo estudiadas; por lo tanto, no se descartan los efectos tóxicos de este plaguicida, ya que como se ha mencionado repetidamente, las evidencias en la literatura muestran que este herbicida representa un riesgo para la salud del cerebro murino.

IX. Conclusiones

La administración de 1 ó 10 mg de ATR durante 10 meses no tiene efecto en la coordinación motora de las ratas intoxicadas con este plaguicida.

La administración de 10 mg de ATR durante 12 meses podría asociarse con alteraciones de conductas estereotipadas en la rata SD.

La administración crónica de dosis bajas de ATR no se asoció con hallazgos histopatológicos en la SN al examinar su citoarquitectura con la tinción de Nissl.

La administración crónica de dosis bajas de ATR no causó neurodegeneración en la SN de la rata SD cuando se utilizó la tinción FJC como marcador de daño.

La administración crónica de dosis bajas de ATR no se asoció con inflamación o astrocitosis en la SN de la rata SD, cuando se utilizaron los marcadores iba1 y GFAP para evaluar dichas condiciones.

X. Perspectivas

Las evidencias en la literatura indican que la administración de ATR durante 12 meses está relacionada con disminución en el número de neuronas dopaminérgicas en la SN, sin embargo, no se cuenta con datos que indiquen el momento exacto en el que se presenta la muerte de estas neuronas, por ello, se considera necesario

realizar un curso temporal mensual, para conocer el momento exacto en el que mueren o se degeneran las neuronas de la SN y si existen en ese momento alteraciones morfológicas en las células, que coincidan con un aumento en la microglía o astrocitos en este núcleo cerebral. Cabe mencionar que se realizará un análisis de la morfología de la microglía, con la finalidad de identificar de manera más específica posibles alteraciones en esta población celular, que no estén ligadas al número de células residentes, sino más bien, a cambios sutiles en las mismas. Por otro lado, se cuenta con el tejido de la SN de 3 animales por grupo experimental, que ya ha sido procesado para realizar microscopia electrónica de transmisión, con la finalidad de indagar en la ultraestructura de las células y así, contar con más evidencias acerca de los posibles efectos de la ATR en la SN de la rata SD.

Referencias

- Abarikwu, S. O., Farombi, E. O., & Pant, A. B. (2011). Biflavanone-kolaviron protects human dopaminergic SH-SY5Y cells against atrazine induced toxic insult. *Toxicology in Vitro*, 25(4), 848-858. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.02.005>.
- Abel, E. L., Opp, S. M., Verlinde, C. L., Bammler, T. K., & Eaton, D. L. (2004). Characterization of atrazine biotransformation by human and murine glutathione s-transferases. *Toxicological Sciences*, 80(2), 230-238. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh152>.
- Adinoff, B. (2004). Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harvard Review of Psychiatry*, 12(6), 305-320. DOI: [10.1080/10673220490910844](https://doi.org/10.1080/10673220490910844).
- Afari-Sefa, V., Asare-Bediako, E., Kenyon, L., & Micah, J. A. (2015). Pesticide use practices and perceptions of vegetable farmers in the cocoa belts of the Ashanti and western regions of Ghana. *Advances in Crop Science and Technology*, 1-10. DOI: [10.4172/2329-8863](https://doi.org/10.4172/2329-8863).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2003). “*Reseña toxicológica de la atrazina (en inglés)*”. Recuperado el 1 noviembre de 2020, de https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts153.html.
- Ait-Bali, Y., Ba-M'hamed, S., Gambarotta, G., Sassoè-Pognetto, M., Giustetto, M., & Bennis, M. (2020). Pre-and postnatal exposure to glyphosate-based herbicide causes behavioral and cognitive impairments in adult mice: evidence of cortical and hippocampal dysfunction. *Archives of Toxicology*, 1-21. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02677-7>.
- Aschner, M., & Costa, L. G. (Eds.). (2004). The role of glia in neurotoxicity. CRC Press.
- Australian Pesticides and Veterinary Medicine Authority (2004). “*Review of atrazine –technical report: toxicology assessment*”. Recuperado el 20 abril de 2020, de <https://apvma.gov.au/node/14346>.
- Balderrama-Carmona, A. P., Silva-Beltrán, N. P., Alvarez, L. A. Z., Bante, N. P. A., & Palacio, E. F. M. (2020). Consequences of herbicide use in rural environments and their effect on agricultural workers. *In Sustainability Concept In Developing Countries*. IntechOpen. DOI: [10.5772 / intechopen.90546](https://doi.org/10.5772/intechopen.90546).
- 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*, 33(2), 263-272. DOI: [10.1016 / j.ntt.2010.09.001](https://doi.org/10.1016/j.ntt.2010.09.001).
- 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*, 40, 59-66. DOI: [10.1016/j.ntt.2013.10.003](https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.10.003).

