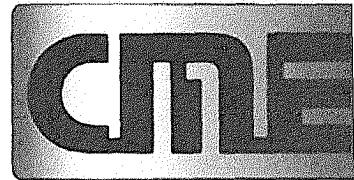




QP364.7
M6



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
“DR. ERNESTO PALACIOS PRÜ”
POSTGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES

EFFECTOS NEUROTOXICOS INDUCIDOS POR LA EXPOSICION
SUBCRONICA A ATRAZINA Y MANCOZEB DURANTE EL
DESARROLLO POSTNATAL TARDIO HASTA ADULTO JOVEN EN EL
HIPOTALAMO DE RATON MACHO

www.bdigital.ula.ve

AUTOR: FCTO. YASMIN COROMOTO MORALES OVALLES

TUTOR: DRA. LETICIA MIRANDA DE CONTRERAS

COTUTOR: DRA. ROSA VIRGINIA MENDOZA BRICEÑO

MÉRIDA, MAYO 2014

**EFFECTOS NEUROTOXICOS INDUCIDOS POR LA EXPOSICION
SUBCRONICA A ATRAZINA Y MANCOZEB DURANTE EL
DESARROLLO POSTNATAL TARDIO HASTA ADULTO JOVEN
EN EL HIPOTALAMO DE RATON MACHO**

www.bdigital.ula.ve

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO POR LA
FARMACÉUTICA: YASMIN C. MORALES O, C.I: 12.460.726, ANTE
EL CONSEJO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, COMO CREDENCIAL DE MÉRITO
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAGISTER SCIENTIARUM
EN CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES

AUTOR: FARMACEUTICA YASMIN COROMOTO MORALES OVALLES

TUTOR: DRA. LETICIA MIRANDA DE CONTRERAS
PROFESORA TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
COORDINADORA DEL LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA DEL
CENTRO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA “*DR. ERNESTO PALACIOS
PRÜ*”

CO-TUTOR: DRA. ROSA VIRGINIA MENDOZA BRICEÑO
PROFESORA TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
DIRECTORA DEL CENTRO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA “*DR.
ERNESTO PALACIOS PRÜ*”

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTO

A Dios y a la Virgen María, embajadora de Dios en la tierra, su guía y apoyo nos da la fortaleza que necesitamos para poder alcanzar los objetivos y propósitos, sé que me acompañan en todo los momentos de mi vida.

A la memoria del Dr. Ernesto Palacios Prú, Quien me abrió las puertas del Centro de Microscopía Electrónica y depositó su confianza en mí. Le dedico este logro que la vida no le dió la oportunidad de ver, pero hoy se lo dedico. *Que el señor lo tenga en su santa gloria.*

A mis padres y hermanos, quienes me han motivado a ser cada día mejor, ciertamente me han dado una vida llena de amor, comprensión y apoyo incommensurables.

A mis hijos Daniel Alejandro y Carlos Daniel, quienes son mi motivación principal y mi razón de vivir, los AMO.

A mi amiga y colega María Luisa Di Bernardo, quien siempre me ha acompañado en los retos de investigación, estudio y trabajo, compartiendo los triunfos y fracasos de la dura pero hermosa profesión que compartimos, constituyéndose en un bastón para mí.

A mi tutora, Dra. Leticia Miranda de Contreras, quien se compenetró conmigo en el hermoso trabajo de investigación; gracias por su paciencia, sabia enseñanza y motivación.

A la Dra. Rosa Virginia Mendoza, MSc. Zulma Peña, Ing. Alirio Balza, Lic. Delsy Davila, Ing. Emilitzá Labarca, por su apoyo en el desarrollo de las actividades para culminar este trabajo, y a todo el personal del Centro de Microscopía Electrónica, quienes me ofrecieron su ayuda y apoyo en múltiples ocasiones.

A la Ilustre Universidad de Los Andes, por medio de este postgrado, me dio la oportunidad de continuar formándome académicamente.

A todas aquellas personas que no confiaron en mí para alcanzar esta meta, fueron la mayor fuente de energía para lograrlo.

A Todos Mil Gracias

ÍNDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CONTENIDO	i
INDICE DE TABLAS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE ANEXOS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
CAPITULO I	1
I. Introducción	2
I.1. MARCO TEÓRICO	5
I.1.1. Generalidades de los Plaguicidas	4
I.1.1.1. Fungicidas Ditiocarbamatos	5
I.1.1.2. Herbicidas Triazinas	7
I.1.2. Neurotoxicidad de Plaguicidas	8
I.1.2.1. Disrupción Neuroendocrina: El Hipotálamo y la Glándula Pituitaria	8
I.1.2.2. Estrés Oxidativo	11
I.1.2.3. Alteración de la Neurotransmisión Sináptica	13
I.1.3. Neurotoxicidad de Plaguicidas durante el Desarrollo	15
I.1.4. Neurotoxicidad de Plaguicidas Específicos	16
I.1.4.1. Neurotoxicidad de Mancozeb	16
I.1.4.2. Neurotoxicidad de Atrazina	17
I.1.5. Neurotransmisores Aminoacídicos	19
I.1.5.1. Neurotransmisores Excitatorios	19

I.1.5.1.1. Glutamato	19
I.1.5.1.2. Aspartato	20
I.1.5.2. Neurotransmisores Inhibitorios	21
I.1.5.2.1. GABA	21
I.1.5.2.2. Glicina	22
I.1.5.2.3. Taurina	23
I.2. OBJETIVOS	24
I.2.1. Objetivos Generales	24
I.2.2. Objetivos Específicos	24
CAPÍTULO II	25
II. MATERIALES Y REACTIVOS	26
II.1. Reactivos	26
II.2. Instrumental Utilizado	26
II.3. Animales de Experimentación	27
II.4. Administración de Plaguicidas	27
II.5. Peso Corporal como Parámetro del Desarrollo Físico	28
II.6. Evaluación de Actividad Locomotora	28
II.7. Análisis de Neurotransmisores mediante HPLC-DAD	30
II.8. Análisis Morfológico con Microscopía de Luz de Alta Resolución y Microscopía Electrónica de Transmisión	31
II.9. Análisis Estadístico	32
CAPÍTULO III	33
III. RESULTADOS	34
III.1. Peso Corporal	34
III.2. Actividad Locomotora	38
III.3. Variación de los niveles de neurotransmisores aminoacídicos	41

excitatorios e inhibitorios	
III.3.1. Efectos de la exposición crónica a Atrazina	41
III.3.2. Efectos de la exposición crónica a mancozeb	42
III.3.3. Efectos de la exposición crónica a plaguicidas sobre la relación Excitación/Inhibición en el hipotálamo	44
III.4. Efectos de la exposición subcrónica a plaguicidas sobre las características histológicas y ultraestructurales del hipotálamo de ratón macho	45
III.4.1. Efectos de la exposición subcrónica a Atrazina	45
III.4.2. Efectos de la exposición subcrónica a Mancozeb	49
CAPÍTULO IV	57
IV.1 DISCUSIÓN	57
IV.2 CONCLUSION	67
IV.3 BIBLIOGRAFÍA	68
IV.4 ANEXOS	81

INDICE DE TABLA

Tabla	Descripción	Página
1	Variación del peso corporal (g) de los ratones del grupo control y de los expuestos a Atrazina y Mancozeb, entre P11 y P55. Experimento A: 10 mg AT/kg y 30 mg MZ/kg p.c.; Experimento B: 30 mg AT/kg y 90 mg MZ/kg p.c.	35
2	Actividad locomotora horizontal de ratones machos, expresada en distancia total recorrida (cm) durante un período de 10 min, luego de 15 (A1), 18 (A2) y 21 (A3) inyecciones con 10 mg AT/kg y 30 mg MZ/kg p.c.; y después de 11 (B1), 14 (B2) y 17 (B3) inyecciones con 30 mg AT/kg y 90 mg MZ/kg p.c. durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55.	39
3	Actividad locomotora vertical, expresada en número de veces que el ratón se levanta durante un período de 10 min, luego de 15 (A1), 18 (A2) y 21(A3) inyecciones con 10 mg AT/kg y 30 mg MZ/kg p.c.; así como, luego de 11 (B1), 14 (B2) y 17 (B3) inyecciones con 30 mg AT/kg y 90 mg MZ/kg p.c. durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55.	39
4	Niveles de neurotransmisores aminoacídicos del hipotálamo de ratones expuestos a 10mg AT/kg y 30 mg MZ/kg p.c. durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55.	43
5	Niveles de neurotransmisores aminoacídicos del hipotálamo de ratones expuestos a 30 mg AT/kg y 90 mg MZ/kg p.c. durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55.	43

INDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Estructuras químicas de algunos plaguicidas ditiocarbamatos	6
2	Estructura química general de plaguicidas triazinas	7
3	El hipotálamo está compuesto por neuronas neurosecretoras magnocelulares y parvocelulares	9
4	Estructura química de mancozeb	17
5	Estructura química de atrazina	18
6	Diseño experimental y plan de trabajo para la exposición subcrónica de ratones machos a los plaguicidas AT y MZ, durante el período postnatal tardío hasta adulto joven, entre 11 y 55 días de edad.	29
7	Variación del peso corporal de ratones machos expuestos veinte veces con una dosis subcrónica de AT: (A) 10 mg AT/kg p.c; (B) 30 mg AT/kg p.c, durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55. Diferencias Estadísticas: *p=0,01; **p<0,005; ***p<0,0001	36
8	Variación del peso corporal de ratones machos expuestos veinte veces con una dosis subcrónica de MZ: (A) 30 mg MZ/kg p.c; (B) 90 mg MZ/kg p.c, durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55. Diferencias Estadísticas: *p=0,01; **p<0,005; ***p<0,0001	37
9	Actividad locomotora horizontal, expresada en distancia recorrida (cm) durante un período de 10 min, de ratones machos luego de 15 (A1), 18 (A2) y 20 (A3) inyecciones con 10 mg AT/kg y 30 mg MZ/kg p.c; así como con la dosis de 30 mg AT/kg y 90 mg MZ/kg p.c, después de 11 (B1), 14 (B2) y 17 (B3) inyecciones. Los valores representan promedios ± D.E., n= 10. Diferencias Estadísticas: * p < 0,005	40
10	Actividad vertical, expresado en número de veces en que el ratón se levanta durante un período de 10 min, luego de 15 (A1), 18 (A2) y 20 (A3) inyecciones con 10 mg AT/kg y 30 mg MZ/kg p.c; así como con la dosis de 30 mg AT/kg y 90 mg MZ/kg p.c, después de 11 (B1), 14 (B2) y 17 (B3) inyecciones. Los valores representan promedios ± D.E., n= 10. Diferencias Estadísticas: *p < 0,05; **p < 0,005, ***p < 0,0001	40
11	Niveles de neurotransmisores aminoacídicos del hipotálamo de ratones machos expuestos a 10 mg AT/kg y 30 mg AT/kg p.c durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55. Diferencias estadísticas: *p < 0,05; **p = 0,009; ***p < 0,0001	41

12	Niveles de neurotransmisores aminoacídicos del hipotálamo de ratones machos expuestos a 30 mg MZ/kg y 90 mg MZ/kg p.c, entre P11 y P55. Diferencias Estadísticas: * $p = 0,02$; *** $p < 0,0001$	42
13	Relación Excitación/Inhibición en el hipotálamo de ratones machos expuestos a 10 mg AT/kg y 30 mg AT/kg p.c, así como a 30 mg MZ/kg y 90 mg MZ/kg p.c entre P11 y P55. Diferencias Estadísticas: *** $p < 0,0001$, n=10.	44
14	Características histológicas del hipotálamo de ratón macho control y expuestos subcrónicamente a 30 mg AT/kg p.c.	46
15	Micrografías en las que se muestra el tejido hipotalámico control (a-b) en comparación con el tejido hipotalámico de ratones machos expuestos subcrónicamente a 30 mg AT/kg p.c.	47
16	Microfotografías del tejido hipotalámico de ratones machos P60 control (a) en comparación con el hipotálamo de ratones machos P60, que fueron expuestos a 30 mg MZ/kg p.c.	49
17	Microfotografías del tejido hipotalámico de ratones machos P60 control (a) en comparación con el hipotálamo de ratones machos P60, que fueron expuestos a 90 mg MZ/kg p.c.	50
18	Micrografías en las que se muestra el tejido hipotalámico de ratón P60, intoxicado con 30 mg MZ/kg p.c.	51
19	Micrografías en las que se muestra el tejido hipotalámico de ratón P60, expuesto subcrónicamente a 90 mg MZ/kg p.c.	53

INDICE DE ANEXOS

Anexo	Descripción	Página
1	Dosis acumulada de AT en ratones machos expuestos durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55.	81
2	Dosis acumulada de MZ en ratones machos expuestos durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55.	82

www.bdigital.ula.ve

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
Ap	Apoptosis
Asp	Aspartato
AT	Atrazina
ATP	Adenosintrifosfato
Ax	Axón
BDNF	Factor Neurotrófico Derivado Cerebral
Ca	Calcio
CAT	Catalasa
Cl	Cloro
CREB	Proteína Elemento de Repuesta de Unión
D	Dendrita
D.E	Desviación Estándar
DAD	Detector de arreglo de Diodos
DnsCl	Cloruro de Dansilo
E	Edad embrionaria
E/I	Relación Excitación /Inhibición
np	Neuropila
GABA	Acido gamma-aminobutírico
GABA _A	Receptor ionotrópico de GABA
GABA _B	Receptor metabotrópico de GABA
GAD	Enzima carboxilasa glutámica
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GlyTs	Transportadores específicos de Gly
GnRH	H ormona liberadora de gonadotropina
GPx	Glutatión peroxidasa
HPG	Hipotálamo-pituitaria-gonalal
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
iGlu	Receptores inotrópicos de glutamato
K	Potasio
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
m	Mitocondrias
MB	Maneb
MG	Magnocelular

mGLU	Receptores metabotrópicos de glutamato
Mn	Manganoso
MZ	Mancozeb
n	Núcleo
Na	Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NMDA	N-metil-D-aspartato
p.c	Peso corporal
PG	Procesos gliales
PQ	Paraquat
PV	Parvocelular
REL	Retículo endoplásmico liso
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido Dismutasa
TAU	Taurina
Zn	Zinc

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

Introducción: La atrazina (AT) es un herbicida derivado de triazina y el mancozeb (MZ), un fungicida del tipo ditiocarbamato; ambos son plaguicidas ampliamente utilizados en la agricultura. Su toxicidad como disruptor endocrino ha sido demostrada particularmente en los ejes neuroendocrinos: hipotálamo-hipófisis-gónada e hipotálamo-hipófisis-tiroides, razón por la cual hemos realizado este trabajo de investigación sobre los efectos neurotóxicos de AT y MZ específicamente en el hipotálamo del ratón macho, que es la región del sistema nervioso central (SNC) fundamental en la regulación de la homeostasis endocrina. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la exposición subcrónica a AT y MZ durante el período crítico del desarrollo cerebral, entre la etapa puberal hasta adulto joven, causa alteraciones neuroquímicas y morfológicas durante el desarrollo hipotalámico, y tiene efectos transitorios o permanentes en el comportamiento del animal en la etapa adulta.

Metodología: Fueron empleados 80 ratones machos NMRI en total: por cada plaguicida, se utilizaron 40 ratones distribuidos en dos grupos experimentales y un grupo control, a los cuales fueron administrados, por vía peritoneal: 10 mg AT/kg p.c., 30 mg AT/kg p.c. y solución salina fisiológica, 0,9% NaCl, para el grupo control; en el caso de MZ, 30 mg MZ/kg p.c., 90 mg MZ/kg p.c. y solución salina fisiológica para el grupo control. La exposición se hizo 20 veces, entre los 11 días postnatales (P11) y P55. Los niveles de neurotransmisores excitatorios, aspartato (Asp) y glutamato (Glu), e inhibitorios, GABA, glicina (Gly) y taurina (Tau) se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Para la evaluación de la actividad locomotora, se utilizó una cámara de actividad locomotora automatizada. Las alteraciones morfológicas fueron observadas mediante microscopía de luz de alta resolución y microscopía electrónica de transmisión.

Resultados: Los resultados obtenidos de la exposición subcrónica de ratones machos, entre P11 y P55, a 10 mg AT/kg p.c. y 30 mg MZ/kg p.c., no mostraron diferencias significativas de p.c y actividad locomotora horizontal en comparación con el grupo control; la actividad locomotora vertical para el grupo de MZ mostró una disminución significativa en relación al grupo control en la etapa adulta. En ambos grupos experimentales, se observó un aumento significativo en los niveles de neurotransmisores excitatorios, Asp y Glu, sin embargo los de neurotransmisores inhibitorios, GABA y Gly, fueron comparables con los de animales control.

La relación excitación/inhibición (E/I) también fue comparable con el grupo control. En contraste, los ratones expuestos a 30 mg AT/kg p.c. y 90 mg MZ/kg p.c. mostraron una reducción significativa en el p.c durante el desarrollo y una hipoactividad locomotora, siendo más marcada la hipoactividad vertical para el grupo MZ en comparación con el grupo control. Se incrementó muy significativamente los niveles de Asp y Glu, así como de GABA, Gly y Tau, resultando en una relación de E/I igual a 2,1 para el grupo de AT y 2,6 para el grupo de MZ, es decir, un estado de sobre-excitación hipotalámica. Por otra parte, los estudios morfológicos proveyeron evidencias concluyentes de procesos de neurodegeneración por excitotoxicidad causada por la exposición subcrónica a AT, y procesos de gliosis provocados por la muerte de células neurosecretoras y desmielinización axonal ocasionada por la exposición subcrónica al MZ.

Conclusion: Estos resultados indican que la exposición subcrónica a AT y MZ, durante la etapa puberal hasta adulto joven, puede producir cambios funcionales sutiles durante el desarrollo del hipotálamo, causando alteraciones en el sistema de neurotransmisión aminoacidérgica y daños a las células neurosecretoras por excitotoxicidad, que puede estar afectando el normal funcionamiento del sistema neuroendocrino. Estos hallazgos demuestran los efectos neurotóxicos de los plaguicidas disruptores endocrinos AT y MZ.

Palabras claves: atrazina, mancozeb, hipotálamo, disruptor endocrino, neurotransmisores aminoacídicos, neurotoxicidad, ratón macho

ABSTRACT

Introduction: Atrazine (AT) is a triazine derivative herbicide and mancozeb (MZ), a dithiocarbamate fungicide; both are widely used pesticides in agriculture. Their endocrine disruptor capacity has been particularly demonstrated in neuroendocrine axes: hypothalamic-pituitary-gonadal and hypothalamic-pituitary-thyroid, for this reason, we have conducted this research on the neurotoxic effects of AT and MZ specifically on the hypothalamus of male mouse, which is the region of the central nervous system (CNS) responsible in the regulation of endocrine homeostasis. The objective of this study was to determine whether subchronic exposure to AT and MZ during the critical period of brain development, from pubertal to young adult stage, causes neurochemical and morphological alterations in the development of the hypothalamus, and have temporary or permanent behavioral effects in adulthood.

Methodology: A total of 80 NMRI male mice were employed in this study. For each pesticide, 40 mice were distributed into two experimental groups and one control group, to which were administered, by peritoneal route, 10 mg AT/kg body weight (b.w.), 30 mg AT/kg b.w. and physiological salt solution, 0.9% NaCl, for the control group; in the case of MZ, 30 mg MZ/kg b.w., 90 mg MZ/kg b.w. and physiological salt solution for the control group. Exposure was made 20 times, between postnatal day 11 (P11) and P55. Levels of excitatory neurotransmitters, aspartate (Asp) and glutamate (Glu), and inhibitory neurotransmitters, GABA, glycine (Gly) and taurine (Tau), were analyzed by high resolution liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). For assessment of locomotor activity, an automated locomotor activity chamber was used. Morphological alterations were observed by light microscopy and high resolution transmission electron microscopy.

Results: The results obtained from subchronic exposure of male mice to 10 mg AT/kg b.w. and 30 mg MZ/kg b.w. showed no significant differences in body weight gain and horizontal locomotor activity during development, as compared with the control group; there was a significant decrease in vertical locomotor activity of the MZ-exposed group, as compared with the control group, in adulthood. In both experimental groups, a significant increase in the levels of Asp and Glu excitatory neurotransmitters was observed; however, the levels of inhibitory neurotransmitters, GABA and Gly, were comparable to those of control animals. The excitation/inhibition (E/I) ratio was also comparable with the control group. In contrast, mice

exposed to 30 mg AT/kg b.w. and 90 mg MZ/kg b.w. showed significant decreases in body weight gain and locomotor hypoactivity during development, with vertical hypoactivity being more marked in the MZ-exposed group compared with the control group. The levels of Asp and Glu were very significantly increased, as well as the levels of GABA, Gly and Tau, resulting in an E/I ratio equal to 2.1 for the AT-exposed group and 2.6 for the MZ-exposed group, showing a status of over-excitement in the hypothalamus. Moreover, morphological studies provided conclusive evidence of neurodegeneration by excitotoxic processes caused by subchronic exposure to AT, and axonal demyelination and gliosis induced by neurosecretory cell death caused by subchronic exposure to MZ.

Conclusion: These results indicate that subchronic exposure to AT and MZ, from pubertal to young adult stage, may produce subtle functional changes during development of the hypothalamus, causing alterations in aminoacidic neurotransmission system and damage to neurosecretory cells by excitotoxicity, that may affect the normal functioning of the neuroendocrine system. These findings demonstrate the neurotoxic effects of endocrine disrupting pesticides AT and MZ.

Keywords: atrazine, mancozeb, hypothalamus, endocrine disruptor, amino acid neurotransmitters, neurotoxicity, male mouse

CAPÍTULO I

www.bdigital.ula.ve

I. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son ampliamente utilizados en la actividad agrícola para prevenir o controlar plagas, enfermedades y otros patógenos de las plantas, en un esfuerzo para reducir o eliminar pérdidas en la cosecha y mantener una alta calidad de los productos (Ramírez y Lacasaña, 2001). Sin embargo, existen serias preocupaciones sobre los riesgos a la salud humana causados bien sea, por una exposición ocupacional o a través de residuos de plaguicidas en alimentos o en el agua para consumo humano (Morales y Rodríguez, 2004; Flores y col., 2011). A pesar de que se han realizado muchos estudios sobre la toxicidad de los plaguicidas y su destino en el ambiente, existe cierta incertidumbre sobre sus efectos a largo plazo, en particular sobre los efectos tóxicos de la exposición crónica a dosis bajas sobre la salud humana (Alavanja y col., 2004; Payan y col., 2013).

Es generalmente aceptado que la exposición ambiental a compuestos químicos tóxicos durante el desarrollo puede causar efectos adversos sobre la morfología y funcionamiento del sistema nervioso (Eskenazi y col., 2008; Miller y col., 2009). Existen varias clases de agroquímicos que pueden causar alteraciones del desarrollo cerebral al interferir con la función neuroendocrina, la cual está relacionada con las interacciones entre el sistema nervioso y el sistema endocrino (Gore, 2008; Weiss, 2011). El término neuroendocrino se refiere a la interacción entre el sistema nervioso y el sistema endocrino, donde neuronas especializadas liberan hormonas en la sangre en respuesta a la estimulación del sistema nervioso (Gore, 2010). Los compuestos que mimetizan o antagonizan las acciones de las hormonas endógenas tienen el potencial de causar efectos adversos durante el desarrollo del sistema nervioso; en general, a estas sustancias se denominan compuestos disruptores endocrinos (CDEs). En el año 2000, la Comisión Europea recopiló una lista de posibles CDEs que incluye cerca de 550 compuestos químicos, de los cuales 189 son plaguicidas o sus metabolitos (European Commission, 2000).

