



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
DE JURIQUILLA

“EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN REPETIDA AL HERBICIDA
ATRAZINA EN EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO
NIGROESTRIATAL DE LA RATA HEMBRA
SPRAGUE-DAWLEY”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN NEUROCIENCIAS

P R E S E N T A

TRIANA ACEVEDO HUERGO

TUTOR: Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

Juriquilla, Querétaro, Agosto 2023.





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.

Agradecimientos

A mi tutora, la Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova, por compartir sus conocimientos conmigo, por su paciencia y por el increíble ambiente de su laboratorio, además del chisme que compartíamos casi todos los días. Por escucharme, por sus consejos tanto de la tesis como de vida, por alentarme, orientarme e incrementar mi gusto por la neurotoxicología, por haberme ofrecido un proyecto con hembras ya que despertó aún más mi interés en profundizar el conocimiento que se tiene en ellas/nosotras. Por hacer esta última etapa, una muy divertida.

A la bióloga, María Soledad Mendoza Trejo; Sol, por su constante apoyo en la elaboración de este proyecto, por su orientación en la manipulación de mis ratitas, por compartirme una pizca de la infinidad de conocimiento que posee, por sus gelatinas deliciosas y por la plática y chismes que nos echábamos con la Dra. en el lab.

A mi mamá, por su apoyo incondicional, por escucharme todas esas veces que surgieron dudas sobre mi camino. Por ser mi roca en este proceso tan complicado, pero divertido.

A mi papá, por su apoyo incondicional, por alentarme a no rendirme y escucharme.

A ambos, (mamá y papá) por su comprensión y apoyo, su paciencia y acompañamiento, por su esfuerzo en mantenerme saludable a pesar de las adversidades que se nos presentaron en este último tramo. No tengo palabras suficientes, ni papel suficiente para expresar mi gratitud.

A mi abuela, Apple, simplemente por ser ella. No tengo palabras para describir lo que significa para mí, más de la mitad de mi corazón es suyo.

A mis michis, simplemente por existir, por acompañarme en los ratos de escritura y estrés.

A mi hermano, la rata, por estar.

A Jonathan, mi compañero de laboratorio, pero más que eso, mi amigo, por su constante orientación y acompañamiento, por hacer de este capítulo uno que recordaré con mucho cariño, por ver mis series en tiempos “libres” y chismear, escalar y debatir de la vida.

A mis amigos de vida, Luis Fer (Le Diva) y Mario, por su constante apoyo y, sobre todo, su amistad durante estos últimos 6 años (de la 3 gang al menos), no tengo palabras suficientes para agradecerles, pero sé que vamos por más.

A mis ratas, que ni en esta, ni en mil vidas podré pagarles la contribución que tuvieron en este capítulo. Gracias infinitas.

A todas las personas que tuvieron un impacto en mi vida, haya sido positivo o negativo, sin ustedes no sería la persona que soy hoy.

Al programa de Apoyo de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológicas UNAM-DGAPA-PAPIIT: 212522 y proyecto CONACYT 251510 por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto de investigación.

Resumen

Desde la década de los 50's del siglo pasado, la atrazina (ATR) ha sido uno de los herbicidas más usados a nivel mundial y debido a su uso indiscriminado, actualmente es considerada un contaminante ambiental. Diversos estudios han clasificado a la ATR como un disruptor endócrino y recientemente se han reportado efectos neurotóxicos en ratas macho, donde se ve afectado el sistema dopaminérgico nigroestriatal, indicando que este sistema de neurotransmisión es un blanco de este tóxico. Sin embargo, no existen estudios que evalúen la neurotoxicidad por la exposición a ATR en ratas hembra. Dado lo anterior, en este estudio se emplearon 18 ratas hembra adultas de la cepa Sprague-Dawley, las cuales recibieron seis inyecciones de vehículo (1% metilcelulosa) o 100 mg ATR/kg de peso vía intraperitoneal (IP) durante dos semanas. Cuarenta y ocho horas después de la última administración de ATR, las ratas recibieron una inyección de solución salina IP. Se registró la actividad locomotora de las ratas 15 minutos antes y 2 horas inmediatamente después de cada inyección. Al finalizar el último registro de actividad locomotora, se sacrificaron a los roedores por decapitación y se colectó el estriado (Str), el núcleo accumbens (NAcc) y el mesencéfalo ventral (Midv) con el fin de analizar la dopamina y sus metabolitos, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovalínico (HVA), se utilizó cromatografía líquida (HPLC-DE). Los resultados muestran que la exposición repetida a 100 mg ATR/kg de peso causa hipoactividad, la cual permanece hasta 48 h después de la última administración, además, se incrementan los niveles de DA y DOPAC en el Midv y en el NAcc. Estos datos muestran alteraciones sexo-dependientes por la exposición repetida a ATR siendo el sistema mesolímbico especialmente susceptible en las hembras.

Índice

Agradecimientos.....	2
Lista de figuras	8
II. Antecedentes.....	10
2.1 Sistema nervioso.....	10
2.1.1 Generalidades.....	10
2.2 Ganglios Basales.....	11
2.2.1 Estriado.....	12
2.2.2 Núcleo Accumbens.....	13
2.2.3 Mesencéfalo.....	13
2.2.4 Substancia nigra.....	14
2.2.5 Área ventral tegmental.....	15
2.2.6 Dopamina.....	15
2.2.7 Sistema dopaminérgico.....	17
2.3 Herbicidas.....	19
2.3.1 Generalidades de los herbicidas.....	19
2.3.2 Atrazina.....	19
2.3.3 Metabolismo y biotransformación.....	20
2.4 Exposición a atrazina.....	21
2.4.1 Exposición a atrazina en modelos animales.....	21
2.4.2 Exposición a atrazina en humanos.....	22
2.5 Efectos tóxicos de la atrazina.....	22
2.5.1 Efectos tóxicos de la atrazina en el sistema dopaminérgico.....	22
2.5.2 Efectos de la atrazina en la conducta motora.....	24
2.6 El sexo como factor experimental.....	25
2.7 Ciclo estral.....	27
2.8 Diferencias de sexo ante la exposición a atrazina.....	29
III. Justificación.....	30
IV. Objetivo.....	30

V. Hipótesis.....	30
VI. Materiales y métodos	30
6.1 Animales.....	31
6.2 Reactivos.....	31
6.3 Diseño experimental	32
6.4 Registro de actividad locomotora	32
6.5 Determinación de dopamina y sus metabolitos por HPLC.....	33
6.7 Análisis estadístico	35
VII. Resultados.....	35
7.1 Efecto de la ATR sobre el peso corporal	35
7.2 Efecto de la ATR sobre la actividad locomotora.....	36
7.3 Efecto de la ATR sobre los niveles de DA y sus metabolitos (DOPAC y HVA) en el estriado, núcleo accumbens y mesencéfalo ventral	41
VIII. Discusión	43
8.1 Peso corporal.....	43
8.2 Actividad locomotora	43
8.3 Niveles de DA y sus metabolitos.....	45
IX. Conclusiones	48
X. Perspectivas	48
XI. Referencias.....	49

Lista de abreviaturas

ATR	Atrazina
AVT	Área ventral tegmental
CEDRSSA	Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria
COMT	Catecol-o-metil-transferasa
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DG	Día gestacional
DOPAC	3, 4-dihidroxifenilacético
DPN	Día post natal
EP	Enfermedad de Parkinson
EPA	Agencia de Protección Ambiental
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
HVA	Ácido homovanílico
IP	Intraperitoneal
LH	Hormona leutinizante
MAO	Monoamino oxidasa
NAcc	Núcleo accumbens
PAP	Plaguicida altamente peligroso
PROFECO	Procuraduría Federal del Consumidor
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SNpc	Substancia nigra pars compacta
Str	Estriado
TH	Tirosina hidroxilasa
VMAT2	Transportador vesicular de monoaminas 2

Lista de figuras

Figura 1	Esquema del modelo clásico de los ganglios basales	12
Figura 2	Estructura molecular de la dopamina	16
Figura 3	Esquema de la síntesis de dopamina	17
Figura 4	Esquema del sistema dopaminérgico	18
Figura 5	Estructura química del herbicida ATR	20
Figura 6	Metabolismo de la ATR	21
Figura 7	Esquema del mecanismo de acción propuesto de la ATR	22
Figura 8	Diseño experimental	30
Figura 9	Peso corporal	35
Figura 10	Distancia total	36
Figura 11	Actividad horizontal	37
Figura 12	Número de estereotipias	38
Figura 13	Actividad vertical	39
Figura 14	Niveles de DA, DOPAC y HVA	41
Figura 15	Relación DOPAC/DA	41

I. Introducción

Hoy en día estamos expuestos a miles de agentes externos que afectan nuestro organismo, entre ellos están los plaguicidas, agentes químicos diseñados principalmente para ser tóxicos que previenen o detienen plagas. Un plaguicida, según la FAO (2023), es “cualquier sustancia destinada a impedir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales... incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas”. Dentro de estas sustancias, encontramos a los herbicidas, funguicidas, insecticidas, entre otros. Este tipo de compuestos tienen como uso principal el agrícola y esto viene siendo debido al incremento de población, por lo que los métodos de producción se tienen que aumentar y/o hacerlos más eficientes y una de las maneras de lograrlo es utilizando estas sustancias. Entre los 90's y 2018, el uso de plaguicidas incrementó a nivel mundial un 79%, siendo los herbicidas los que encabezaron el incremento, con un aumento que se mostraba arriba del 100% (CEDRSSA, 2020).

Aunque nosotros como personas consumidoras no estamos exentas de los efectos tóxicos de estos compuestos, los que se llevan la peor parte son los aplicadores de plaguicidas, ya que, en la mayoría de los casos, la administración de estos compuestos no está regulada y se aplica sin protección ya sea porque no hay un conocimiento de aplicación adecuada o por ahorrar gastos en el equipo de protección. Existen diversos estudios que reportan el peligro al que se exponen los aplicadores, entre ellos, se ha informado que la exposición a pesticidas puede desempeñar un papel significativo en el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Viel et al., 1998; Giordano et al., 2006; Carroza et al., 2008;), la infertilidad (Chevrier et al., 2013), la enfermedad de Parkinson (Ascherio et al., 2006; Frigerio et al., 2006; Elbaz et al., 2009), entre otras y los datos parecen indicar una fuerte asociación con la exposición principalmente a herbicidas e insecticidas.

Los plaguicidas se clasifican de acuerdo con su nivel de toxicidad, plaguicidas altamente peligrosos (PAP), el nivel más alto. En México, se utilizan alrededor de 36 PAP de los cuales, cinco se encuentran entre los plaguicidas más tóxicos del mundo. Entre ellos está la atrazina (ATR), un herbicida que está prohibido en 31 países, sin embargo, mundialmente sigue siendo uno de los más utilizados.

Adicionalmente, los pesticidas han sido muy estudiados por, la asociación que se ha establecido entre su exposición en seres humanos y el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Frigerio, et al., 2006; Elbaz et al., 2009), una enfermedad que afecta el movimiento debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra, que resulta en una falta de dopamina en el estriado (Poewe et al., 2017).

Los estudios experimentales presentes en la literatura han sido realizados principalmente utilizando a roedores macho, por lo que la mayoría de los efectos toxicológicos, aunque pueden, en ciertos casos, presentar similitudes con las hembras, no es del todo correcto afirmarlo. En la actualidad, las investigaciones con hembras han ido incrementando, abriendo paso así, a un conocimiento más amplio sobre los diferentes efectos que distintos agentes contaminantes pueden tener en organismos tanto masculinos como femeninos.

II. Antecedentes

2.1 Sistema nervioso

2.1.1 Generalidades

El sistema nervioso tiene dos subdivisiones. La primera subdivisión es el sistema nervioso central (SNC), el cual está compuesto por el encéfalo y la médula espinal y es responsable del procesamiento sensorial y también es el responsable de la memoria, pensamientos y emociones. También, la gran parte de la información que estimula la contracción de los músculos y la secreción de las glándulas son controladas por el SNC. La segunda subdivisión es el sistema nervioso periférico (SNP), el cual consiste en el tejido nervioso que se encuentra afuera del SNC y está constituido por nervios y receptores sensoriales, los receptores sensoriales son estructuras que monitorean los cambios en el ambiente cerebral tanto interno como externo, como los receptores al tacto en la piel, los fotorreceptores en los ojos y los receptores de olfato en la nariz, siendo el SNP el receptor sensorial (Fessenden M, 2017). Un nervio está formado por numerosos axones que, a su vez, se relacionan con el tejido conectivo y vasos sanguíneos fuera de la médula espinal y del cerebro. El cerebro cuenta con 12 pares de nervios craneales, mientras que la médula espinal cuenta con 31 pares de nervios espinales, cada uno de los nervios sigue una vía definida que cumple una función específica de una parte específica del cuerpo. A su vez, el SNP cuenta con dos

divisiones, está la parte sensorial (aférente) y la motora (eferente). La motora se vuelve a dividir en el sistema nervioso somático (SNS), el cual transmite la información de salida del SNC a los músculos esqueléticos, esta acción es una respuesta muscular voluntaria; y la segunda división es el sistema nervioso autonómico (SNA), el cual tiene la función de transmitir la información desde el SNC hacia los músculos lisos, el músculo cardíaco y las glándulas. Dado que las respuestas del SNA son inconscientes, su acción es involuntaria.

En este trabajo nos enfocamos en los movimientos voluntarios, los cuales para su ejecución involucran a los ganglios basales dada la susceptibilidad de estos núcleos a la exposición a pesticidas.

2.2 Ganglios basales

“No puedes tener el cerebro de un vertebrado sin ganglios basales...” -Reiner A., 2010.

Los ganglios basales son un grupo de estructuras interconectadas responsables principalmente del control motor con neuronas excitatorias (glutamato) e inhibitorias (GABA), compuestos por el estriado (conformado por el putamen y el núcleo caudado), globo pálido externo e interno, el núcleo subtalámico y la sustancia nigra (Hendrik J.G et al., 2010). Cabe mencionar que los ganglios basales también tienen participaciones en la memoria motora, en las funciones ejecutivas, en el comportamiento y en las emociones (Lanciego et al., 2012).

Hace más de dos décadas se propuso el modelo clásico de los ganglios basales, el cual muestra cómo es el circuito de información entre los ganglios basales y la corteza cerebral y sugiere dos vías, la vía directa y la vía indirecta (Fig. 1), cada una con efectos opuestos para la ejecución correcta del movimiento (Calabresi et al., 2014; Hendrik JG et al., 2010). Ahora bien, los ganglios basales unen las señales neuroquímicas del sistema límbico y la corteza, las integran y posteriormente las redistribuyen a la corteza frontal y al tallo cerebral, se involucran en el movimiento al regular la actividad de las neuronas motoras.

Daños a los ganglios basales resultan en disfunciones motoras y están involucrados en las enfermedades de Parkinson y Huntington, entre otras.

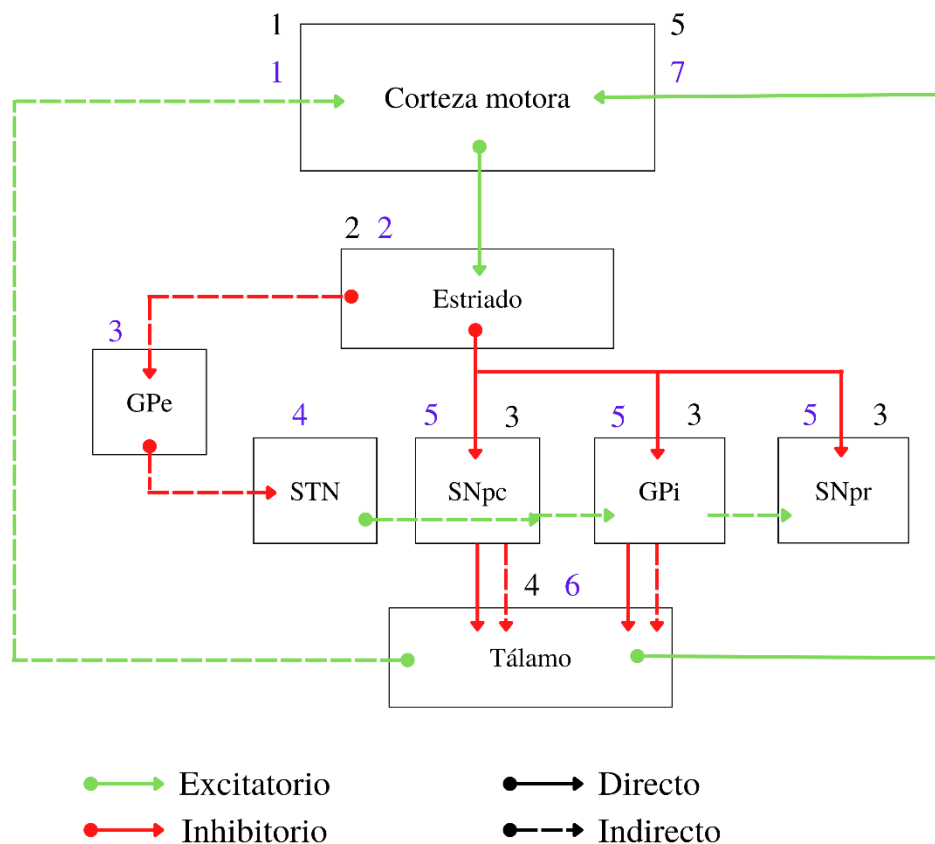


Figura 1. Esquema del modelo clásico de los ganglios basales, compuesto por una proyección corticoestriatal, dando pase a las dos vías de proyección, directa e indirecta. Siendo la vía directa la que inicia el movimiento (números negros: 1. Corteza motora 2. Estriado 3. Globo pálido interno (GPi), sustancia nigra pars compacta (SNpc) y sustancia nigra pars reticulata (SNpr) 4. Tálamo 5. Corteza motora) y la indirecta (números azules: 1. Corteza motora 2. Estriado 3. Globo pálido externo (GPe) 4. Núcleo subtalámico (NST) 5. SNpc, GPi y SNpr 6. Tálamo 7. Corteza motora) la que lo termina. Modificado de Lanciego et al. (2012) en BioRender.