- Bautista, F. E. A., Junior, A. S. V., Corcini, C. D., Acosta, I. B., Caldas, S. S., Primel, E. G., & Zanette, J. (2018). The herbicide atrazine affects sperm quality and the expression of antioxidant and spermatogenesis genes in zebrafish testes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 206, 17-22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.02.003>.
- Bejarano-González, F., Aguilera-Márquez, D., Álvarez-Solís, J. D., Arámbula-Meraz, E., Arellano-Aguilar, O., Bastidas-Bastidas, P. J., ... & Waliszewski-Kubiak, S. M. (2017). *Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México*. Texcoco, Estado de México, México: Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, A. C. (RAPAM).
- Berridge, K. C. (1989). Substantia nigra 6-OHDA lesions mimic striatopallidal disruption of syntactic grooming chains: a neural systems analysis of sequence control. *Psychobiology*, 17(4), 377-385. DOI: <https://doi.org/10.3758/BF03337797>.
- Berridge, K. C., Aldridge, J. W., Houchard, K. R., & Zhuang, X. (2005). Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive-compulsive disorder and Tourette's. *BMC biology*, 3(1), 4. DOI: [10.1186/1741-7007-3-4](https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-4).
- Bolles, R. C. (1960). Grooming behavior in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 53(3), 306. DOI: <https://doi.org/10.1037/h0045421>.
- Brady, S., Siegel, G., Albers, R. W., & Price, D. (Eds.). (2005). *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Elsevier.
- Butterfield, P. G., Valanis, B. G., Spencer, P. S., Lindeman, C. A., & Nutt, J. G. (1993). Environmental antecedents of young-onset Parkinson's disease. *Neurology*, 43(6), 1150-1150. DOI: [10.1212 / wnl.43.6.1150](https://doi.org/10.1212/wnl.43.6.1150).
- Campos-Pereira, F. D., Oliveira, C. A., Pigoso, A. A., Silva-Zacarin, E. C., Barbieri, R., Spatti, E. F., ... & Severi-Aguiar, G. D. (2012). Early cytotoxic and genotoxic effects of atrazine on Wistar rat liver: a morphological, immunohistochemical, biochemical, and molecular study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 170-177. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2011.11.020](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.020).
- Castano, P., Ferrario, V. F., & Vizzotto, L. (1982). Sciatic nerve fibers in albino rats after atrazine treatment: a morpho-quantitative study. *International Journal of Tissue Reactions*, 4(4), 269-275.
- Chávez-Pichardo, M. E., Reyes-Bravo, D. Y., Mendoza-Trejo, M. S., Marín-López, A. G., Giordano, M., Hernández-Chan, N., ... & Rodríguez, V. M. (2020). Brain alterations in GABA, glutamate and glutamine markers after chronic atrazine exposure in the male albino rat. *Archives of Toxicology*, 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02806-2>.

- Cicchetti, F., Lapointe, N., Roberge-Tremblay, A., Saint-Pierre, M., Jimenez, L., Ficke, B. W., & Gross, R. E. (2005). Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiology of Disease*, 20(2), 360-371. DOI: [10.1016/j.nbd.2005.03.018](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.03.018).
- Coban, A., & Filipov, N. M. (2007). Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. *Journal of Neurochemistry*, 100(5), 1177-1187. DOI: [10.1111/j.1471-4159.2006.04294.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04294.x).
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (2010). *Catálogo de plaguicidas*. Recuperado el 18 de octubre de 2018, de <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>.
- Cookson, M. R., McClean, R., & Pentreatk, V. W. (1995). Preparation and use of cultured astrocytes for assay of gliotoxicity. En *In Vitro Toxicity Testing Protocols* (pp. 17-23). Humana Press.
- Crossman, A. R., Neary, D., & Frpc, M. D. (2007). *Neuroanatomía. Texto y atlas en color*. Elsevier.
- De Roos, A., Zahm, S. H., Cantor, K. P., Weisenburger, D. D., Holmes, F. F., Burmeister, L. F., & Blair, A. (2003). Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occupational and Environmental Medicine*, 60(9), e11-e11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/oem.60.9.e11>.
- Dong, Y., & Benveniste, E. N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia*, 36(2), 180-190. DOI: <https://doi.org/10.1002/glia.1107>.
- Donna, A., Betta, P. G., Robutti, F., & Bellingeri, D. (1986). Carcinogenicity testing of atrazine: preliminary report on a 13-month study on male Swiss albino mice treated by intraperitoneal administration. *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro*, 8(3-4), 119-121.
- Dow AgroSciences (2016). *Hoja de datos de seguridad: atrazina 500 SC*. Recuperado el 4 de abril de 2020, de http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh_0970/0901b80380970de2.pdf?filepath=cl/pdfs/noreg/013-60047.pdf&fromPage=GetDoc.
- Ehara, A., & Ueda, S. (2009). Application of fluoro-jade C in acute and chronic neurodegeneration models: utilities and staining differences. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 0912170071-0912170071. DOI: [10.1267/ahc.09018](https://doi.org/10.1267/ahc.09018).
- Fernaund-Espinosa, I., Nieto-Sampedro, M., & Bovolenta, P. (1993). Differential activation of microglia and astrocytes in aniso-and isomorphic gliotic tissue. *Glia*, 8(4), 277-291. DOI: <https://doi.org/10.1002/glia.440080408>.