Los CDEs son sustancias químicas, naturales o artificiales, exógenas al organismo, que tienen la capacidad de alterar los mecanismos de homeostasis del sistema endocrino (Panzica y col., 2005; Mnif y col; 2011). Los potenciales efectos adversos de los CDEs son múltiples: aquellos que afectan los procesos de desarrollo y regulación neuroendocrina, pero que también afectan el hábitat silvestre, aún en concentraciones muy bajas. Esto indica que aún en dosis extremadamente bajas, como son los niveles en que se encuentran los contaminantes medio

ambientales, los CDEs pueden afectar un organismo causando alteraciones en el sistema hormonal y tener consecuencias neurológicas, reproductivas, inmunológicas y metabólicas, entre otras (Gore y Patisaul, 2010).

Destacan como momentos de particular sensibilidad a la exposición de los CDEs las etapas de gestación y la primera infancia, etapas en las cuales se producen los procesos de desarrollo controlados por diferentes hormonas, alterando el desarrollo del cerebro, el sistema inmune y otros órganos, como las gónadas y la tiroides, entre otros (Rice y Barone, 2000; Gore, 2008). La neurotoxicidad producida por la exposición a los CDEs durante el desarrollo puede variar cualitativamente y cuantitativamente dependiendo de la etapa del crecimiento y maduración del sistema nervioso (Eskenazi y col., 2008; Costa y col., 2008). Es posible que un CDE pueda afectar los procesos de neurodesarrollo si la exposición ocurre durante el período crítico de la maduración neuroendocrina, pero afectaría muy poco o nada si la exposición ocurre en etapas posteriores del mismo (Rice y Barone, 2000).

En este trabajo de investigación, hemos estudiado la neurotoxicidad de dos de los veinte agroquímicos más utilizados en la agricultura venezolana, AT y MZ, los cuales representan diferentes clases y grupos químicos de plaguicidas con capacidad de disruptión endocrina (Ceconni y col., 2007; Timofeeva y col., 2008; Hayes, 2011). Estos agroquímicos se han detectados como contaminantes de las aguas para consumo humano y aguas superficiales en la región agrícola de Bailadores, Municipio Rivas Dávila del Estado Mérida, Venezuela (Molina y col., 2012; Flores y col., 2011).

La AT es un derivado triazínico que ha sido identificado como un CDE en estudios realizados en los anfibios a través de los cuales se demuestra que a bajas concentraciones de este compuesto causan feminización (Hayes y col., 2006), sin embargo, existe poca información en relación a sus efectos tóxicos sobre el sistema nervioso en desarrollo. Por otra parte, el MZ, un polímero complejo de etilenbis-ditiocarbamato (EBDC) que contiene manganeso (Mn) y zinc (Zn), ha sido demostrado que causa hipotiroxinemia y otros efectos adversos sobre el sistema hormonal de la tiroides en animales experimentales (Axelstad y col., 2011). En humanos, una alta incidencia de desórdenes de la glándula tiroidea fue observada en trabajadores agrícolas expuestos a los fungicidas EBDC (Panganiban y col., 2004). La hipotiroxinemia causada por la exposición a MZ durante la etapa temprana del embarazo se ha asociado con efectos adversos sobre el desarrollo del sistema nervioso y puede perjudicar el desarrollo de la función cognitiva y

motora en los niños (Axelstad y col., 2011); este compuesto tiene un alto potencial como CDE actuando sobre el eje hipotálamo-hipófisis-glándula tiroides (Panganiban y col., 2004).

En el presente trabajo, fueron administradas tres veces por semana, para un total de 20 dosis de AT y MZ, a dos grupos diferentes de ratones machos durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55. Luego, fue diseccionado el hipotálamo, tanto de los animales experimentales así como del control, para su posterior análisis neuroquímico y ultraestructural. Los niveles de neurotransmisores excitatorios, Asp y Glu, e inhibitorios: Gly, GABA y Tau, se determinaron por HPLC-DAD.

Los resultados de este estudio proveerán las bases bioquímicas de las alteraciones en los sistemas de neurotransmisores aminoacídicos hipotalámicos durante el desarrollo para tener una mejor comprensión de cómo tratar los pacientes expuestos crónicamente a plaguicidas y relacionar patologías sin causas aparentes.

www.bdigital.ula.ve

I.1. MARCO TEÓRICO

I.1.1. Generalidades de los Plaguicidas

Un plaguicida es una sustancia o mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas cuya finalidad es prevenir, destruir y controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedades humanas o animales, especies indeseadas de plantas o animales capaces de causar daños o interferir de cualquier forma en la producción, procesamiento, almacenamiento o transporte de los alimentos, otros productos agrícolas, madera y sus derivados, que pueden ser administrados a los animales para el control de insectos, arácnidos u otras plagas en sus organismos (FAO, 1986).

Existen diferentes criterios para la clasificación de los plaguicidas: a) De acuerdo con su uso y tipo de organismo que afectan (insecticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, desinfectantes y fumigantes); b) Destino de su aplicación y acción específica (contacto, ingestión, fumigante, sistémicos); c) Grado de toxicidad (ligeramente peligroso, moderadamente peligroso, altamente peligroso, extremadamente peligroso); d) Composición química (organoclorados, organofosforados, carbamatos, ditiocarbamatos, triazinas, piretroides, bipiridilos, derivados de urea, entre otros); e) Por su vida media de efectividad (no persistente, moderada, persistente, permanente); f) Por el destino de aplicación: agrícola, urbano, pecuario, industrial, forestal, doméstico (Ramirez y Lacasaña, 2001).

I.1.1.1. Fungicidas Ditiocarbamatos

Los fungicidas son compuestos empleados extensamente en la industria, agricultura y el hogar para controlar los hongos que pueden infectar y causar enfermedades en plantas y animales; no se necesitan grandes dosis de estas sustancias para producir su efecto. Con pocas excepciones, la mayoría de los fungicidas producen toxicidad baja en mamíferos, aunque se ha demostrado mediante pruebas de mutagenicidad microbiana *in vitro* que todos los fungicidas son citotóxicos (Klaassen y Watkins III, 2001).

Los fungicidas del tipo ditiocarbamatos comprenden una serie de sustancias que tienen una estructura química relacionada con la de los insecticidas y herbicidas carbamatos y varios de ellos contienen en su estructura química un metal, como se muestra en la figura 1. Estos compuestos exhiben una débil actividad anticolinesterásica, por lo que no tienen efecto significativo sobre esta enzima (Gonzalez y Bello, 1999). Estas sustancias forman estructuras poliméricas que le dan estabilidad ambiental y proporcionan una buena protección foliar así

como un orden bajo de toxicidad aguda. En el ambiente y en los organismos vivos, los ditiocarbamatos sufren una transformación convirtiendo el principio activo etilenbisditiocarbamato (EBDC) en etilentiourea (ETU), el cual es bien conocido por su acción mutagénica, teratogénica y carcinogénica (Axelstad y col., 2011); también se puede formar el ETU durante el procesamiento y el cocinado de productos contaminados con EBDC. El EBDC se ha reconocido como posible factor de riesgo ambiental que causa la Enfermedad de Parkinson (EP), debido a que estos tóxicos ambientales actúan como disruptores del sistema antioxidante en células dopaminérgicas del sistema nigro-estriatal, inhiben la función proteosomal e inducen la agregación de la alfa-sinucleína en neuronas dopaminérgicas, catalizando la auto-oxidación del catecol (Domico y col., 2006)

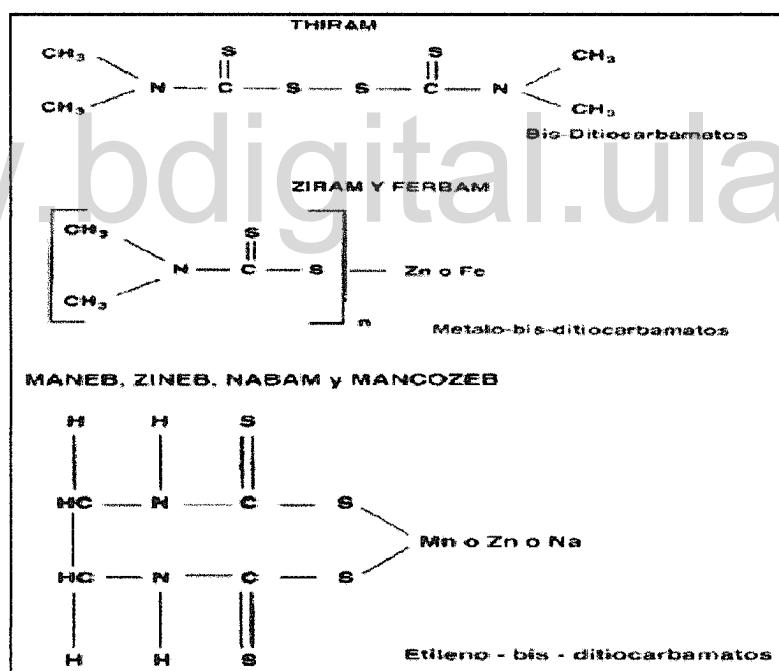


Figura 1. Estructuras químicas de algunos plaguicidas ditiocarbamatos.
Fuente: <http://www.bvsde.paho.org/tutorial2/c/unidad7/index.html>

I.1.1.2. Herbicidas Triazinas

Las triazinas son plaguicidas pertenecientes al grupo de herbicidas utilizados para el control del crecimiento de malezas. Químicamente son anillos de seis miembros que contienen tres nitrógenos (el prefijo tri- quiere decir “tres”) y una azina (se refiere a un anillo que contiene nitrógeno) formando los nitrógenos heterocíclicos (Figura 2). Son fuertes inhibidores del transporte fotosintético de electrones. Su selectividad depende de la habilidad de las plantas tolerantes para degradar o metabolizar el compuesto parental (las plantas susceptibles no lo hacen); estas sustancias se aplican al suelo.

Si bien su efecto toxicológico sobre el ser humano no es tan grave como el de otros plaguicidas clorados y/o fosforados, sí lo puede ser su persistencia en el ambiente, motivado tanto por su baja solubilidad en agua como por su alta retención por adsorción en el suelo y sedimentos de los cauces hídricos (Álvarez, 2010).

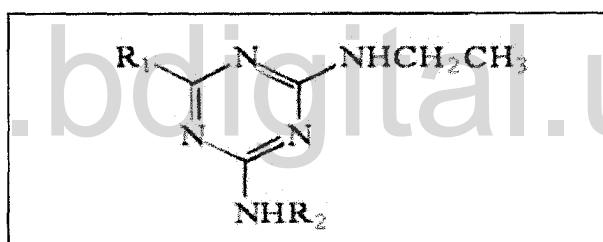


Figura 2. Estructura química general de plaguicidas triazinas. R₁ = Cl; R₂ = CH(CH₃)₂ (Atrazina); R₁ = CH₃S; R₂ = CH(CH₃)₂ (Ametrina); R₁ = Cl; R₂ = CH₂CH₃ (Simazina). Fuente: Klaassen y Watkins III, 2001

La dosis letal 50 (DL 50) en ratas es de 1.780 mg/kg, es decir, son levemente tóxicas para humanos y otros mamíferos, ya sea por la vía oral, dérmica o inhalatoria. Sin embargo, pueden causar graves daños en los ecosistemas y la salud humana durante la exposición crónica a través de alimentos, agua y aire. Las triazinas, como AT, simazina y cianazina, fueron clasificadas por la EPA como un posible carcinógeno humano de clase C. Son potentes disruptores endocrinos y provocan desórdenes en la reproducción de los mamíferos (Hernández, 2010). Bloquean la síntesis del estradiol, probablemente inhibiendo la acción de la aromatasa y

potenciando de esta forma la acción de la testosterona, por lo que producen finalmente una acción androgénica (Morales y Rodriguez, 2004).

I.1.2. Neurotoxicidad de Plaguicidas

I.1.2.1. Disrupción Neuroendocrina: El Hipotálamo y la Glándula Pituitaria

El hipotálamo y la glándula pituitaria constituyen las zonas cerebrales responsables de la función neuroendocrina, puesto que producen una gran cantidad de hormonas que a su vez regulan la síntesis y liberación de muchas otras (Figura 3). El hipotálamo y la adenohipofisis se comunican mediante capilares sanguíneos que forman el sistema porta hipotálamo-hipófisis. Las células neurosecretoras parvocelulares (del latín *parvus* o pequeño) del hipotálamo secretan hormonas liberadoras o inhibidoras que llegan mediante el sistema porta hipofisiaria a la adenohipofisis y regulan la producción de hormonas hipofisiarias. Otras células neurosecretoras hipotalámicas, las neuronas magnocelulares (del latín *magnus* o grande) producen oxitocina y vasopresina, que son liberadas directamente a la neurohipofisis dentro de las mismas fibras nerviosas, mediante transporte axónico hacia los capilares, y de este modo ingresan a la circulación general (Kandell y col., 2001).

Por medio del sistema circulatorio, las hormonas se distribuyen a sus órganos diana donde controlan procesos tan importantes como el crecimiento, la función reproductiva y el metabolismo. De modo inverso, las hormonas producidas en las glándulas endocrinas, una vez liberadas al torrente sanguíneo, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al sistema nervioso central (SNC) donde ejercerán algunas de sus funciones, como por ejemplo, la regulación de la propia función neuroendocrina en el hipotálamo (mediante un mecanismo de retroalimentación positiva o negativa), el comportamiento sexual y de manera más general, en otras áreas del cerebro modulando funciones cognitivas.

El sistema neuroendocrino es el responsable de mantener el control de los procesos homeostáticos en el organismo. Cuando la homeostasis neuroendocrina se ve afectada por sustancias químicas que se encuentran en el medio ambiente, como los CDEs, que pueden actuar como agonistas o antagonistas de las hormonas liberadas en el hipotálamo o la hipófisis, se pueden producir una serie de perturbaciones que alteran el sistema neuroendocrino, afectando el proceso de desarrollo de la función reproductiva en seres humanos y animales silvestres y domésticos (Hotchkiss y col., 2008; Gore y Patisaul, 2010).

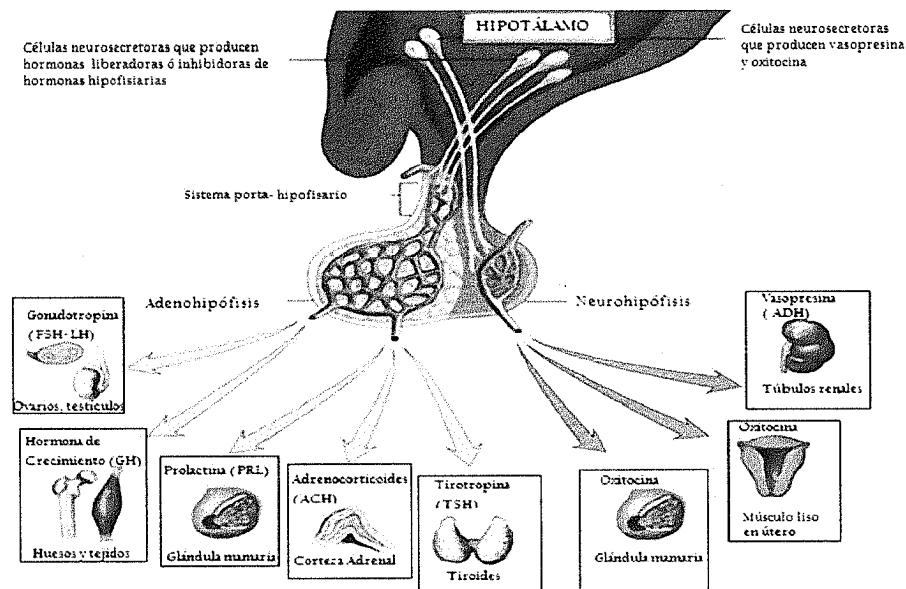


Figura 3. El hipotálamo está compuesto por neuronas neurosecretoras magnocelulares y parvocelulares, cuya actividad secretora proporciona las neurohormonas a la glándula pituitaria. Las neuronas parvocelulares producen factores hipofisiotrópicos que regulan la función adenohipofisiaria. Las neuronas magnocelulares componen las neuronas supraópticas y paraventriculares que sintetizan oxitocina y vasopresina, liberando sus productos de neurosecreción al torrente sanguíneo en la neurohipófisis. Tomado de: <http://www.studyblue.com/endocrine-system-characteristics-of-hormones>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a un CDE como una sustancia o mezcla de sustancias exógenas que altera la función del sistema endocrino y por consiguiente causan efectos adversos a la salud en un organismo intacto o su progenie (OMS, 1993). Los CDEs actúan principalmente afectando la función de las hormonas naturales por su gran potencial para unirse a los receptores andrógenos o estrógenos, se unen activando los receptores de diversas hormonas imitando la acción de la hormona natural, así mismo puede unirse a los receptores sin activarlos, bloqueando la acción de los receptores. También pueden interferir con la síntesis, transporte, metabolismo y eliminación de las hormonas, lo que disminuye su concentración normal (Guzman y Zambrano, 2007).

La exposición a CDEs afectan la fisiología normal del eje reproductivo, originando cambios a diferentes niveles en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Gore, 2008; Weiss, 2011). Las neuronas liberadoras de la gonadotropina (GnRH) del hipotálamo controlan la función reproductiva de todos los vertebrados; estas células neuronales proyectan sus axones a la

eminencia media o infundíbulo del hipotálamo, donde se libera GnRH en los capilares que vascularizan la glándula pituitaria anterior. En la glándula pituitaria, la GnRH se une a sus receptores que sintetizan y liberan la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) a la circulación general, para luego unirse a sus receptores en los ovarios o los testículos para producir la esteroidogénesis y la gametogénesis. Estas hormonas esteroideas gonadales son de gran importancia para la reproducción y cumplen funciones claves en los procesos del desarrollo del SNC, desde la etapa fetal hasta los períodos postnatales tardíos, siendo fundamental para los procesos de la neurogénesis, moldeando la diferenciación sexual del cerebro. Por otra parte, las hormonas gonadales también son cruciales para el normal funcionamiento del cerebro durante la madurez y hasta la senectud y ejercen acciones de protección contra enfermedades neurodegenerativas, como la demencia (Guzman y Zambrano, 2007).

Mnif y colaboradores (2011) señalan que el efecto de los plaguicidas CDEs ha sido comprobado por diferentes investigadores en los invertebrados, reptiles, peces, pájaros y mamíferos. La mayoría de los estudios están vinculados a la exposición a plaguicidas organoclorados que afectan la función reproductiva. Por ejemplo, un estudio sobre *Daphnia magna* se ha demostrado que el sulfato de endosulfán afecta la regulación de los procesos como el desarrollo embrionario, la muda, y la actividad hormonal (que regula la proporción de sexos) de crustáceos (Palma y col., 2009). Otro ejemplo es la influencia de linurón en el eje gonadal; la producción de testosterona en ratas se redujo significativamente después de la exposición intrauterina a linurón, mientras que la producción de progesterona no se vio afectada (Mnif y col., 2011). Asimismo, estudios realizados en ratas han podido comprobar que existen varios mecanismos posibles para la acción antagonista de los plaguicidas órganosfosforados; estos compuestos pueden ejercer directamente una acción inhibitoria sobre los testículos o afectar la hipófisis y causar cambios en la concentración de gonadotropinas con el subsiguiente daño testicular (Slotkin y col., 2009). También se ha demostrado que los plaguicidas CDEs alteran el desarrollo reproductivo y sexual en humanos y estos efectos parecen depender de varios factores, incluyendo género, edad, dieta y la ocupación (Payán y col., 2013).

Los CDEs actúan además sobre otros ejes neuroendocrino, como el eje hipotálamo-hipofisis-glandula tiroides y el sistema inmunológico e incluso pueden tener más de un tipo de actividad en el sistema neuroendocrino (Pelch y col., 2011). Para mantener la homeostasis en el

eje tiroideo, es necesario que en todo momento se secrete la cantidad de hormona tiroidea necesaria, mediante el mecanismo específico de retroalimentación, que actúa a través del hipotálamo-adenohipófisis, lo que permite controlar la secreción tiroidea. La adenohipófisis libera la hormona estimulante de la tiroides (TSH), que activa la secreción de hormonas en la glándula tiroidea. En el hipotálamo, las neuronas neurosecretoras parvocelulares secretan la hormona liberadora de tirotropina (TRH), activando la liberación de TSH en la adenohipófisis. Estas hormonas tiroideas son reguladas por la retroalimentación negativa por la misma hormona. En consecuencia, el aumento de hormonas tiroideas en la sangre a causa de los CDEs inhibirá la secreción de TSH en la hipófisis anterior y, más débilmente, la TRH por el hipotálamo.

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides es sensible a un gran número de CDEs, entre los que podemos mencionar percloratos, bifenilopoliclorados y plaguicidas como amitrol, cialotrina, maneb (MB), MZ, pentachloronitro-benceno, prodiamicina, pirimetamol, tiazopir, ziram, zineb, entre otros. Estos compuestos actúan disminuyendo la producción de tiroxina debido a una baja respuesta de TSH a TRH, evidenciando una disfunción hipotalámica-hipofisiaria (Zoeller y col., 2002). La hormona tiroidea es esencial para el desarrollo cerebral debido a que está involucrada en los procesos de migración, diferenciación neuronal, mielinización y sinaptogénesis, además tiene influencia sobre el comportamiento y la función cognitiva (Gore, 2010). Otra de las funciones de las hormonas tiroideas es la modulación de las funciones serotoninérgicas y catecolaminérgicas, que regulan el metabolismo cerebral y controlan la expresión de genes, por ejemplo, el gen de la proteína básica de la mielina; estas funciones sugieren que las hormonas tiroideas tienen un efecto predominante en el hipocampo y la corteza prefrontal de gran importancia ya que implican funciones de memoria y atención (Yen, 2001), asimismo, cumplen funciones importantes en las características morfológicas de las células piramidales (Whybrow y col., 2005).

I.1.2.2. Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo juega un papel importante en la toxicidad de numerosos agentes químicos, muchos de ellos interaccionan con diversos componentes tisulares y generan radicales libres (Salvador y col., 2003; Sáez, 2005). En las últimas décadas se ha tenido mayor relevancia en la inducción del estrés oxidativo a causas de sustancias exógenas como los plaguicidas (Hernández y col., 2012).

Los radicales libres son moléculas que contienen un electrón no apareado; esta característica los hace sumamente reactivos y capaces de dañar a otras moléculas transformándolas a su vez en moléculas muy reactivas, causando una reacción en cadena que produce daño oxidativo desde células hasta tejidos (Martínez y col., 2003). En 1954, Gershman estableció por primera vez la conexión entre radicales libres y agentes tóxicos, así como también entre radicales libres y enfermedad, describiendo que los radicales libres son capaces de oxidar las cadenas de aminoácidos que forman las proteínas, alterando su conformación espacial y por tanto, su función. Las moléculas más afectadas son las proteínas de membranas (canales iónicos, receptores, etc.), las proteínas estructurales y enzimáticas (Ramón, 1993). En condiciones fisiológicas normales, existe un equilibrio entre la formación de radicales libres y los mecanismos de defensa antioxidantes; cuando este equilibrio se rompe a favor de la generación de radicales libres, nos encontramos ante una situación denominada estrés oxidativo (Martínez y col., 2003). En esta situación aumenta la probabilidad de que los radicales libres lesionen moléculas de mayor importancia biológica, tales como ADN, proteínas y lípidos de membranas, produciendo una degeneración celular; la acumulación de agregados intracelulares ocasiona disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis. La mitocondria es la mayor fuente de radicales libres asociada con la función primaria de las organelas, denominada metabolismo oxidativo y síntesis de adenosin trifosfato (ATP), cuya función es esencial durante el metabolismo oxidativo normal. La generación de radicales libres en la cadena respiratoria ha sido clásicamente atribuida al complejo III, semiquinona, pero el complejo I es un importante generador de radicales libres (Vera y Chinopoulos, 2006; Drechsel y Patel, 2008).