2.2.1 Estriado

El estriado (Str) o cuerpo estriado es considerado la parte receptiva de los ganglios basales, siendo sus neuronas el destino final de distintos circuitos cerebrales (Purves et al., 2004). Este destino de axones provenientes de la corteza son dendritas de neuronas espinosas medianas y se caracterizan por tener ramificaciones grandes que les facilita la integración de la información recibida de distintas regiones y conforman al estriado en un 95%, adicionalmente, estas neuronas son principalmente inhibitorias y liberan GABA (Wilson, 2014). Prácticamente todas las regiones de

la neocorteza tienen proyecciones directas al estriado, esto significa que la corteza cerebral es la fuente de entrada más grande a los ganglios basales (Lanciego et al., 2012).

El estriado, se divide en dorsal y ventral, el estriado ventral está constituido por el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio y sus funciones están involucradas en la modulación de funciones afectivas y motivacionales (Voorn et al., 2004). Mientras que el estriado dorsal, que es considerado la estructura principal de los ganglios basales (Valjent & Gangarossa, 2021), está compuesto por el putamen y el núcleo caudado. El estriado dorsal, a su vez, está dividido en estriado dorsomedial, el cual está involucrado principalmente en conducta de motivación y el estriado dorsolateral, involucrado en la formación de hábitos (Floresco, 2015; Malvaez & Wassum, 2018).

2.2.2 Núcleo Accumbens

El núcleo accumbens (NAcc) es un componente del estriado ventral y se ha considerado durante mucho tiempo una estructura que está involucrada en procesos motivacionales y emocionales, además de tener un rol en el sistema motor límbico. Su estructura es única y puede ser dividida en un núcleo central rodeado ventral, medio y lateralmente por una cubierta (Záborszky L et al., 1985). Recientemente se ha propuesto una división en dos partes, el Nacc “shell” (del inglés que quiere decir cubierta) y NAcc “core” (del inglés que quiere decir núcleo), además se ha asociado a la cubierta NAcc con el sistema límbico y al núcleo del NAcc con el sistema motor, esta observación es clara en roedores, pero en humanos no se distingue del todo (Floresco 2017; Park et al., 2019). Al igual que el estriado, el NAcc está conformado por neuronas espinosas medianas y se encuentran distribuidas de manera heterogénea. Recibe aferencias de la amígdala, área ventral tegmental, hipocampo y corteza prefrontal (Phillipson OT et al., 1985).

2.2.3 Mesencéfalo

El mesencéfalo forma parte de la conexión entre el cerebro, puente y prosencéfalo. El mesencéfalo ventral (Midv) por su parte, cuenta con la vía piramidal que se encarga de los movimientos de las extremidades y la vía corticopontina, que está implicada en los movimientos coordinados y planificados. Esta región cuenta con fibras ascendentes que se extienden desde el tronco del encéfalo hasta la corteza, y con fibras motoras que se originan en la corteza motora y van hacia los

núcleos motores y la médula espinal (Snell et al., 2010). También cuenta con núcleos implicados en la visión, en la vía auditiva, en el movimiento ocular y otros involucrados en los mecanismos de recompensa, así como núcleos relacionados con dos pares de nervios craneales, el nervio óculo motor y el troclear, además uno del trigémino (Mancall et al., 2011, Snell et al., 2010). En el mesencéfalo, la parte anterior, cuenta con un par de tractos denominados pedúnculos cerebrales, que contienen los axones de neuronas motoras de los haces corticobulbar y corticoprotuberancial. Estos axones permiten la conducción de los impulsos nerviosos desde la corteza cerebral hasta la médula espinal, el bulbo raquídeo y la protuberancia (Tortora & Derrickson, 2011). Lesiones o alteraciones en el mesencéfalo pueden causar parálisis de los nervios como síndrome de Benedick, hemiplejía, lesión del tracto trigeminotalámico y la parálisis del tercer par craneal, entre otras (Adeva et al., 1999).

2.2.4 Substancia nigra

La substancia nigra es una parte heterogénea del mesencéfalo y una de las principales estructuras que forman a los ganglios basales. Su rol principal es la modulación del movimiento y también forma parte del sistema de recompensa. La substancia nigra se divide en dos regiones, la substancia nigra pars compacta (SNpc) la cual está conformada por neuronas dopaminérgicas medianas y con proyecciones al estriado, el putamen y el núcleo caudado. Por otro lado, la substancia nigra pars reticulada (SNpr), es conformada heterogéneamente por neuronas GABAérgicas de tamaño grande y mediano, esta tiene proyecciones hacia el tálamo, el colículo superior y el núcleo pedunculopontino (Gilman et al., 1981). En la SNpc, la concentración de neuronas dopaminérgicas es mayor y estas contienen neuromelanina, y debido a esto, en disecciones se puede observar una apariencia oscura, con el paso del tiempo esto disminuye, significando en una disminución de neuronas dopaminérgicas. Cuando la disminución se ve alterada de manera grave se considera una patología, conocida como la enfermedad de Parkinson, en esta enfermedad es característica la muerte neuronal y afecta la síntesis de dopamina (Tanner & Goldman, 1996).

2.2.5 Área ventral tegmental

El área ventral tegmental (AVT) forma parte del mesencéfalo ventral y está formado por grupos de neuronas dopaminérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas (Morales & Margolis, 2017). Se ha observado que las neuronas de esta área tienen la capacidad de liberar más de un neurotransmisor, de igual manera, se ha especulado que la liberación de GABA o glutamato desde el AVT puede generar conductas motivantes sin necesidad de DA, sin embargo, los mecanismos y su significancia son desconocidos.

Las proyecciones principales del AVT van a regiones corticales y subcorticales, proyecciones que conforman la vía mesocortical y la vía mesolímbica, que, a su vez, tiene como función el procesamiento emocional, procesos de motivación y recompensa, aprendizaje y memoria (White, 1996). Al mismo tiempo, las alteraciones en estas vías resultan en depresión mayor (Russo & Nestler, 2013; Friedman et al., 2009), enfermedades como lo es la esquizofrenia (Nielsen et al., 2017), el dolor crónico (Yang et al., 2020) o las adicciones (Berridge & Robinson, 1998; Sinha, 2008).

2.2.6 Dopamina

Por muchos años se creyó que la dopamina (DA) (Fig. 2) estaba en el cerebro únicamente como precursor de la norepinefrina y no fue hasta 1960 que se dio a conocer que es uno de los principales neurotransmisores del SNC (Bear et al., 2016).

La DA pertenece al grupo de las catecolaminas, que son neurotransmisores y/u hormonas del CNS y de la periferia. Es precursora de la norepinefrina y epinefrina, y actúa como un neurotransmisor importante en distintas vías. También funciona como hormona y el tipo de función que ejerza va a depender del sitio donde sea secretado y hacia dónde neuronas que contienen DA se encuentran activas durante respuestas emocionales, conductas de adicción y experiencias placenteras o de recompensa. De igual manera, neuronas que liberan DA auxilian en la regulación de tono muscular y en ciertos aspectos del movimiento que involucra la contracción muscular.

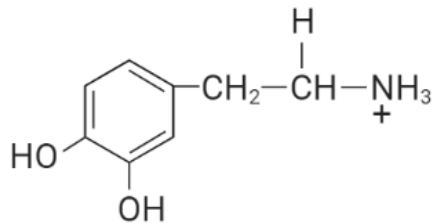


Figura 2. Estructura molecular de la DA.

En cuanto a su síntesis (Figura 3), su precursor es la L-Tirosina, sobre la que actúa la enzima tirosina hidroxilasa, resultando el L-DOPA y a través de la enzima DOPA-descarboxilasa se eliminará un carbono y resultará en la DA, posteriormente sucede la vesiculación de DA mediada por VMAT2 y liberación de DA en la hendidura sináptica seguida de la activación de receptores a DA tipo D1 (D1 y D5) y D2 (D2, D3 y D4), ubicados en la neurona postsináptica y presináptica. Finalmente, para el fin del ciclo de vida de DA, el transportador de DA (DAT) lleva a cabo la recaptación de DA del espacio extracelular por medio de dos enzimas, primero, la monoamino oxidasa B (MAO-B) degrada la DA citosólica a DOPAC (3, 4-dihidroxifenilacético). Mientras que, en el espacio extracelular, la enzima COMT (catecol-o-metiltransferasa) y la MAO degradan la DA extracelular y se produce el ácido homovanílico (HVA) (Elsworth & Roth, 1997; Brady et al., 2012; Wasel & Freeman, 2020).

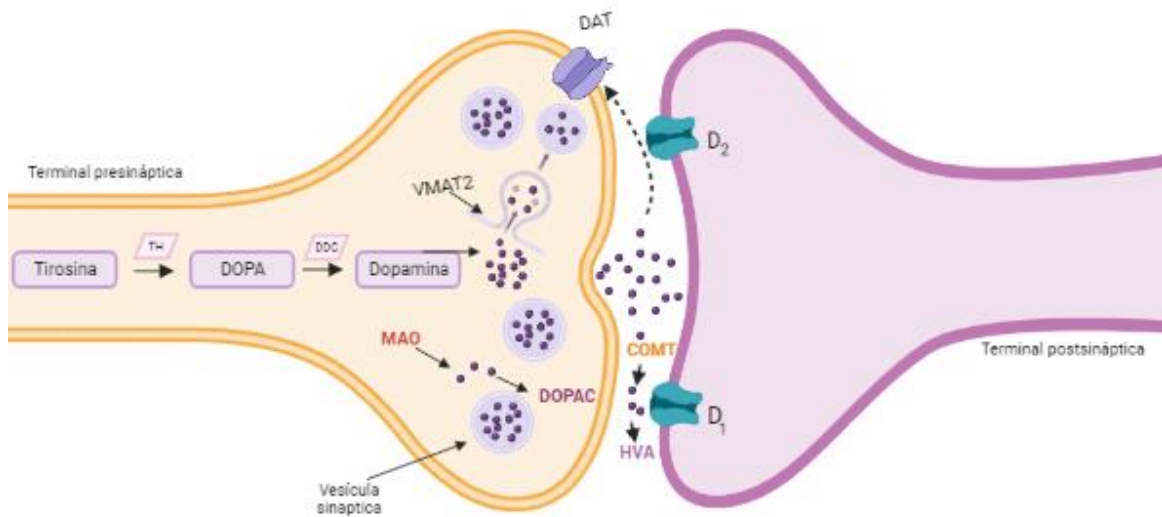


Figura 3. Síntesis de dopamina. El esquema muestra las enzimas implicadas en la síntesis de dopamina. La enzima tirosina hidroxilasa (TH) actúa sobre la tirosina convirtiéndola en DOPA, posteriormente, por acción de la enzima DOPA descarboxilasa sobre el DOPA se sintetiza la dopamina. La cual es posteriormente empacada en vesículas en el citoplasma por VMAT-2 y bajo la acción de un potencial de acción, se libera hacia el espacio sináptico y ya sea que se una a los receptores de DA o sea recaptada hacia el citoplasma por el DAT. Una vez después de la recaptura, la DA puede ser degradada por la enzima MAO a DOPAC o revesiculada por VMAT-2. Si no hay recaptura, la DA del espacio extracelular puede ser degradada a HVA por las enzimas MAO y COMT (Modificado de Wasel & Freeman, 2020 con Biorender).

2.2.7 Sistema dopaminérgico

El sistema dopaminérgico (Figura 4) está conformado por distintos núcleos subcorticales que se encargan de funciones como el procesamiento afectivo y la conducta motora. En la elaboración de este proyecto nos enfocaremos en tres vías dopaminérgicas, la vía mesolímbica, la vía mesocorticolímbica y la vía nigroestriatal.

La vía mesolímbica, que se encarga de modular respuestas conductuales a estímulos de gratificación emocional y de motivación, cuenta con neuronas dopaminérgicas que tienen origen en el área ventral tegmental (AVT) y proyecciones dirigidas principalmente al núcleo accumbens, ubicado en el estriado ventral, aunque también cuenta con proyecciones aferentes que se extienden hacia la amígdala, el hipotálamo lateral, el núcleo de la estría terminal y el área septal lateral, con esto, la recompensa se relaciona a la activación de esta vía. Por otro lado, en la vía mesocortical,

el AVT también cuenta con proyecciones hacia regiones de la corteza prefrontal (Bannon & Roth, 1983), esta vía dopaminérgica es esencial para el reforzamiento, la regulación de movimientos voluntarios y motivación. También está involucrada en la modulación adaptativa del organismo, alteraciones en esta vía han sido relacionadas a esquizofrenia (Nielsen et al., 2017), es importante mencionar que esta vía y la mesolímbica están fuertemente relacionadas, Blum y colaboradores (2012) reportaron que alteraciones en mecanismos de estas vías tienen relación con psicosis (White 1996) y con conductas de adicción, de manera directa como es con la cocaína o indirecta como lo es con la nicotina (Pariyadath et al., 2016).

Por último, la vía nigroestriatal, la cual tiene proyecciones dopaminérgicas que tienen su origen en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) y termina en el estriado y tiene uno de los papeles principales en el control de los movimientos voluntarios y en acciones motoras finas. Alteraciones en esta vía están relacionadas con enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas, como son el síndrome de Tourette y la enfermedad de Parkinson (Bahena et al., 2000).

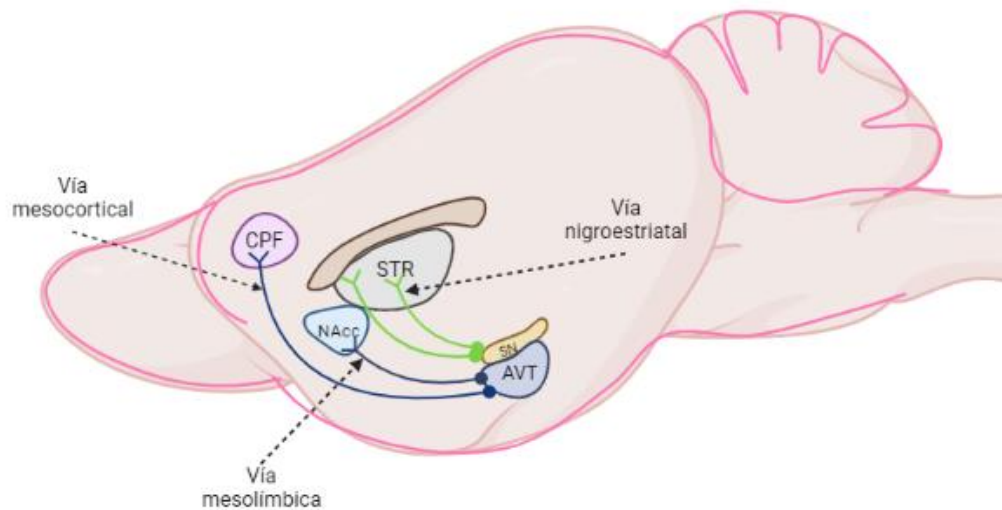


Figura 4. Esquema del sistema dopaminérgico. Esquema que presenta el origen y proyecciones de la vía nigroestriatal (verde), vía mesocortical y vía mesolímbica (azul) en un plano sagital del cerebro de un roedor adulto. SN: sustancia nigra, AVT: área ventral tegmental, NAcc: núcleo accumbens, CPF: corteza prefrontal, STR: estriado. (Modificado de Money et al. 2013, con BioRender).

2.3 Herbicidas

2.3.1 Generalidades de los herbicidas

Los herbicidas, en México, se clasifican como plaguicidas, según la FAO. Dependiendo el organismo al que es aplicado, es la clasificación del plaguicida, entre ellos están los insecticidas, herbicidas, fungicidas y acaricidas.

La Ley General de Salud define a los herbicidas como una “sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten las enfermedades y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieren con la producción agropecuaria forestal...”. Este término comprende a las sustancias utilizadas para la regulación del crecimiento de plantas y las que se aplican en cultivos antes o después de la cosecha.

Particularmente, los herbicidas son clasificados como plaguicidas de uso agrícola, ya que se emplean para el manejo de malezas y plagas dañinas para las cosechas. El uso de estos compuestos es necesario ya que las malezas se alimentan de los nutrientes de los cultivos, crecen rápidamente y se dispersan fácilmente gracias a la cantidad de semillas que sueltan (PROFECO, 2021).

En México, la producción de plaguicidas ha incrementado de manera considerable, en 2018, se fabricaron 123.5 mil toneladas de ellos, de las cuales 33.9 mil toneladas fueron herbicidas (CEDRSSA, 2020).