- Foradori, C. D., Hinds, L. R., Hanneman, W. H., & Handa, R. J. (2009). Effects of atrazine and its withdrawal on gonadotropin-releasing hormone neuroendocrine function in the adult female Wistar rat. *Biology of Reproduction*, 81(6), 1099-1105. DOI: [10.1095/biolreprod.109.077453](https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077453).
- Gad, S. C. (Ed.). (2006). *Animal models in toxicology*. CRC press.
- Gammon, D. W., Aldous, C. N., 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: formerly Pesticide Science*, 61(4), 331-355. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.1000>.
- 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*, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/7978219>.
- Garman, R. H. (2010). Histology of the central nervous system. *Toxicologic Pathology*, 39(1), 22–35. DOI: [10.1177/0192623310389621](https://doi.org/10.1177/0192623310389621).
- Gheorghe, R. O., Deftu, A., Filippi, A., Grosu, A., Bica-Popi, M., Chiritoiu, M., ... & Ristoiu, V. (2020). Silencing the cytoskeleton protein Iba1 (ionized calcium binding adapter protein 1) interferes with BV2 microglia functioning. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1-17. DOI: [10.1007/s10571-020-00790-w](https://doi.org/10.1007/s10571-020-00790-w).
- Gorell, J. M., Johnson, C. C., Rybicki, B. A., Peterson, E. L., & Richardson, R. J. (1998). The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology*, 50(5), 1346-1350. DOI: <https://doi.org/10.1212/WNL.50.5.1346>.
- Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T., & Ando, M. (1999). In vitro metabolism of chlorotriazines: characterization of simazine, atrazine, and propazine metabolism using liver microsomes from rats treated with various cytochrome P450 inducers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 156(3), 195-205. DOI: <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8648>.
- Hansen, A. M., Quintanilla, L. G. T., Pacheco, H. M., Canela, M. V., Márquez, L. C. G., Garcés, R. A. G., & Antonio, A. H. (2013). Atrazina: un herbicida polémico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 65-84.
- Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., Wallig, M. A., Bolon, B., & Ochoa, R. (Eds.). (2013). *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. Academic Press.
- Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., ... & Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male african clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4612-4617. DOI: [10.1073/pnas.0909519107](https://doi.org/10.1073/pnas.0909519107).
- Hazell, A. S., Normandin, L., Norenberg, M. D., Kennedy, G., & Yi, J. H. (2006). Alzheimer type II astrocytic changes following sub-acute exposure to

- manganese and its prevention by antioxidant treatment. *Neuroscience Letters*, 396(3), 167–171. DOI: [10.1016/j.neulet.2005.11.064](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.064).
- He, Y., Liu, X., & Chen, Z. (2020). Glial scar—a promising target for improving outcomes after CNS injury. *Journal of Molecular Neuroscience*, 70(3), 340–352. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01417-6>.
- Helgren, M. E., Cliffer, K. D., Torrento, K., Cavnor, C., Curtis, R., DiStefano, P. S., ... & Lindsay, R. M. (1997). Neurotrophin-3 administration attenuates deficits of pyridoxine-induced large-fiber sensory neuropathy. *Journal of Neuroscience*, 17(1), 372–382. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-01-00372.1997>.
- Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, 62(9), 1377–1391. DOI: [10.1002/glia.22683](https://doi.org/10.1002/glia.22683).
- Hopperton, K. E., Mohammad, D., Trépanier, M. O., Giuliano, V., & Bazinet, R. P. (2018). Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer’s disease: a systematic review. *Molecular Psychiatry*, 23(2), 177–198. DOI: <https://doi.org/10.1038/mp.2017.246>.
- Hossain, M. M., & Filipov, N. M. (2008). Alteration of dopamine uptake into rat striatal vesicles and synaptosomes caused by an in vitro exposure to atrazine and some of its metabolites. *Toxicology*, 248(1), 52–58. DOI: [10.1016/j.tox.2008.03.007](https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.03.007).
- Hovens, I. B., Nyakas, C., & Schoemaker, R. G. (2014). A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 1(2), 82–88. DOI: [10.4103/2347-8659.139719](https://doi.org/10.4103/2347-8659.139719).
- Huang, C. L., Chao, C. C., Lee, Y. C., Lu, M. K., Cheng, J. J., Yang, Y. C., ... & Huang, N. K. (2016). Paraquat induces cell death through impairing mitochondrial membrane permeability. *Molecular Neurobiology*, 53(4), 2169–2188. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9198-y>.
- Ishola, I. O., Akinyede, A. A., Adeluwa, T. P., & Micah, C. (2018). Novel action of vinpocetine in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in mice: involvement of oxidative stress and neuroinflammation. *Metabolic Brain Disease*. DOI: [10.1007/s11011-018-0256-9](https://doi.org/10.1007/s11011-018-0256-9).
- Jäkel, S., & Dimou, L. (2017). Glial cells and their function in the adult brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. DOI: [10.3389/fncel.2017.00024](https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00024).
- Jallow, M. F., Awadh, D. G., Albaho, M. S., Devi, V. Y., & Thomas, B. M. (2017). Pesticide knowledge and safety practices among farm workers in Kuwait: results of a survey. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(4), 340. DOI: [10.3390/ijerph14040340](https://doi.org/10.3390/ijerph14040340).