Es bien conocido que los radicales libres pueden causar la muerte de neuronas y astrocitos por apoptosis y necrosis (Martínez y col., 2003). La mitocondria está implicada en la muerte celular por excitotoxicidad a través de la liberación de calcio y la apertura de poros de transición en la membrana mitocondrial (cambio de permeabilidad). El estrés oxidativo está también relacionado con la liberación de glutamato y la activación continua del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), produciendo radicales superóxidos en neuronas y macrófagos cerebrales.

Se ha sugerido que uno de los mecanismos moleculares implicados en la toxicidad de los plaguicidas es la peroxidación lipídica (Banerjee y col., 1999). El mecanismo de defensa frente a radicales libres es la producción de superóxidos, tales como: superóxido dismutasa, catalasa,

glutatión peroxidasa, entre otros, que pueden ejercer un papel protector frente a los efectos deletéreos de las especies reactivas de oxígeno inducidos por plaguicidas (Matés, 2000).

Existen diferentes reportes en la literatura que relacionan los plaguicidas con el estrés oxidativo y los daños causados sobre los sistemas de neurotransmisión (Slotkin y col., 2009; Torres-Altoro y col., 2011). Cabe destacar los trabajos realizados por Drechsel y Patel (2008); ellos hicieron estudios donde establecen que el estrés oxidativo juega un papel importante en la toxicidad de diversos compuestos químicos, como los plaguicidas, lo que puede contribuir a las manifestaciones tóxicas de estos compuestos. El daño tisular producido por los radicales libres contribuye a la aparición de numerosos procesos patológicos de tipo crónico. Los plaguicidas dieldrin y maneb inhiben selectivamente el complejo III de la cadena respiratoria, lo que sugiere la posibilidad de un mecanismo directo de la producción de radicales reactivos de oxígeno y el estrés oxidativo, aunque es menos conocido su potencial para la inducción de estrés oxidativo en comparación con el paraquat (PQ) o rotenona; estos compuestos han ayudado a dar forma a la comprensión de los procesos neurodegenerativos (Drechsel y Patel, 2008).

El estrés oxidativo causado por los efectos de los radicales libres en las células ha sido implicado en la patogénesis de muchas enfermedades, principalmente en las enfermedades neurodegenerativas: tales como el Mal de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica. La neurotoxicidad dopamínérgetica puede estar causada por el catabolismo de la dopamina, generando una gran cantidad de especies de oxígeno reactivo. En el metabolismo de dopamina se producen peróxidos y en la auto-oxidación, se generan peróxidos y radicales libres. De este modo altas concentraciones de este neurotransmisor pueden causar la formación de radicales libres, los cuales pueden contribuir a un estado de estrés oxidativo (García y col., 2006).

I.1.2.3. Alteración de la Neurotransmisión Sináptica

Los estudios experimentales en animales indican que la neurotoxicidad de varios plaguicidas pueden estar relacionadas con la alteración de los diferentes sistemas de neurotransmisores, influyendo en sus procesos de síntesis, la liberación, la absorción y la degradación (Alvarado y Serrano, 2007).

La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico del SNC que juega un papel importante en el control de los movimientos voluntarios y la postura del cuerpo, así como en las funciones cognitivas y las emociones (Bear y col., 2008). Un desorden de la neurotransmisión

dopaminérgica producido por la exposición a plaguicidas daría lugar a procesos patológicos, entre los que se encuentra la EP, cuadros psicóticos y estados de ansiedad y depresión. Durante los últimos años, los estudios epidemiológicos y toxicológicos han proporcionado evidencias de que los plaguicidas tienen el potencial de actuar como tóxicos dopaminérgicos, contribuyendo al desarrollo de la EP (Drechsel y Patel, 2008). Se han vinculados los ditiocarbamatos, tales como maneb y MZ, en un rango de anomalías con efectos adversos sobre los sistemas dopaminérgicos y glutamatérgicos (Thiruchelvam y col., 2002; Dominico y col., 2006). Estudios con animales de experimentación han asociado la toxicidad selectiva de los fungicidas ditiocarbamatos a las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, lo que indicaba que la exposición a este plaguicida podía suponer un riesgo potencial para el desarrollo de la EP. La exposición crónica al MZ produce neurodegeneración en neuronas dopaminérgicas y gabaérgicas en modelos de *Caenorhabditis elegans* (Negga y col., 2011).

Con respecto a la neurotransmisión aminoacidérgica, desde hace varios años se sabe que la principal diana de plaguicidas organoclorados en el SNC es el receptor GABA_A; varios trabajos en animales de experimentación, tanto *in vivo* como *in situ*, han señalado que la exposición crónica a dieldrin altera la expresión de algunas de las subunidades del receptor GABA_A (Liu y col., 1997; 1998). Recientemente, Briz y colaboradores (2010) han confirmado el bloqueo permanente de los receptores GABA_A por la exposición crónica de cultivos de neuronas corticales a dieldrin, lo cual resulta en una reducción de la neurotransmisión glutamatérgica. Estos resultados podían explicar las deficiencias cognitivas y de aprendizaje observadas en animales después del tratamiento crónico con dieldrin.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la exposición prenatal de ratones NMRI a los plaguicidas Paraquat (PQ), MZ y la mezcla de ambos altera la formación del circuito cerebeloso, afectando principalmente el desarrollo de las neuronas inhibitorias: las células de Purkinje y las células de Golgi, produciendo cambios en la cronología y magnitud de la transmisión sináptica en la corteza cerebelosa durante el desarrollo (Miranda-Contreras y col., 2005). En otro trabajo, se ha demostrado que la exposición prenatal a PQ altera los niveles basales de neurotransmisores aminoacídicos durante el desarrollo postnatal de la corteza parietal del ratón, predominando la excitación sobre la inhibición durante todo el período estudiado (Benítez-Díaz y col., 2009). Estas alteraciones en el desarrollo de la neurotransmisión

aminoacidérgica podían indicar la ocurrencia de importantes daños corticales causado por la exposición a PQ durante la etapa de gestación.

I.1.3. Neurotoxicidad de Plaguicidas durante el Desarrollo

El desarrollo del SNC comienza en las primeras semanas de gestación y consiste en una serie de procesos que ocurren con una secuencia determinada y dependen uno del otro, por lo que la interferencia de uno de ellos puede también afectar a las fases posteriores. Esto explicaría la importancia del período y duración de exposición a sustancias tóxicas en la organogénesis e histogénesis cerebral, que se puede expresar con lesiones más tardías, e incluso en la vida adulta (Ortega y col., 2005).

Gore (2008) señala que los momentos críticos de la vida de un individuo son las etapas embrionaria, fetal y primera infancia, así lo han demostrado con experimentos en animales y algunos casos muy concretos de investigación sobre humanos. Estas etapas son sensibles frente a las agresiones del medio ambiente, ya que pueden afectar las fases del desarrollo del SNC, es decir, la proliferación, migración, diferenciación, sinaptogénesis, mielinización y modelaje (Tilson, 1998; Rice y Barone, 2000)

Se ha demostrado que los CDEs actúan desde la etapa temprana del neurodesarrollo alterando funciones metabólicas, las cuales incrementan la susceptibilidad de padecer enfermedades en la edad adulta (Jacobson y Jacobson, 1996; Ortega y col., 2005). Así las principales enfermedades neurodegenerativas en la edad adulta se inician en la edad temprana de la vida cuando han sido expuestos a dosis crónicas de plaguicidas (Slotkin y col., 2006).

Jacobson y Jacobson (1996) reportaron que hay factores que explican que el embrión/feto es más vulnerable a la exposición de compuestos químicos que los recién nacidos y esos factores son: 1) La inmadurez de los mecanismos de detoxificación e inmunoprotección que no se desarrollan completamente hasta después del nacimiento; 2) Los niños tienen reservorios de grasas que no lo tienen los fetos y estos reservorios pueden absorber xenobióticos extrayéndolos del torrente circulatorio; 3) El cerebro fetal puede ser más vulnerable a xenobióticos porque la barrera hematoencefálica no está operativa hasta el desarrollo más avanzado; 4) El desarrollo del SNC no concluye en la etapa prenatal sino hasta que el individuo alcanza la pubertad; es en esta etapa del desarrollo cuando el individuo es más vulnerable a los factores ambientales, como la exposición a sustancias tóxicas (Spyker, 2000).

El momento de la exposición a un CDE es crucial para determinar su efecto final. Se reconoce que existen períodos críticos del desarrollo durante los cuales los sistemas neuroendocrinos son modulados por las hormonas esteroideas y no esteroideas. Por ejemplo, la exposición en los primeros años de vida a los andrógenos o estrógenos endógenos, sobre todo en la vida fetal y la infancia, organiza el cerebro de una manera sexualmente dimórfica (es decir, que resulta en diferencias morfológicas y funcionales entre hombres y mujeres (Gore, 2010). La exposición a sustancias exógenas, como los CDEs, es probable que tenga consecuencias negativas más profundas en los organismos en desarrollo que en los adultos. Este concepto es aplicable a los sistemas neuroendocrinos. Por ejemplo, en el caso del eje hipotálamo-pituitaria-gonadal (HPG), la exposición temprana a CDEs ambientales pueden alterar permanentemente el desarrollo sexual, dando lugar a mujeres masculinizadas o defeminizadas y a hombres feminizados o demasculinizados. Se ha observado una creciente prevalencia de infertilidad masculina asociada con la baja calidad del semen y alta incidencia de cáncer testicular en hombres, mientras que en la mujer se ha identificado baja fertilidad, anomalías menstruales y tumores urogenitales asociadas a la exposición prenatal con CDEs, y en general, durante períodos críticos del desarrollo (Rice y Barone, 2000).

Los esteroides sexuales y las hormonas tiroideas juegan un papel crucial en el desarrollo del hipotálamo, el hipocampo y la corteza cerebral; estas hormonas tienen efectos de por vida en las funciones centrales al influir en la proliferación celular, crecimiento dendrítico y formación de las sinapsis. Los cambios estructurales en el cerebro, después de haber sufrido alteraciones hormonales durante la vida fetal y perinatal, tienen consecuencias funcionales en la adolescencia y la edad adulta (Parent y col., 2011).

I.1.4. Neurotoxicidad de Plaguicidas Específicos

I.1.4.1. Neurotoxicidad de Mancozeb

EL MZ (Figura 4) es ampliamente utilizado como fungicida protector. Los metales que contiene este compuesto, Mn y Zn, difieren en que el Mn tiene mayor permeabilidad cerebral que el zinc y el hierro, lo que le permite al Mn concentrarse más fácilmente en el cerebro, especialmente en los ganglios basales, y puede causar un síndrome neurológico irreversible similar a la EP (Klaassen y Watkins III, 2001).

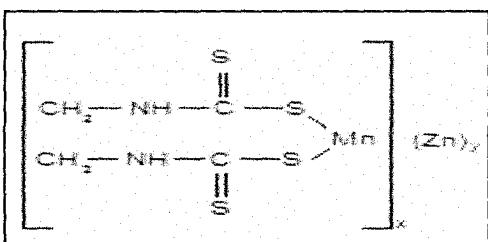


Figura 4. Estructura química de mancozeb.

El MZ presenta un amplio espectro antifúngico frente a hongos endoparásitos causantes de enfermedades foliares. La toxicidad aguda del MZ en mamíferos por vía oral es prácticamente inexistente; la DL50 por vía oral y dérmica en ratas es > 5000 mg/Kg, aunque se han descrito acciones irritantes en la piel y se aconsejan evitar la exposición. Estudios demuestran que la tiroides, el hígado y el riñón sufren cambios anatomo-patológico en función de la dosis y del tiempo de exposición al fungicida. El efecto deletéreo del MZ sobre las glándulas endocrinas ha sido puesto de manifiesto especialmente sobre la tiroides (Axelstad y col., 2011). En los humanos, la hipotiroxinemia temprana en el embarazo se asocia con efectos adversos sobre el desarrollo del sistema nervioso y puede causar deterioro de la función cognitiva y desarrollo motor de los niños (Debbagh y col., 2002).

El MZ es un neurotóxico potente y causa toxicidad a las neuronas mesencéflicas dopaminérgicas y gabaérgicas de manera dosis dependiente. Sin embargo, algunos trabajos indican que el MZ no es selectivo en término de toxicidad, es decir, produce toxicidad en todas las poblaciones neuronales (Harrison y col., 2012). Su mecanismo de acción es a través de la inhibición del complejo III de la cadena transportadora de electrones en mitocondrias, disminuyendo la síntesis de ATP, incrementando el metabolismo anaeróbico y la producción de lactato (Domico y col., 2006).

I.1.4.2. Neurotoxicidad de Atrazina

La AT es uno de los herbicidas más aplicados para controlar o evitar el crecimiento de malezas en cultivos de maíz, sorgo y caña de azúcar, entre otros. Este herbicida es fácilmente liberado al ambiente y se ha demostrado que tiene una alta persistencia debido a que su degradación química o biológica es muy lenta (Graymore y col., 2001; Gammon y col., 2005). Es un herbicida orgánico nitrogenado derivado de la triazina (Figura 5), cuyo mecanismo de acción es inhibir el transporte fotosintético de electrones, lo cual a su vez inhibe el crecimiento

de todos los órganos de plantas intactas. Se ha demostrado que grupos afines a la AT alteran el control hormonal en el eje gonadal y han sido considerado como un posible carcinógeno humano (Stoker y col., 2002; Kucka y col., 2012). La tasa de toxicidad de AT es alta y se ha observado que causa la producción de tumores mamarios en mamíferos. La AT actúa sobre el hipotálamo afectando las señales que inducen la liberación pulsátil de GnRH e inhibiendo la secreción pituitaria de la hormona luteinizante, lo que induce al envejecimiento prematuro del aparato reproductor en ratas hembras (Cooper y col., 2000). Se ha confirmado que bajas concentraciones de AT producen alteraciones en el desarrollo sexual de larvas de anfibios, induciendo hermafroditismo y masculinización de la laringe; también se ha observado que en machos adultos produce desmasculinización y feminización completa (Hayes y col., 2010).

Se ha demostrado que la exposición a dosis crónicas de AT causa alteraciones en las neuronas catecolaminérgicas hipotalámicas, las cuales juegan un papel importante en la mediación de una amplia gama de funciones críticas en el comportamiento. Específicamente afecta de forma negativa el sistema dopamínérigo, que son los sitios de conciliación del movimiento, las funciones cognitivas y ejecutivas. Por lo tanto, la AT puede ser considerado un factor de riesgo ambiental que contribuye a la manifestación de enfermedades del sistema dopamínérigo (Rodríguez y col., 2005).

Adicionalmente, se ha demostrado que la AT también provoca alteraciones cardíacas, hepáticas y renales; estudios en animales de laboratorio indicaron un incremento en el desarrollo de leucemias y linfomas, y en humanos, se les asocia con la incidencia de linfomas no-Hodgkin (OLCA, 2004).

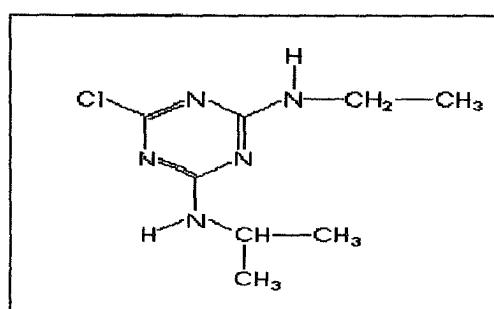


Figura 5. Estructura química de atrazina.

I.1.5. Neurotransmisores Aminoacídicos

La mayor parte de la comunicación entre neuronas del SNC del mamífero se realiza por aminoácidos que actúan como neurotransmisores. Han sido reconocidos como neurotransmisores aminoacídicos: ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina (Gly), taurina (Tau), glutamato (Glu) y aspartato (Asp). Los tres primeros tienen efectos predominantemente inhibitorios, mientras que los dos últimos son normalmente excitatorios. Los más abundantes y fisiológicamente más importantes son el Glu y el GABA. El Glu media la mayoría de la transmisión sináptica excitatoria, contribuyendo además a cambios duraderos en la eficacia sináptica (Cooper, 2000).

I.1.5.1. Neurotransmisores Excitatorios

I.1.5.1.1. Glutamato

El Glu es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC. Puede ser sintetizado por dos vías distintas: a partir de la glutamina a través de la acción de la enzima glutaminasa (mecanismo predominante en las neuronas) o bien mediante la reacción de la transaminación del α -cetoglutarato (mecanismo habitual en las células gliales), que es un intermedio del Ciclo de Krebs. Este neurotransmisor, una vez liberado por las vesículas presinápticas de las neuronas glutamatérgicas, actúa sobre los receptores de Glu postsinápticos dando lugar a una respuesta fisiológica. Además, puede activar los receptores de Glu presentes en la membrana presináptica y regular de esa manera su propia exocitosis, en un mecanismo de retroalimentación positiva o negativa en función del tipo de receptor de Glu que se active; la concentración extracelular del Glu está regulada por los transportadores de Glu.

El Glu juega un papel vital durante el desarrollo del SNC, donde participa en procesos fisiológicos como aprendizaje, memoria y desarrollo de plasticidad; está también implicado en patologías como la epilepsia, la hipoxia y las lesiones cerebrales isquémicas, así como en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, o la Corea de Huntington (Durand y col., 2008).

Las acciones fisiológicas del Glu están mediadas a través de la activación de dos clases de receptores específicos: ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos de Glu (iGlu) son canales iónicos activados por ligandos de 4 dominios transmembrana con un extremo N-terminal extracelular que alberga el sitio de unión al ligando y otro C-terminal intracelular con diferentes sitios de fosforilación que regulan su actividad y la interacción con proteínas en la membrana. Cuando el Glu se une a su receptor produce cambios conformacionales en el receptor

dando lugar a la apertura del canal permitiendo el flujo de iones calcio (Ca^{+2}) y sodio (Na^{+}) hacia el interior de la célula, y los iones de potasio (K^{+}) hacia el espacio extracelular, produciendo una despolarización de la membrana neuronal. Los receptores iGlu están implicados en la neurotransmisión rápida en el SNC y se clasifican en tres tipos en función del agonista que los activa: NMDA (ácido N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y kainato.

Los receptores metabotrópicos de Glu (mGlu) no forman canales iónicos sino que están acoplados a proteínas G, responsables de la activación en cascada de segundos mensajeros que regulan la actividad de enzimas membranales y canales iónicos. Los receptores mGluRs se encuentran en neuronas glutamatérgicas y no glutamatérgicas. Estos receptores median la actividad sináptica excitatoria lenta pero prolongada en el SNC y tienen un papel modulador (Durand y col., 2008).

La concentración del Glu en el espacio extracelular no debe alterar la homeostasis del sistema glutamatérgico, que incluye su metabolismo, mecanismo de liberación, abundancia de sus receptores y transportadores, y que debe estar altamente regulada. Cuando se altera la homeostasis glutamatérgica, se produce una liberación excesiva de Glu provocando una sobreactivación de sus receptores, en particular del tipo NMDA, causando excitotoxicidad por Glu, que ha sido implicada en enfermedades cerebrales graves, como la epilepsia, o a la muerte neuronal por sobre-excitación en situaciones de hipoxia, tanto en procesos agudos como isquemia o traumatismos como en procesos crónicos típicos de enfermedades neurodegenerativas, como las enfermedades de Parkinson, de Huntington o de Alzheimer.

I.1.5.1.2. Aspartato

El Asp es otro neurotransmisor excitatorio en el SNC, al igual que el Glu, activa a las neuronas postsinápticas liberándose por exocitosis calcio-dependiente. Se ha encontrado un incremento de Asp en el líquido cerebroespinal en varias enfermedades neurológicas como Parkinson, meningitis tuberculosa, enfermedad cerebrovascular (Bradford y Nadler, 2004). Se libera en el cerebro durante la inhibición metabólica y puede activar los receptores NMDA (Marcaggi y col., 2005), liberándose fuera de las zonas activas presinápticas y por lo tanto puede servir como agonista predominante para los receptores NMDA extrasináptico (Bradford y Nadler, 2004).

I.1.5.2. Neurotransmisores Inhibitorios

I.1.5.2.1. GABA

El GABA es el aminoácido inhibitorio presente en mayor cantidad en el SNC. También se conocen otros aminoácidos inhibitorios como Gly y Tau. Ellos actúan sobre receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Todos abren canales de Cl^- en membranas postsinápticas e inducen la hiperpolarización con la consecutiva disminución en la capacidad de descarga de la neurona postsináptica (Cortes-Romero y col., 2011). Como reflejo de su amplio y crítico papel en la inhibición, el GABA se distribuye por todo el SNC, sin embargo, se concentra en el estriado, el hipotálamo, la médula espinal y el lóbulo temporal (Represa y Ben, 2005).

El GABA se sintetiza a partir del ácido glutámico con ayuda de la enzima carboxilasa glutámica (GAD) y puede ser liberado junto con la Gly o ATP; actúa como neurotransmisor inhibitorio cuando activa los receptores de Gly pero no los de NMDA, y excitatorio, cuando atenúa la respuesta fisiológica de GABA (Albrecht y col., 2010). Además, durante el desarrollo, el Glu es liberado junto con GABA y Gly, lo que parece contribuir al refinamiento de las sinapsis inhibitorias (Represa y Ben, 2005). Hasta el momento se han identificado dos tipos de receptores de GABA: ionotrópico, el receptor GABA_A abren los canales de cloro, que permiten que los iones de cloro cargados negativamente (Cl^-) penetren en la célula. El flujo de estos iones cargados negativamente en las neuronas reduce (hace más negativo) su potencial de reposo, que suele ser -70 mV. La reducción del potencial de reposo inducida por el GABA hiperpolariza la membrana plasmática y produce la consecuente inhibición de la neurotransmisión. En cuanto a los receptores GABA_B , ellos pertenecen a la misma superfamilia de los receptores metabotrópicos de Glu acoplados a proteínas G; la estimulación de los receptores GABA_B inhiben la formación de AMPc y contribuyen así al efecto inhibitorio del GABA (Mohler y col., 2001).

La deficiencia de GABA se caracteriza por una falta de inhibición, lo que genera una actividad excesiva. Por ejemplo, la enfermedad de Huntington, que produce la corea, reduce las concentraciones del GABA en los ganglios basales y en el líquido cefalorraquídeo (LCR). La falta de inhibición resultante en los ganglios basales origina presumiblemente un exceso de movimientos involuntarios, sobre todo la corea; en el hipotálamo produce deficiencias del sistema neuroendocrino (Maffucci y Gore, 2009).