2.3.2 Atrazina

El herbicida llamado atrazina (6-cloro-N-etil-N-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina; ATR) (Fig. 5) es de espectro amplio y pertenece al grupo de las triazinas. Se utiliza para controlar o eliminar el crecimiento de malezas en diversos cultivos como sorgo, maíz, piña, caña, entre otros (Shaner et al., 2011, PROFECO, 2021). La ATR interfiere en la fotosíntesis de las plantas al interrumpir la cadena de transporte de electrones en el cloroplasto (Gysin & Knuesli, 1960; Hansen et al., 2013). Tiene una vida media de aproximadamente 200 días, en una condición neutra, sin embargo, puede diferir en un aproximado de 4 a 57 semanas, según diferentes factores en el ambiente

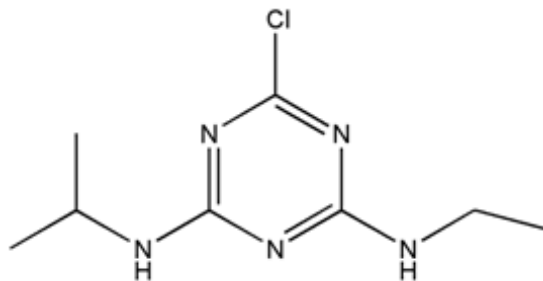


Figura 5. Estructura química del herbicida ATR (6-cloro-N-etil-N-isopropil-1, 3, 5-triazina-2, 4-diamina).

En 1958, la ATR comenzó a utilizarse globalmente como un herbicida de uso previo y posterior. Para 1987, ya empezaba la controversia en torno a la ATR y las preocupaciones ambientales empezaron a aumentar debido a que se empezó a reportar presencia de este herbicida en aguas subterráneas y superficiales (Garrido et al., 2000, Gilliom et al., 2006, Barbash et al., 2001, Meffe et al., 2014). Posteriormente se reportaron alteraciones en anfibios (Hayes et al., 2002), alteraciones en el desarrollo (Cooper et al., 1999, Rohr et al., 2013) y disminución del número de espermatozoides en ratas (Kniewald et al., 2000). Por otro lado, recientemente se ha evaluado la neurotoxicidad de la atrazina en roedores (Bardullas et al., 2011, Rodríguez et al., 2013, 2017; Chávez-Pichardo et al., 2020; Reyes-Bravo et al., 2022). Además, se ha observado que la ATR es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica a través de mecanismos desconocidos (Ross et al., 2009).

2.3.3 Metabolismo y biotransformación

La ATR (Fig. 6) es absorbida de manera principal en el tracto gastrointestinal (Islam et al., 2002). En ratas de la cepa Sprague-Dawley, se ha visto que después de la administración de la dosis oral única de 1 a 100 mg ATR/kg de peso, en un periodo de 7 días independientemente de la dosis o el sexo, aproximadamente se excreta el 74% de la dosis total en orina y un 19% en las heces, lo cual refiere a una absorción completa del herbicida ATR (Orr, 1987).

La ATR se metaboliza en el hígado principalmente por isoenzimas del complejo de citocromos P450 (CYP) a metabolitos clorados desalquilados y también pueden ser metabolizados a metabolitos no clorados a través de la enzima glutatión transferasa (Lang et al., 1997).

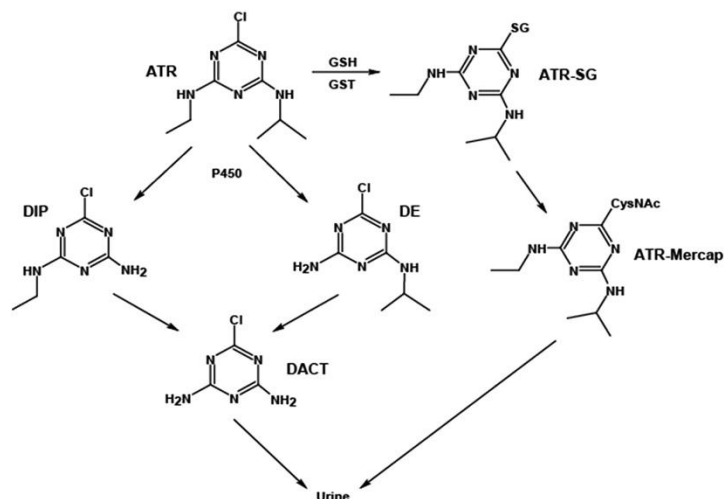


Figura 6. Metabolismo de la ATR. La ATR se metaboliza principalmente por el citocromo P450 y en menor medida por GST. Este esquema muestra diferentes vías y enzimas implicadas en la biotransformación de la ATR en el hígado. DE, desetil-atrazina; DIP, desisopropil-atrazina; DACT, didequil-atrazina; ATR-SG, atrazina-glutation; ATR-Mercap, atrazina-mercaptopuro. DACT ha sido el metabolito principalmente encontrado en estudios in vivo en ratas, en cuanto a humanos, el ATR-Mercap ha sido encontrado en orina, lo que lo clasifica como un metabolito útil para la detección de ATR en humanos. (Ross & Filipov, 2006.)

2.4 Exposición a atrazina

2.4.1 Exposición a atrazina en modelos animales

Estudios han demostrado que la ATR es un disruptor endócrino con diversos efectos, entre ellos, la desmasculinización y feminización en ranas macho (Hayes et al., 2002, 2011), el desarrollo anormal de las glándulas mamarias de roedores hembra (Kass et al., 2020) y la alteración del ciclo ovárico en ratas hembra (Cooper et al., 1999), entre otros.

Los estudios en animales con exposición a ATR han ido incrementando y además de las alteraciones endócrinas, del desarrollo, reproductivas e inmunológicas que se han reportado, se han revelado alteraciones en la actividad locomotora y en los niveles dopaminérgicos del estriado (Cooper et al., 1999; Coban y Filipov, 2007; Bardullas et al., 2011; Rodríguez et al., 2013), atrayendo importancia al enfoque no solo endócrino, sino neurotóxico que tiene este herbicida.

2.4.2 Exposición a atrazina en humanos

En México, datos reportados hasta el año 2021, demuestran que, en el sector primario, existen alrededor de 6.4 millones de trabajadores, de los cuales el 88.4% se conforma por hombres y el 11.6% por mujeres. De estos 6.4 millones de personas, 5.3 millones se dedican al sector agrícola (SIAP, 2021). Adicionalmente, datos recabados en 2022 reportan que alrededor de 992 mil mujeres se dedican a trabajar en el sector primario, de las cuales el 83.9% lo hace en la agricultura (SADR, 2022).

Ahora bien, estudios realizados en humanos han revelado que los trabajadores que se exponen directamente a plaguicidas, entre ellos la atrazina, tienen mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas motoras, como lo es la enfermedad de Parkinson (EP) en hombres. Lo anterior destaca el hecho de que la EP no es una enfermedad enteramente genética y hace énfasis en el papel que juega el medio ambiente que rodea al ser humano en el desarrollo de esta, volviéndola también, una patología de índole neurotóxico ambiental y trayendo a primer plano la exposición a pesticidas como una de las posibles causas de dicha enfermedad (Frigerio, et al., 2006; Elbaz et al., 2009; Smith & Dahodwala, 2014). Por otro lado, en mujeres, se ha reportado que en aquellas que residen cerca de comunidades rurales expuestas a atrazina en agua potable tienen una tendencia a ciclos menstruales irregulares, los cuales incluyen una fase folicular más prolongada y una fase lútea reducida (Cragin et al., 2011). Sin embargo, no toda la información que se tiene sobre los efectos de la exposición a la ATR en humanos es precisa y esta discrepancia puede deberse a que la cuantificación de la ATR no es correcta o es inexistente (Ross et al., 2009).

2.5 Efectos tóxicos de la atrazina

2.5.1 Efectos tóxicos de la atrazina en el sistema dopaminérgico

Se ha reportado que la ATR inhibe la recaptación de DA en vesículas, dicha inhibición disminuye la DA vesicular y aumenta los niveles de DA citosólica, al mismo tiempo, el aumento de DA en el citosol produce autooxidación y se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) (estrés oxidativo), esto ocasiona una toxicidad hacia las neuronas dopaminérgicas, resultando en muerte neuronal (Hossain & Filipov, 2008) (Figura 7).

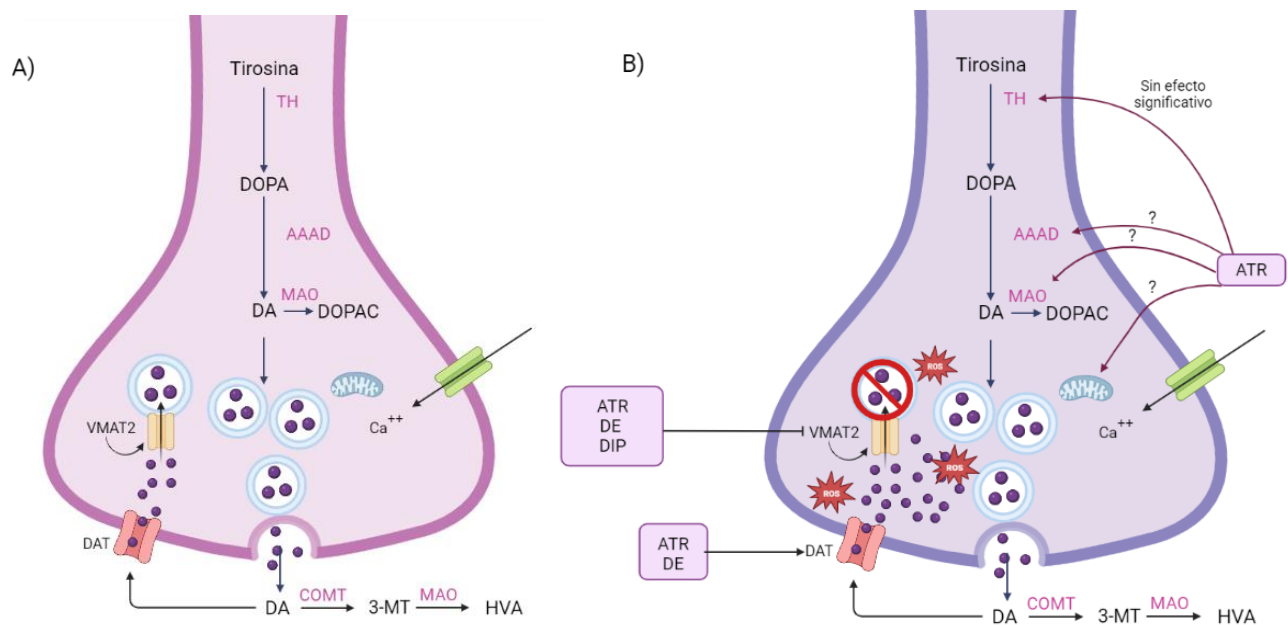


Figura 7. Esquema del mecanismo propuesto de acción de ATR sobre neuronas dopaminérgicas. A) neurona dopaminérgica en estado normal, B) neurona dopaminérgica después de la exposición a ATR. Los efectos que tiene la ATR sobre AAAD, MAO y las mitocondrias son desconocidos. DE, desetil-atrazina; DIP, desisopropil-atrazina; TH, tirosina hidroxilasa; AAAD, aminoácido aromático descarboxilasa; MAO, monoamina-oxidasa; COMT, catecol-o-metiltransferasa; DAT, transportador de dopamina; VMAT2, transportador vesicular de dopamina 2. (Modificado de Hossain & Filipov, 2008; elaborado con BioRender).

En estudios previos en ratas macho que fueron expuestas con ATR mediante seis inyecciones de 100 mg ATR/kg de peso, se reportó una disminución importante en los niveles de DA y sus metabolitos en el estriado y, al mismo tiempo se detectó una regulación temporalmente reducida del gen de la enzima antioxidante tioredoxina en el núcleo accumbens (Trx-1), mientras que para el mesencéfalo ventral se reportó una regulación a la baja del ARNm para tirosina hidroxilasa (TH) y del transportador de DA (DAT) y una regulación a la alta del transportador vesicular de monoaminas (VMAT-2), resultando en una relación baja de ARNm de DAT/VMAT-2 (Rodríguez et al., 2013).

Adicional a lo anterior, estudios en ratas macho con exposición crónica a ATR, mostraron una disminución en los niveles estriatales de DA (Bardullas et al., 2011, 2013). Similarmente, en estudios con ratones macho expuestos a altas dosis de ATR, 125 o 250 mg ATR/kg de peso, durante

dos semanas, resultan en una reducción en los niveles estriatales de DA y sus metabolitos (DOPAC y HVA) (Coban & Filipov, 2007).

Por otro lado, Li y colaboradores (2018) reportaron que la exposición en ratas durante la gestación y la lactancia a 50 o 100 mg ATR/kg de peso, presentan alteraciones en la etapa adulta, en procesos como el aprendizaje, la memoria y las funciones ejecutivas, además de que aumentaba los niveles de la dopamina hipocampal en ambos grupos, mientras que disminuía los niveles de expresión del ARNm de los receptores a dopamina D1 y, a su vez, alteraba la expresión de genes y proteínas en la descendencia. En este mismo sentido, se reportó que la exposición repetida en ratas macho a 100 mg ATR/kg de peso a través de seis inyecciones IP durante dos semanas provocó una disminución en la unión a los receptores a dopamina tipo D1, en el estriado (Márquez-Ramos, et al., 2017).

También, en ratas Wistar se reportó que la ATR en dosis de 10, 50 o 100 mg/kg de peso es responsable de inducir apoptosis de las neuronas dopaminérgicas estriatales y autofagia mitocondrial, al igual que un decremento en el mesencéfalo ventral del número de células TH positivas (Song, X. et al., 2015), lo cual, podría dar explicación a los niveles disminuidos de DA en los estudios previamente mencionados.

2.5.2 Efectos de la atrazina en la conducta motora

Estudios previos en ratas macho con exposición repetida a 100 mg ATR/kg de peso durante dos semanas han reportado hipoactividad inmediatamente después de la inyección con el herbicida, la cual permaneció hasta 5 días después de la inyección. Alteraciones en la actividad locomotora son desenmascaradas utilizando un reto con anfetaminas hasta dos meses después del tratamiento (Rodríguez et al., 2013).

Por otro lado, la exposición crónica a 10 mg ATR/kg de peso durante un año en ratas macho, mostraron alteraciones en la actividad locomotora donde, a los 8 meses de exposición, se observó una disminución en la coordinación motora y posteriormente, a los 12 meses se observó un aumento en la actividad locomotora espontánea en ambas fases del ciclo luz/obscuridad. Estos resultados fueron relacionados al decremento de los niveles de DA estriatales (Bardullas et al., 2011).

Estudios en ratas macho con exposición crónica a 1 o 10 mg ATR/kg de peso durante 12-14 meses, reportaron que las ratas expuestas a 10 mg ATR/kg de peso exhibieron hiperactividad en la

actividad vertical acompañados de aumento en los niveles basales extracelulares de GABA y glutamato (Chávez-Pichardo, et al., 2020; Reyes-Bravo et al., 2022). Estos resultados amplían el panorama de estudio, ya que las alteraciones vistas en la actividad locomotora de los roedores pueden estar asociadas a alteraciones no solo en el sistema dopaminérgico, sino en los sistemas glutamatérgico y GABAérgico.

2.6 El sexo como factor experimental

A lo largo de la historia, tanto las mujeres, como las hembras del reino animal no han obtenido la atención merecida en comparación con los hombres y machos del reino animal. Es sabido que en el campo científico las hembras son excluidas como sujetos de experimentación, a no ser que sea una investigación específica del sexo, como el desarrollo, comportamiento reproductivo o investigación de índole endócrino. A este respecto, es de cierta manera obvio, ya que las mujeres tienden a desarrollar cáncer de ovarios y a su vez, los hombres tienen más tendencia a padecer cáncer de próstata. En cuanto a desordenes neurodegenerativos, diversos estudios han indicado que las mujeres presentan una mayor prevalencia a padecer la enfermedad de Alzheimer (Snyder et al., 2016; Nebel et al., 2018) que los hombres. De igual manera, se ha observado que las mujeres tienen peores posibilidades de recuperación tras sufrir un derrame cerebral (Spychala et al., 2017). Mientras que los hombres tienen más probabilidades de padecer la enfermedad de Parkinson (Smith & Dahodwala, 2014). Con lo anterior, es importante mencionar que varias teorías con respecto a la aumentada incidencia del Alzheimer y los derrames cerebrales en mujeres, son relacionadas a la extendida longevidad de vida de ellas. De igual manera, se ha reportado que, aunque la EP tiene más incidencia en hombres, cuando las mujeres lo padecen, tienden a desarrollar los síntomas más rápido y en general, la enfermedad presenta un desarrollo rápido (Cerri et al., 2019).

En el campo de la investigación, son pocos los estudios que realizan experimentos con ambos sexos. Lo anterior podría deberse a una forma de reducir los costos de las investigaciones, ya que se considera que las hembras tienen demasiadas variables a controlar, entre las cuales se encuentran la presencia y variabilidad de hormonas sexuales femeninas, las cuales varían durante el ciclo estral y podría interferir con los resultados (McCarthy et al., 2002, Wizemann et al., 2001) y, de forma errónea, muchos investigadores creen que los resultados obtenidos en machos aplican de la misma manera para hembras (Beery et al., 2010). No obstante, tener estudios utilizando hembras como

modelo de investigación abre paso a un mejor conocimiento de los problemas de salud en las mujeres e inclusive, a una mejor resolución y/o un tratamiento específico para un organismo femenino, además, se podría encontrar otra manera de abordar un problema que igual y con machos no se ha podido resolver.