- Jeong, H. K., Ji, K., Min, K., & Joe, E. H. (2013). Brain inflammation and microglia: facts and misconceptions. *Experimental Neurobiology*, 22(2), 59. DOI:[10.5607/en.2013.22.2.59](https://doi.org/10.5607/en.2013.22.2.59).
- Joo, H., Choi, K., & Hodgson, E. (2010). Joo, H., Choi, K., y Hodgson, E. (2010). Human metabolism of atrazine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98(1), 73-79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.05.002>.
- Jowa, L., & Howd, R. (2011). Should atrazine and related chlorotriazines be considered carcinogenic for human health risk assessment? *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 29(2), 91–144. DOI: [10.1080/10590501.2011.577681](https://doi.org/10.1080/10590501.2011.577681).
- Kalueff, A. V., Aldridge, J. W., LaPorte, J. L., Murphy, D. L., & Tuohimaa, P. (2007). Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. *Nature Protocols*, 2(10), 2538. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.367>.
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., & Fentress, J. C. (2016). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), 45–59. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>.
- Katoh, H. (2000). International harmonization of laboratory animals. In *Microbial Status and Genetic Evaluation of Mice and Rats: Proceedings of the 1999 US/Japan Conference*. National Academies Press (US).
- Kauffman, E. B., & Kramer, L. D. (2017). Zika virus mosquito vectors: competence, biology, and vector control. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_10), S976-S990. DOI: [10.1093/infdis/jix405](https://doi.org/10.1093/infdis/jix405).
- Kaufmann, W., Bolon, B., Bradley, A., Butt, M., Czasch, S., Garman, R. H., ... & McKay, J. (2012). Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse central and peripheral nervous systems. *Toxicologic Pathology*, 40(4_suppl), 87S-157S. DOI:[10.1177/0192623312439125](https://doi.org/10.1177/0192623312439125).
- Komsky-Elbaz, A., Saksier, M., Biran, D., Argov-Argaman, N., Azaizeh, H., Landau, Y. S., & Roth, Z. (2019). Atrazine-induced toxicity in goat spermatozoa is alleviated to some extent by polyphenol-enriched feed. *Chemosphere*. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2019.124858](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124858).
- Kraig, R. P., Mitchell, H. M., Christie-Pope, B., Kunkler, P. E., White, D. M., Tang, Y. P., & Langan, G. (2010). TNF- α and microglial hormetic involvement in neurological health and migraine. *Dose-Response*, 8(4), dose-response. DOI: [10.2203/dose-response.09-056.kraig](https://doi.org/10.2203/dose-response.09-056.kraig).
- Kucka, M., Pogrmic-Majkic, K., Fa, S., Stojilkovic, S. S., & Kovacevic, R. (2012). Atrazine acts as an endocrine disrupter by inhibiting cAMP-specific phosphodiesterase-4. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 265(1), 19-26. DOI: [10.1016/j.taap.2012.09.019](https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.09.019).

- Lang, D. H., Rettie, A. E., & Böcker, R. H. (1997). Identification of enzymes involved in the metabolism of atrazine, terbuthylazine, ametryne, and terbutryne in human liver microsomes. *Chemical Research in Toxicology*, 10(9), 1037-1044. DOI: <https://doi.org/10.1021/tx970081l>.
- Lasserre, J. P., Fack, F., Revets, D., Planchon, S., Renaut, J., Hoffmann, L., ... & Bohn, T. (2009). Effects of the endocrine disruptors atrazine and PCB 153 on the protein expression of MCF-7 human cells. *Journal of Proteome Research*, 8(12), 5485-5496. DOI: <https://doi.org/10.1021/pr900480f>.
- Li, J., Li, X., Bi, H., Ma, K., & Li, B. (2018). Developmental exposure to atrazine impairs spatial memory and downregulates the hippocampal D1 dopamine receptor and cAMP-dependent signaling pathway in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2241. DOI: [10.3390/ijms19082241](https://doi.org/10.3390/ijms19082241).
- Li, P., Li, X., Yao, L., Wu, Y., & Li, B. (2020). Soybean isoflavones prevent atrazine-induced neurodegenerative damage by inducing autophagy. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110065. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110065>.
- Li, Z., Zheng, J., & Zhang, X. F. (2018). Detrimental effects of paraquat on astrocytes-regulating synaptic functions. *Dose-Response*, 16(2), 1559325818761681. DOI: [10.1177/1559325818761681](https://doi.org/10.1177/1559325818761681).
- Lin, Z., Dodd, C. A., & Filipov, N. M. (2013). Short-term atrazine exposure causes behavioral deficits and disrupts monoaminergic systems in male C57BL/6 mice. *Neurotoxicology and Teratology*, 39, 26-35. DOI: [10.1016/j.ntt.2013.06.002](https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.06.002).
- MacLennan, P. A., Delzell, E., Sathiakumar, N., Myers, S. L., Cheng, H., Grizzle, W., ... & Wu, X. C. (2002). Cancer incidence among triazine herbicide manufacturing workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 44(11), 1048-1058. DOI: [10.1097 / 00043764-200211000-00011](https://doi.org/10.1097/00043764-200211000-00011).
- Mann, A., & Chesselet, M. F. (2015). Techniques for motor assessment in rodents. In *Movement Disorders* (pp. 139-157). Academic Press.
- Martin, B., Mattson, M. P., & Maudsley, S. (2006). Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. *Ageing Research Reviews*, 5(3), 332-353. DOI: [10.1016/j.arr.2006.04.002](https://doi.org/10.1016/j.arr.2006.04.002).
- Martins-Santos, E., Pimenta, C. G., Campos, P. R. N., Franco, M. B., Gomes, D. A., Mahecha, G. A. B., & Oliveira, C. A. (2017). Persistent testicular structural and functional alterations after exposure of adult rats to atrazine. *Reproductive Toxicology*, 73, 201-213. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.08.010>.
- Martins-Santos, E., Pimenta, C. G., Campos, P. R. N., Oliveira, A. G., Mahecha, G. A. B., & Oliveira, C. A. (2018). Atrazine affects the morphophysiology, tissue homeostasis and aromatase expression in the efferent ductules of adult rats