I.1.5.2.2. Glicina

Es el aminoácido más pequeño; se obtiene a partir de la serina y desempeña numerosas funciones metabólicas importantes especialmente en el SNC de los mamíferos. Representa, junto con el GABA, uno de los dos neurotransmisores inhibidores del SNC, pero utilizando diferentes receptores. La Gly es especialmente abundante en zonas caudales del SNC, como el tallo cerebral, la zona pontinocerebelosa y la médula espinal. En el tallo cerebral y la médula espinal, las interneuronas glicinérgicas controlan la generación de ritmos motores, la coordinación de respuestas reflejas espinales y el procesamiento de señales sensoriales y nociceptivas. Las interneuronas espinales glicinérgicas del tipo Ia median circuitos reflejos de inhibición recíproca, permitiendo de esta forma la relajación de músculos antagonistas y la contracción coordinada de músculos agonistas, mientras que las interneuronas de Renshaw regulan la excitabilidad de motoneuronas mediante la producción de señales inhibidoras recurrentes a través de un sistema de retroalimentación negativa (Legendre, 2001). Por otra parte, la Gly es un importante neurotransmisor implicado en el procesamiento de la información auditiva y visual (Wenthold y Hunter, 1990). Un segundo papel de la Gly en el SNC, adicional al de neurotransmisor inhibidor, es el de neuromodulador en vías glutamatérgicas excitadoras que utilizan el receptor NMDA de Glu, del que la Gly es un activador necesario tanto para la unión del Glu como para el reciclado del receptor en la membrana plasmática (Betz y Laube, 2006).

En una neurona glicinérgica inhibidora, la despolarización producida por la llegada de un potencial de acción al terminal provoca la liberación de la Gly contenida en vesículas sinápticas mediante exocitosis dependiente de calcio (exocitosis regulada). Tras su liberación en el espacio sináptico, la Gly interacciona y activa receptores postsinápticos específicos (GlyRs) que pertenecen, al igual que los receptores de GABA_A, a la superfamilia de receptores pentaméricos. La activación de GlyRs determina la apertura de canales iónicos que provocan flujo de cloruro al citoplasma de la neurona postsináptica. La hiperpolarización resultante estabiliza el potencial de membrana alrededor del valor de reposo, alejándolo de activación y, por lo tanto, inhibe a la neurona postsináptica. La acción neurotransmisora de la Gly finaliza cuando su concentración en la sinapsis disminuye y se recuperan los niveles anteriores a la estimulación. Los transportadores específicos de Gly (GLYT), localizados en la membrana plasmática de las neuronas o de las células gliales adyacentes, llevan a cabo esta fase final de la neurotransmisión al transportar Gly activamente hacia el interior celular. El ciclo iniciado por la despolarización neuronal se

completa con el relleno de las vesículas sinápticas con la GABA presente en el citoplasma del terminal nervioso, función que lleva a cabo el transportador vesicular, VIAAT/VGAT. La Gly y el GABA comparten el mismo transportador vesicular, lo que permite que algunos terminales inhibidores (mixtos) almacenen conjuntamente ambos neurotransmisores en las mismas vesículas desde donde serán liberados simultáneamente (Gasnier, 2004).

I.1.5.2.3. Taurina

La Tau es un aminoácido neutro en cuya composición hace parte el azufre. Este aminoácido, a diferencia de los otros aminoácidos, no se incorpora a las proteínas. Es un neurotransmisor inhibitorio, que está presente en altas concentraciones en la medula espinal; ha sido considerado como un neuromodulador inhibitorio y además, un estabilizador de membranas excitables, como un osmorregulador, desempeñando una función importante durante el desarrollo del cerebro (Hagar, 2004; Kumari y Prentice, 2013). La localización de la taurina en terminales axónicos, identificados morfológicamente como inhibidores a nivel del asta dorsal de la medula espinal, aportó evidencias morfológicas a la hipótesis de que la Tau juega un papel inhibitorio y tiene un efecto antinociceptivo selectivo sobre la nocicepción inducida químicamente. Por otra parte, su localización en astrocitos y células endoteliales en las astas dorsal y ventral de la médula espinal indica su participación en la osmorregulación (Miranda-Contreras y col., 2002). Sus funciones patológicas muestran que los cambios de los niveles de taurina en fluidos y tejidos fisiológicos también tienen una estrecha relación con muchas enfermedades tales como: la enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, hipercolesterolemia, la epilepsia y otros trastornos convulsivos (Ripps y Shen, 2012). La Tau se encuentra en altas concentraciones al nacer disminuyendo rápidamente con la edad. Pacientes con bajas concentraciones de Tau pueden sufrir de inmunodeficiencia, cardiomiopatía, degeneración retinal y retraso en el crecimiento, especialmente en caso de deficiencia en el desarrollo (Boelens y col., 2003). Altas concentraciones de Tau como neurotransmisor induce despolarización de la membrana con dependencia parcial del calcio (Hagar, 2004).

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. Objetivos Generales

El objetivo principal de este trabajo es determinar si la exposición subcrónica a AT y MZ causa alteraciones neuroquímicas, morfológicas y del comportamiento en ratones machos durante el periodo postnatal tardío hasta adulto joven.

I.2.2. Objetivos Específicos

1. Determinar los niveles de neurotransmisores aminoacídicos: Asp, Glu, Gly, GABA y Tau, mediante el análisis con HPLC, en la región hipotalámica de ratones machos después de recibir 20 dosis de AT y MZ durante el periodo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55, con la finalidad de detectar alteraciones en el desarrollo de la neurotransmisión sináptica aminoacidérgica.

2. Determinar los efectos de la exposición a AT y MZ al desarrollo físico de los animales de experimentación, mediante la medición del p.c durante la aplicación del tratamiento, tres veces a la semana, entre los P11 y P55.

3. Evaluar la actividad locomotora de los animales control y experimentales durante el periodo de exposición a los plaguicidas.

4. Determinar los cambios morfológicos en las células hipotalámicas expuestas a las diferentes dosis de AT y MZ, mediante microscopía de luz de alta resolución y microscopía electrónica de transmisión.

CAPÍTULO II

www.bdigital.ula.ve

II. MATERIALES Y REACTIVOS

II.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y los solventes de grado HPLC. Los estándares de plaguicidas fueron obtenidos de la casa comercial AccuStandard: Atrazina (99%), Mancozeb (99%). Los solventes para HPLC: metanol, acetonitrilo y acetona fueron suministrados por J.T. Baker. El tartrato de sodio y potasio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$), fosfato de sodio monobásico monohidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 99%), el fosfato de sodio bibásico dodecahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 99%), el tetraborato disódico ($Na_2B_4O_7$, 98%), el carbonato de sodio (Na_2CO_3 , 99,5%) y el cloruro de sodio ($NaCl$, 99,5%) y el ácido perclórico ($H_2Cl_2O_7$, 70%) fueron suministrados por MERCK. El cloruro de manganeso ($MnCl_2$, 99%), cloruro de dansilo ($DnsCl$, 99,5%), el dodecil sulfato de sodio (SDS; $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$, 98,5%) y el Reactivo de Folin (Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent, 2,0 Normal) fueron suministrados por SIGMA; el hidróxido de sodio ($NaOH$, 99%) fue suministrado por Riedel-de Haen; el sulfato cúprico ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 99,5%) fue suministrado por AnalaR.

II.2. Instrumental Utilizado

Para la realización de este trabajo se utilizó el siguiente instrumental:

- Sistema Milli-Q Biocel, Millipore, que permite obtener agua de $18.2\text{ M}\Omega\text{cm}$ de resistividad.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), marca Agilent, serie 1200, que consta de:
 - Desgasificador, G1322A
 - Sistema de bombas binarias, G1312A
 - Inyector manual Rheodyne 7725, lazo de muestra de $100\text{ }\mu\text{l}$, G1328B
 - Compartimiento de columna termostático, G1316A
 - Detector de arreglo de diodo, G1315B
 - Columna analítica de fase reversa (BIO Sil ODS-5S; $250 \times 4,0\text{ mm}$; $5\mu\text{m}$; WATERS)
 - Software ChemStation para HPLC, 2D de 32 bit para la adquisición, control y evaluación de la data del cromatógrafo líquido.
- Espectrofotómetro UV-visible, UV mini 1240, marca Shimadzu

- Centrifuga Eppendorf, marca Sanyo.
- Balanza COBOS de precisión, C300.
- Balanza analítica Sartorius 2434.
- pH metro, PHM 84 Research pH meter, marca Radiometer Copenhagen.
- Homogeneizador ultrasónico YSTROM Systems.

III.3. Animales de Experimentación

Se utilizaron ratones machos NMRI de 8 días de edad, provenientes del Bioterio Central de la Universidad de los Andes, que fueron ambientados en el bioterio de nuestro laboratorio conjuntamente con sus progenitoras durante dos días antes de comenzar los experimentos. Los animales estaban mantenidos en condiciones de temperatura controlada ($24\pm1^{\circ}\text{C}$), con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad y suministro de comida y agua ad libitum. Este protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética del Bioterio de la Universidad de Los Andes, Mérida, bajo el número 018/11 el 07 de Junio del 2011.

III.4. Administración de Plaguicidas

En la figura 6 se muestra el diseño experimental y el plan de trabajo para la presente investigación. La parte experimental constó de dos etapas, que están diferenciadas por la dosis de plaguicidas administrada a los animales en estudio, manteniéndose el resto de los parámetros iguales (edad, vía de administración de la dosis, intervalo de inyección).

Etapa A. Para este estudio se emplearon 40 ratones machos, los cuales fueron colocados aleatoriamente en dos grupos de experimentales ($n=15$ por grupo) y un grupo control ($n=10$). Los diferentes grupos fueron identificados como: control (C), atrazina (AT), mancozeb (MZ), a los cuales se les administró por vía peritoneal los siguientes tratamientos: grupo C: solución salina (NaCl al 0,9%), grupo AT: 10 mg AT/kg p.c., grupo MZ: 30 mg MZ/kg p.c. Se inició el suministro de los plaguicidas a los 11 días de edad, a dosis interdiarias (los días lunes, miércoles y viernes), llegando a un total de 20 inyecciones a los 55 días de edad.

Las dosis fueron escogidas de acuerdo a ensayos realizados en nuestro laboratorio, que coincidieron además con dosis empleadas por otros grupos (Rodríguez y col., 2005; Miranda-Contreras y col., 2005; Bardullas y col., 2011). Para tal fin se utilizaron soluciones madre de 2mg AT/ml, 5mg MZ/ml, preparadas en solución salina al 0,9%. El volumen de inyección se

ajustó en cada caso según el peso del animal para suministrar la dosis deseada y la inyección se hizo intraperitonealmente con una aguja de 26G.

Etapa B. En la segunda etapa, se emplearon 40 ratones machos los cuales fueron colocados aleatoriamente en dos grupos de experimentales ($n=15$ por grupo) y un grupo control ($n=10$). Los diferentes grupos fueron identificados como: control (C), atrazina (AT), mancozeb (MZ), a los cuales se les administró por vía peritoneal el triplicado de la dosis de los plaguicidas que fueron suministradas en la primera etapa: 30 mg AT/kg p.c., 90 mg MZ/kg p.c., las dosis de plaguicidas fueron suministradas entre los 11 y 56 días de edad, los días lunes, miércoles y viernes hasta llegar a un total de 20 inyecciones. Se utilizaron soluciones madres de 10 mg AT/ml y 15 mg MZ/ml, preparadas en solución salina, 0,9%, ajustando el volumen de inyección en cada caso según el peso del animal para suministrar la dosis deseada.

II.5. P.c como Parámetro del Desarrollo Físico

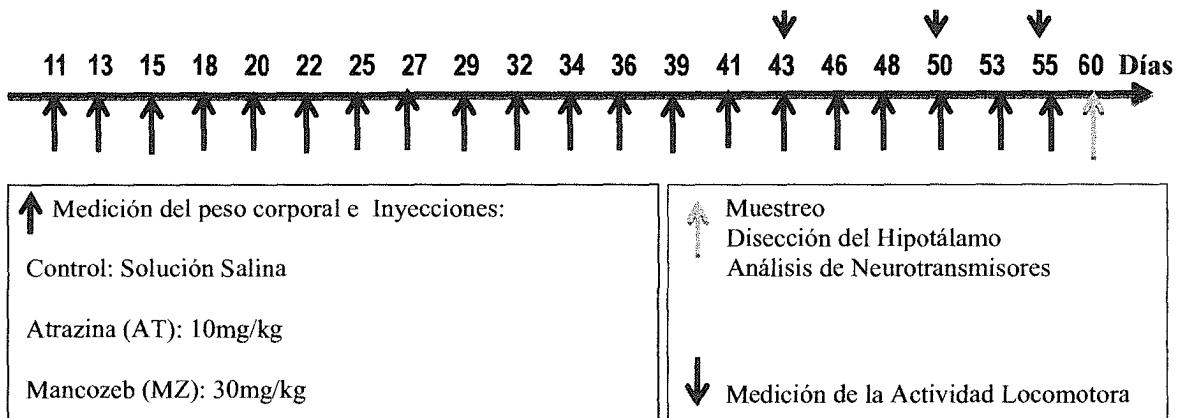
Se realizó la medición del p.c de los animales control y los expuestos a los agroquímicos a partir de los 11 días de edad hasta la etapa de adulto joven, a los 55 días de edad, con la finalidad de hacer un análisis comparativo entre el grupo control y los grupos expuestos a los plaguicidas de la primera y segunda etapa experimental. La evaluación de este parámetro nos puede dar indicios sobre el efecto de la intoxicación en el desarrollo físico de los animales en estudio

II.6. Evaluación de Actividad Locomotora

La exposición crónica durante el desarrollo a las sustancias tóxicas, como son los plaguicidas AT y MZ, así como a altos niveles de MN, puede tener efectos sobre el desarrollo físico del animal, por lo cual se evaluó durante las últimas tres semanas de exposición la actividad locomotora, tanto horizontal como vertical. Para tal fin empleamos la metodología utilizada por Thiruchelvam y col. (2000), la cual describiremos brevemente. Para esta prueba se utilizó una caja de madera abierta de $40 \times 40 \times 35 \text{ cm}^3$, con sensores infrarrojos de movimientos colocados a intervalos de 10 cm. Cada animal fue colocado en el centro de la caja y se medía la distancia recorrida y actividad vertical durante 10 min, con contadores digitales y reloj de conteo regresivo. Luego de la observación de cada animal, la superficie de la caja era limpiada con agua y alcohol.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Etapa A



Etapa B

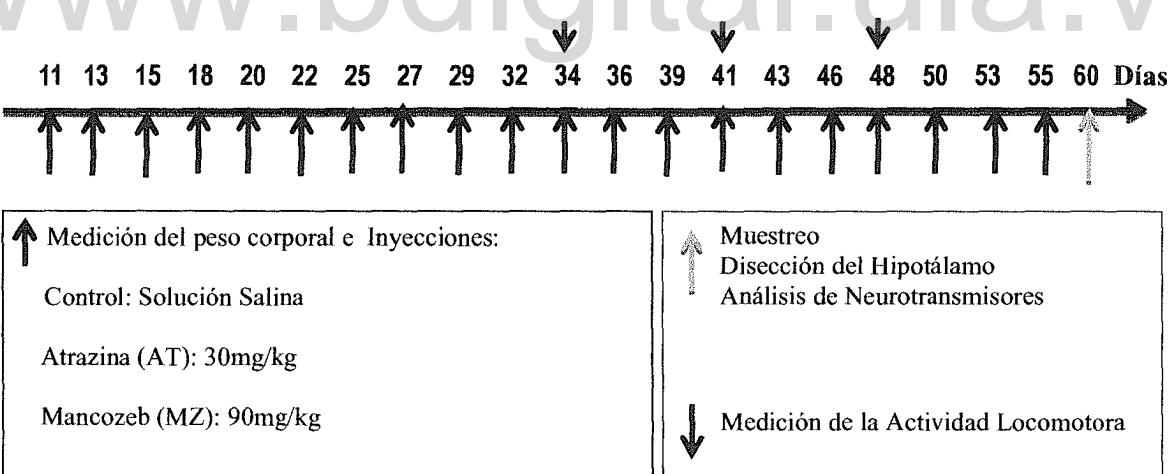


Figura 6. Diseño experimental y plan de trabajo para la exposición subcrónica de ratones machos a los plaguicidas AT y MZ, durante el período postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55.

II.7. Análisis de Neurotransmisores mediante HPLC-DAD

Para el análisis de neurotransmisores aminoácídicos, se tomaron los grupos de ratones control y bajo tratamiento (AT, MZ) en etapa de adulto joven, a los 60 días de edad. El sacrificio se realizó mediante la dislocación cervical, rápidamente se extrajo el encéfalo, el cual se colocó en buffer fosfato 0,1 M, pH 7,2, a 4°C, y se diseccionó el hipotálamo. Las muestras fueron colocadas en tubos Ependorf y guardadas a -70°C hasta el día del análisis. Se utilizaron 9 animales por grupo y uno para microscopía electrónica.

El análisis de los neurotransmisores aminoacídicos Asp, Glu, Gly, Tau y GABA se realizó mediante HPLC-DAD, después de derivatización con cloruro de dansilo (DnsCl), según el procedimiento de Oray y col. (1983). A continuación se describirá brevemente el procedimiento: las muestras fueron homogeneizadas en 200μl de ácido perclórico 0,05N y luego se tomaron alícuotas de 10μl para la determinación de proteínas totales. Los homogeneizados fueron centrifugados a 4°C durante 15 min en una centrifuga Ependorf a 10.000 g, del sobrenadante se tomó una alícuota de 50 μl, a la cual se le añadieron 250 μl de Borato de Sodio, 50 mM, pH 9,5, y 80 μl de DnsCl, 2,5 mg/ml en acetonitrilo, luego se calentó en un baño de María a 60°C, durante 15 min. Posteriormente se enfrió en hielo y se agregaron 20 μl de NaOH, 0,4 N. El producto de la derivatización fue filtrado en una membrana Millipore de 0,45 μm. Del filtrado se tomó una alícuota de 25 μl que fue inyectada en el HPLC.

La columna analítica utilizada fue una columna de fase reversa BIO Sil ODS-5S (250 x 4,0 mm; tamaño de la partícula, 5 μm) mantenida a 33°C. Para la separación cromatográfica se utilizó un gradiente con dos fases móviles: solvente A: acetonitrilo al 5% en tampón fosfato, 30 mM, pH 6,5; y solvente B: acetonitrilo al 60% en tampón fosfato, 30 mM, pH 6,5. Los aminoácidos dansilados fueron eluidos a un flujo de 1 ml/min y detectados por su absorbancia a 215 nm. Los niveles de neurotransmisores aminoacídicos fueron calculados por el método del estándar externo, utilizando estándares de 40 μl/ml de Asp, 40 μl/ml de Glu, 15 μl/ml de Gly, 30 μl/ml de Tau y 10 μl/ml de GABA, y los valores expresados en μmol/100 mg de proteínas.

Las determinaciones de proteínas fueron realizadas utilizando el método de Lowry modificado (Stoscheck, 1990), el cual consiste en preparar una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino como estándar. La alícuota de muestra de 10 μl se diluye hasta un volumen de 200 μl con agua Milli-Q. Tanto al estándar como a la muestra se le añaden 400 μl de

Reactivos de Lowry (3 partes de Reactivo de Cobre, 1 parte de Lauril Sulfato de Sodio (SDS) al 1% y 1 parte de NaOH, 1N), se agita y se deja reposar durante 15 min, luego se añaden 400 µl de Reactivo de Folin & Ciocalteu's Phenol, 0,2 N, y se deja reposar durante media hora. Las lecturas de absorbancia se hicieron a 750 nm.

II.8. Análisis Morfológico con Microscopia de Luz de Alta Resolución y Microscopía Electrónica de Transmisión

Las muestras de tejido hipotalámico fueron fijadas en una mezcla de glutaraldehido al 3% y formaldehido al 3%, preparada en tampón cacodilato 0,1 M, pH 6,3. Transcurridas las 24 horas de fijación, las muestras se lavaron 3 veces, por 5 min cada vez, con tampón cacodilato 0,1 M, pH 6,3 y se post-fijaron durante 12 a 14 horas en una solución de tetraóxido de osmio al 1% preparado en el mismo tampón. Luego, cumplido el tiempo de la post-fijación, se repitió el proceso de lavado mencionado anteriormente.

Las muestras fueron deshidratadas de acuerdo al siguiente esquema:

Alcohol etílico al 30%	10 min
Alcohol etílico al 50%	10min
Alcohol etílico al 80%	20min
Alcohol etílico al 100%	20min
Alcohol etílico al 100%	20min
Alcohol etílico 100% + oxido de propileno 100% (1:1)	10min
Oxido de propileno	20min

Luego se procedió a la infiltración del material con la resina epoxídica:

Óxido de propileno + Epon (4:1)	30 min
Óxido de propileno + Epon (3:2)	30 min
Óxido de propileno + Epon (2:3)	60 min
Óxido de propileno + Epon (1:4)	60 min
Epon puro	12 a 18 hrs

Finalmente, el material se incluyó en Epon puro y se colocó en la estufa por 48 hrs, a 60°C, para que polimerizara la resina.

Para observar los resultados obtenidos se hicieron cortes de 1 a 2 micras de espesor utilizando un micrótomo Porter-Blum MT2-B. Los cortes fueron fijados a una lámina portaobjeto, mediante calor a baja temperatura obtenido por medio de una plancha de calentamiento; posteriormente, fueron coloreados con p-difeniletendiamina al 1% diluido en solución acuosa, procediendo a realizar el montaje de los cortes con bálsamo de Canadá en una porta objetos. Los cortes coloreados fueron observados con microscopía de luz de alta resolución (Polyvar), donde se escogió el material con mejores características fenotípicas para su ulterior observación al microscopio electrónico.

Secciones finas de 90 nm de espesor fueron teñidas con citrato de plomo y acetato de uranilo para el análisis ultraestructural con el microscopio electrónico de transmisión (Hitachi 7000).

II.9. Análisis Estadístico

La actividad locomotora y los niveles de neurotransmisores fueron expresados como promedio \pm Desviación Estándar (DE). Para determinar las diferencias estadísticas se aplicó la prueba de ANOVA de una vía, utilizando el Software GraphPad InStat tm, versión 2.04a.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

III. RESULTADOS

III.1. Peso Corporal

Los resultados de las mediciones del peso corporal de los ratones expuestos a 10 mg AT/kg p.c. y 30 mg MZ/kg p.c., durante el período postnatal tardío hasta la edad de adulto joven, entre P11 y P55, no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo control (Tabla 1 y Figuras 7A y 8A). En los animales experimentales, no se observaron señales evidentes de toxicidad y no hubo mortalidad durante todo el período de exposición a los plaguicidas. Sin embargo, al aumentar tres veces la dosis de cada uno de los plaguicidas, 30 mg AT/kg p.c. y 90 mg MZ/kg p.c., respectivamente, se registraron reducciones significativas en el peso corporal de los ratones expuestos (Figuras 7B – 8B) en comparación a los animales control.

A partir de una dosis acumulada de 0,53 mg de AT (Anexo 2), el peso corporal del ratón expuesto comenzó a disminuir significativamente relativo al control ($6,16 \pm 0,6$ vs $7,71 \pm 0,8$ g, respectivamente, $p < 0,0001$, Figura. 7B). A una dosis acumulada de 2,45 mg de AT a los 29 días de edad, el peso corporal disminuyó en un 27,9% en comparación con el ratón control ($p < 0,005$). Luego de 13 veces de exposición con 30 mg AT/kg p.c., la dosis acumulada fue 4,78 mg de AT y el peso corporal se redujo por un 27,7% relativo al control ($19,92 \pm 2,6$ vs $27,54 \pm 2,8$ g, respectivamente, $p < 0,0001$). A la edad de adulto joven, a los 55 días, hubo una acumulación de 10 mg de AT y una reducción del peso corporal por un 23,7% con respecto al animal control ($23,94 \pm 2,1$ vs $31,37 \pm 3,5$ g, respectivamente, $p < 0,0001$).