En 1993, los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH por sus siglas en inglés), decretó la incorporación de mujeres a estudios clínicos humanos y no fue hasta 2014 que el mismo NIH lo implementó en animales experimentales por falta de estudios pre-clínicos. Se instauraron políticas para incluir el uso de ambos sexos en experimentos. Aunque es importante mencionar, que estudios que involucran a hembras han aumentado y se ha hablado mucho de las diferencias dependientes del sexo en animales y humanos.

En humanos, estudios han reportado que los hombres, en comparación con las mujeres, son más sensibles a los efectos adversos de las drogas y estudios en animales reportaron que las hormonas esteroides de los ovarios tienen que ver con esa diferencia (Carroll & Anker, 2010). Incluso, la densidad y volumen cerebral difiere de un hombre a una mujer, donde los hombres tienen un cerebro más grande y las áreas con mayor diferencia perceptible son la amígdala, el hipocampo y la ínsula, áreas que han sido asociadas en la prevalencia de trastornos psiquiátricos (Ruigrok et al., 2013). Por otra parte, en cuanto enfermedades motoras, se ha reportado que los hombres tienen mayor probabilidad de padecer la enfermedad de Parkinson, como se mencionaba anteriormente, el síndrome de Tourette y los tics, en cambio las mujeres tienden más a padecer corea asociada al embarazo (por obvias razones solo se presenta en mujeres) y la distonía sensible a la DOPA (Smith & Dahodwala, 2014), y se especula, que, uno de los factores que marcan la diferencia ante la susceptibilidad a estas enfermedades es el estrógeno.

En modelos animales, por otro lado, se tiene más evidencia sobre las diferencias hormonales y el papel que estas desempeñan en procesos conductuales, cognitivos, de memoria y aprendizaje, por lo que es de intuir que las hembras tienen una respuesta diferente a distintos estímulos. Por ejemplo, algunos estudios han reportado que, en contextos clásicos de condicionamiento del miedo, las ratonas hembra muestran una respuesta generalizada de shock, además, se observó que las áreas que se activaban durante los periodos de condicionamiento al miedo eran diferentes, en machos se observó un aumento en la actividad del hipocampo, indicando un uso de memoria para obtener información acerca de lo que sucede, mientras que en hembras la amígdala era el área que se

activaba, indicando una respuesta más emocional y, por lo tanto, una respuesta más defensiva (Keiser et al., 2017). Aunque en ratas se ha reportado que, al evaluar la ansiedad basal en machos y hembras, los machos tienden a presentar mayor ansiedad en comparación las hembras (Simpson & Kelly, 2012), pero también se ha reportado que existen variaciones en los niveles de ansiedad de las hembras según la fase del ciclo estral en la que se encuentren (Marcondes et al., 2001). En modelos de depresión los resultados también son inconsistentes, algunos estudios realizados en machos reportan conductas con menor nivel de depresión (Dalla et al., 2010; Kokras et al., 2012; Goodwill et al., 2019), otros mayor nivel de depresión (Brotto et al., 2000; Kamper et al., 2009; Burke et al., 2016) o, sin diferencias entre machos y hembras (Alves et al., 2008; Eltokhi et al., 2021). También, Carrol y Anker (2010) reportaron que las ratas macho son más susceptibles a los síntomas aversivos durante la abstinencia, mientras que las hembras presentan una mejor respuesta a tratamientos farmacológicos y conductuales para el tratamiento de la adicción. Sin embargo, Becker y Chartoff (2019) reportaron mayor susceptibilidad a adicción y recaída en hembras. Estos resultados denotan la importancia de estudios en ambos sexos, para así poder llegar a un resultado enfocado a cada sexo.

Por otra parte, en el campo neurotoxicológico, como en otros campos de estudio, se ha empezado a tomar al sexo como una variable a estudiar, así como lo son los factores genéticos. El tomar en cuenta a un organismo como completo, incluyendo el sexo y la genética, nos va a ayudar en un futuro a identificar la susceptibilidad de cada individuo a los neurotóxicos ambientales, además de proveer distintos métodos de cuidado y protección para la prevención de enfermedades neurodegenerativas y no solo en el campo neurotoxicológico.

2.7 Ciclo estral

Las hormonas sexuales y sus diferentes niveles a lo largo del ciclo estral de la rata cuentan con un papel fundamental en el desarrollo, entre ellas tenemos a la hormona folículo estimulante (FSH), a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo, la hormona luteinizante (LH) que al igual que la FSH es liberada por la hipófisis anterior derivada de la GnRH y finalmente la progesterona y el estradiol, producidas por los ovarios (Marcondes et al., 2002). El estradiol es el que ocasiona los cambios citológicos de la mucosa vaginal durante el ciclo de reproducción, la progesterona, por otro lado, juega un papel predominante en la preparación del útero para la

implantación, es liberada principalmente por el cuerpo lúteo, el cual es una estructura que se conforma posteriormente a la expulsión del óvulo al folículo (Marcondes et al., 2002).

Ahora bien, la duración del ciclo estral de las ratas es de aproximadamente entre 4 y 5 días (Long & Evans 1922), este tiempo tan corto es una de las razones que convierte en ideal el modelo de investigación reproductiva en hembras. Los cambios morfológicos en los ovarios, el útero y la vulva son característicos del ciclo estral (Goldman et al., 2007) y estos cambios ocurren durante 4 etapas que conforman el ciclo y las cuales se pueden identificar dependiendo el tipo de células que se observen en el fluido vaginal (Long & Evans 1922). Dentro de las cuatro etapas, tenemos el proestro, el cual tiene una duración aproximada de 12 a 14 horas y se puede dividir en proestro temprano o en proestro tardío. También, durante el proestro, existe un aumento en los niveles de estrógeno alcanzando su pico más alto a la mitad de esta etapa y la LH y la FSH estimulan los folículos para que estos crezcan rápidamente (Hebel & Stromberg, 1986). Al final del proestro, se presenta un pico de LH y de FSH en menor medida. Ahora bien, la siguiente etapa es el estro, esta etapa tiene una duración similar a la del proestro y al final de esta etapa ocurre la ovulación, generalmente durante la noche después del pico de la LH del proestro, la cual estimula el desarrollo del cuerpo lúteo seguido de disminución en niveles de FSH, LH y estrógenos. Posteriormente sucede la etapa del metaestro, que tiene una duración aproximada de 8 horas (Hubscher et al., 2005) en esta ocurre una disminución en la secreción de estrógeno y se sigue secretando progesterona, además, el fluido vaginal se observa un poco más blanquecino y opaco, se secreta la hormona inhibina la cual se verá involucrada en el mantenimiento del decremento de los niveles de LH y FSH (Aritonang et al., 2017). Finalmente, la cuarta etapa del ciclo estral de las ratas es el diestro, tiene una duración de más de la mitad del ciclo, alrededor de 55 a 58 horas es la fase en la cual la progesterona se encuentra en su pico más alto y los niveles bajos de LH y FSH hacen que el cuerpo lúteo involucre, como consecuencia hay una interrupción en la secreción de progesterona y nuevamente hay un aumento en los niveles de FSH y LH, iniciando el ciclo estral de nuevo.

Ahora bien, es importante mencionar que la pubertad de una rata da inicio cuando hay apertura vaginal, la cual se ha reportado que sucede alrededor del DPN 32-39 (Parker et al., 1976; Laws et al., 2000; Leibowitz et al., 2009), posterior a esta, se empieza a establecer el ciclo estral (DPN 50-60) (Sharp & La Regina, 1998), donde suceden los cambios en los niveles hormonales mencionados previamente y separando el ciclo en cuatro etapas.

2.8 Diferencias de sexo ante la exposición a atrazina

En estudios previos en ratas hembra durante el desarrollo expuestas a 35 mg ATR/kg de peso desde el DG 10 hasta el DPN 23, se observó una inmunosupresión dependiente del sexo, donde ratas macho presentaban supresión en la función humoral, efecto no observado en hembras (Rooney et al., 2003). Similarmente Rowe y colaboradores (2007) reportaron disminución en la respuesta inmune, resultando en un efecto dependiente de la edad y de sexo a exposición prenatal en ratones expuestos a 0.7 mg de ATR in-utero por 21 días y durante la lactancia.

En un estudio con arañas expuestas a 2.2 kg ATR/hectárea, se reportó que ambos sexos presentaron una alteración en su conducta, las hembras actuando de manera similar a como hacen los machos, esto es de una manera más exploratoria, cuando su conducta normal es estacionaria y en cuanto a los machos, se les reportó más inmóviles, incluso se observó una pequeña disminución en la duración del cortejo por parte del macho (Godfrey & Rypstra, 2019).

En ratones tratados con una dosis de 100 μ g ATR/kg de peso durante la gestación y el desarrollo, Giusi y colaboradores (2006) reportaron la presencia de ATR en el mesencéfalo y telencéfalo de ratones hembra, regiones cerebrales involucradas en el movimiento y en la conducta, además, se observó un daño neuronal en el estriado, tanto en hembras como en machos. También se ha reportado un aumento en la expresión en los receptores tipo 2 a somatostatina en el hipotálamo y en el núcleo supraquiasmático en hembras. Por otra parte, en machos se observaron alteraciones a la alta y a la baja en la expresión del receptor 3 a somatostatina en la amígdala e hipocampo. Cabe recalcar que la somatostatina es una hormona peptídica producida por el hipotálamo y el páncreas, una de sus funciones principales en el sistema nervioso es el de inhibir la secreción de la hormona de crecimiento, que cuando interactúa con el sistema GABAérgico parece tener un efecto en la liberación de esta misma hormona, además está involucrada en funciones cognitivas, motoras, sensoriales y autonómicas (Epelbaum et al., 1994).

En un estudio reciente del laboratorio llevado a cabo con ratas hembra expuestas a 1 o 10 mg ATR/kg de peso, reportó hipoactividad únicamente en el primer mes de exposición a ATR sin observarse cambios en la actividad durante los trece meses restantes de intoxicación (Sánchez, J. 2022), esto llama la atención dado que un estudio realizado en ratas macho por Bardullas y colaboradores (2011), mostró hipoactividad únicamente a los 10 meses de tratamiento con ATR e hiperactividad a los 12 meses de tratamiento.

III. Justificación

La exposición repetida a seis inyecciones de 100 mg/kg del herbicida ATR causa alteraciones conductuales asociadas con modificaciones en el sistema dopaminérgico nigroestriatal en ratas macho y sugieren una disminución en la actividad locomotora la cual es acompañada por niveles reducidos de dopamina y sus receptores en el estriado (Rodríguez et al., 2013; Marquez-Ramos et al., 2017). Sin embargo, no existen estudios en ratas hembra que evalúen la neurotoxicidad por la exposición repetida a ATR en la vía nigroestriatal, por lo que es importante evaluar si la exposición repetida a ATR en ratas hembra provoca alteraciones similares a las presentadas por los machos, esto con la finalidad de establecer si existe dependencia de sexo en la neurotoxicidad por exposición repetida al herbicida ATR.

IV. Objetivo

Evaluar los efectos de la exposición repetida a ATR sobre la actividad locomotora y los sistemas dopaminérgicos cerebrales de la rata hembra a través de la cuantificación de dopamina y sus metabolitos en diferentes regiones cerebrales, incluyendo el estriado, núcleo accumbens y mesencéfalo ventral.

V. Hipótesis

- a) La exposición repetida a 100 mg ATR/kg de peso provocará alteraciones en la actividad locomotora de ratas hembra en comparación con el grupo control.
- b) Los sistemas dopaminérgicos cerebrales de ratas hembra expuestas repetidamente a 100 mg ATR/kg de peso se verán alterados en comparación con el grupo control.

VI. Materiales y métodos

Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo los lineamientos bioéticos establecidos por el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México para el uso de animales experimentales, siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

En la Figura 8 se resumen las actividades experimentales del presente proyecto, posteriormente se explica con mayor detalle cada una de las fases.

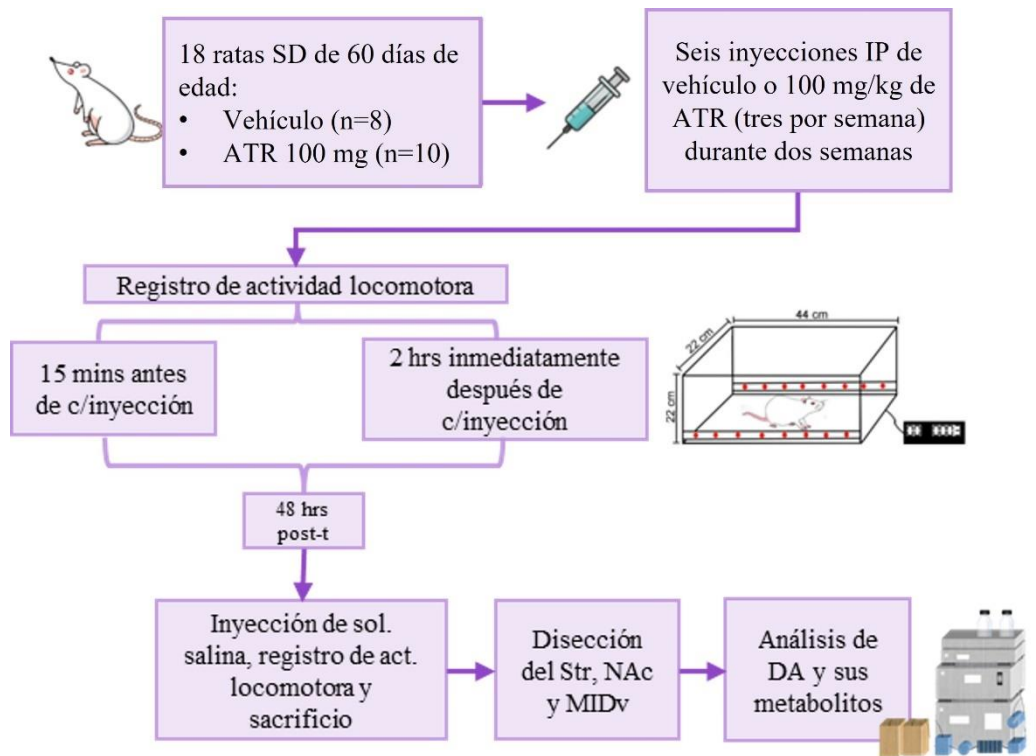


Figura 8. Resumen del protocolo experimental.

6.1 Animales

Se emplearon 18 ratas hembra adultas de la cepa Sprague-Dawley de aproximadamente 60 días de edad con un peso inicial de 165-180 g. Las ratas se obtuvieron del bioterio del Instituto de Neurobiología-UNAM.

6.2 Reactivos

La atrazina fue obtenida de Chem Service (98% pureza, West Chester, PA, Estados Unidos de América) y los reactivos para la determinación de las monoaminas se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos de América), a menos que se especifique lo contrario.

6.3 Diseño experimental

Los animales fueron sometidos a un periodo de adaptación durante una semana a un ciclo invertido de luz/oscuridad (luz: 20:00 – 8:00), el alimento y agua se administró *ad libitum* durante el curso del experimento. Los animales fueron divididos en 2 grupos experimentales, vehículo (metilcelulosa al 1%) y 100 mg ATR/kg, de 8 y 10 sujetos por grupo, respectivamente. El peso corporal se registró antes de cada inyección con la finalidad de determinar el volumen a inyectarse del vehículo o de la solución de ATR.

La administración del herbicida ATR, se realizó por vía intraperitoneal (100 mg/kg de peso), se aplicaron tres inyecciones por semana durante dos semanas, mientras que los controles recibieron inyecciones de vehículo. Cuarenta y ocho horas después de la última administración de vehículo o ATR todas las ratas recibieron una inyección de solución salina IP. A los roedores se les registró su actividad locomotora 15 minutos antes y 2 horas inmediatamente después de cada inyección. Al finalizar este último registro de actividad locomotora, se sacrificó a los animales por decapitación. El cerebro fue extraído y se procedió a realizar la disección del estriado, núcleo accumbens y mesencéfalo ventral. Posteriormente se congeló el tejido a -72°C para el análisis de la DA y sus metabolitos (DOPAC y HVA) por HPLC.

6.4 Registro de actividad locomotora

Las ratas fueron colocadas individualmente en una caja de acrílico transparente con dimensiones de 40 x 40 x 35.5 cm, que cuenta con sensores infrarrojos, los cuales registran la información y la envían a un sistema de registro computarizado (VersaMax Animal Activity Monitors, AccuScan Instruments, Inc. Columbus, OH, Estados Unidos de América). Las variables analizadas en esta prueba fueron las siguientes:

- Actividad horizontal (AH): representa el conteo de cambios de sensor horizontal (interrupciones al haz horizontal).
- Actividad vertical (AV): representa el número de interrupciones en el sensor vertical del muestreo determinado (interrupciones al haz vertical).
- Distancia total (DT): representa la distancia recorrida en centímetros por el animal en un tiempo de muestreo determinado.