- with mild alterations in the ventral prostate. *Chemosphere*, 193, 958-967. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.124>.
- Meme, S., Calas, A. G., Montécot, C., Richard, O., Gautier, H., Gefflaut, T., ... & Beloeil, J. C. (2009). MRI characterization of structural mouse brain changes in response to chronic exposure to the glufosinate ammonium herbicide. *Toxicological Sciences*, 111(2), 321-330. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp174>.
- Miltiadous, P., Stamatakis, A., & Stylianopoulou, F. (2010). Neuroprotective effects of IGF-I following kainic acid-induced hippocampal degeneration in the rat. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(3), 347-360. DOI: [10.1007/s10571-009-9457-4](https://doi.org/10.1007/s10571-009-9457-4).
- Mirshekar, M. A., Miri, S., & Shahraki, A. (2020). A survey of the effects of diosmin on learning and memory following the use of paraquat herbicide poisoning in a model of rats. *Shiraz E-Medical Journal*, 21(5). DOI: [10.5812 / semj.94143](https://doi.org/10.5812/semj.94143).
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2017). Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology*, 91(2), 549-599. DOI: [10.1007/s00204-016-1849-x](https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x).
- Mubushar, M., Aldosari, F. O., Baig, M. B., Alotaibi, B. M., & Khan, A. Q. (2019). Assessment of farmers on their knowledge regarding pesticide usage and biosafety. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1903-1910. DOI: [10.1016/j.sjbs.2019.03.001](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.03.001).
- Muir, K., Rattanamongkolgul, S., Smallman-Raynor, M., Thomas, M., Downer, S., & Jenkinson, C. (2004). Breast cancer incidence and its possible spatial association with pesticide application in two counties of England. *Public Health*, 118(7), 513-520. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2003.12.019>.
- Munger, R., Isacson, P., Hu, S., Burns, T., Hanson, J., Lynch, C. F., ... & Hausler Jr, W. J. (1997). Intrauterine growth retardation in Iowa communities with herbicide-contaminated drinking water supplies. *Environmental Health Perspectives*, 105(3), 308-314. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.97105308>.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009, Plaguicidas: que establece los requisitos del envase, embalaje y etiquetado de productos grado técnico y para uso agrícola, forestal, pecuario, jardinería, urbano, industrial y doméstico. Diario Oficial de la Federación, Ciudad de México, México, 13 de abril de 2010.
- O'Connor, J. C., Plowchalk, D. R., Van Pelt, C. S., Davis, L. G., & Cook, J. C. (2000). Role of prolactin in chloro-s-triazine rat mammary tumorigenesis. *Drug and Chemical Toxicology*, 23(4), 575-601. DOI: <https://doi.org/10.1081/DCT-100101972>.
- Okoffo, E. D., Mensah, M., & Fosu-Mensah, B. Y. (2016). Pesticides exposure and the use of personal protective equipment by cocoa farmers in Ghana.

Environmental Systems Research, 5(1), 17. DOI: [10.1186/s40068-016-0068-z](https://doi.org/10.1186/s40068-016-0068-z).

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2017) FAOSTAT. Recuperado el 2 abril de 2020.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación / Organización Internacional del Trabajo. (2015). *¡Protege a los niños de los plaguicidas! Guía visual del facilitador*. Recuperado el 13 de noviembre de 2020, de <http://www.fao.org/3/a-i4598s.pdf>.

Ortíz, I., Avila-Chávez, M. A., & Torres, L. G. (2014). Erratum to: plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 2(5), 1-1. DOI: [10.7603/s40682-013-0003-1](https://doi.org/10.7603/s40682-013-0003-1).

Ospina-García, N., Pérez-Lohman, C., Vargas-Jaramillo, J. D., Cervantes-Arriaga, A., & Rodríguez-Violante, M. (2017). Ganglios basales y conducta. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 18(6), 74-86.

Pelosi, A., Girault, J. A., & Hervé, D. (2015). Unilateral lesion of dopamine neurons induces grooming asymmetry in the mouse. *PLoS One*, 10(9), e0137185. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137185>.