En relación al MZ, durante las primeras dos semanas de exposición a 90 mg MZ/kg p.c., los ratones experimentales y controles fueron comparables en promedios de peso corporal (Figura 8B). Sin embargo, durante las tres semanas siguientes de exposición, los ratones mostraron una disminución significativa en su peso corporal en comparación a los animales control, con una reducción de 22% a una dosis acumulada (Anexo 2) de 7,35 mg de MZ ($17,10 \pm 1,6$ vs $21,95 \pm 2,0$ g, respectivamente, $p = 0,02$), y una rebaja de 19%, al acumularse 28 mg de MZ a los 53 días de edad ($25,52 \pm 1,4$ vs $31,47 \pm 3,6$ g, respectivamente, $p < 0,005$).

Tabla 1. Variación del p.c (g) de los ratones del grupo control y de los expuestos a Atrazina y Mancozeb, entre P11 y P55. Experimento A: 10 mg AT/kg y 30 mg MZ/kg p.c.; Experimento B: 30 mg AT/kg y 90 mg MZ/kg p.c..

Edad	ETAPA A			ETAPA B		
	Control 0,9% NaCl	Atrazina 10 mg/kg p.c.	Mancozeb 30 mg/kg p.c.	Control 0,9% NaCl	Atrazina 30 mg/kg p.c.	Mancozeb 90 mg/kg p.c.
11	8,2 ± 0,4	7,8 ± 1,0	5,6 ± 0,6	6,5 ± 0,5	5,5 ± 0,7	6,6 ± 0,5
13	6,8 ± 0,4	7,8 ± 0,8	7,0 ± 0,4	6,6 ± 0,5	5,9 ± 0,6	6,9 ± 0,8
15	7,3 ± 0,4	8,4 ± 0,8	7,4 ± 0,5	7,7 ± 0,8	6,1 ± 0,6	6,4 ± 0,7
18	8,5 ± 0,4	9,1 ± 1,1	8,3 ± 0,7	8,8 ± 1,3	6,8 ± 0,7	7,8 ± 1,2
20	9,7 ± 0,6	10,1 ± 1,7	9,2 ± 1,7	10,9 ± 1,6	7,5 ± 0,9	10,0 ± 1,5
22	11,7 ± 0,6	11,4 ± 1,8	10,9 ± 0,3	12,3 ± 2,5	9,0 ± 1,4	11,8 ± 1,6
25	15,6 ± 0,7	14,5 ± 1,9	14,9 ± 0,8	15,2 ± 2,2	11,2 ± 1,9	16,1 ± 2,0
27	18,7 ± 0,9	18,0 ± 2,2	12,7 ± 1,9	19,0 ± 2,5	13,4 ± 2,3	18,6 ± 1,6
29	17,7 ± 1,2	19,8 ± 1,7	18,3 ± 2,5	21,9 ± 2,0	15,8 ± 2,2	17,1 ± 1,6
32	24,6 ± 1,3	23,7 ± 1,3	22,5 ± 2,3	24,8 ± 1,5	17,0 ± 2,8	19,7 ± 1,4
34	26,1 ± 1,5	26,3 ± 0,9	23,6 ± 0,9	25,0 ± 2,1	19,5 ± 3,0	22,5 ± 1,3
36	27,3 ± 1,5	28,0 ± 0,9	25,3 ± 1,4	26,3 ± 2,8	21,0 ± 3,9	24,1 ± 1,5
39	28,8 ± 1,1	26,9 ± 1,2	26,9 ± 2,0	27,5 ± 2,8	19,9 ± 2,6	23,1 ± 1,3
41	29,3 ± 1,9	29,7 ± 0,9	28,6 ± 1,1	28,5 ± 3,6	23,4 ± 2,9	27,0 ± 1,9
43	28,9 ± 2,7	29,9 ± 1,1	28,0 ± 1,6	27,5 ± 2,8	24,3 ± 3,1	28,8 ± 2,0
46	30,8 ± 2,7	31,2 ± 1,1	28,9 ± 1,6	28,0 ± 3,5	25,1 ± 3,1	24,7 ± 2,2
48	31,1 ± 2,9	31,5 ± 1,2	29,9 ± 1,9	28,8 ± 4,3	25,4 ± 3,3	29,3 ± 1,8
50	29,0 ± 2,6	32,4 ± 1,4	31,4 ± 1,9	29,4 ± 3,7	25,9 ± 3,2	27,6 ± 1,7
53	32,2 ± 3,0	32,8 ± 1,9	32,1 ± 2,4	31,4 ± 3,6	27,2 ± 3,2	25,5 ± 1,4
55	32,6 ± 2,8	33,5 ± 1,5	32,1 ± 3,0	31,3 ± 3,5	23,9 ± 2,1	32,8 ± 2,1

Los valores (g) son expresados en promedios ± D.E

p.c.,

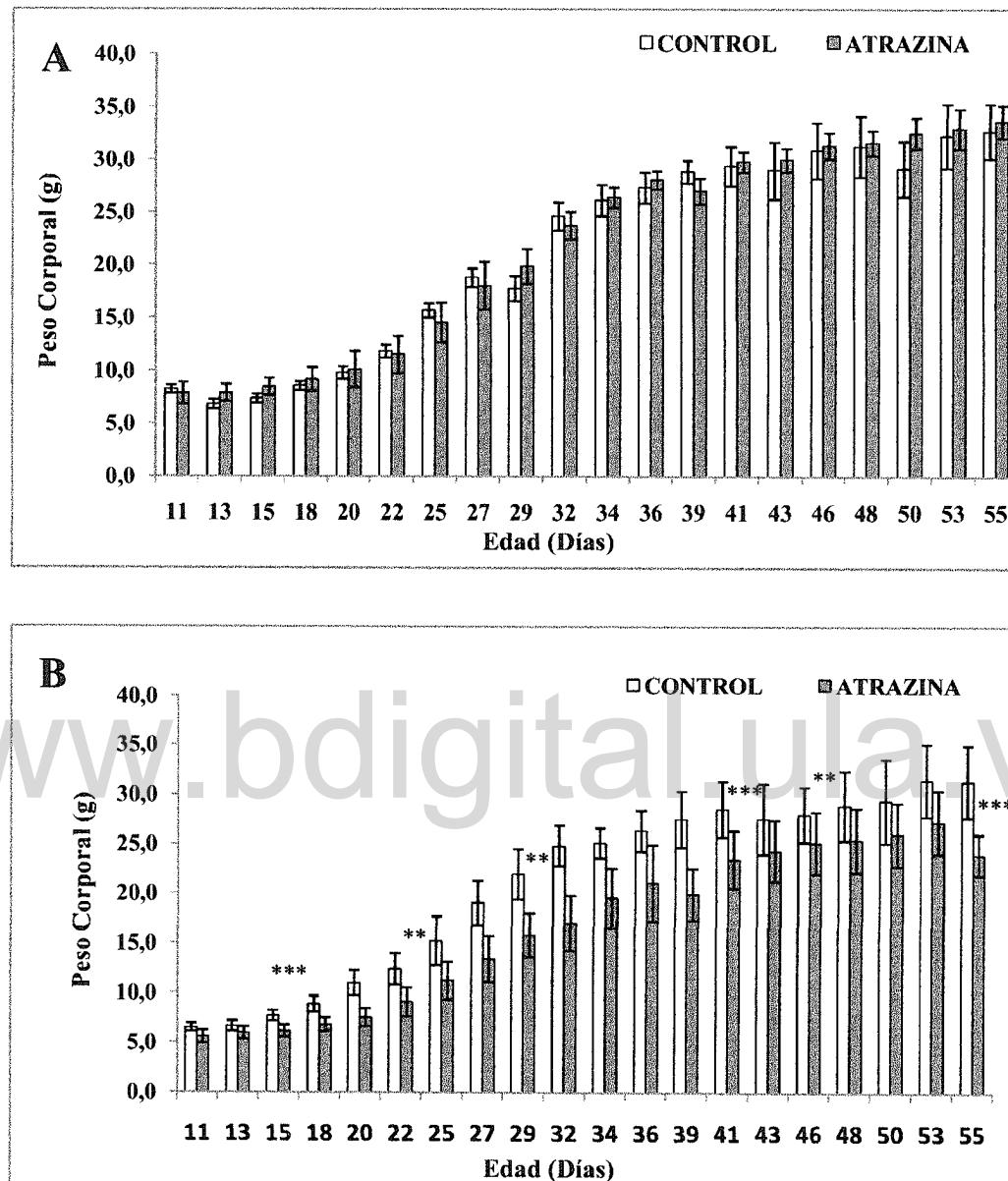


Figura 7. Variación del peso corporal de ratones machos expuestos veinte veces con una dosis subcrónica de Atrazina (AT): (A) 10mg AT/kg p. c.; (B) 30mg AT/kg peso corporal, durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55. Diferencias Estadísticas: *p=0,01; **p<0,005; ***p<0,0001.

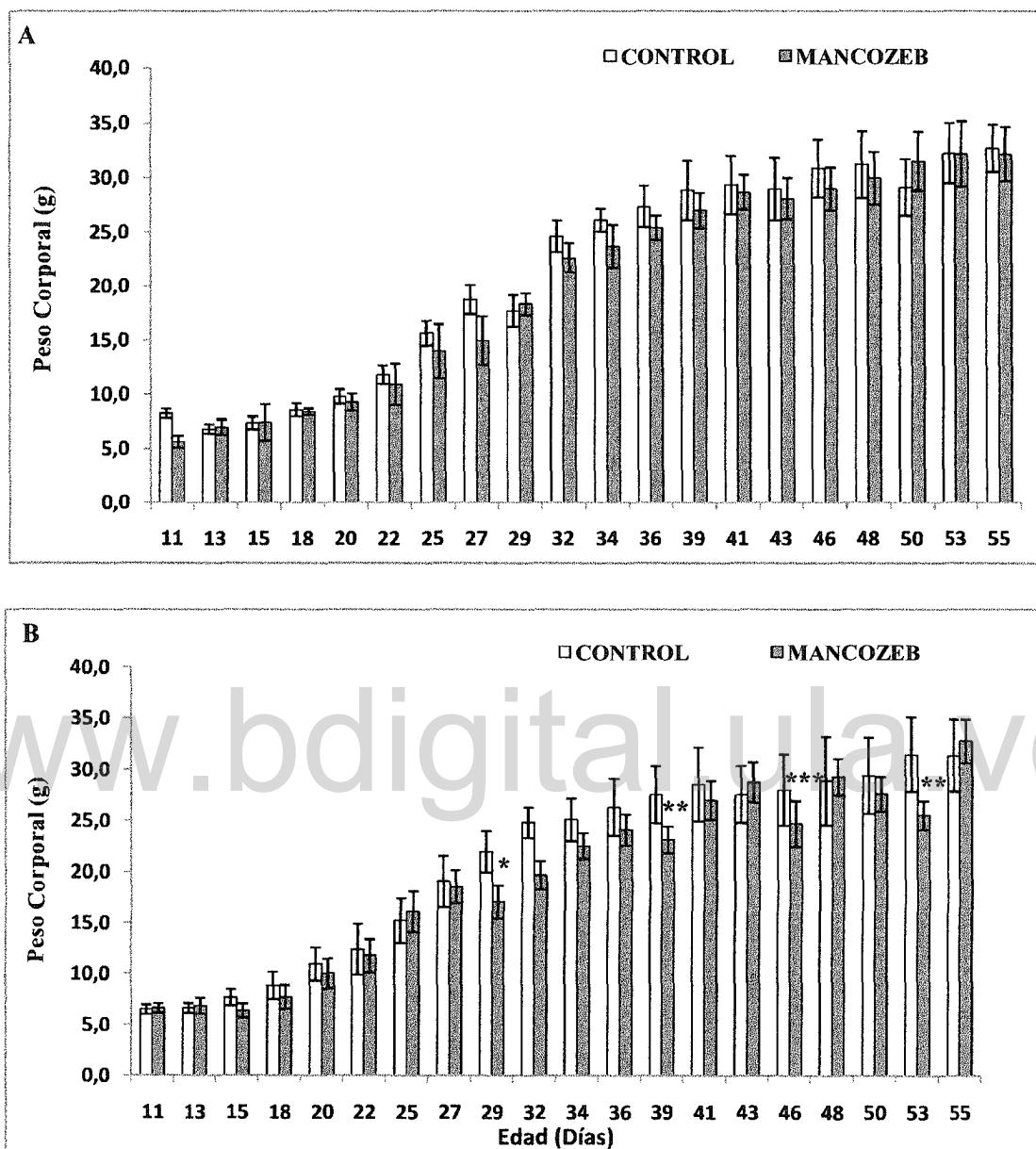


Figura 8. Variación del peso corporal de ratones machos bajo exposición subcrónica a Mancozeb (MZ) entre P11 y P55: (A) 30 mg MZ/kg p.c; (B) 90 mg MZ/kg p.c. Diferencias Estadísticas: * $p = 0,02$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$.

III.2. Actividad Locomotora

En las Tablas 2-3 y figuras 9-10 se muestran los efectos de la exposición subcrónica de ratones machos, durante el período postnatal tardío hasta adulto joven, a los plaguicidas AT y MZ, sobre la actividad locomotora y exploradora de los animales durante el desarrollo.

La actividad locomotora horizontal, expresada en distancia total recorrida (cm) durante 10 min, y vertical, expresada en número de veces que el animal se levanta durante 10 min, de los ratones expuestos a 10 mg AT/kg p.c., fueron comparables con las actividades de los animales control (Figura 9, A1 – A3; Figura 10, A1 - A3). Sin embargo, al aumentar tres veces la dosis de AT a 30 mg/kg p.c., se observó una disminución significativa de las actividades horizontales y verticales en comparación al grupo control, después de 11 y 14 exposiciones, correspondientes a una dosis acumulada de 3,55 – 5,48 mg AT (Anexo 1 y Figuras 9 - 10, B1 – B3). Al final de la exposición, llegando a la edad de adulto joven, se normalizó la actividad locomotora, tanto horizontal como vertical.

Con respecto al MZ, en la actividad locomotora horizontal, se observó una tendencia a hipoactividad de los ratones luego de 18 inyecciones con 30 mg MZ/kg p.c., equivalente a una dosis acumulada de 11,29 mg de MZ (Anexo 2), sin embargo, al final de las 20 inyecciones, la actividad locomotora fue comparable a los animales control (Tabla 2 y Figura 9-A3). En el caso de los ratones expuestos a una dosis alta 90 mg MZ/kg p.c., no fue observada una marcada diferencia en actividad locomotora horizontal con el grupo control (Tabla 2 y Figura 9). Por otra parte, la actividad locomotora vertical se redujo significativamente, tanto en los ratones expuestos a 30 mg MZ/kg, así como en los animales administrados con 90 mg MZ/kg p.c. en comparación al grupo control 82 ± 1 vs 65 ± 5 , $p < 0,0001$; 68 ± 7 vs 34 ± 6 , $p < 0,0001$, respectivamente (Tabla 3 y Figura 10).

Tabla 2. Actividad locomotora horizontal de ratones machos, expresada en distancia total recorrida (cm) durante un período de 10 min, luego de 15 (A1), 18 (A2) y 21 (A3) inyecciones con 10 mg AT/kg y 30mg MZ/kg p.c.; y después de 11 (B1), 14 (B2) y 17 (B3) inyecciones con 30mg AT/kg y 90mg MZ/kg p.c. durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55.

	Control	Atrazina	Mancozeb
A1	469 ± 4	465 ± 4	413 ± 4
A2	475 ± 4	365 ± 4	373 ± 5
A3	437 ± 8	434 ± 3	403 ± 6
B1	341 ± 6	303 ± 1	351 ± 4
B2	462 ± 8	365 ± 4	398 ± 3
B3	466 ± 9	372 ± 4	518 ± 3

Los valores, expresados en cm, representan promedios ± D.E. n=10.

Tabla 3. Actividad locomotora vertical, expresada en número de veces que el ratón se levanta durante un período de 10 min, luego de 15 (A1), 18 (A2) y 21 (A3) inyecciones con 10 mg AT/kg y 30mg MZ/kg p.c.; así como, luego de 11 (B1), 14 (B2) y 17 (B3) inyecciones con 30mg AT/kg y 90mg MZ/kg p.c. durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55.

Etapa Experimental	Control	Atrazina	Mancozeb
A1	81 ± 6	95 ± 6	69 ± 3
A2	89 ± 8	78 ± 8	53 ± 8
A3	82 ± 1	86 ± 1	65 ± 5
B1	49 ± 1	30 ± 1	44 ± 7
B2	73 ± 5	59 ± 3	57 ± 1
B3	68 ± 7	64 ± 2	34 ± 6

Los valores, expresados en número de veces, representan promedios ± D.E. n=10

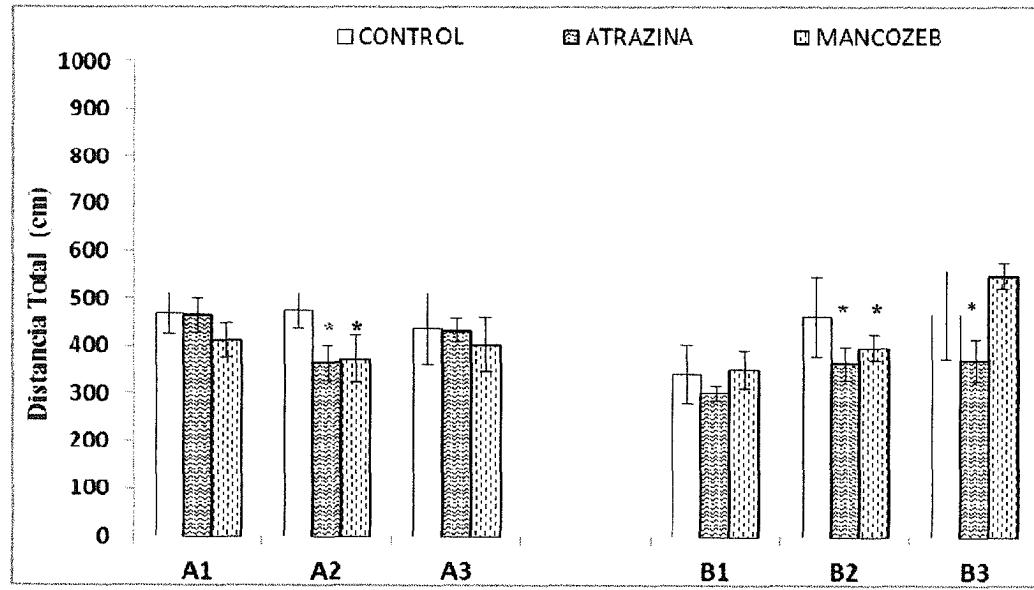


Figura 9. Actividad locomotora horizontal, expresada en distancia recorrida (cm) durante un período de 10 min, de ratones machos luego de 15 (A1), 18 (A2) y 20 (A3) inyecciones con 10 mg AT/kg y 30 mg MZ/kg p.c; así como con la dosis de 30 mg AT/kg y 90 mg MZ/kg p.c, después de 11 (B1), 14 (B2) y 17 (B3) inyecciones. Los valores representan promedios ± D.E. n= 10. Diferencias Estadísticas: * p < 0,005

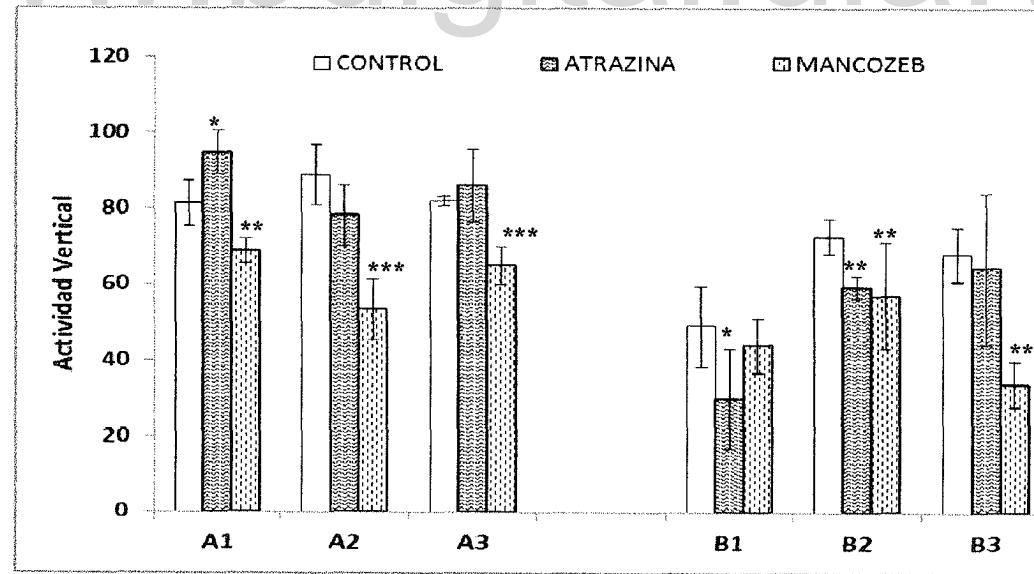


Figura 10. Actividad vertical, expresado en número de veces en que el ratón se levanta durante un período de 10 min, luego de 15 (A1), 18 (A2) y 20 (A3) inyecciones con 10 mg AT/kg y 30 mg MZ/kg p.c; así como con la dosis de 30 mg AT/kg y 90 mg MZ/kg p.c, después de 11 (B1), 14 (B2) y 17 (B3) inyecciones. Los valores representan promedios ± D.E. n= 10. Diferencias Estadísticas: *p < 0,05; **p < 0,005, ***p < 0,0001

III.3. Variación de los niveles de neurotransmisores aminoacídicos excitatorios e inhibitorios

III.3.1. Efectos de la exposición crónica a Atrazina

En la Tabla 4 y figura 11, se muestran los niveles de neurotransmisores aminoacídicos excitatorios, Asp y Glu, e inhibitorios, Gly, GABA y Tau, del hipotálamo de ratones machos expuestos a 10 mg AT/kg y 30 mg AT/kg p.c. durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven. Con la primera dosis de 10 mg AT/kg p.c., aumentos leves pero significativos fueron observados en los niveles de Asp ($p<0,05$) y Glu ($p<0,05$); al aumentar la dosis a 30 mg AT/kg p.c., se incrementaron muy significativamente los niveles de todos los neurotransmisores en comparación a los controles: Asp en 3,7 veces ($30,06 \pm 9,65$ vs $8,38 \pm 0,28 \mu\text{mol}/100\text{mg proteínas}$, $p < 0,0001$); Glu en 5,4 veces ($14,27 \pm 5,60$ vs $2,64 \pm 0,25 \mu\text{mol}/100\text{mg proteínas}$, $p < 0,0001$); Gly en 1,3 veces ($3,41 \pm 0,95$ vs $2,55 \pm 0,35 \mu\text{mol}/100\text{mg proteínas}$, $p < 0,05$); GABA en 2,5 veces ($17,75 \pm 0,08$ vs $7,11 \pm 1,57 \mu\text{mol}/100\text{mg proteínas}$, $p < 0,0001$) y Tau en 2 veces ($6,93 \pm 2,93$ vs $3,43 \pm 1,02 \mu\text{mol}/100\text{mg proteínas}$, $p = 0,009$).