- Actividad estereotípica (AE): representa el número de interrupciones del haz de luz debido a la actividad estereotipada. Se considera una estereotipia cuando el animal interrumpe el mismo haz (o conjunto de haces) repetidamente por más de un segundo.

6.5 Determinación de dopamina y sus metabolitos por HPLC

Preparación del tejido

Posterior a la disección del estriado, núcleo accumbens y mesencéfalo ventral, se colocó el tejido en un tubo Eppendorf y se agregó 500 μL de ácido perclórico al 0.1 N. Posteriormente se sonicó el tejido utilizando el sonicador Branson Sonifier 250 – 2 Hz (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, Connecticut, Estados Unidos de América). Luego se centrifugó el tejido dos veces durante 20 minutos a 10,000 rpm a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio para el análisis de monoaminas por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución, y mientras que el precipitado se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas en el tejido.

Las muestras para la determinación de monoaminas fueron guardadas a -80°C hasta la determinación por HPLC.

Preparación de las muestras para análisis de proteínas en tejido

Del precipitado generado del tejido para la determinación de dopamina y sus metabolitos, se removió el exceso de PCA 0.1N del pellet (dejando secar el tubo destapado a temperatura ambiente por 2 o 3 días). Una vez seco, se le agregó 500 μL de NaOH 0.5 M y se refrigeró a 4°C hasta su hidratación. Posteriormente se sonicó el tejido y se midió la concentración de proteínas.

Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se empleó el método de Lowry.

Esta técnica es un método de valoración cuantitativa de proteínas mediante un procedimiento colorimétrico. Consiste en agregar a la muestra un reactivo que contiene molibdato, tungstato y ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu) que forma un complejo coloreado cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de proteínas. De acuerdo con la ley de

Lambert-Beer, la absorbancia (A) es igual a la absorbancia molar (ϵ) multiplicada por la longitud del paso óptico (l) y la concentración molar (c), es decir, $A = \epsilon \cdot l \cdot c$.

El método de Lowry consta de dos etapas:

1. En una placa de ELISA se agregó 5 μ L de muestra (por triplicado, contenida en buffer correspondiente de NaOH 0.5 M o estándares de albumina), posteriormente se adicionaron 25 μ L de la solución de Lowry (solución A=S+A' 20:1000 respectivamente, kit de BioRad Dc Protein assay, Hércules, CA, USA) en medio alcalino. Los iones de cobre (Cu^{2+}) se unen a las proteínas para formar complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos, lo que resulta en la formación de complejos proteína- Cu^{2+} de color azul claro. Además, estos complejos pueden provocar la desnaturalización de la estructura tridimensional de la proteína, lo que expone los residuos de tirosina que participan en la segunda etapa de la reacción.

En seguida se lleva a cabo la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu (agregando 200 μ L de solución B, Bio-Rad Dc Protein assay), donde los grupos fenólicos de los residuos de tirosina actúan como sustrato y el cobre funciona como catalizador. El componente principal de este reactivo es el ácido fosfomolibdotúngstico, el cual tiene un color amarillo característico. Cuando se produce la reducción del ácido fosfomolibdotúngstico por los grupos fenólicos, se forma un complejo de color azul intenso.

2. En la segunda etapa, se incubaron las muestras durante 15 minutos para permitir que la reacción se lleve a cabo. Posteriormente, se leyó la placa en un espectrofotómetro (Microplate Reader modelo 680, Bio-Rad) a una longitud de onda de 655 nm. Para determinar la concentración de proteínas de las muestras, se interpoló en una curva de calibración de concentración conocida de albumina de suero bovino.

Determinación de monoaminas por cromatografía líquida de alta resolución

Las monoaminas DA, 5-HT y sus metabolitos fueron cuantificadas por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a detección electroquímica. Las monoaminas se separaron en una columna C-18 (Altima, HiChrom, Inglaterra) con un tamaño de partícula de 3 μ m y longitud de 100 mm x 4.6mm de ancho, la cual se encontraba conectada a una bomba (Perkin Elmer series 200, PerkinElmer, San José, CA. Estados Unidos de América) por donde se inyecta una fase móvil

isocrática compuesta por 0.1 M de fosfato de sodio monobásico, 0.3 mM de octil sulfato de sodio, 0.03 mM EDTA y 11-13% de metanol. La detección se realizó ajustando a un potencial amperométrico de 850 mV relacionado a un electrodo de referencia Ag/AgCl y una sensibilidad de 10 nA. Los resultados se analizaron con el software de TotalChrom Navigator versión 6.3.1.0504 (PerkinElmer) y se utilizaron curvas de calibración externas para la determinación de las monoaminas. Los resultados de monoaminas se expresan en ng/mg de proteína.

6.7 Análisis estadístico

El programa estadístico utilizado para el análisis de datos fue GraphPad Prism versión 9. Para la actividad locomotora se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas de dos vías y para la comparación entre la relación de tratamiento (entre cada inyección) se utilizó una prueba de Mann-Whitney o una *t* no pareada dependiendo el caso si los datos cumplían con los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor de *p* era menor a 0.05.

VII. Resultados

7.1 Efecto de la ATR sobre el peso corporal

Durante la exposición a ATR se realizó el registro constante del peso corporal. Para evaluar si la exposición a ATR tuvo algún efecto sobre este parámetro, se llevó a cabo un ANOVA de medidas repetidas, el cual mostró que no hay un efecto significativo de tratamiento [$F(1, 15) = 0.9725, p = 0.3397$], ni de interacción (tratamiento x número de inyecciones) [$F(6, 90) = 0.6634, p = 0.6793$], pero sí de tiempo [$F(6, 90) = 22.64, p < 0.0001$], sin embargo, esto representa el crecimiento normal de los roedores. A continuación, se muestra el gráfico correspondiente (Figura 9).

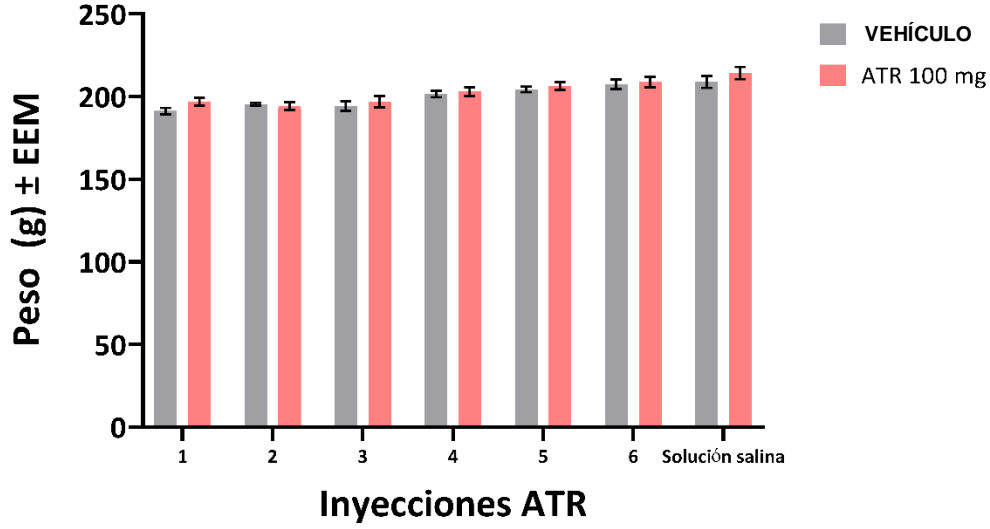


Figura 9. Análisis de peso corporal. Las gráficas muestran el promedio del peso y el error estándar de los animales control (metilcelulosa al 1%) y tratados con 100 mg ATR/kg de peso vía intraperitoneal a lo largo de 6 inyecciones y una última inyección de solución salina.

7.2 Efecto de la ATR sobre la actividad locomotora

Actividad exploratoria

Distancia total

El ANOVA de medidas repetidas durante la evaluación de los primeros 15 minutos de registro demostró un efecto significativo de tratamiento [$F(1, 15) = 40.90, p < 0.0001$], en el número de inyecciones [$F(6, 90) = 5.348, p = 0.028$] y en la interacción (tratamiento x número de inyecciones) [$F(6, 90) = 4.264, p = 0.0008$]. En el análisis de cada inyección se observó un efecto de tratamiento para las inyecciones 2-6 [$t's(15) = 2.394 - 6.148, p < 0.05$]. Mientras que para inyección de solución salina 48 h después de la última inyección con ATR también se observó el efecto de tratamiento [$t = 3.741, p = 0.002$] (Figura 10).

Registro de distancia total dos horas después de la inyección con ATR

Se observaron efectos significativos de tratamiento [$F(1, 15) = 115.3, p < 0.0001$] y en el número de inyecciones [$F(6, 90) = 2.496, p = 0.028$], pero no en la interacción [$F(6, 90) = 0.374, p = 0.8937$] registrado durante las dos horas después de la administración de vehículo (MC 1%) o 100 mg ATR/kg. En el análisis de cada inyección, se observó un efecto de grupo para todas las exposiciones al herbicida [$t's(15) = (4.438 - 10.96), p < 0.05$] (Figura 10).

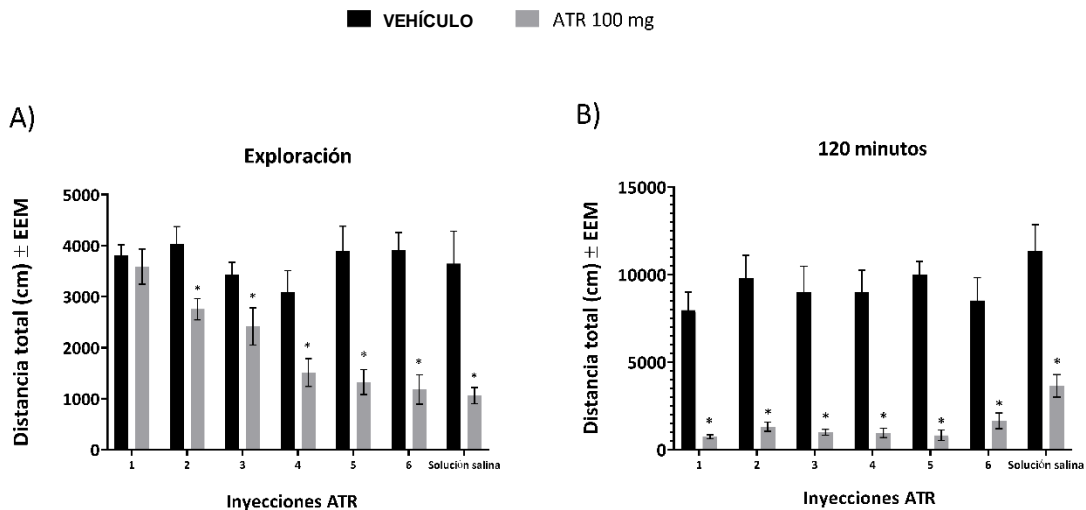


Figura 10. Distancia total. Las gráficas muestran el promedio del registro de actividad locomotora y el error estándar de la evaluación de distancia total (cm) durante 15 minutos previos a cada inyección (A) y 2 horas inmediatamente después (B) de cada inyección de vehículo o 100 mg ATR/kg de peso en ratas hembra Sprague-Dawley. Cada barra representa el promedio del grupo ± EEM. *Diferente de grupo control, $p < 0.05$.

Actividad horizontal

Actividad exploratoria

El ANOVA de medidas repetidas durante la evaluación de los primeros 15 minutos de registro demostró un efecto significativo de tratamiento [$F(1, 15) = 36.3, p < 0.0001$], en el número de inyecciones [$F(6, 90) = 10.8, p < 0.0001$] y en la interacción [$F(6, 90) = 4.23, p = 0.0009$]. En el análisis de cada inyección se observó un efecto de grupo para la inyección 2 [$t = 2.614, p = 0.0195$], inyección 3 [$t = 3.824, p = 0.0017$], inyección 5 [$t = 4.072, p = 0.001$], inyección 6 [$t = 5.594, p <$

0.0001]. Mientras que la inyección de solución salina también se observó efecto de tratamiento [$t = 3.786, p = 0.0018$], 48 h después de la última inyección a ATR (figura 11).

Registro de actividad horizontal dos horas después de la inyección con ATR

Después de inyectar con vehículo (metilcelulosa al 1%) o 100 mg ATR/kg de peso y registrar durante dos horas de la actividad locomotora, se observaron efectos significativos de tratamiento [$F(1, 15) = 94.27, p < 0.0001$], en el número de inyecciones [$F(6, 90) = 3.095, p = 0.0312$], pero no en la interacción [$F(6, 90) = 1.342, p = 0.2469$]. En el análisis de cada inyección se observó efecto de tratamiento para todas las inyecciones [$t's(15) = (3.674 - 8.291), p < 0.05$] (Figura 11).

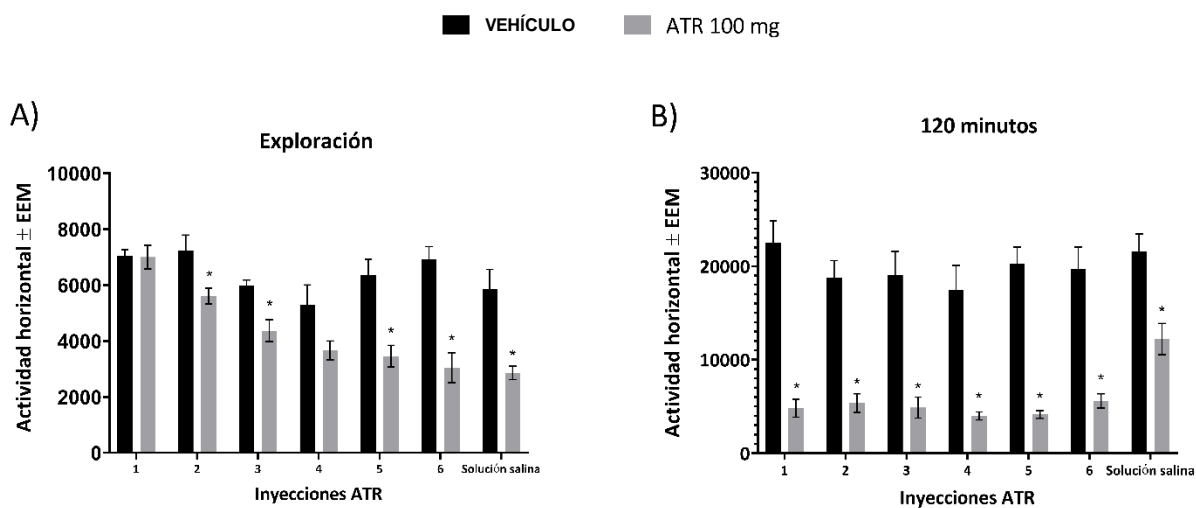


Figura 11. Actividad horizontal. Las gráficas muestran el promedio del registro de actividad locomotora y el error estándar de la evaluación la actividad horizontal durante 15 minutos previos a cada inyección (A) y 2 horas inmediatamente después (B) de cada inyección de vehículo o 100 mg ATR/kg de peso en ratas hembra Sprague-Dawley. Cada barra representa el promedio del grupo \pm EEM. *Diferente de grupo control, $p < 0.05$.

Número de estereotipias

Actividad exploratoria

El ANOVA de medidas repetidas durante la evaluación de los primeros 15 minutos de registro no se mostraron diferencias significativas de tratamiento [$F(1, 15) = 0.7729, p = 0.3932$], ni de interacción [$F(6, 90) = 1.622, p = 0.1501$], pero en el número de inyecciones sí se observaron diferencias significativas [$F(6, 90) = 3.873, p = 0.0017$] (Figura 12).

Registro de número de estereotipias dos horas después de la inyección con ATR

Después de inyectar con vehículo (metilcelulosa al 1%) o 100 mg ATR/kg de peso y registrar 2 horas de actividad locomotora, se observó un efecto significativo de tratamiento [$F(1, 15) = 19.55$, $p = 0.0005$], de interacción [$F(6, 90) = 2.299$, $p = 0.0413$] y en el número de inyecciones [$F(6, 90) = 1.756$, $p = 0.01563$]. En el análisis de cada inyección se observó efecto de tratamiento para las 6 exposiciones [$t's(15) = (1.916 - 3.922)$, $p < 0.05$], pero no se observó efecto de tratamiento en la inyección de solución salina (séptima inyección) 48 h después de la última exposición a ATR (Fig. 12).