Plowman, E. K., & Kleim, J. A. (2011). Behavioral and neurophysiological correlates of striatal dopamine depletion: a rodent model of Parkinson's disease. *Journal of Communication Disorders*, 44(5), 549-556. DOI: [10.1016/j.jcomdis.2011.04.008](https://doi.org/10.1016/j.jcomdis.2011.04.008).

Poirier, L. J., Giguère, M. & Marchand, R. (1983). Comparative morphology of the substantia nigra and ventral tegmental area in the monkey, cat and rat. *Brain Research Bulletin*, 11(3), 371–397. DOI:[10.1016/0361-9230\(83\)90173-9](https://doi.org/10.1016/0361-9230(83)90173-9).

PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-127-SSA1-2017, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua. Diario Oficial de la Federación, Ciudad de México, México, 6 de diciembre de 2019.

Pubchem: open chemistry data base: atrazine. Recuperado el 2 de abril de 2020, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/atrazine#section=Top>.

Puig, M., Rose, J., Schmidt, R., & Freund, N. (2014). Dopamine modulation of learning and memory in the prefrontal cortex: insights from studies in primates, rodents, and birds. *Frontiers in Neural Circuits*, 8, 93. DOI: [10.3389/fncir.2014.00093](https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00093).

Rodríguez V.M., Mendoza-Trejo, M.S., Hernández-Plata I., & Giordano M. (2017). Behavioral effects and neuroanatomical targets of acute atrazine exposure in the male Sprague-Dawley rat. *NeuroToxicology*, 58, 161–170. DOI: [10.1016/j.neuro.2016.12.006](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.12.006).

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*, 34, 82-94. DOI: [10.1016/j.neuro.2012.10.012](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.10.012).
- Ross, M. K., Jones, T. L., & Filipov, N. 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*, 37(4), 776-786. DOI: [10.1124/dmd.108.024927](https://doi.org/10.1124/dmd.108.024927).
- Rubin, L. L., & Staddon, J. M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annual Review of Neuroscience*, 22(1), 11-28. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.11>.
- Saalfeld, G. Q., Junior, A. S. V., Castro, T., Pereira, F. A., Gheller, S. M. M., da Silva, A. C., ... & Colares, E. P. (2018). Low atrazine dosages reduce sperm quality of *Calomys laucha* mice. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(3), 2924-2931. DOI: [10.1007/s11356-017-0657-z](https://doi.org/10.1007/s11356-017-0657-z).
- Saint-Pierre, M., Tremblay, M. È., Sik, A., Gross, R. E., & Cicchetti, F. (2006). Temporal effects of paraquat/maneb on microglial activation and dopamine neuronal loss in older rats. *Journal of Neurochemistry*, 98(3), 760-772. DOI: [10.1111/j.1471-4159.2006.03923.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03923.x).
- Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. W., & van den Berg, M. (2002). Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182(1), 44-54. DOI: <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9420>.
- Sanderson, J. T., Letcher, R. J., Heneweer, M., Giesy, J. P., & van den Berg, M. (2001). Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*, 109(10), 1027-1031. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.011091027>.
- Schaar, K. L., Brenneman, M. M., & Savitz, S. I. (2010). Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental and Translational Stroke Medicine*, 2(1), 13. DOI: [10.1186/2040-7378-2-13](https://doi.org/10.1186/2040-7378-2-13).
- Schummers, J., Yu, H., & Sur, M. (2008). Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science*, 320(5883), 1638-1643. DOI: [10.1126/science.1156120](https://doi.org/10.1126/science.1156120).
- Semchuk, K. M., Love, E. J., & Lee, R. G. (1992). Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology*, 42(7), 1328-1328. DOI: <https://doi.org/10.1212/WNL.42.7.1328>.
- Shukla, A., & Devine, M. D. (2008). Basis of crop selectivity and weed resistance to triazine herbicides. *The Triazine Herbicides*, 50, 111-118. DOI: [10.1016/b978-044451167-6.50012-x](https://doi.org/10.1016/b978-044451167-6.50012-x).