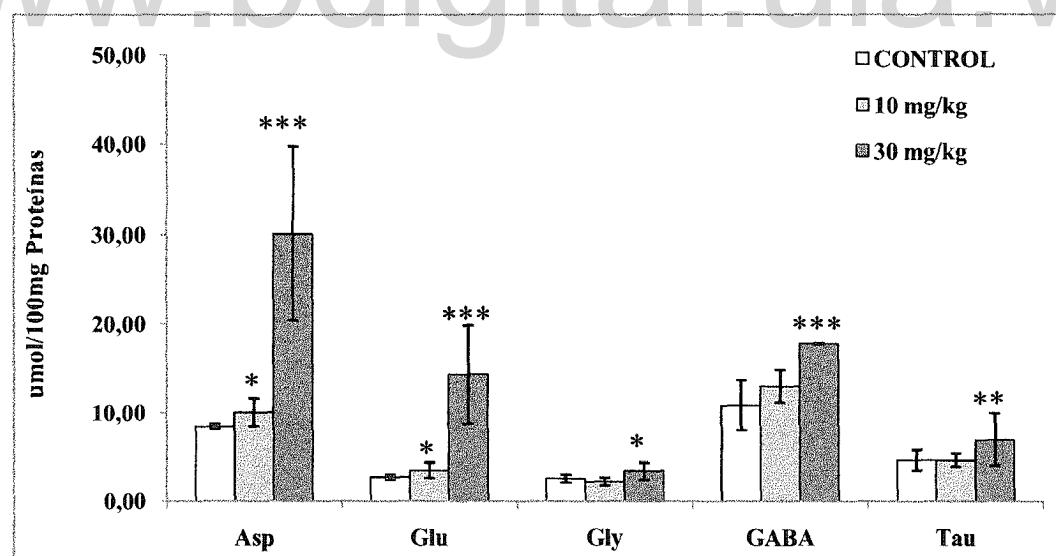


Figura 11. Niveles de neurotransmisores aminoacídicos del hipotálamo de ratones machos expuestos a 10 mg AT/kg y 30 mg AT/kg p.c. durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55. Diferencias estadísticas: * $p < 0,05$; ** $p = 0,009$; *** $p < 0,0001$

III.3.2. Efectos de la exposición crónica a mancozeb

La exposición de los ratones machos con la primera dosis de 30 mg MZ/kg p.c. entre P11 y P55 causó un incremento significativo en los niveles de neurotransmisores excitatorios: Asp ($p < 0,0001$) y Glu ($p = 0,02$) pero no se observó cambios significativos en los niveles de neurotransmisores inhibitorios (Tabla 4 y Figura 12). Sin embargo, con la segunda dosis de 90 mg MZ/kg p.c., aumentaron significativamente los niveles de Asp, Glu, GABA y Tau (Tabla 5 y Figura 12). Al comparar con los niveles basales, los incrementos en la liberación de los neurotransmisores fueron los siguientes: Asp, 4,6 veces ($8,40 \pm 0,26$ vs $38,20 \pm 10,86$ $\mu\text{mol}/100\text{mg proteínas}$, $p < 0,0001$); Glu, 10,7 veces ($8,40 \pm 0,26$ vs $28,35 \pm 4,87$ $\mu\text{mol}/100\text{mg proteínas}$, $p < 0,0001$); GABA, 3,7 veces ($8,40 \pm 0,26$ vs $26,06 \pm 7,48$ $\mu\text{mol}/100\text{mg proteínas}$, $p < 0,0001$); y Tau, 3,0 veces ($8,40 \pm 0,26$ vs $10,48 \pm 3,31$ $\mu\text{mol}/100\text{mg proteínas}$, $p < 0,0001$).

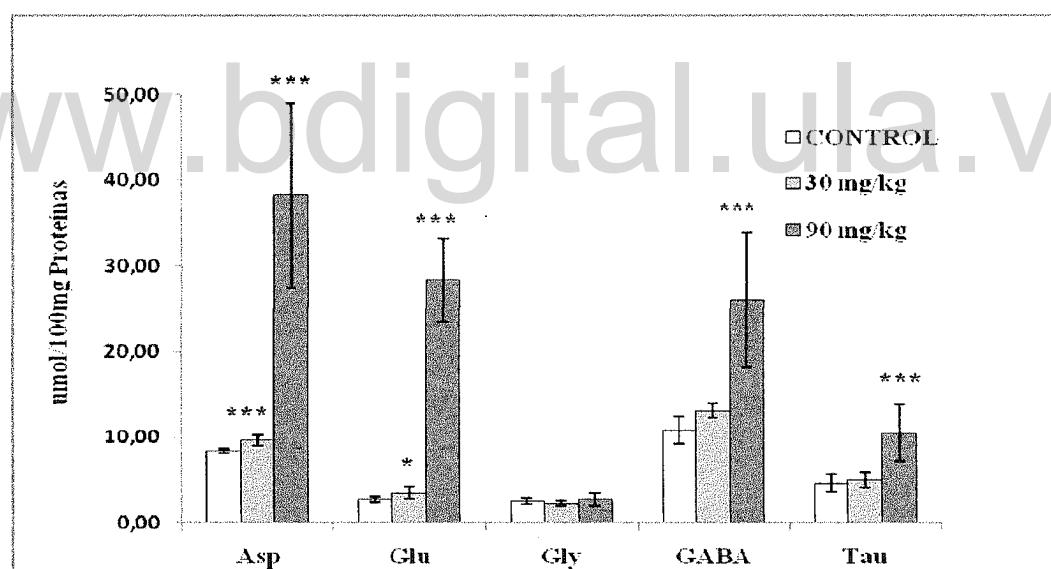


Figura 12. Niveles de neurotransmisores aminoacídicos del hipotálamo de ratones machos expuestos a 30mg MZ/kg y 90mg MZ/kg p.c, entre P11 y P55. Diferencias Estadísticas: * $p = 0,02$; *** $p < 0,0001$

Tabla 4. Niveles de neurotransmisores aminoacídicos del hipotálamo de ratones expuestos a 10 mg AT/kg y 30 mg MZ/kg p.c. durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55.

	Asp	Glu	Gly	GABA	Tau	E/I*
CONTROL	8,40 ± 0,26	2,68 ± 0,25	2,55 ± 0,35	8,95 ± 2,60	4,03 ± 0,80	0,98 ± 0,20
10 mg AZ/kg	10,04 ± 1,61	3,46 ± 0,89	2,19 ± 0,42	12,94 ± 1,81	4,62 ± 0,76	0,89 ± 0,11
30 mg MZ/kg	9,65 ± 0,63	3,50 ± 0,76	2,22 ± 0,30	13,09 ± 0,83	5,01 ± 0,86	0,86 ± 0,03

*Excitación / Inhibición = Asp + Glu / Gly + GABA

Los valores, expresados en µmol/100mg proteínas, son promedios ± desviación estándar (n = 8).

Tabla 5. Niveles de neurotransmisores aminoacídicos del hipotálamo de ratones expuestos a 30 mg AT/kg y 90 mg MZ/kg p.c. durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55.

	Asp	Glu	Gly	GABA	Tau	E/I*
CONTROL	8,38 ± 0,28	2,64 ± 0,25	2,55 ± 0,35	7,11 ± 1,57	3,43 ± 1,02	1,09 ± 0,16
30mg AZ/kg	30,06 ± 9,65	14,27 ± 5,60	3,41 ± 0,95	17,75 ± 0,08	6,93 ± 2,93	2,08 ± 0,64
90mg MZ/kg	38,20 ± 10,86	28,35 ± 4,87	2,71 ± 0,76	26,06 ± 7,84	10,48 ± 3,3	2,56 ± 0,37

*Excitación / Inhibición = Asp + Glu / Gly + GABA

Los valores, expresados en µmol/100mg proteínas, son promedios ± desviación estándar (n = 8).

III.3.3. Efectos de la exposición crónica a plaguicidas sobre la relación Excitación/Inhibición en el hipotálamo

La relación Excitación/Inhibición (E/I) es la relación entre las concentraciones de neurotransmisores excitatorios (Asp + Glu) e inhibitorios (Gly + GABA). En las Tablas 4-5 y figura 13, se muestran los cambios en la relación E/I del hipotálamo de ratones machos expuestos durante la etapa postnatal tardío hasta adulto joven a diferentes dosis de los plaguicidas AT y MZ. Con la primera dosis de los plaguicidas, los grupos experimentales no mostraron un desbalance entre excitación e inhibición, demostrando una relación E/I del hipotálamo comparable con la E/I de los ratones normales después de 20 veces de exposición. Triplicando la dosis inicial de los plaguicidas, los grupos experimentales registró un incremento muy significativo en la relación E/I del hipotálamo de los ratones expuestos individualmente a 30 mg AT/kg p.c., dando una relación E/I = 2,08 ($p=0,001$) y a 90 mg MZ/kg p.c., resultando en una relación E/I= 2,56 ($p<0,0001$).

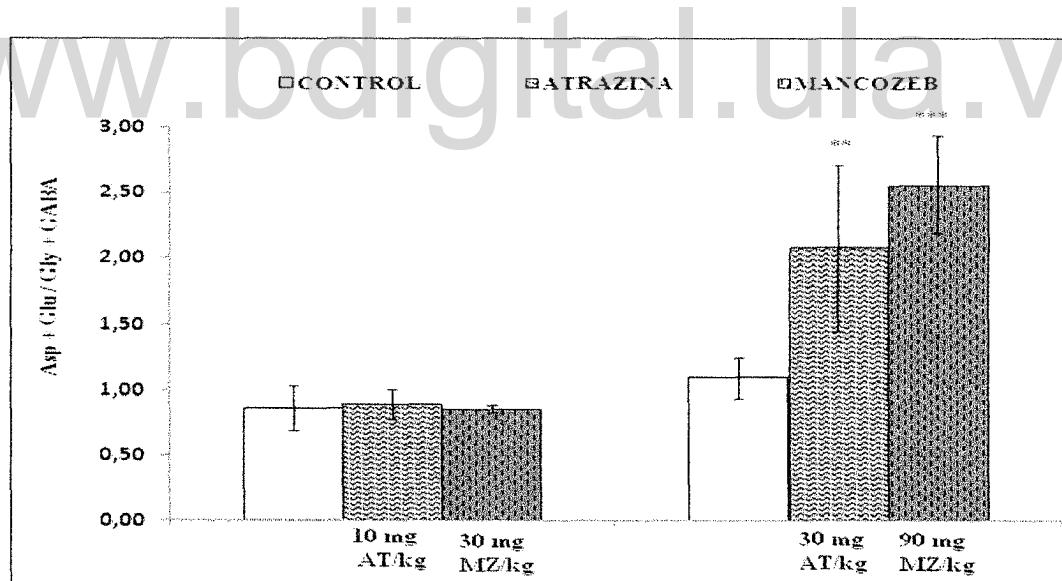


Figura 13. Relación Excitación/Inhibición en el hipotálamo de ratones machos expuestos a 10 mg AT/kg y 30 mg AT/kg p.c, así como a 30 mg MZ/kg y 90 mg MZ/kg peso corporal entre P11 y P55. Diferencias Estadísticas: *** $p < 0,0001$, n=10.

III.4. Efectos de la exposición subcrónica a plaguicidas sobre las características histológicas y ultraestructurales del hipotálamo de ratón macho

III.4.1. Efectos de la exposición subcrónica a Atrazina

El hipotálamo de ratón macho, adulto joven de P60, muestra las características histológicas normales. En la figura 14a, se aprecia neuronas hipotalámicas grandes, con un núcleo central y su nucléolo bien diferenciado, y neuronas más pequeñas con su núcleo central. Alrededor de ellas se puede observar una región de neuropila bien conformada, tanto por procesos dendríticos como axónicos. Se muestran algunas células en proceso de muerte celular, sin afectar a las células vecinas.

Las características histológicas del hipotálamo de ratón macho expuesto crónicamente a 10 mg AT/kg p.c., 20 veces entre P11 y P55, fueron homologables con las características de los animales control. En contraste, el hipotálamo de los ratones sometidos a intoxicación con 30 mg AT/kg p.c. presentaron edema en la región de neuropila y mostraron cambios visibles en su conformación (Figura 14b). También se aprecian células neuronales en distintas etapas de muerte celular. Sin embargo, no se observaron cambios histológicos importantes en las neuronas principales del hipotálamo, como se aprecia en la figura (14-b) donde se observan neuronas grandes y pequeñas con núcleos en posición central y sus respectivos nucléolos sin signos de daño tisular.

Con microscopía electrónica de transmisión (Figura 15, a-b), se pudo apreciar que el tejido hipotalámico control presentó características morfológicas propias de este tejido; es decir, se observaron células hipotalámicas parvocelulares y magnocelulares bien conformadas con núcleo grande, en posición central y provista generalmente de un nucléolo (Figura 15a). En el citoplasma se distinguen diversas organelas aunque destaca la abundancia de mitocondrias. Igualmente, se encontraron células parvocelulares en proceso de muerte celular; las cuales mostraron un núcleo muy electróndenso y un citoplasma retráido y no se aprecia alrededor de ellas señales de daño tisular o de un proceso inflamatorio. Cuando se observó a mayor aumento la región de neuropila (Figura 15b), se distinguen terminales axónicos y dendríticos con organelas características de ellos sin alteraciones morfológicas aparentes y entre ellas se pueden ver uniones sinápticas a predominio del tipo excitatorio.

En las micrografías del hipotálamo de ratones machos expuestos a 30 mg AT/kg p.c. (Figura 15, c-f), se evidenciaron alteraciones ultraestructurales importantes en la región de neuropila, cuyos procesos axónicos y dendríticos están edematizados y muestran signos de

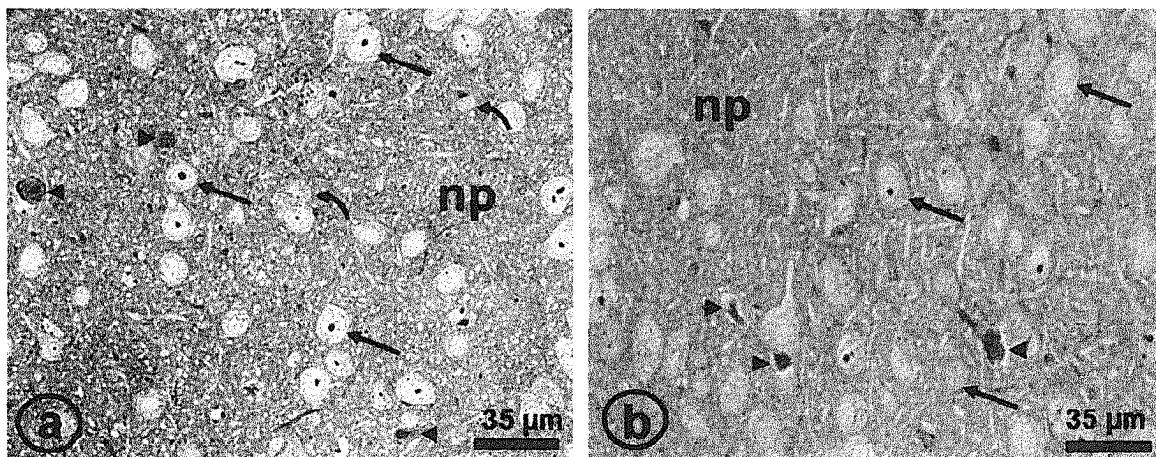


Figura 14. El hipotálamo de ratón macho control de P60 muestra características histológicas normales (Figura 14a). En esta fotografía se aprecian neuronas hipotalámicas magnocelulares con un núcleo central y su nucléolo bien diferenciado (flechas rectas) y neuronas parvocelulares con su núcleo central (flechas curvas). Alrededor de ellas se puede observar una región de neuropila bien conformada, tanto por procesos dendríticos como axónicos. Se muestran algunas células en proceso de muerte celular (cabezas de flecha) sin afectar a las células vecinas. np, neuropila. **Barra = 35 μm.**

Los ratones machos P60, expuestos subcrónicamente a 30 mg AT/kg p.c., no presentaron cambios histológicos importantes en las neuronas principales del hipotálamo, como se aprecia en la Figura 14b. Se observan neuronas parvocelulares y magnocelulares con núcleos en posición central y sus respectivos nucléolos (flechas rectas). Por el contrario, la región de neuropila (np) presenta edema y muestra cambios visibles en su conformación. También se aprecian células neuronales en distintas etapas de muerte celular (cabezas de flecha). **Barra = 35 μm**

daño intracelular, como se demuestra por la presencia de cuerpos membranosos en forma de cebolla y/o cuerpos fantasma de membranas, lo cual indica que hay procesos de autofagia evidenciados por un mayor aumento de organelas intracelulares dañadas o en proceso de degeneración (Figura 15c). En estos terminales axónicos y dendríticos se observa una disminución en la población de vesículas sinápticas, tanto electronegativas como electrondensas, en comparación con los terminales axónicos que no muestran signos de daño celular.

Con respecto a la población neuronal, las células hipotalámicas se observaron con características ultraestructurales normales, rodeadas de región de neuropila, donde se alternan áreas con alteraciones morfológicas y áreas con características normales. Se apreciaron células parvocelulares con signos de muerte celular por apoptosis; es decir, el núcleo mostró

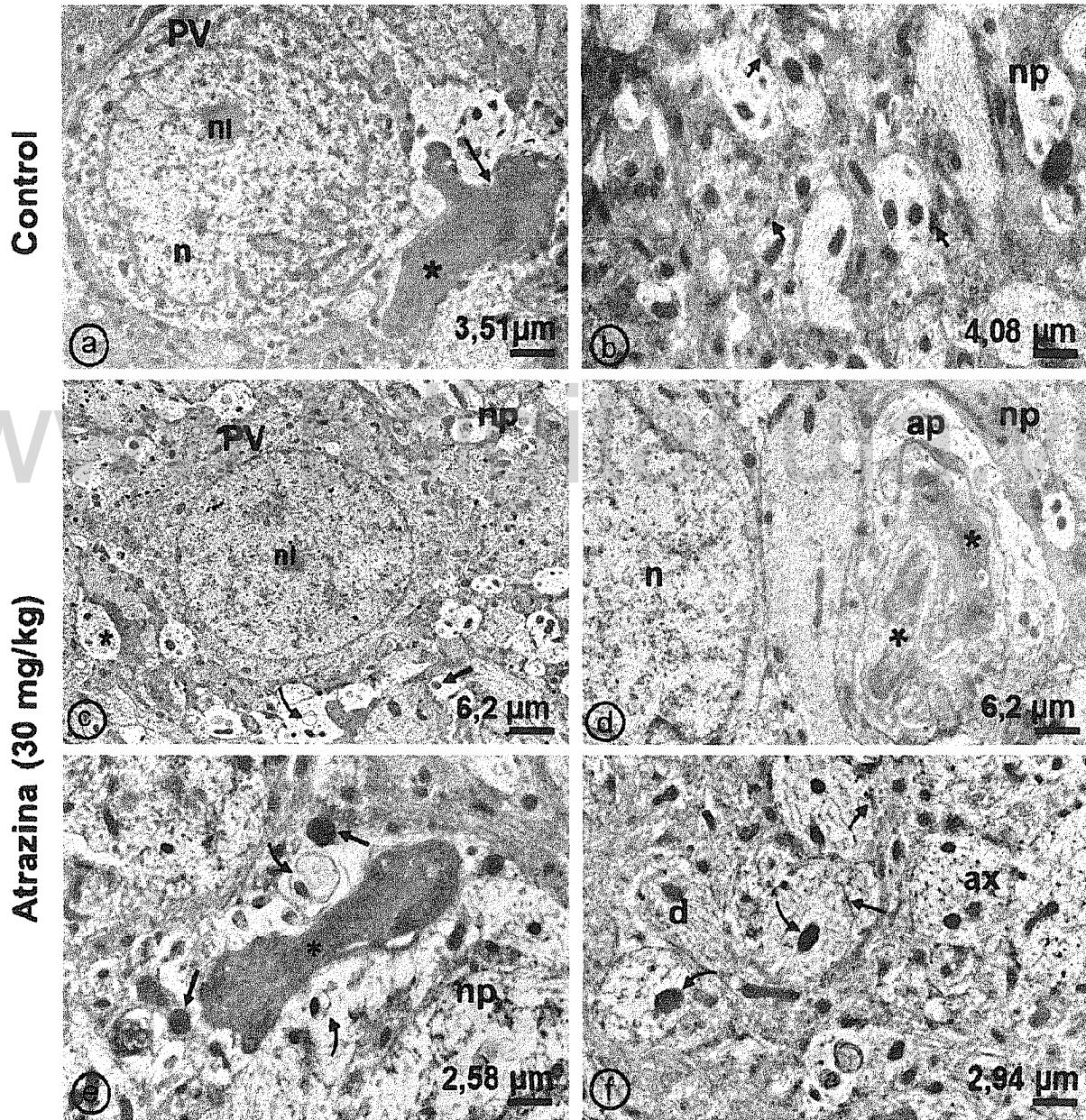


Figura 15. Micrografías en las que se muestra el tejido hipotalámico control (a-b) en comparación con el tejido hipotalámico de ratones machos expuestos subcrónicamente a 30 mg AT/kg p.c. (c-f).

En la Figura 15a, se observa una célula parvocelular (PV) con características ultraestructurales normales y una célula neuronal en proceso de apoptosis (flecha recta), en la cual se aprecia el núcleo condensado (asterisco) y retracción del citoplasma celular, además, no se aprecian signos de inflamación en el tejido circundante. n, núcleo; nl, nucléolo. Aumento original, **Barra = 3,51μm**. A mayor aumento (Figura 15b), se muestra una región de neuropila (np) del tejido hipotalámico en la cual se observan terminales dendríticos y axónicos con características ultraestructurales normales, donde se distinguen algunas sinapsis excitatorias (flechas cortas) propias de esta región. **Barra = 4,08μm**. En la Figura 15c, se aprecia una célula parvocelular (PV) ultrastructuralmente normal rodeada de neuropila (np) en la cual se observa procesos dendríticos y axónicos con signos de edematización (asterisco) y en su interior se hallan cuerpos en cebolla (flecha recta) y cuerpos fantasma de membrana (flecha curva), los cuales son signos del daño celular causado por excitotoxicidad. n, núcleo; nl, nucléolo. **Barra = 6,2μm**

En la Figura 15d, se muestra una célula en proceso de apoptosis (ap), en la cual se observa la fragmentación del núcleo (asteriscos) y disminución del volumen citoplásmico. Esta célula se encuentra rodeada de una región de neuropila (np) y próxima a ella se observa una célula normal. n, núcleo. **Barra = 6,2μm**. En la Figura 15e, se observa una célula parvocelular en proceso de apoptosis rodeada de una región de neuropila (np) que muestra edema y daños morfológicos en los procesos dendríticos y axónicos (flechas curvas), además se puede apreciar mitocondrias edematizadas (flechas rectas). **Barra = 2,58μm**. A mayor aumento (Figura 15f), se muestra la región de neuropila en la cual se aprecian procesos dendríticos (d) y procesos axónicos (ax) que se encuentran edematizados y en su interior se observan mitocondrias tumefactas (flechas curvas); también se pueden observar sinapsis (flechas rectas) en esta región de neuropila. **Barra = 2,94μm**.

cariopinosis o fragmentación y en el citoplasma se observó procesos de fagocitosis y degeneración de mitocondrias, las cuales son evidencias ultraestructurales de muerte celular, específicamente de apoptosis, mientras que las células circundantes no mostraron ninguna alteración de tipo inflamatorio (Figura 15d).