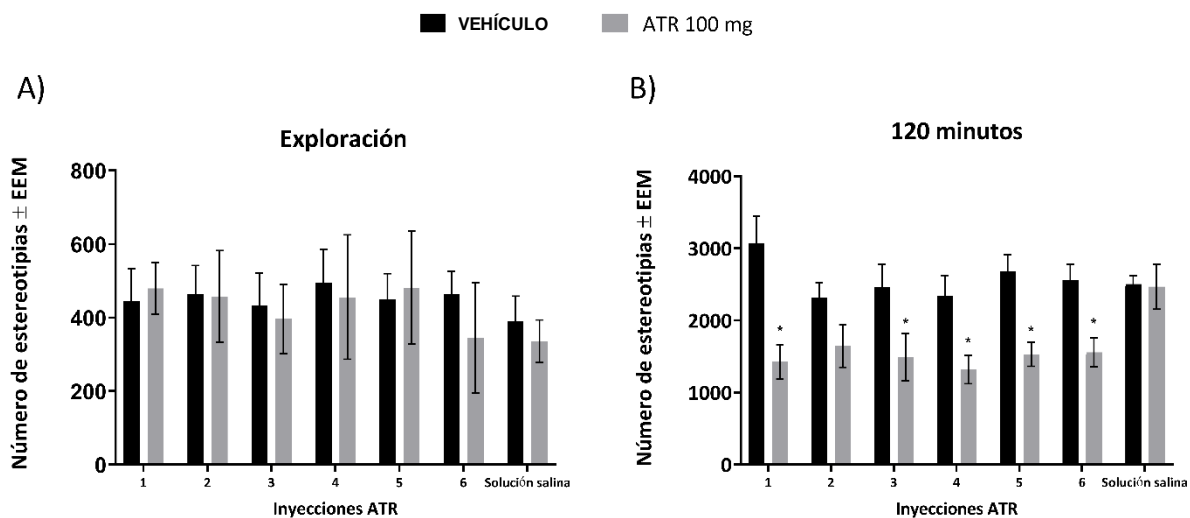


Figura 12. Número de estereotipias. Las gráficas muestran el promedio del registro de actividad locomotora y el error estándar de la evaluación del número de estereotipias durante 15 minutos previos a cada inyección (A) y 2 horas inmediatamente después (B) de cada inyección de vehículo o 100 mg ATR/kg de peso en ratas hembra Sprague-Dawley. Cada barra representa el promedio del grupo \pm EEM. *Diferente de grupo control, $p < 0.05$.

Actividad vertical

Actividad exploratoria

El ANOVA de medidas repetidas durante la evaluación de los primeros 15 minutos de registro mostraron efectos significativos de tratamiento [$F(1, 15) = 12.8$, $p = 0.0027$], en el número de inyecciones [$F(6, 90) = 8.134$, $p < 0.0001$] y en la interacción [$F(6, 90) = 2.893$, $p = 0.0126$]. El análisis de cada inyección reveló un efecto de tratamiento para la inyección 4 [$t = 2.564$, $p = 0.0216$], la inyección 5 [$t = 3.392$, $p = 0.004$], la inyección 6 [$t = 4.652$, $p = 0.0003$] y la inyección

de solución salina [$t = 2.705$, $p = 0.0163$] evaluada 48 h después de la última inyección con ATR (figura 13).

Registro de la actividad exploratoria dos horas después de la inyección con ATR

Después de inyectar con vehículo (metilcelulosa al 1%) o 100 mg ATR/kg de peso y registrar 2 horas de actividad locomotora, se observaron efectos significativos de tratamiento [$F(1, 15) = 85.86$, $p < 0.0001$], en el número de inyecciones [$F(6, 90) = 2.24$, $p = 0.0464$], pero no en la interacción (tratamiento x número de inyecciones) [$F(6, 90) = 0.3772$, $p = 0.8919$]. En el análisis de cada inyección se observó un efecto de grupo para todas las exposiciones, incluso en la de solución salina 48 h después de la última exposición [$t's(15) = (3.939 - 7.907)$, $p < 0.05$] (Figura 13).

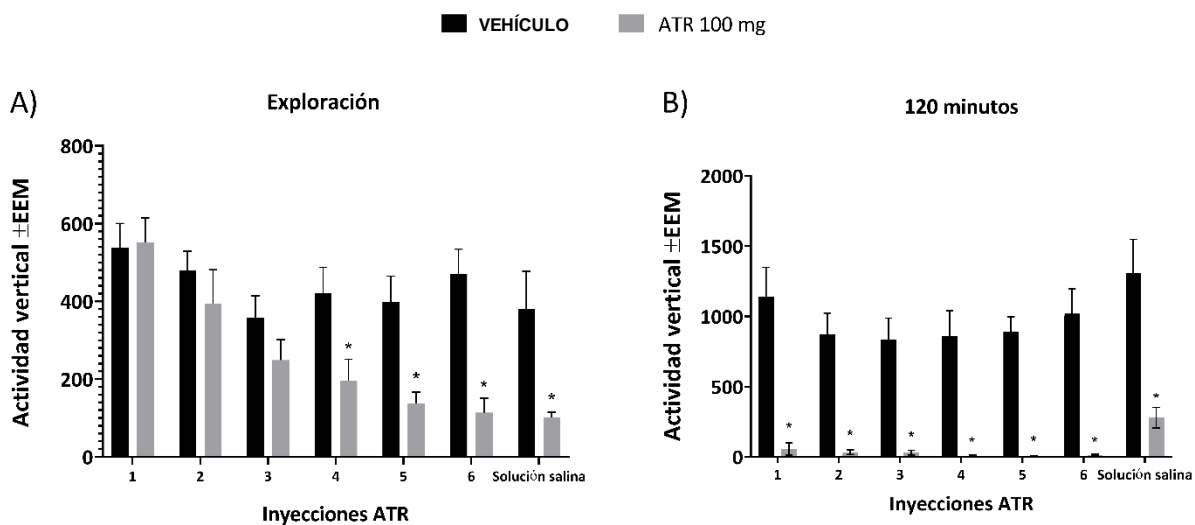


Figura 13. Actividad vertical. Las gráficas muestran el promedio del registro de actividad locomotora y el error estándar de la evaluación de la actividad vertical durante 15 minutos previos a cada inyección (A) y 2 horas inmediatamente después (B) de cada inyección de vehículo o 100 mg ATR/kg de peso en ratas hembra Sprague-Dawley. Cada barra representa el promedio del grupo \pm EEM. *Diferente de grupo control, $p < 0.05$.

7.3 Efecto de la ATR sobre los niveles de DA y sus metabolitos (DOPAC y HVA) en el estriado, núcleo accumbens y mesencéfalo ventral

Estriado

Al medir los niveles de DA y sus metabolitos (DOPAC y HVA) en el estriado, no se observaron alteraciones significativas en los niveles de DA y sus metabolitos (DOPAC y HVA) [U's = (0.22 - 30, $p > 0.05$)] entre el grupo tratado con ATR y el grupo vehículo.

Núcleo accumbens

En el núcleo accumbens se observó un aumento significativo en los niveles de DA [U = (17), $p = 0.0434$] y su metabolito DOPAC [U = (16), $p = 0.0343$] en el grupo expuesto a ATR en comparación con el grupo control, sin encontrarse alterados los niveles de HVA en esta región cerebral.

Mesencéfalo ventral

De manera similar al núcleo accumbens, se observaron aumentos significativos en los niveles de DA [U = (12), $p = 0.0117$] y su metabolito DOPAC [U = (7), $p = 0.0021$] en el mesencéfalo ventral en el grupo tratado con atrazina al compararlo con el grupo control.

Además, no se observaron cambios significativos en el recambio de DOPAC/DA en ninguna de las regiones analizadas.

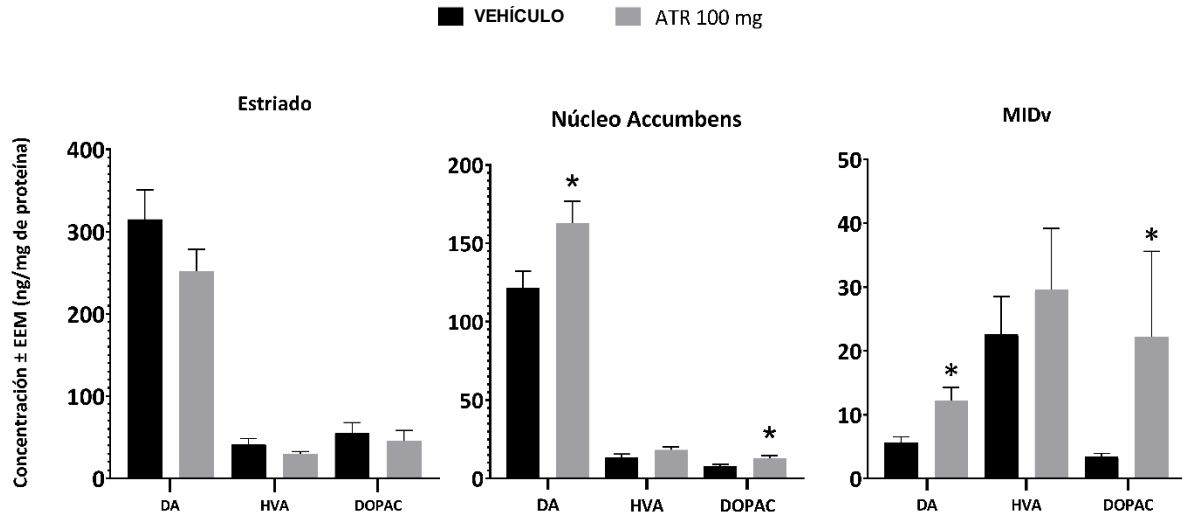


Figura 14. Niveles de DA, HVA y DOPAC en el estriado (Str), núcleo accumbens (Nacc) y mesencéfalo ventral (Midv) de ratas hembra sacrificadas 48 h después de la última exposición a ATR medidos mediante HPLC-DE. Cada barra representa el promedio del grupo ± EEM en animales control (metilcelulosa al 1%) y expuestos a 100 mg ATR/kg de peso. *Diferente de grupo control, $p < 0.05$.

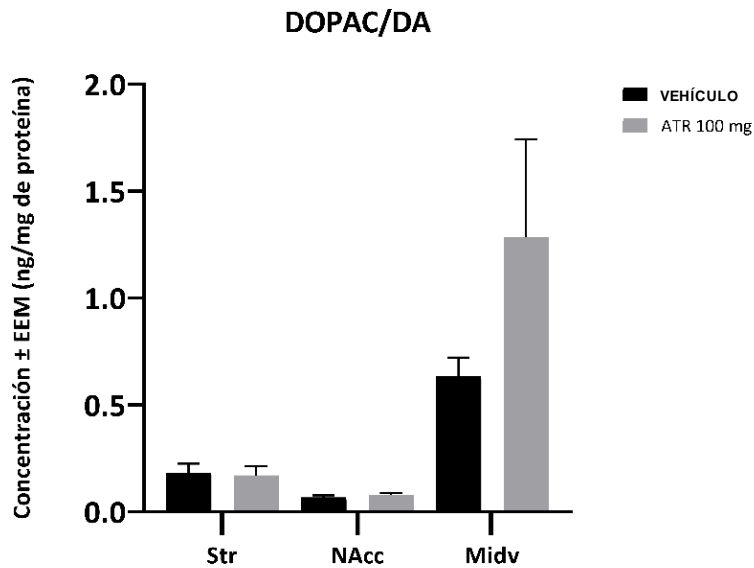


Figura 15. Relación DOPAC/DA medidos por HPLC-DE en estriado (Str), núcleo accumbens (NAcc) y mesencéfalo ventral (Midv) de ratas hembra sacrificadas 48 h después de la última exposición a ATR. Cada barra de la gráfica representa el promedio del grupo ± EEM en animales control (metilcelulosa al 1%) y expuestos a 100 mg ATR/kg de peso.

VIII. Discusión

8.1 Peso corporal

El peso corporal de las ratas no se vio alterado por la exposición repetida al herbicida ATR (Figura 9). Estos resultados presentan similitudes a los obtenidos en estudios previos, tanto en exposición repetida al herbicida ATR en ratones macho (Coban & Filipov, 2007) o en ratas macho (Rodríguez et al., 2013; Márquez-Ramos, et al., 2017), como en exposición crónica al herbicida ATR en ratas macho (Bardullas et al., 2011, 2013; Chávez-Pichardo et al., 2020; Reyes-Bravo et al., 2022) e incluso con exposición durante la etapa del desarrollo (DPN 28) en ratas macho (Li et al., 2018) y en ratas macho y hembra expuestas in-utero (Rooney et al., 2003; Li et al., 2017).

8.2 Actividad locomotora

Estudios previos en ratas macho expuestas a 100 mg ATR/kg de peso por un periodo de tiempo de dos semanas, reportaron que la exposición repetida a este herbicida causa hipoactividad que se mantiene aún 48 h después de la última exposición (Rodríguez et al., 2013; Márquez-Ramos, et al., 2017). Además, Rodríguez y colaboradores (2013) reportaron una disminución significativa en el registro exploratorio (15 minutos previos a inyección) en todos los parámetros evaluados (distancia total, actividad vertical y número de estereotipias) después de la primera inyección de ATR, en comparación con este estudio, las hembras presentaron una hipoactividad significativa en la exploración a partir de la segunda inyección con ATR en distancia total y actividad horizontal, pero en la actividad vertical se observó hasta la cuarta inyección, sin embargo, en el número de estereotipias, no hubo diferencias significativas en la actividad exploratoria.

En este estudio, los resultados de la primera sesión de exploración antes del tratamiento no muestran diferencias entre el grupo control y el expuesto a ATR (inyección 1), a diferencia de la actividad exploratoria evaluada 48 h después de cada exposición a ATR, donde se observó una hipoactividad significativa en la distancia total en comparación al grupo control. Lo anterior tiene sentido ya que los roedores aún no han recibido la inyección con el herbicida. Ahora bien, en el registro de 2 horas, posterior a la administración del herbicida, se observaron diferencias significativas desde la primera inyección hasta 48 horas después de la última exposición, mostrando hipoactividad a largo plazo en el grupo expuesto a ATR, datos que están de acuerdo con estudios previos en ratas macho.

En cuanto a estudios con exposición a ATR en hembras, su principal enfoque es en efectos relacionados al desarrollo o a ciertos tipos de cáncer, principalmente al cáncer mamario, los cuales han reportado que la exposición a este herbicida ocasiona alteraciones en el inicio de la pubertad, retrasándola, presentando cambios significativos en la liberación de GnRH, LH y a su vez, un atraso en la apertura vaginal (Laws et al., 2000; Ashby et al., 2002), en cuanto a tumores cancerígenos, es bien sabido que los tumores mamarios son principalmente dependientes a hormonas, siendo el estradiol y la prolactina las hormonas promotoras principales del crecimiento de estos.

Por otra parte, es sabido que el sistema dopaminérgico tiene interacción con el sistema estrogénico y ambos juegan un papel en la función motora (Becker, 1990; Yoest, 2016, 2018). Se ha reportado ampliamente que el estradiol, además de sus funciones reproductivas, participa en la diferenciación sexual del sistema nervioso, en la neurogénesis, neuroprotección y en la plasticidad cerebral (Wright et al., 2010; Smith & Dahodwala, 2014). Se ha reportado que modula la liberación de la dopamina al unirse a sus receptores membranales de estradiol en el estriado (Srivastava et al., 2013). De igual manera, estudios han reportado que hembras ovariectomizadas presentan un nivel basal menor de DA extracelular (Xiao & Becker, 1994).

Considerando lo anterior, el trabajo actual es el primero en reportar hipoactividad como consecuencia de la exposición repetida al herbicida ATR en la actividad locomotora de ratas hembra mostrando efectos parecidos a los presentados en ratas macho (Rodríguez et al., 2013; Márquez-Ramos et al., 2017). Sin embargo, es importante mencionar que el inicio de la exposición a ATR y a su vez la evaluación de la actividad locomotora en ratas hembra durante este experimento se llevó a cabo (DPN 60 ± 5) una vez ya establecido el ciclo estral. Por lo que la hipoactividad observada en los resultados de este proyecto se pueda deber en parte a un malestar generalizado debido a la alta dosis de ATR utilizada. A pesar de lo anterior, la hipoactividad se mantiene aún 48 h después de la última exposición, sugiriendo que la hipoactividad puede tener relación con una alteración neuroquímica. Por otra parte, sería importante considerar la evaluación de la actividad locomotora con una exposición más extendida o bien, con una evaluación posterior, con la finalidad de profundizar sobre los efectos de la ATR en el cerebro de la rata hembra.

En estudios previos, Márquez-Ramos y colaboradores (2017) realizaron una evaluación de la actividad locomotora durante 15 minutos a los dos meses después a la última inyección a ATR, en este estudio, se continuó observando hipoactividad. Adicionalmente, un estudio realizado por Rodríguez y colaboradores (2013), en el que realizaron evaluaciones de actividad locomotora

durante 24 h continuas a los 2, 5, 10, 60 y 90 días después de la última inyección de ATR. Ellos reportaron hipoactividad a los 2 y 5 días, la cual desapareció a los 10 y a los 90 días post inyección de ATR. En la evaluación a los 60 días post inyección de ATR, se administró un reto farmacológico de anfetamina con la finalidad de desenmascarar alteraciones ocultas en el sistema dopaminérgico y se observó mayor actividad en el grupo expuesto a ATR, indicando modificaciones en el mismo sistema dopaminérgico.

Dado lo anterior, una evaluación posterior de la actividad locomotora en hembras sería fundamental para así poder comparar de mejor manera si sucede exactamente lo mismo a lo que sucede en los machos o si existe la posibilidad de que el estradiol juegue un papel neuroprotector y se pudiera observar un efecto compensatorio frente a este tóxico en menor cantidad de tiempo en comparación a los machos.