- Sifatec (2015). Hoja de datos de seguridad: coach. Recuperado el 2 de abril de 2020, de <https://sifatec.com.mx/wp-content/uploads/2015/09/COACH-90-DF-ilovepdf-compressed.pdf>.
- Singhal, N. K., Srivastava, G., Patel, D. K., Jain, S. K., & Singh, M. P. (2011). Melatonin or silymarin reduces maneb-and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in the mouse. *Journal of Pineal Research*, 50(2), 97-109. DOI: [10.1111/j.1600-079X.2010.00819.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00819.x).
- Somayajulu, M. (2009). A model of sporadic Parkinson's disease: herbicide induced Parkinson's disease in rat and neuroprotection by water soluble CoQ10. *Electronic Theses and Dissertations*, 8001. Recuperado el 1 de noviembre de 2020, de <https://scholar.uwindsor.ca/etd/8001>.
- Song, X. Y., Li, J. N., Wu, Y. P., Zhang, B., & Li, B. X. (2015). Atrazine causes autophagy-and apoptosis-related neurodegenerative effects in dopaminergic neurons in the rat nigrostriatal dopaminergic system. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 13490-13506. DOI: [10.3390/ijms160613490](https://doi.org/10.3390/ijms160613490).
- Sonne, J., & Beato, M. R. (2018). Neuroanatomy, substantia nigra. En *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Spruijt, B. M., Van Hooff, J. A., & Gispen, W. H. (1992). Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological Reviews*, 72(3), 825-852. DOI: [10.1152/physrev.1992.72.3.825](https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.3.825).
- Stojanovic, B. J., Hutto, F., Kennedy, M. V., & Shuman Jr, F. L. (1972). Mild thermal degradation of pesticides. *Journal of Environmental Quality*, 1(4), 397-401. DOI: <https://doi.org/10.2134/jeq1972.00472425000100040013x>.
- Syngenta. 2010. Hoja de datos de seguridad: gesaprim calibre 90 G.D.A. Recuperado el 2 de abril de 2020, de <http://dunemexicali.com.mx/archivos/AGROQUIMICOS/PROTECCION%20DE%20CULTIVOS/CONVENCIONALES/HERBICIDAS/SYNGENTA/GESA PRIM%20CA%2090/GESAPRIM%20CA%2090%20HS.pdf>.
- Ueda, S., Sakakibara, S. I., Nakadate, K., Noda, T., Shinoda, M., & Joyce, J. N. (2005). Degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra of zitter mutant rat and protection by chronic intake of vitamin E. *Neuroscience Letters*, 380(3), 252-256. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.01.053>.
- Verkhatsky, A., Rodríguez, J. J., & Parpura, V. (2013). Astroglia in neurological diseases. *Future Neurology*, 8(2), 149-158. DOI: <https://doi.org/10.2217/fnl.12.90>.
- Villanueva, C. M., Durand, G., Coutté, M. B., Chevrier, C., & Cordier, S. (2005). Atrazine in municipal drinking water and risk of low birth weight, preterm delivery, and small-for-gestational-age status. *Occupational and Environmental Medicine*, 62(6), 400-405. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/oem.2004.016469>.

- Vlaardingerboek A., Brignon J.-M., Genty A., Feenstra L., Oesterholt I., Krupanek J., & Zielonka U. (2009). An inventory and assessment of options for reducing emissions: atrazine. *Source Control of Priority Substances in Europe. (Socopse). Deliverable, (3.1).*
- Voorhees, J. R., Remy, M. T., Erickson, C. M., Dutca, L. M., Brat, D. J., & Pieper, A. A. (2019). Occupational-like organophosphate exposure disrupts microglia and accelerates deficits in a rat model of Alzheimer's disease. *npj Aging and Mechanisms of Disease, 5(1)*, 1-14. DOI: [10.1038/s41514-018-0033-3](https://doi.org/10.1038/s41514-018-0033-3).
- 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, 289(2)*, 185–192. DOI: [10.1016/j.taap.2015.09.026](https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.09.026).
- Wang, S., Zhang, Q., Zheng, S., Chen, M., Zhao, F., & Xu, S. (2019). Atrazine exposure triggers common carp neutrophil apoptosis via the CYP450s/ROS pathway. *Fish and Shellfish Immunology, 84*, 551-557. DOI: [10.1016/j.fsi.2018.10.029](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.029).
- Waxman S.G. (2010). *Neuroanatomía clínica*. McGraw-Hill.
- Wetzel, L. T., Luempert III, L. G., Breckenridge, C. B., Tisdell, M. O., Stevens, J. T., Thakur, A. K., ... & Eldridge, J. C. (1994). Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues, 43(2)*, 169-182. DOI: [10.1080/15287399409531913](https://doi.org/10.1080/15287399409531913).
- Wilson, C., & Tisdell, C. (2001). Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecological economics, 39(3)*, 449-462. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(01\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(01)00238-5).
- World Health Organization / International Programme on Chemical Safety. (2010). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009*. Recuperado el 14 de agosto de 2020, de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44271>.
- World Health Organization. (2003). *Atrazine in drinking-water: background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality* (No. WHO/SDE/WSH/03.04/32). Recuperado el 2 de abril de 2020, de [http://www.who.int/water sanitation health/dwq/chemicals/antrazine.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/antrazine.pdf).
- Xu, S., Lu, J., Shao, A., Zhang, J. H., & Zhang, J. (2020). Glial cells: role of the immune response in ischemic stroke. *Frontiers in Immunology, 11*, 294. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00294>.
- Yadav, R., Kori, R., Thakur, R., & Kumar, R. (2018). assessment of adverse health effects among chronic pesticide-exposed farm workers in Sagar district of Madhya Pradesh, India. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases, 8(4)*, 153. DOI: [10.4103/ijnpnd.ijnpnd_48_18](https://doi.org/10.4103/ijnpnd.ijnpnd_48_18).