Sin embargo, en otras áreas hipotalámicas se pudieron observar células parvocelulares en proceso de apoptosis, inmersas en una región de neuropila que presenta edema y alteraciones morfológicas de los procesos dendríticos y axónicos, tales como mitocondrias edematizadas, cuerpos en cebolla y cuerpos fantasma (Figura 15e). Además, destaca la ausencia casi total de vesículas sinápticas, la aparente disminución de contactos sinápticos y las mitocondrias, en estos procesos, muestran una morfología ultraestructural afectada en su membrana externa y en las crestas mitocondriales (Figura 15f). Por lo tanto, se pudo constatar que tanto las células parvocelulares como las neuronas magnocelulares del hipotálamo del ratón expuesto a 30 mg AT/kg p.c., mostraron cambios ultraestructurales que demuestran procesos apoptóticos y de muerte celular en este tejido nervioso.

III.4.2. Efectos de la exposición subcrónica a Mancozeb

Las características histológicas del hipotálamo de ratón macho adulto joven de P60 se muestran en la figura 16a. Se pueden apreciar neuronas neurosecretoras magnocelulares con un núcleo central y su nucléolo bien diferenciado y neuronas parvocelulares con su núcleo central. Alrededor de ellas se puede observar una región de neuropila bien conformada, tanto por

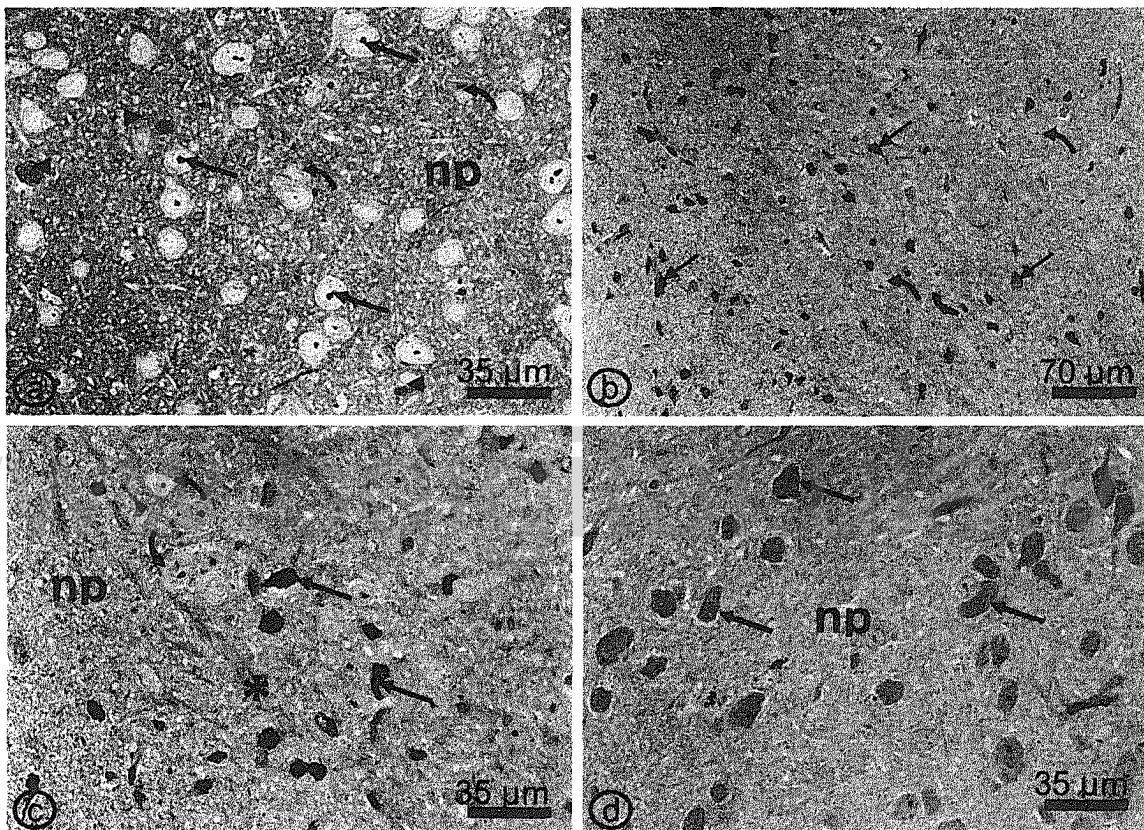


Figura 16. Microfotografías del tejido hipotalámico de ratones machos P60 control (**a**) en comparación con el hipotálamo de ratones machos P60, que fueron expuestos a 30mg MZ/kg p.c., entre P11-55 (**b-d**). En Fig. 16a, se aprecian neuronas neurosecretoras magnocelulares con un núcleo central y su nucléolo bien diferenciado (flechas rectas) y neuronas parvocelulares con su núcleo central (flechas curvas). Alrededor de ellas se puede observar una región de neuropila bien conformada, tanto por procesos dendríticos como axónicos. Se muestran algunas células en proceso de muerte celular (cabezas de flecha) sin afectar a las células vecinas. Barra=35μm. En Fig. 16b, se aprecian células neurosecretoras en proceso de apoptosis celular (flechas rectas) alternando con células viables (flechas curvas). Barra=70μm. En Fig. 16c, se distinguen células hipotalámicas en distintos estadios de muerte celular (flechas rectas) alternando con células neurosecretoras viables (flechas curvas). Por otra parte, se puede observar zonas de neuropila (np) con alteraciones morfológicas y daño tisular (asterisco), alternando con áreas que presentan características histológicas normales. Barra=35μm En Fig. 16d, se observan neuronas neurosecretoras hipotalámicas en proceso de muerte celular (flechas rectas) y región de neuropila (np) con cambios histológicos que concuerdan con procesos de gliosis tisular. Barra=35μm.

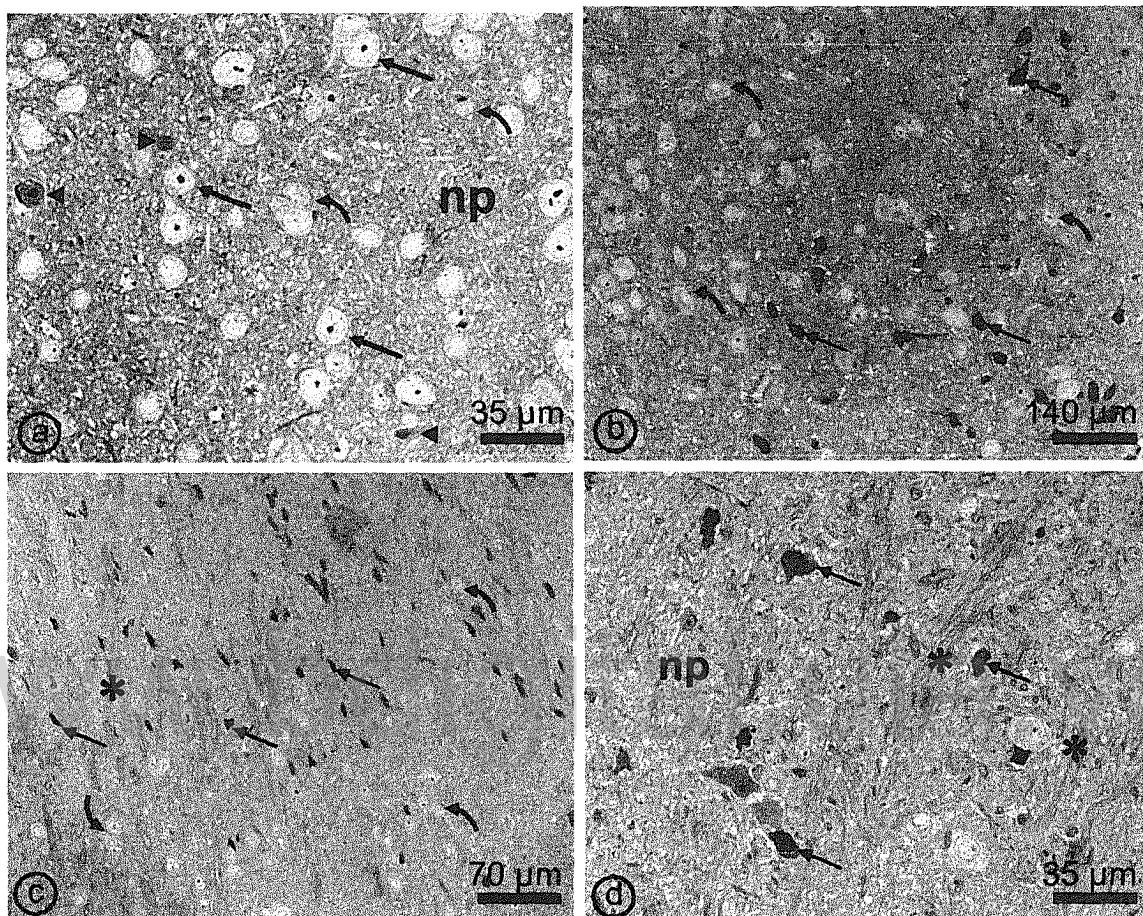


Figura 17. Microfotografías del tejido hipotalámico de ratones machos P60 control (a) en comparación con el hipotálamo de ratones machos P60, que fueron expuestos a 90mg MZ/kg p.c., entre P11-55 (b-d). En Fig. 17a, se aprecian neuronas hipotalámicas magnocelulares con un núcleo central y su nucléolo bien diferenciado (flechas rectas) y neuronas parvocelulares con su núcleo central (flechas curvas). Alrededor de ellas se puede observar una región de neuropila (np) bien conformada, tanto por procesos dendríticos como axónicos. Se muestran algunas células en proceso de muerte celular (cabezas de flecha) sin afectar a las células vecinas. Aumento original, Barra=35μm. En Fig. 17b, se pueden ver neuronas neurosecretoras, tanto magnocelulares como parvocelulares, en proceso de apoptosis o muerte celular, alternando con áreas de células hipotalámicas viables. Barra=140μm. En Fig. 17c, se observan células neurosecretoras en proceso de apoptosis (flechas rectas) intercaladas con neuronas viables (flechas curvas). En la región de neuropila (np) se aprecian cicatrices a lo largo de los trayectos axónicos (asterisco). Barra=70μm En Fig. 17d, se pueden distinguir neuronas neurosecretoras en diferentes estadios de apoptosis (flechas rectas). En la región de neuropila (np) se observan cicatrices o estriaciones (asteriscos) en el tejido que recuerdan daños causados por gliosis celular. Barra=35μm

30 mg MZ/kg peso

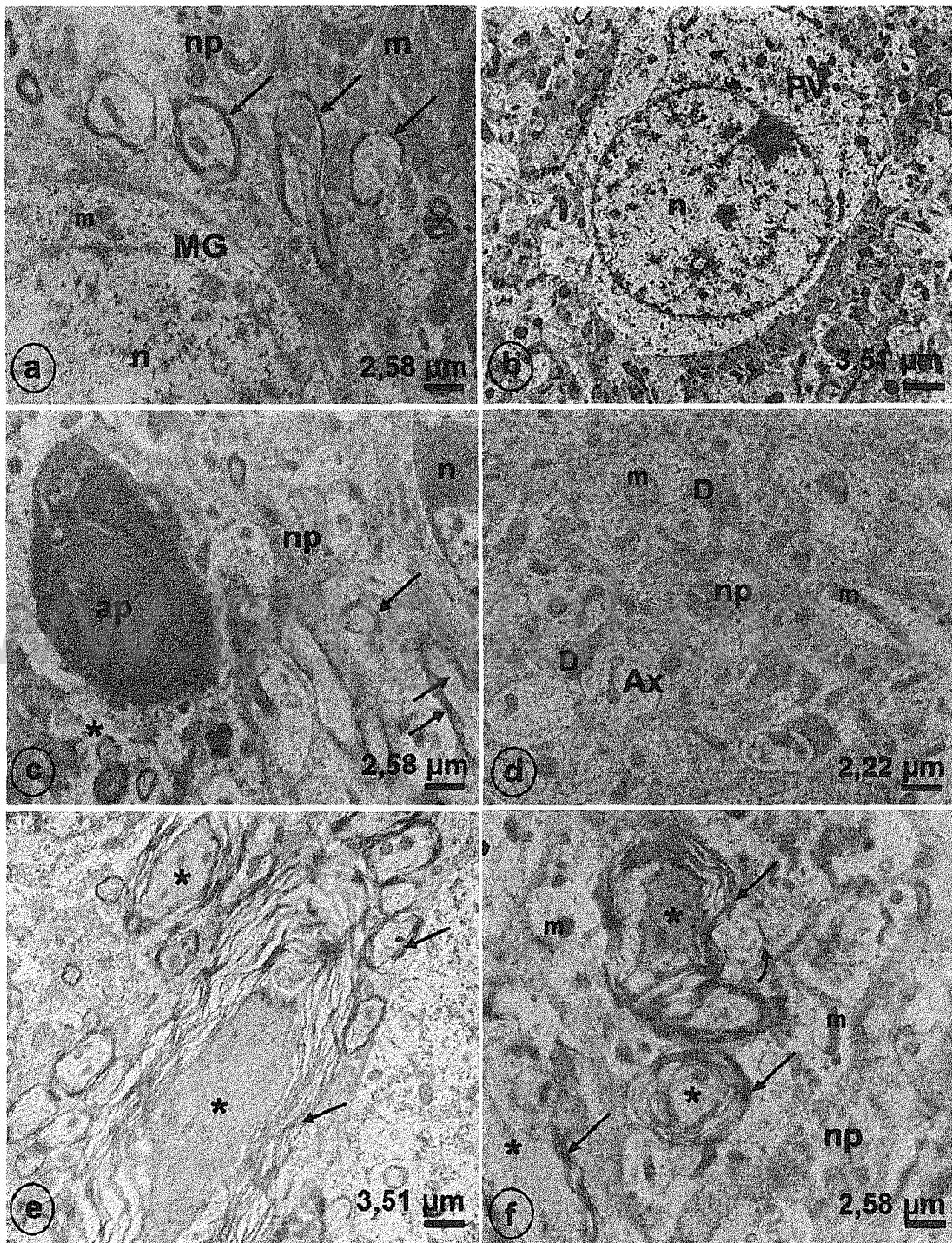


Figura 18. Micrografías en las que se muestra el tejido hipotalámico de ratón P60, intoxicado con 30 mg MZ/Kg p.c.. En la Fig. 18a, se puede apreciar una célula magnocelular (MG) con núcleo (n) voluminoso y el citoplasma presenta características ultraestructurales normales; es importante destacar la presencia de abundantes mitocondrias (m) de gran tamaño. En la región de neuropila (np) se muestran procesos axónicos (flechas rectas) con alteración de la envoltura de mielina. En el interior de los procesos axónicos y dendríticos se pueden apreciar mitocondrias (m) que presentan características ultraestructurales alteradas, predominando la edematización. **Barra = 2,58μm.** En la Fig. 18b, se muestra una célula parvocelular (PV) con un núcleo (n) de características ultraestructurales normales y su citoplasma contiene abundantes organelas de aspecto normal. **Barra = 3,51μm.** En la Fig. 18c, se observa una célula hipotalámica en proceso de apoptosis (ap) rodeada de neuropila (np), donde destacan procesos axónicos, tanto transversales como longitudinales, en los cuales se evidencia deterioro en la mielina que recubre estos procesos (flechas rectas). Igualmente hay zonas en la región de neuropila (np) donde se ven alteraciones ultraestructurales (asterisco) del tejido, alternando con áreas de neuropila morfológicamente normales. n, núcleo. **Barra = 2,58μm** En la Fig. 18d, se pueden apreciar procesos dendríticos (D) y axónicos (Ax) con mitocondrias (m) hinchadas y alteraciones en su morfología ultraestructural; sin embargo, no se aprecian procesos de edematización en la neuropila. **Barra = 2,22μm** En la Fig. 18e, se detallan los procesos axónicos (asteriscos) con alteraciones muy marcadas en el patrón de la mielina, tanto en prolongaciones axónicas pequeñas como de mayor diámetro (flechas rectas), también observándose alteraciones en el interior de los axones. **Barra = 3,51μm.** En la Fig. 18f, se observa una región de neuropila (np), donde se aprecian prolongaciones axónicas (asteriscos) con gran deterioro de la envoltura de mielina, caracterizado por la pérdida del arreglo en capas (flechas rectas) que conduce a una fase de desmielinización de los procesos axónicos. En esta fotografía también se pueden ver sinapsis donde se aprecia una disminución de la población vesicular (flecha curva). Al igual que en las imágenes anteriores, se observan abundantes mitocondrias (m) con cambios morfológicos como el hinchamiento de estas. **Barra = 2,58μm**

90 mg MZ/kg peso

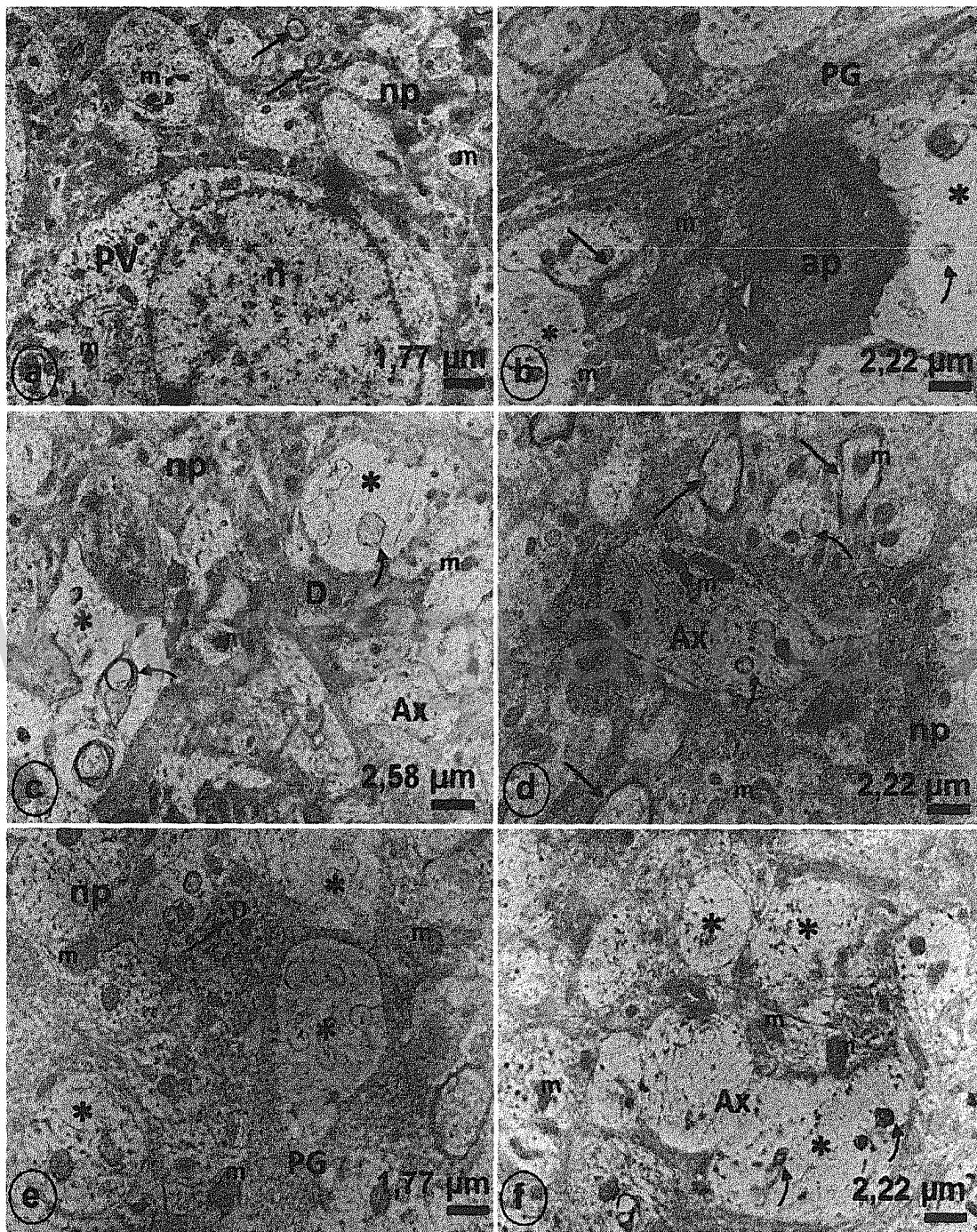


Figura 19. Micrografías en las que se muestra el tejido hipotalámico de ratón P60, expuesto subcronicamente con 90 mg MZ/Kg p.c.. En la Fig. 19a, se muestra un corte histológico de una célula parvocelular (PV). En el interior del citoplasma de la PV se observan abundantes mitocondrias (m) con signos de daño morfológico, también se observa el núcleo (n), el cual presenta la membrana nuclear regular y de características citológicas aparentemente normales; además se observan organelas como el retículo endoplásmico liso (REL). En la región de neuropila (np) se observan terminales dendríticos (D) con abundantes mitocondrias, así como una aparente disminución de la población vesicular en estos. Por otra parte se observa procesos axónicos con mielina alteradas (flechas). Barra = 1,77 μ m En la Fig. 19b, se distingue claramente una célula nerviosa hipotalámica en proceso de apoptosis, rodeado por procesos axónicos que muestran avanzado deterioro morfológico, como son: la edematización (*) y la presencia de cuerpos residuales en su interior (flechas curvas). Igualmente se aprecian abundantes procesos gliales (PG) rodeando las prolongaciones dendríticas y axónicas presentes. Es importante señalar la presencia de sinapsis, en la cual se ve disminuido en el terminal presináptico la población vesicular (flecha recta). Otro signo de daño tisular es la presencia de mitocondrias (m) aumentadas de tamaño y la disminución o ausencia total de vesículas sinápticas en los terminales dendríticos. Barra = 2,22 μ m En la Fig. 19c, se distingue una región de neuropila (np), donde se aprecian procesos axónicos con signos de deterioro ultraestructural (*) alternando con procesos axónicos (Ax) y dendríticos (D) de características morfológicas normales. Por otra parte, se aprecian en el interior de los procesos axónicos y dendríticos, abundantes mitocondrias (m) edematizadas como signo de estrés celular. Barra = 2,58 μ m En la Fig. 19d, se muestra una región de neuropila (np) con abundantes procesos axónicos, en los cuales se destaca la presencia de mitocondrias (m) hinchadas y aumentadas de tamaño, vainas de mielina (flechas rectas) alteradas en su estructura, así como procesos axónicos con signos de daño ultraestructural, como es la presencia de cuerpos en cebolla (flechas curvas) en su interior. Por otra parte se observa la presencia de abundantes procesos gliales. Barra = 2,22 μ m En la Fig. 19e, se observa a mayor aumento la neuropila (np) en la cual se aprecian alteraciones ultraestructurales como: terminales axónicos que han perdido la estructura morfológica interna y presencia de cuerpos membranosos fantasmas en su interior (flechas curvas). Igualmente se aprecian abundantes mitocondrias (m) edematizadas. Los pocos procesos dendríticos (D) que presentan características ultraestructurales normales muestran vesículas electrondensas y electrontransparentes en su interior. Por otra parte se observan abundantes procesos gliales (PG) rodeando los procesos axónicos. Barra = 1,77 μ m En la Fig. 19f, se observan a mayor aumento procesos axónicos y dendríticos de la neuropila (np), en la cual se distinguen procesos axónicos con distintos grados de daño morfológico. Es de destacar la edematización y la pérdida de contenido celular dentro de los procesos axónicos, así como la presencia de mitocondrias (m) aumentadas en tamaño y proceso de fagocitosis intracelular (*). Estos procesos axónicos se alternan con procesos dendríticos que muestran características ultraestructurales típicas y en los cuales se aprecian vesículas sinápticas electrondensas y electrontransparentes. Barra = 2,22 μ m

procesos dendríticos como axónicos. Se muestran algunas células en proceso de muerte celular, sin afectar a las células vecinas. Por otra parte, en los cortes histológicos del hipotálamo de ratones expuestos subcrónicamente a 30 mg MZ/kg p.c. por 20 veces durante el periodo del desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven (Figura 16, b-d), se pudo observar una gran cantidad de células neurosecretoras en proceso de apoptosis alternadas con tejido hipotalámico de características histológicas normales. En las fotografías tomadas a bajo aumento (Figura 16b), se observan células magnocelulares y parvocelulares en diferentes estadios de apoptosis celular. En cortes observados a mayor aumento (Figura 16, c-d), se puede apreciar la región de neuropila con alteraciones compatibles con procesos de desmielinización axónica y muerte celular por apoptosis. Es importante destacar que, en la región de neuropila, se observaron cambios estructurales como desorganización tisular y espacios “blancos” que rodean las células en proceso de muerte celular.