8.3 Niveles de DA y sus metabolitos

Al analizar los resultados obtenidos en este proyecto, se observa que los niveles de dopamina y su metabolito, DOPAC, se ven aumentados en el NAcc y en el Midv en el grupo expuesto a ATR. Esto es distinto a lo reportado en estudios previos con exposición repetida a ATR en ratas macho, donde Rodríguez y colaboradores (2013) reportaron una disminución en la DA y sus metabolitos en el estriado y, similarmente, Márquez-Ramos y colaboradores (2017) reportaron una reducción en la unión específica a receptores de DA en el estriado. Coban y Filipov (2007), reportaron que en ratones expuestos a 125 y 250 mg ATR/kg de peso exhibieron una disminución en los niveles de DA y sus metabolitos (DOPAC y HVA) en el estriado. Por otro lado, en exposiciones crónicas en ratas macho, reportaron una disminución de DA en el estriado (Bardullas et al., 2011, 2013).

Lo anterior es importante mencionarlo ya que el modelo animal del presente trabajo está basado en estudios con exposición repetida a ATR en ratas macho. Por lo cual, los resultados obtenidos en ratas hembra al estar expuestas a 100 mg ATR/kg de peso durante 2 semanas, sugieren que hay una relación entre la reducción de actividad locomotora y el aumento de los niveles de DA y su metabolito DOPAC en el grupo tratado con 100 mg ATR/kg de peso, además de que las regiones que se ven alteradas es el NAcc y el Midv, y no el Str, lo que podría significar una relación más estrecha a la hipoactividad presente en este estudio. Adicionalmente, estos resultados sugieren que

el sistema dopaminérgico alterado en hembras ante la exposición repetida a ATR es el mesolímbico y no el nigroestriatal como lo es en machos.

Cabe destacar, que existen diferencias anatómicas y fisiológicas en el sistema dopaminérgico entre machos y hembras, entre las cuales, Yoest y colaboradores (2018) reportaron un aumento en la liberación de DA en el estriado con la presencia de estradiol.

Ahora bien, Westerink y colaboradores (1976) reportaron que, al administrar ciertos fármacos, los niveles de los metabolitos de DA no cambiaban y esto se observaba más en áreas mesolímbicas y sugirieron que los niveles del metabolito DOPAC estaban más relacionados al metabolismo de DA, indicando menor metilación en niveles basales de DOPAC a HVA en esta región, además, reportaron que bajo condiciones donde la actividad dopaminérgica se ve alterada, la metilación de DOPAC se ve afectada, esto es importante ya que los niveles de DOPAC se han asociado a los niveles de dopamina, esto quiere decir que si los niveles de DA aumentan, también lo harán los niveles de DOPAC o viceversa.

Los diferentes sistemas dopaminérgicos cuentan con una gran cantidad de receptores a estrógeno, lo cual sugiere una intervención importante e influencia que tiene esta hormona femenina en la actividad dopaminérgica, en cuanto a la relación de estrógeno con ATR, hasta hoy no se ha podido llegar a una respuesta concreta sobre esta interacción, sin embargo, se cree que la interacción podría ser indirecta, siendo que la ATR afecte diferentes y factores menos específicos que puede, o no, estén involucrados con respuestas mediadas por estrógeno y por eso se vean afectadas (Eldridge et al., 2008).

Otra diferencia importante entre machos y hembras es que receptores a estrógeno alfa y beta se encuentran en neuronas dopaminérgicas en el AVT y en el NAcc (Almey et al., 2015). Becker (1990) reportó que el estradiol regula la liberación y los mecanismos de eliminación de dopamina en hembras. Similarmente, en estudios donde se administró estradiol, se observó un incremento en la liberación de DA y en la actividad de DAT y en ratas ovariectomizadas se reportó un aumento a niveles basales de liberación de DA (Falardeau et al., 1987; Schmitz et al., 2003). Incluso, el estrógeno juega un rol importante en cuanto a la susceptibilidad a enfermedades, por ejemplo, en cuanto al sistema dopaminérgico nigroestriatal, las diferencias dependientes de sexo suelen ser un poco más conocidas, pero no del todo entendidas, como lo es con la enfermedad de Parkinson, la cual tiende a desarrollarse principalmente en hombres, las causas siguen sin ser exactas. Los factores ambientales y genéticos influyen en el desarrollo de la EP y, actualmente, la exposición a

pesticidas es considerado un factor de riesgo al padecimiento de esta enfermedad. La susceptibilidad del Parkinson en hombres se cree que es debida a la falta de estrógeno como lo hay en mujeres, sin embargo, se ha visto que cuando las mujeres padecen esta enfermedad, avanza de manera más rápida, lo cual también puede deberse a la disminución repentina de estrógeno en la menopausia (Smith & Dahodwala, 2014). Debido a que esta enfermedad afecta mayoritariamente a los ganglios basales, específicamente a la sustancia nigra y dentro de los estudios se ha visto que los pesticidas también afectan la motricidad en machos, la diferencia encontrada en este estudio tiene que ver específicamente con el sistema dopaminérgico mesolímbico.

Anatómicamente, las diferencias no suelen notarse y en cuanto a la composición de ciertas regiones, en hembras se ha reportado una mayor densidad de dendritas en el núcleo accumbens (Wissman et al., 2012). Por otra parte, estudios han demostrado, que los machos tienen menor susceptibilidad a volverse adictos a sustancias de abuso y una de las teorías para esto es que el estradiol juega un papel en la actividad dopaminérgica neuronal en el sistema mesolímbico sensibilizando las neuronas y aumentando la respuesta a la exposición a drogas (Fox & Sinha, 2009). Sin embargo, otros estudios reportan la susceptibilidad a la adicción de manera inversa, siendo los machos los más susceptibles a padecer los efectos aversivos de la adicción que las hembras (Carroll & Anker, 2009). En estudios con exposición prenatal a cannabis, Traccis y colaboradores (2021) reportaron que en machos hubo cambios a nivel molecular en el sistema dopaminérgico mesolímbico, pero no en hembras. Sin embargo, en hembras se notó una modificación en la actividad locomotora espontánea y en la motivación por comida al llegar a la edad adulta, dichas alteraciones están relacionadas a cambios en la actividad dopaminérgica en dicho sistema, lo cual podría compararse en cierto sentido con el presente estudio de ATR en hembras, aunque nosotros no observamos un cambio en la alimentación, pero sí un cambio en la actividad locomotora espontánea.

Este tipo de resultados tan variados nos demuestra que no hay un conocimiento profundo de los sistemas, sus mecanismos y las diferencias dependientes de sexo en ellos, además de las diferentes reacciones que tiene cada organismo a un factor extrínseco e intrínseco, como lo es la ATR en este estudio, que, a comparación de los machos, afecta principalmente al sistema dopaminérgico mesolímbico.

Adicionalmente, lo encontrado en el presente proyecto son resultados nuevos, por lo que un estudio posterior podrá ser más específico para contestar y profundizar preguntas que quedan inconclusas.

IX. Conclusiones

La exposición repetida a 100 mg ATR/kg de peso por dos semanas en ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley, causa hipoactividad, la cual permanece aún 48 h después de la última exposición en el caso de los parámetros de distancia total, actividad horizontal y actividad vertical, este efecto puede estar relacionado al aumento de dopamina y su metabolito DOPAC en el núcleo accumbens y en el mesencéfalo ventral observado en el grupo tratado con ATR.

La exposición repetida a 100 mg ATR/kg de peso por dos semanas en ratas hembra Sprague-Dawley no causa alteraciones en los niveles de DA y sus metabolitos en el estriado, lo cual podría implicar que, en hembras, la ATR afecta al sistema dopaminérgico mesolímbico.

Estos resultados, abren paso a estudios más específicos para la valoración de la susceptibilidad del sistema dopaminérgico mesolímbico de forma sexo específica.

X. Perspectivas

A lo largo de este trabajo se pudo observar la importancia que tiene el realizar investigaciones con hembras y dado el estado actual del mundo, hoy más que nunca es necesario incluirlas, aún más, como sujetos de investigación. Con este trabajo queda todavía más claro que existen diferencias entre sexos ante la exposición a ATR, y, siendo este el primero de su tipo, es importante seguir en esta área de neurotoxicología para profundizar el conocimiento y poder ejercer una acción que pueda ser beneficiosa no solo para la investigación sino para la sociedad, sabiendo realmente qué es lo que sucede en un organismo femenino. Además de que cada día que pasa, se desarrollan nuevas sustancias que se incluyen a la lista agentes ambientales (posiblemente tóxicos) que interfieren con el organismo y es necesario saber cómo actúan en él, tanto en machos como en hembras.

XI. Referencias

- Adeva, M. T., Gómez-Sánchez, J. C., Marcos, M. M., Ciudad, J., & Feroso, J. (1999). Triple association of mesencephalic syndromes. *Revista de Neurologia*, 28(4), 403–404. <https://europepmc.org/article/med/10714324>
- Almey, A., Milner, T. A., & Brake, W. G. (2015). Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females. *Hormones and Behavior*, 74, 125–138. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.06.010>
- Alves, C. J., Magalhães, A., Summavielle, T., Melo, P., De Sousa, L., Tavares, M. A., & Monteiro, P. R. R. (2008). Hormonal, neurochemical, and behavioral response to a forced swim test in adolescent rats throughout cocaine withdrawal. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1139(1), 366–373. <https://doi.org/10.1196/annals.1432.047>
- Aritonang, T. R., Rahayu, S., Sirait, L. I., Karo, M. B., Simanjuntak, T. P., Natzir, R., Sinrang, A. W., Massi, M. N., Hatta, M., & Kamelia, E. (2017). The role of FSH, LH, estradiol and progesterone hormone on estrus cycle of female rats. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)*, 35(1), 92–100. <http://repository.uki.ac.id/755/>
- Ashby, J., Tinwell, H., Stevens, J., Pastoor, T., & Breckenridge, C. B. (2002). The effects of atrazine on the sexual maturation of female rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 35(3), 468–473. <https://doi.org/10.1006/rtp.2002.1571>
- Ascherio, A., Chen, H., Weisskopf, M. G., O'Reilly, E., McCullough, M. L., Calle, E. E., Schwarzschild, M. A., & Thun, M. J. (2006). Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 60(2), 197–203. <https://doi.org/10.1002/ana.20904>
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaña, J. A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Revista Biomédica*, 11(1), 39-60. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v.11i1.218>
- Bannon, M. J., & Roth, R. H. (1983). Pharmacology of mesocortical dopamine neurons. *Pharmacological Reviews*, 35(1), 53-68. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6138783>
- Barbash JE, Thelin GP, Kolpin DW, Gilliom R.J. (2001). Major herbicides in ground water: results from the National Water-Quality Assessment. *Journal of Environmental Quality*, 30(3), 831-845. <https://doi.org/10.2134/jeq2001.303831x>

- 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. <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. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.10.003>
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. (2016). *Neuroscience: Exploring the brain*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Becker, J. B. (1990). Direct effect of 17 beta-estradiol on striatum: sex differences in dopamine release. *Synapse*, *5*(2): 157–164. <https://doi.org/10.1002/syn.890050211>
- Becker, J. B., & Chartoff, E. (2018). Sex differences in neural mechanisms mediating reward and addiction. *Neuropsychopharmacology*, *44*(1), 166–183. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0125-6>
- Beery, A. K., & Zucker, I. (2011). Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *35*(3), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.002>
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Reviews*, *28*(3), 309–369. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(98\)00019-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00019-8)
- Blum, K., Werner, T., Carnes, S., Carnes, P., Bowirrat, A., Giordano, J., Marlene-Oscar-Berman, & Gold, M. (2012). Sex, Drugs, and Rock “N” Roll: Hypothesizing common mesolimbic activation as a function of reward gene polymorphisms. *Journal of Psychoactive Drugs*, *44*(1), 38–55. <https://doi.org/10.1080/02791072.2012.662112>
- Brady, S. T., Siegel, G. J., R Wayne Albers, & Price, D. L. (2012). *Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology*. Academic Press/Elsevier.
- Society for Neuroscience. (2023, May 1). Executive Function (M. Fessenden, Ed.) [Review of *Executive Function*]. BrainFacts.org.

- Brotto, L. A., Barr, A. M., & Gorzalka, B. B. (2000). Sex differences in forced-swim and open-field test behaviours after chronic administration of melatonin. *European Journal of Pharmacology*, 402(1-2), 87–93. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(00\)00491-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00491-x)
- Burke, N. N., Coppinger, J., Deaver, D. R., Roche, M., Finn, D. P., & Kelly, J. (2016). Sex differences and similarities in depressive- and anxiety-like behaviour in the Wistar-Kyoto rat. *Physiology & Behavior*, 167, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.08.031>
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., & Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature Neuroscience*, 17(8), 1022–1030. <https://doi.org/10.1038/nn.3743>
- Carroll, M. E., & Anker, J. J. (2010). Sex differences and ovarian hormones in animal models of drug dependence. *Hormones and Behavior*, 58(1), 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.10.001>
- Carozza, S. E., Li, B., Elgethun, K., & Whitworth, R. (2008). Risk of childhood cancers associated with residence in agriculturally intense areas in the United States. *Environmental Health Perspectives*, 116(4), 559–565. <https://doi.org/10.1289/ehp.9967>
- CEDRSSA. (2020). Uso y regulación de herbicidas en México. 2022, de Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. Sitio web: <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/76Herbicidas.pdf>
- Cerri, S., Mus, L., & Blandini, F. (2019). Parkinson’s disease in women and men: What’s the difference? *Journal of Parkinson’s Disease*, 9(3), 501–515. <https://doi.org/10.3233/jpd-191683>
- Chávez-Pichardo, M. E., Reyes-Bravo, D. Y., Mendoza-Trejo, M. S., Marín-López, A. G., Giordano, M., Hernández-Chan, N., Domínguez-Marchan, K., Ortega-Rosales, L. C., & Rodríguez, V. M. (2020). Brain alterations in GABA, glutamate and glutamine markers after chronic atrazine exposure in the male albino rat. *Archives of Toxicology*, 94(9), 3217–3230. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02806-2>
- Chevrier, C., Warembourg, C., Gaudreau, E., Monfort, C., Le Blanc, A., Guldner, L., & Cordier, S. (2013). Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, seafood consumption, and time-to-pregnancy. *Epidemiology*, 24(2), 251–260. <https://doi.org/10.1097/ede.0b013e31827f53ec>

- Coban, A., & Filipov, N. M. (2006). Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. *Journal of Neurochemistry*, *100*(5), 1177–1187. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04294.x>
- Cooper, R. L. (2000). Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicological Sciences*, *53*(2), 297–307. <https://doi.org/10.1093/toxsci/53.2.297>
- Cragin, L. A., Kesner, J. S., Bachand, A. M., Barr, D. B., Meadows, J. W., Krieg, E. F., & Reif, J. S. (2011). Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. *Environmental Research*, *111*(8), 1293–1301. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.09.009>
- Dalla, C., Pitychoutis, P. M., Kokras, N., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2010). Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *106*(3), 226–233. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00516.x>
- Dewing P, Chiang CWK, Sinchak K, Sim H, Fernagut P-O, Kelly S, et al. Direct regulation of adult brain function by the male-specific factor SRY. *Curr Biol*. 2006; *16*:415–420. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.017>
- Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B, et al. (2009). Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Annals of Neurology*, *66*(4): 494–504. <https://doi.org/10.1002/ana.21717>
- Eldridge, J. C., Stevens, J. T., & Breckenridge, C. B. (2008). Atrazine interaction with estrogen expression systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 147–160. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78444-1_6
- Eltokhi, A., Kurpiers, B., & Pitzer, C. (2021). Baseline depression-like behaviors in wild-type adolescent mice are strain and age but not sex dependent. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.759574>
- Epelbaum, J., Dournaud, P., Fodor, M., & Viollet, C. (1994). The neurobiology of somatostatin. *Critical Reviews in Neurobiology*, *8*(1-2), 25–44. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7907281>
- Elsworth, J. D., & Roth, R. H. (1997). Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: Relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, *144*(1), 4–9. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.6379>

- Falardeau, P., & Di Paolo, T. (1987). Regional effect of estradiol on rat caudate-putamen dopamine receptors: lateral-medial differences. *Neuroscience Letters*, *74*(1), 43–48. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90048-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90048-6)
- Plaguicidas | CODEXALIMENTARIUS | FAO-WHO. (n.d.). www.fao.org. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/themes/pesticides/es/>
- Floresco, S. B. (2015). The nucleus accumbens: an interface between cognition, emotion, and action. *Annual Review of Psychology*, *66*(1), 25–52. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010213-115159>
- Frigerio, R., Sanft, K. R., Grossardt, B. R., Peterson, B. J., Elbaz, A., Bower, J. H., Ahlskog, J. E., De Andrade, M., Maraganore, D. M., & Rocca, W. A. (2006). Chemical exposures and Parkinson’s disease: A population-based case–control study. *Movement Disorders*, *21*(10), 1688–1692. <https://doi.org/10.1002/mds.21009>
- Fox, H. C., & Sinha, R. (2009). Sex differences in drug-related stress-system Changes. *Harvard Review of Psychiatry*, *17*(2), 103–119. <https://doi.org/10.1080/10673220902899680>
- Garrido, T., Fraile, J., Niñerola, J. M., Figueras, M., Antoni Ginebreda, & Olivella, L. (2000). Survey of ground water pesticide pollution on rural areas of Catalonia (Spain). *78*(1), 51–65. <https://doi.org/10.1080/03067310008032692>
- Gilliom, R. J., Barbash, J. E., Crawford, C. G., Hamilton, P. A., Martin, J. D., Nakagaki, N., Nowell, L. H., Scott, J. C., Stackelberg, P. E., Thelin, G. P., & Wolock, D. M. (2006). Pesticides in the nation’s streams and ground water, 1992–2001. [Pubs.er.usgs.gov](http://pubs.er.usgs.gov). <https://pubs.er.usgs.gov/publication/cir1291>
- Gilman, S., & Arbor, A. (1983). Handbook of physiology. Section 1: The nervous system, vol II. Motor control, parts 1 and 2. Section editors: John M. Brookhart and Vernon B. Mountcastle volume editor: Vernon B. Brooks Bethesda, MD, American Physiological Society, 1981 1480 pp, illustrated. *Annals of Neurology*, *13*(1), 111–111. <https://doi.org/10.1002/ana.410130130>
- Giordano, F., Dell’Orco, V., Giannandrea, F., Lauria, L., Valente, P., & Figà-Talamanca, I. (2006). Mortality in a cohort of pesticide applicators in an urban setting: sixty years of follow-up. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, *19*(4 Suppl), 61–65. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17291409/>
- Giusi, G., Facciolo, R. M., Canonaco, M., Alleva, E., Belloni, V., Dessi’-Fulgheri, F., & Santucci, D. (2005). The endocrine disruptor atrazine accounts for a dimorphic