- Yang, Z., & Wang, K. K. W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences*, 38(6), 364–374. DOI: [10.1016/j.tins.2015.04.003](https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003).
- Yarpuz-Bozdogan N. (2018). The importance of personal protective equipment in pesticide applications in agriculture. *Current Opinion in Environmental Science and Health*. 4:1-4. DOI: [10.1016/j.coesh.2018.02.001](https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.02.001).
- Yuan, B., Liang, S., Jin, Y. X., Zhang, M. J., Zhang, J. B., & Kim, N. H. (2017). Toxic effects of atrazine on porcine oocytes and possible mechanisms of action. *PloS One*, 12(6), e0179861. DOI: [10.1371/journal.pone.0179861](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179861).
- Zeljezic, D., Garaj-Vrhovac, V., & Perkovic, P. (2006). Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicology in Vitro*, 20(6), 923-935. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.01.017>.
- Zhang, B., Ma, K., & Li, B. (2015). Inflammatory reaction regulated by microglia plays a role in atrazine-induced dopaminergic neuron degeneration in the substantia nigra. *The Journal of Toxicological Sciences*, 40(4), 437–450. DOI: [10.2131/jts.40.437](https://doi.org/10.2131/jts.40.437).
- Zhang, C., Qin, L., Dou, D. C., Li, X. N., Ge, J., & Li, J. L. (2018). Atrazine induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in quail (*Coturnix C. coturnix*) kidney via modulating Nrf2 signaling pathway. *Chemosphere*, 212, 974-982. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2018.08.138](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.138).
- Zhao, X., Wang, R., Xiong, J., Yan, D., Li, A., Wang, S., ... & Zhou, J. (2017). JWA antagonizes paraquat-induced neurotoxicity via activation of Nrf2. *Toxicology Letters*, 277, 32–40. DOI: [10.1016/j.toxlet.2017.04.011](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.04.011).
- Zhu, J., Patzoldt, W. L., Radwan, O., Tranel, P. J., & Clough, S. J. (2009). Effects of photosystem-II-interfering herbicides atrazine and bentazon on the soybean transcriptome. *The Plant Genome*, 2(2), 191-205. DOI: [10.3835/plantgenome2009.02.0010](https://doi.org/10.3835/plantgenome2009.02.0010).
- Zhu, L., Dong, X., Xie, H., Wang, J., Wang, J., Su, J., & Yu, C. (2011). DNA damage and effects on glutathione-S-transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 26(5), 480-488. DOI: [10.1002/tox.20575](https://doi.org/10.1002/tox.20575).
- Zhu, Y., Liu, F., Zou, X., & Torbey, M. (2015). Comparison of unbiased estimation of neuronal number in the rat hippocampus with different staining methods. *Journal of Neuroscience Methods*, 254, 73-79. DOI: [10.1016/j.jneumeth.2015.07.022](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.07.022).

Apéndices

Apéndice A. Tinción de Nissl

	Solución	Tiempo
1	Cloroformo absoluto	30 min
2	Alcohol 25 %	2 min
3	Violeta de cresilo (0.25 g de violeta de cresilo (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en 100 mL de alcohol al 25%)	7 min
4	Alcohol 50 %	1 min
5	Alcohol 70 %	5 min
6	Solución diferenciadora (300 mL de alcohol al 70% con 10 gotas de ácido acético)	30 s
7	Alcohol 95 %	1 min
8	Alcohol absoluto	30 s
9	Alcohol : Xilol	2 min
10	Xilol	2 min

Apéndice B. Tinción fluoro jade C

	Solución	Tiempo
1	Alcohol 80% al 1 % NaOH	5 min
2	Alcohol 70 %	2 min
3	H ₂ O desionizada	2 min
4	KMnO ₄ al 0.06 %	10 min
5	H ₂ O desionizada	2 min
6	FJC al 0.0004 % en ácido acético al 0.1 % (Sigma Aldrich)	20 min
7	3 lavados con H ₂ O desionizada	2 min c / uno

Apéndice C. Técnica inmunohistoquímica

	Solución	Tiempo
1	Buffer salino de fosfato de potasio (KPBS) al 0.05 M.	6 lavados de 10 min c / uno
2	Peróxido de hidrógeno al 0.3 % en KPBS	15 min
3	Buffer salino de fosfato de potasio (KPBS) al 0.05 M.	3 lavados de 10 min c / uno
4	Anticuerpo primario a 4°C Iba1 (1:3000) o GFAP (1:15000)	72 horas
5	Buffer salino de fosfato de potasio (KPBS) al 0.05 M.	6 lavados de 10 min c / uno
6	Anticuerpo secundario (1:800) Anti-rabbit (BA-1000-1.5; Vector Laboratories);	1 h a temperatura ambiente
7	Buffer salino de fosfato de potasio (KPBS) al 0.05 M.	5 lavados de 10 min c / uno
8	Complejo Avidina Biotina (ABC) VECTASTAIN® Elite ABC-HRP Kit, Peroxidase (Standard) (PK-6100; Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA)	1 h a temperatura ambiente
9	Buffer salino de fosfato de potasio (KPBS) al 0.05 M.	3 lavados de 5 min c / uno
10	Acetato de sodio al 0.175 M	3 lavados de 5 min c / uno
11	Diaminobencidina	20 min
12	Acetato de sodio al 0.175 M	3 lavados de 5 min c / uno
13	Buffer salino de fosfato de potasio (KPBS) al 0.05 M.	2 lavados de 5 min c / uno