- somatostatinergic neuronal expression pattern in mice. *Toxicological Sciences*, 89(1), 257–264. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj012>
- Godfrey, J. A., & Rypstra, A. L. (2019). Atrazine exposure shifts activity but has minimal effects on courtship in an agrobiont spider. *Ecotoxicology*, 28(5), 499–506. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02041-1>
 - Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth defects research part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2), 84–97. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>
 - Goodwill, H. L., Manzano-Nieves, G., Gallo, M., Lee, H.-I., Oyerinde, E., Serre, T., & Bath, K. G. (2019). Early life stress leads to sex differences in development of depressive-like outcomes in a mouse model. *Neuropsychopharmacology*, 44(4), 711–720. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0195-5>
 - Gysin H, Knuesli E. Chemistry and herbicidal properties of triazine derivatives. In: Metcalf R, editor. *Advances in pest control research*. New York: Interscience; 1960. p. 289–358.
 - Hansen, A. M., Treviño-Quintanilla, L. G., Márquez-Pacheco, H., Villada-Canela, M., Gonzales-Márquez, L. C., Guillén-Garcés, R. A. & Hernández-Antonio, A. (2013) Atrazina: Un herbicida polémico. *Revista Internacional de Contaminantes Ambientales*, 29: 65-84.
 - Hayes, T. B., Anderson, L. L., Beasley, V. R., de Solla, S. R., Iguchi, T., Ingraham, H., Kestemont, P., Kniewald, J., Kniewald, Z., Langlois, V. S., Luque, E. H., McCoy, K. A., Muñoz-de-Toro, M., Oka, T., Oliveira, C. A., Orton, F., Ruby, S., Suzawa, M., Tavera-Mendoza, L. E., & Trudeau, V. L. (2011). Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1-2), 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.03.015>
 - Hayes, T. B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A. A., & Vonk, A. (2002). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5476–5480. <https://doi.org/10.1073/pnas.082121499>
 - Hebel, R., & Stromberg, m. W. (1986). Anatomy and embryology of the laboratory rat. *BioMed Verlag*.

- Hendrik Jan Groenewegen, Pieter Voorn, Berendse, H. W., Mulder, A. B., & Cools, A. R. (2010). *The Basal Ganglia IX*. Springer Science & Business Media.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.03.007>
- Hubscher, C., Brooks, D., & Johnson, J. (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry*, *80*(2), 79–87. <https://doi.org/10.1080/10520290500138422>
- Islam, M. Omedul., Hara, M., & Miyake, J. (2002). Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase and cytochrome P450 in rat liver by atrazine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *12*(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/s1382-6689\(01\)00121-1](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(01)00121-1)
- Kamper, E. F., Chatzigeorgiou, A., Tsimpoukidi, O., Kamper, M., Dalla, C., Pitychoutis, P. M., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2009). Sex differences in oxidant/antioxidant balance under a chronic mild stress regime. *Physiology & Behavior*, *98*(1-2), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.05.011>
- Kass, L., Gomez, A. L., & Altamirano, G. A. (2020). Relationship between agrochemical compounds and mammary gland development and breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *508*, 110789. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110789>
- Keiser, A. A., Turnbull, L. M., Darian, M. A., Feldman, D. E., Song, I., & Tronson, N. C. (2017). Sex differences in context fear generalization and recruitment of hippocampus and amygdala during retrieval. *Neuropsychopharmacology*, *42*(2), 397–407. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.174>
- Kniewald, J., Jakominić, M., Tomljenović, A., Simić, B., Romać, P., Vranesić, D., & Kniewald, Z. (2000). Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, *20*(1), 61–68. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10641017/>
- Kokras, N., Dalla, C., Sideris, A. C., Dendi, A., Mikail, H. G., Antoniou, K., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2012). Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity. *Neuropharmacology*, *62*(1), 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.025>

- Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12), a009621–a009621. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009621>
- 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. <https://doi.org/10.1021/tx9700811>
- Laws, S. C. (2000). The effects of atrazine on female wistar rats: An evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. *Toxicological Sciences*, 58(2), 366–376. <https://doi.org/10.1093/toxsci/58.2.366>
- Leibowitz, S. F., Akabayashi, A., Alexander, J., Karatayev, O., & Chang, G.-Q. (2009). Puberty onset in female rats: relationship with fat intake, ovarian steroids and the peptides, galanin and enkephalin, in the paraventricular and medial preoptic nuclei. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(6), 538–549. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01870.x>
- 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). <https://doi.org/10.3390/ijms19082241>
- Long JA, Evans HM. 1922. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memoirs of the University of California*, 6:1-148.
- Malvaez, M., & Wassum, K. M. (2018). Regulation of habit formation in the dorsal striatum. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 20, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2017.11.005>
- Mancall, E. L., Brock, D. G., & Gray, H. (2011). *Gray's clinical neuroanatomy: the anatomic basis for clinical neuroscience*. Saunders.
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4A), 609–614. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>
- Márquez-Ramos, J. A., Hernández-Plata, I., Díaz-Muñoz, M., & Rodríguez, V. M. (2017). The hypoactivity associated with the repeated exposure to atrazine is related to decreases in the

specific binding to D1-DA receptors in the striatum of rats. *Journal of Toxicology*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/2169212>

- McCarthy, M. M., Arnold, A. P., Ball, G. F., Blaustein, J. D., & De Vries, G. J. (2012). Sex differences in the brain: the not so inconvenient truth. *Journal of Neuroscience*, 32(7), 2241–2247. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5372-11.2012>
- Meffe, R., & de Bustamante, I. (2014). Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy. *Science of the Total Environment*, 481, 280–295. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.053>
- Money, K. M., & Stanwood, G. D. (2013). Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00260>
- Morales, M., & Margolis, E. B. (2017). Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(2), 73–85. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.165>
- Narotsky, M.G.; Best, D.S.; Guidici, D.L.; Cooper, R.L. Strain comparisons of atrazine-induced pregnancy loss in the rat. *Reproductive Toxicology* 2001, 15, 61–69. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(00\)00111-8](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(00)00111-8)
- Nebel, R. A., Aggarwal, N. T., Barnes, L. L., Gallagher, A., Goldstein, J. M., Kantarci, K., Mallampalli, M. P., Mormino, E. C., Scott, L., Yu, W. H., Maki, P. M., & Mielke, M. M. (2018). Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer’s disease: A call to action. *Alzheimer’s & Dementia*, 14(9), 1171–1183. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.04.008>
- Nestler EJ, Carlezon WA Jr (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological Psychiatry* 59(12): 1151–59. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.09.018>
- Nielsen, J., Fejgin, K., Sotty, F., Nielsen, V., Mørk, A., Christoffersen, C. T., Yavich, L., Lauridsen, J. B., Clausen, D., Larsen, P. H., Egebjerg, J., Werge, T. M., Kallunki, P., Christensen, K. V., & Didriksen, M. (2017). A mouse model of the schizophrenia-associated 1q21.1 microdeletion syndrome exhibits altered mesolimbic dopamine transmission. *Translational Psychiatry*, 7(11). <https://doi.org/10.1038/s41398-017-0011-8>
- Orr, G. (1987) A summary of the disposition, kinetics and metabolism of atrazine in the rat. Ciba-Geigy Corp., Greensboro, NC. Study No. ABR-87116
- Pardue, M. L., & Wizemann, T. M. (Eds.). (2001). Exploring the biological contributions to human health: Does sex matter? *National Academies Press*.

- Pariyadath, V., Gowin, J. L., & Stein, E. A. (2016). Resting state functional connectivity analysis for addiction medicine. *Progress in Brain Research*, 155–173. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.07.015>
- Park, Y.-S., Sammartino, F., Young, N. A., Corrigan, J., Krishna, V., & Rezai, A. R. (2019). Anatomic review of the ventral capsule/ventral striatum and the nucleus accumbens to guide target selection for deep brain stimulation for obsessive-compulsive disorder. *World Neurosurgery*, 126, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.01.254>
- Parker, C. R., & Mahesh, V. B. (1976). Hormonal events surrounding the natural onset of puberty in female rats 1. *Biology of Reproduction*, 14(3), 347–353. <https://doi.org/10.1095/biolreprod14.3.347>
- Phillipson, O. T., & Griffiths, A. C. (1985). The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience*, 16(2), 275–296. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(85\)90002-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(85)90002-8)
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.-E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(3), 17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- PROFECO. (2021). Atrazina, un herbicida tóxico. *Revista del consumidor*, 533, 74-75.
- Purves, D. (2004). Neurociencia (5^{ta} ed.). *Editorial Médica Panamericana*, S.A. De C.V.
- Reyes-Bravo, D. Y., Villalobos-Aguilera, P., Almonte-Zepeda, J. T., Mendoza-Trejo, M. S., Giordano, M., Orozco, A., & Rodríguez, V. M. (2022). Chronic atrazine exposure increases the expression of genes associated with GABAergic and glutamatergic systems in the brain of male albino rat. *Frontiers in Toxicology*, 4. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.933300>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.10.012>
- Rohr, J. R., Raffel, T. R., Halstead, N. T., McMahon, T. A., Johnson, S. A., Boughton, R. K., & Martin, L. B. (2013). Early-life exposure to a herbicide has enduring effects on pathogen-induced mortality. *Proceedings. Biological Sciences*, 280(1772), 20131502. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1502>

- Rooney, A. A. (2003). Developmental atrazine exposure suppresses immune function in male, but not female Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 76(2), 366–375. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg250>
- Ross, M. K., Jones, T. L., & Filipov, N. M. (2008). 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. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.024927>
- Ross, M.K., Filipov, N.M., 2006. Determination of atrazine and its metabolites in mouse urine and plasma by LC-MS analysis. *Analytical Biochemistry*, 351, 161–173. <https://doi.org/10.16/j.ab.2006.01.050>
- Ruigrok, A. N. V., Salimi-Khorshidi, G., Lai, M.-C., Baron-Cohen, S., Lombardo, M. V., Tait, R. J., & Suckling, J. (2014). A meta-analysis of sex differences in human brain structure. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 39(100), 34–50. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.12.004>
- Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9), 609–625. <https://doi.org/10.1038/nrn3381>
- Sánchez J. (2022). Efectos de la exposición crónica de atrazina en conductas asociadas en sistemas dopaminérgicos de ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley (Tesis de maestría, UNAM).
- Schmitz, Y., Benoit-Marand, M., Gonon, F., & Sulzer, D. (2003). Presynaptic regulation of dopaminergic neurotransmission. *Journal of Neurochemistry*, 87(2), 273–289. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02050.x>
- Shaner, D. L., Stromberger, M. E., Khosla, R., Helm, A. L., Bosley, B., & Hansen, N. C. (2011). Spatial distribution of enhanced atrazine degradation across northeastern Colorado cropping systems. <https://doi.org/10.2134/jeq2010.0193>
- Sharp, P. E., & La Regina, M. C. (1998). The laboratory rat. A volume in the laboratory animal pocket reference series. CRC Press LLC.
- Simpson, J., & Kelly, J. P. (2012). An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. *Behavioural Brain Research*, 229(1), 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.036>

- Sinha, R. (2008). Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1141(1), 105–130. <https://doi.org/10.1196/annals.1441.030>
- Smith, K. M., & Dahodwala, N. (2014). Sex differences in Parkinson's disease and other movement disorders. *Experimental Neurology*, 259, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.03.010>
- Snell, R. S. (2010). *Clinical neuroanatomy*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams
- Snyder, H. M., Asthana, S., Bain, L., Brinton, R., Craft, S., Dubal, D. B., Espeland, M. A., Gatz, M., Mielke, M. M., Raber, J., Rapp, P. R., Yaffe, K., & Carrillo, M. C. (2016). Sex biology contributions to vulnerability to Alzheimer's disease: A think tank convened by the Women's Alzheimer's Research Initiative. *Alzheimer's & Dementia*, 12(11), 1186–1196. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.08.004>
- 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(12), 13490–13506. <https://doi.org/10.3390/ijms160613490>
- Spychala, M. S., Honarpisheh, P., & McCullough, L. D. (2016). Sex differences in neuroinflammation and neuroprotection in ischemic stroke. *Journal of Neuroscience Research*, 95(1-2), 462–471. <https://doi.org/10.1002/jnr.23962>
- Srivastava, D. P., Woolfrey, K. M., & Penzes, P. (2013). Insights into rapid modulation of neuroplasticity by brain estrogens. *Pharmacological Reviews*, 65(4), 1318–1350. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005272>
- Stoker, T. (1999). Maternal exposure to atrazine during lactation suppresses suckling-induced prolactin release and results in prostatitis in the adult offspring. *Toxicological Sciences*, 52(1), 68–79. <https://doi.org/10.1093/toxsci/52.1.68>
- Tanner, C. M., & Goldman, S. M. (1996). Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurologic Clinics*, 14(2), 317–335. [https://doi.org/10.1016/s0733-8619\(05\)70259-0](https://doi.org/10.1016/s0733-8619(05)70259-0)
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. H. (2011). *Principles of Anatomy and Physiology*. Wiley.
- Traccis, F., Serra, V., Sagheddu, C., Congiu, M., Saba, P., Giua, G., Devoto, P., Frau, R., Cheer, J. F., & Melis, M. (2021). Prenatal THC does not affect female mesolimbic dopaminergic system in preadolescent rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1666. <https://doi.org/10.3390/ijms22041666>

- Valjent, E., & Gangarossa, G. (2021). The tail of the striatum: from anatomy to connectivity and function. *Trends in Neurosciences*, *44* (3), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.10.016>
- Viel, J.-F., Challier, B., Pitard, A., & Pobel, D. (1998). Brain cancer mortality among French farmers: The vineyard pesticide hypothesis. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, *53*(1), 65–70. <https://doi.org/10.1080/00039899809605690>
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J. M. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. A. (2004). Putting a spin on the dorsal–ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, *27*(8), 468–474. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.06.006>
- Wasel, O., & Freeman, J. L. (2020). Chemical and genetic zebrafish models to define mechanisms of and treatments for dopaminergic neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 5981. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21175981>
- Westerink, B. H. C., & Korf, J. (1976). Acidic dopamine metabolites in cortical areas of the rat brain: localization and effects of drugs. *Brain Research*, *113*(2), 429–434. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90956-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90956-2)
- White, F. J. (1996). Synaptic regulation of mesocorticolimbic dopamine neurons. *Annual Review of Neuroscience*, *19*(1), 405–436. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.19.030196.002201>
- Wilson, Charles J. (2014). The Sensory Striatum. *Neuron*, *83*(5), 999–1001. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.025>
- Wissman, A. M., May, R. M., & Woolley, C. S. (2011). Ultrastructural analysis of sex differences in nucleus accumbens synaptic connectivity. *Brain Structure and Function*, *217*(2), 181–190. <https://doi.org/10.1007/s00429-011-0353-6>
- Xiao, L., & Becker, J. B. (1994). Quantitative microdialysis determination of extracellular striatal dopamine concentration in male and female rats: effects of estrous cycle and gonadectomy. *Neuroscience Letters*, *180*(2), 155–158. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90510-x](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90510-x)
- Yang, S., Boudier-Revéret, M., Choo, Y. J., & Chang, M. C. (2020). Association between chronic pain and alterations in the mesolimbic dopaminergic system. *Brain Sciences*, *10*(10), 701. <https://doi.org/10.3390/brainsci10100701>

- Yoest, K. E., Cummings, J. A., & Becker, J. B. (2018). Oestradiol influences on dopamine release from the nucleus accumbens shell: sex differences and the role of selective oestradiol receptor subtypes. *British Journal of Pharmacology*, *176*(21), 4136–4148. <https://doi.org/10.1111/bph.14531>
- Yoest, K. E., Quigley, J. A., and Becker, J. B. (2018). Rapid effects of ovarian hormones in dorsal striatum and nucleus accumbens. *Hormones and Behavior*, *104*: 119–129. doi: 10.1016/j.yhbeh.2018.04.002
- Záborszky, L., Alheid, G. F., Beinfeld, M. C., Eiden, L. E., Heimer, L., & Palkovits, M. & Wilkins. (1985). Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: A morphological and radioimmunological study. *Neuroscience*, *14*(2), 427–453. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(85\)90302-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(85)90302-1)