En las microfotografías del tejido hipotalámico de ratones machos expuestos subcrónicamente a 90 mg MZ/kg p.c. (Figura 17, b-d), se apreciaron células magnocelulares y parvocelulares en proceso de muerte celular por apoptosis, alternando con células neurosecretoras con características citológicas normales de neuronas funcionales. En la región de neuropila se pudo apreciar abundantes “cicatrices” rodeando las células hipotalámicas. A mayor aumento (Figura 17d), se encontraron células hipotalámicas neurosecretoras en diferentes estadios de muerte neuronal o apoptosis, inmersas en la región de neuropila, la cual presentó alteraciones morfológicas que aparentan “cicatrices gliales” y desmielinización axonal. En estos cortes histológicos, no se observó edematización o procesos de necrosis del tejido estudiado.

El MZ y sus productos metabólicos presentan una alta citotoxicidad, la cual depende de la dosis aplicada en el tejido nervioso. En los animales expuestos a 30 mg MZ/kg p.c. (Figura 18), se apreció en el tejido hipotalámico una gran cantidad de células neurosecretoras en proceso de muerte celular o apoptosis, alternando con células nerviosas aparentemente funcionales (Figura 18a-b). También se observan zonas de neuropila mostrando características de cicatrización alternados con zonas morfológicamente normales (Figura 18c). La región de neuropila mostró trayectos axónicos con alteraciones de la envoltura de mielina, tanto en prolongaciones axónicas pequeñas como de mayor diámetro, caracterizado por la pérdida del arreglo en capas que conduce a una fase de desmielinización de los procesos axónicos (Figura 18d-f).

Al triplicar la dosis de exposición subcrónica a 90 mg MZ/kg p.c. (Figura 19), se apreció un mayor deterioro del tejido hipotalámico que afecta de forma irreversible el hipotálamo del ratón, evidenciado por el daño citológico y ultraestructural de la región de neuropila (Figs. 19a-f). La microscopia electrónica reveló que el hipotálamo de ratones intoxicados con este fungicida, presentan cicatrices que recuerdan procesos resultantes de gliosis, es decir, al ocurrir la muerte celular (por apoptosis o necrosis) de las células principales, estas son sustituidas por procesos gliales, dejando huellas o cicatrices en el tejido (Fig. 19b-d). También se observó que este plaguicida daña a todas las células hipotalámicas pero afecta principalmente los procesos axónicos y las sinapsis de éstas. La región de neuropila mostró alteraciones morfológicas importantes tales como, trayectos axónicos con alteraciones de la mielina y procesos de cicatrización alternados con zonas de neuropila aparentemente normales (Fig. 19c-f).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

www.bdigital.ula.ve

IV. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se reportan evidencias neuroquímicas, morfológicas y de comportamiento sobre los efectos neurotóxicos de AT, un herbicida, y MZ, un fungicida, durante el desarrollo hipotalámico de ratones machos expuestos subcrónicamente durante el período postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55, período del desarrollo que abarca las etapas prepuberal, adolescencia y adulto joven. En roedores, el periodo crítico de sinaptogénesis ocurre durante las primeras tres semanas de vida postnatal, haciendo su pico en la segunda semana y la densidad sináptica llega a su número equivalente en adulto a los 30 días de edad; la etapa de adolescencia, tanto en roedores y humanos, es un proceso continuo de refinamiento y maduración de los circuitos neurales, que se prolonga hasta la etapa adulta (Rice y Baron, 2000; Semple y col., 2013). Por lo tanto, una exposición a sustancias químicas tóxicas, como los CDEs: AT y MZ, durante este período pueden causar alteraciones en el desarrollo del sistema neuroendocrino y tener consecuencias negativas al SNC, cuyos efectos pueden ser notables más tarde en la vida.

Los resultados presentados en este estudio sugieren que la exposición subcrónica a AT y MZ desde la etapa puberal hasta adulto joven, puede producir alteraciones funcionales sutiles durante el desarrollo de las células y del circuito neural hipotalámica, lo cual puede afectar el desarrollo de los circuitos neuroendocrinos que son críticos para la maduración del cerebro y los órganos endocrinos. Se han realizados estudios para analizar los efectos neurotóxicos sobre los sistemas monoaminérgicos, en los cuales se ha demostrado que los plaguicidas AT y MZ causan degeneración de las neuronas dopamínergicas nigroestriatales (Coban y Filipov, 2007; Cooper y col., 2007; Bardullas y col., 2011; Negga y col., 2011; Rodriguez y col., 2005; 2013). En este estudio, se presentan evidencias neuroquímicas donde se demuestra que tanto la AT como el MZ pueden estar provocando una elevación en la relación de E/I en el circuito neural hipotalámico durante el desarrollo, mediante un mecanismo que causa excitotoxicidad a las neuronas neurosecretoras. Adicionalmente, se comprobó con evidencias citológicas y ultraestructurales, los efectos tóxicos de estos CDEs a las neuronas parvocelulares, magnocelulares así como las células gliales del hipotálamo. Nuestros resultados son consistentes con los reportados por otros investigadores en cuanto a la neurotoxicidad de AT y MZ, causando degeneración neuronal a través de mecanismos de excitotoxicidad, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo (Domínguez y col., 2006; Montiel y col., 2010; Martínez y Greenamyre, 2012).

Por otra parte, en este trabajo, la exposición subcrónica a AT produjo alteraciones en las actividades locomotoras, horizontal y vertical y cambios neuroquímicos significativos en el hipotálamo del ratón macho (Tablas 2-3; Figuras 9-10). Después de 18 dosis de 10 mg AT/kg p.c., los ratones mostraron hipoactividad en el plano horizontal que volvió a la normalidad en la edad adulta (Figura 9). Durante el mismo período, los animales exhibieron un comportamiento exploratorio aumentado (actividad vertical), que luego fue homologable con la actividad del grupo control en la etapa adulta (Figura 10). Con la dosis alta de 30 mg AT/kg p.c., los ratones mostraron mayor hipoactividad que los animales tratados con 10 mg AT/kg p.c., y la baja actividad locomotora permaneció hasta la edad adulta (Figuras 9-10).

En otros estudios, Rodríguez y colaboradores (2005) encontraron que las ratas tratadas con 10 mg AT/kg p.c. durante seis meses mostraron hiperactividad y disminución en los niveles de DA estriatal. Bardullas y colaboradores (2011) demostraron que la exposición crónica a 10 mg AT/kg p.c. por un año indujo cambios múltiples en la actividad motora, reducción en el contenido de DA estriatal y alteraciones menores de las funciones cognitivas involucrando los trayectos nigroestriatal y mesolímbico. Belloni y colaboradores (2011) reportaron que los ratones, machos y hembras, expuestos a 1 µg AT/kg/día, desde los 14 días de gestación (E14) hasta P21, exhibieron un comportamiento exploratorio aumentado a los P16. Luego de un periodo inicial de exposición a AT, Rodriguez y colaboradores (2013) observaron una hipoactividad en ratones adultos, y al prolongar la exposición crónica, los animales se tornaron hiperactivos y perseverantes. Estas observaciones demuestran que debido a los ajustes en la función neural, causados por los cambios neuroquímicos y metabólicos producidos por la exposición crónica a AT durante el desarrollo, se afecta la formación de los circuitos neurales involucrados en el establecimiento de los patrones de comportamiento, tanto de la actividad locomotora como de la función cognitiva.

Con respecto a la exposición subcrónica a MZ, la dosis de 30 mg MZ/kg p.c. no produjo alteraciones significativas en el peso corporal, con respecto al grupo control, durante el período de desarrollo bajo estudio (Tabla 1; Figura 8A). Por el contrario, los animales tratados con 90 mg MZ/kg p.c. mostraron una disminución significativa del p.c desde P29 hasta P46 (entre 12 – 22%), el cual coincide con la etapa de desarrollo puberal (Tabla 1; Figura 8B). Se ha demostrado que el MZ produce efectos tóxicos significativos sobre la glándula tiroides y que puede causar hipertiroidismo o hipotiroidismo (Kackar y col., 1997; Panganiban y col., 2004; Goldner y col.,

2010; Axelstad y col., 2011). Está bien establecido que la pérdida de peso constante o brusca es una manifestación frecuente de hipertiroidismo, en contraste, el aumento de peso es una de las consecuencias de hipotiroidismo (Fox y col., 2008). Los resultados de este estudio demuestran que la exposición a altas dosis de MZ, durante la etapa prepuberal y puberal, puede estar afectando la homeostasis tiroidea, cuya importancia para el normal desarrollo cerebral ha sido documentada extensivamente (Hulbert, 2000; Zoeller y col., 2002). La deficiencia de la hormona tiroidea durante períodos críticos del desarrollo cerebral puede alterar los eventos biológicos mediados por tiroxina, por lo tanto pueden tener consecuencias permanentes sobre la morfología y la función neurológica en el adulto (Colborn, 2004; Axelstad y col., 2008). Algunos de los mecanismos de acción de MZ, con respecto a la inhibición de la función tiroidea, incluyen la interferencia con la captación de yodo por la glándula tiroides, disminución de la actividad de peroxidasa tiroidea e interferencia en el nivel sérico de la proteína portadora de yodo (Kackar y col., 1997; Howdeshell, 2002). Por otra parte, se ha demostrado que la dopamina actúa como un modulador inhibitorio de la secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), comprobando su importante papel en la regulación de la función tiroidea (Soldin y Aschner, 2007). Por lo tanto, una reducción en el nivel de dopamina, provocada por la exposición crónica a MZ, estaría afectando tanto las funciones de la glándula tiroides, así como de los ganglios basales asociados fundamentalmente con la coordinación de movimiento.

En relación a la actividad locomotora de los ratones expuestos a MZ, se observó una disminución significativa de la actividad en el plano vertical para ambas dosis de 30 y 90 mg MZ/kg p.c., mientras que la actividad locomotora en el plano horizontal fue comparable con los ratones normales (Tablas 2-3; Figuras 9-10). Se ha demostrado que MB, el cual contiene Mn al igual que MZ, disminuye la actividad locomotora y potencia los efectos Parkinsonianos de paraquat en ratones (Cicchetti y col., 2005, Costello y col., 2009); además algunos estudios han asociado la exposición crónica a MB con la EP en humanos (Thrash y col., 2007, Costello y col., 2009). Morato y colaboradores (1989), en un estudio sobre la exposición aguda de ratas adultas a 30, 60 y 100 mg MB/kg p.c., encontraron que se produce una inhibición sobre la actividad locomotora, agresividad y aumento de tiempo de sueño inducido por barbitúricos, lo cual indica el efecto depresivo de MB sobre el SNC, acotando además que este puede estar mediado por alteraciones en el sistema dopaminérgico. Ratones machos expuestos durante el desarrollo postnatal, entre P5 y P19, a 30 mg MB/kg p.c., dos veces por semana durante tres semanas,

mostraron una reducción del 70% en la actividad motora dos semanas después de la última exposición, asociando la hipoactividad a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales que ocasiona a su vez una reducción significativa de los niveles de dopamina (Thiruchelvam y col., 2000; 2002). Posteriormente, varios trabajos en animales de experimentación proveyeron más evidencias sobre los daños al sistema dopaminérgico nigroestriatal producido por la exposición sólo a MB o en combinación con PQ, demostrando el efecto sinérgico de mezcla de plaguicidas para causar toxicidad (Thiruchelvam y col., 2003; Thrash y col., 2007; Cicchetti y col., 2005).

En contraste, se ha demostrado en trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio (Miranda-Contreras y col., 2005; Benítez-Díaz y Miranda-Contreras, 2009) que las crías de ratonas madres expuestas a PQ, MZ o una combinación de ambos, entre el día de gestación E12 y E20, mostraron hiperactividad dos semanas después del nacimiento y luego, hipoactividad a los P30. En este caso, la exposición prenatal a MZ podría haber causado efectos adversos a la glándula tiroides ya que, en roedores, el desarrollo de este órgano ocurre entre E9 y E17, trayendo consecuencias negativas al desarrollo de las crías debido a la gran importancia de las hormonas tiroideas en los eventos tempranos del desarrollo cerebral (Howdeshell, 2002). Adicionalmente, el período de neurogénesis de las regiones cerebrales involucradas en la coordinación de movimiento, tales como los ganglios basales, el cerebelo y la médula espinal, comienza a partir de E11 y su período de maduración se extiende hasta el día de nacimiento (Howdeshell, 2002), con la excepción del cerebelo cuyo período de desarrollo se extiende hasta los seis semanas después de nacimiento (Chizhikov y Millen, 2003), por lo tanto, la toxicidad del MZ podría haber afectado también el desarrollo de estas regiones.

En este trabajo, hemos evaluado también los efectos tóxicos de la exposición subcrónica a AT y MZ de ratones machos, desde la etapa de infancia hasta adulto joven, sobre la neurotransmisión aminoacídica hipotalámica. Al finalizar la exposición crónica a AT y MZ, hemos observado incrementos significativos en los niveles de neurotransmisores aminoacídicos excitatorios, Asp y Glu, en los ratones expuestos tanto a 10 mg AT/kg p.c. así como a 30 mg MZ/kg p.c., y al triplicar la dosis de cada uno, 30 mg AT/kg p.c. y 90 mg MZ/kg p.c., los niveles de Asp y Glu aumentaron casi cinco y diez veces, respectivamente, en comparación al grupo control (Tablas 4-5; Figuras 11-12). También llama la atención que la cantidad de Asp encontrado fue significativamente mayor que la de Glu. Se ha propuesto que el Asp y el Glu

tienen diferentes funciones neurobiológicas, las cuales involucran la activación de diferentes poblaciones del receptor NMDA (Bradford y Nadler, 2004). El Glu activa predominantemente los receptores NMDA localizados en la membrana postsináptica; la activación de estos receptores promueve la sobrevivencia neuronal, en parte por el realce de la actividad de la Proteína Elemento de Respuesta de Unión al AMP cíclico (CREB, siglas en inglés) y la expresión del Factor Neurotrófico Derivado Cerebral (BDNF, siglas en inglés), que regula la sobrevivencia neuronal. Por otra parte, el Asp activa los receptores NMDA extrasinápticos, los cuales tienen efectos contrarios a la función de CREB; la liberación excesiva de Asp puede estar causando excitotoxicidad por la activación de receptores NMDA extrasinápticos (Hardingham y col., 2002; Vanhoutte y Bading, 2003), aparte de otros eventos celulares que conducen a la excitotoxicidad, disfunción neuronal y degeneración (Lau y Tymiansky, 2010). En este sentido, es posible que la exposición subcrónica a 30 mg AT/kg p.c. (Figura 11) o a 90 mg MZ/kg p.c. (Figura 12), las cuales produjeron un incremento sustancial en los niveles hipotalámicos de Asp, estarían causando una activación excesiva de receptores NMDA extrasinápticos, que a su vez pueden estar provocando una excitotoxicidad crónica, como se ha demostrado con la capacidad de AT y MZ de inducir estrés oxidativo (Rodriguez y col., 2005; Harrison y col., 2012). La activación del sistema neuroendocrino mediado por la señalización glutamatérgica a través de la co-liberación de Glu con péptidos hipofisiotrópicos representaría un mecanismo de adaptación importante (Hrabovszky y Liposits, 2008).

Con respecto a la neurotransmisión aminoacídica inhibitoria en el hipotálamo, numerosas evidencias sugieren que GABA juega un papel importante en el control central simpático y cardiovascular, además, contribuye en la modulación de la liberación de las hormonas hipofisiarias, que actúan sobre los diferentes sistemas neuroendocrinos. GABA ejerce una acción inhibitoria sobre la secreción peptídica y catecolaminérgica (Li y col., 2006; Schöne y Burdakov, 2012). Similarmente a GABA, la Gly también actúa como un neurotransmisor en las sinapsis inhibitorias del SNC, activando receptores glicinérgicos ionotrópicos y metabotrópicos. Además, la Gly puede actuar como co-agonista en los receptores excitatorios NMDA, por lo tanto, también ejerce una función neuromoduladora excitatoria (Mallick y col., 2010). Un número sustancial de fibras Gly-inmunoreactivas se encuentran en los núcleos anterior, posterior, lateral, paraventricular y préóptica del hipotálamo (van den Pol y Gorcs, 1988). La Gly juega un papel

importante en la regulación del ritmo circadiano de las células del núcleo supraquiasmático hipotalámico (Mordel y col., 2011).

La Tau es otro neurotransmisor magnocelulares (Decavel y Hatton, 1995) inhibitorio que se encuentra en altas concentraciones en el hipotálamo (Miranda-Contreras y col., 1998; Palacios-Prü y col., 1998). Se ha reportado que la Tau hiperpolariza las neuronas neurosecretoras y reduce la liberación de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), potenciando la actividad de las neuronas GABAérgicas, por ende actuando también como un neuromodulador excitatorio (Arias y col., 1994). Otras funciones que se han atribuido a la Tau incluyen el papel de osmoregulador (Huxtable, 1989) y como gliotransmisor, que se libera de las células gliales y actúa como neurotransmisor inhibitorio activando receptores glicinérgicos neuronales (Hussy y col., 2000; Choe y col., 2012).

En relación a la función neuroendocrina sobre el sistema reproductivo, el eje hipotálamo-hipófisis-gónada sufre cambios a lo largo del ciclo de vida reproductiva, responsables del desarrollo, la pubertad, la etapa adulta y senescencia del sistema reproductivo (Gore, 2008). Este proceso natural está regulado por el circuito neural que controla el hipotálamo, incluyendo las células que producen y liberan la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y sus neurotransmisores regulatorios. El Glu y el GABA son los principales neurotransmisores excitatorio e inhibitorio del SNC, los cuales contribuyen en la modulación de este eje durante toda la vida, a través de sus acciones directas sobre los receptores de GnRH e indirectamente sobre otros circuitos neurales hipotalámicos. Por lo tanto, la modulación de las células neurosecretoras GnRH depende del balance de las interacciones de Glu y GABA sobre estas células y las consecuencias funcionales de estas interacciones influyen sobre la fisiología reproductiva a lo largo del ciclo de vida (Maffucci y Gore, 2009).

En este estudio, se ha encontrado un incremento significativo en los niveles de GABA, Gly y Tau en los ratones expuestos subcrónicamente a las dosis altas de 30 mg AT/kg p.c. y 90 mg MZ/kg p.c., desde la etapa pubertal hasta adulto joven (Tabla 5, Figuras 12); no se encontraron cambios importantes en los ratones sometidos a las dosis bajas de 10 mg AT/kg p.c. y 30 mg MZ/kg p.c. (Tabla 4, Figura 11). Por otra parte, a pesar del aumento en los niveles de los neurotransmisores inhibitorios (GABA + Gly) en el hipotálamo de los ratones expuestos a las dosis altas de AT y MZ, este incremento no compensa el aumento en los niveles de neurotransmisores excitatorios (Asp + Glu), resultando en un desbalance en la relación

excitación/inhibición (E/I) de 2,08 ($p = 0,001$) para la dosis de 30 mg AT/kg p.c., y 2,56 ($p < 0,0001$) para la dosis de 90 mg MZ/kg p.c., es decir, existe un estado de sobre-excitación importante en la etapa adulta luego de la exposición subcrónica a estos plaguicidas durante el periodo pubertal hasta adulto joven, entre P11 y P55 (Tabla 5, Figura 13). Con respecto al grupo control, se puede apreciar el balance en la relación de E/I igual a 1,0 (Tablas 4-5, Figura 13), el cual indica un normal proceso de maduración y refinamiento de la función hipotalámica. Durante el desarrollo, el balance entre excitación e inhibición regula la excitabilidad neuronal en su totalidad, el cual es crítico para el normal funcionamiento y plasticidad cerebral (Hensch y Fagiolini, 2005). Debido a que el circuito neural hipotalámico está regulado por los sistemas glutamatérgicos y GABAérgicos, entre otros, un desbalance entre estos sistemas puede contribuir a la excitotoxicidad y la muerte neuronal.

Los resultados histológicos y ultraestructurales contribuyeron en demostrar los efectos tóxicos de la exposición temprana a los plaguicidas AT y MZ sobre el desarrollo hipotalámico del ratón macho. Mediante microscopia de luz de alta resolución y microscopia electrónica de transmisión, se evidencia la degeneración de las células neurosecretoras, tanto las magnocelulares como las parvocelulares, en proceso de muerte celular o de apoptosis, así como un gran deterioro de la región de neuropila, donde los procesos axónicos y dendríticos mostraron importantes alteraciones morfológicas (Figuras 14-19). Igualmente se evidencia daños en las células gliales hipotalámicas. Las alteraciones ultraestructurales observadas en las mitocondrias, así como en la región de neuropila, concuerdan con lo referido en procesos de neurodegeneración por excitotoxicidad, debido al aumento en la liberación de neurotransmisores excitatorios, así como a la formación de radicales libres, lo cual directamente puede afectar toda la estructura celular, causando un aumento en los procesos de autofagia de organelas dañadas o a la activación de los procesos de muerte celular programada (Arundine y Tymianski, 2003).

Se ha demostrado que la AT induce apoptosis en las neuronas principales del hipotálamo, además indican que este herbicida tiene un impacto negativo sobre el funcionamiento hipotalámico (Figuras 14-15). Es importante resaltar que las regiones de neuropila edematizadas alternan con áreas que conservan sus características ultraestructurales, lo que nos permite inferir que el efecto de AT es selectivo y no afecta en forma generalizada al tejido hipotalámico.

Con respecto al MZ, las evidencias histológicas demuestran que en altas dosis del fungicida, se observa un mayor deterioro del tejido hipotalámico, evidenciado por daños en la

región de neuropila, en la cual los procesos axónicos mostraron desmielinización y se pudo apreciar zonas cicatrizadas en forma de estriaciones, indicando la ocurrencia de una gliosis celular. Como se menciona anteriormente, el MZ, así como otros ditiocarbamatos, ha sido relacionado con alteraciones de la glándula tiroidea, específicamente como un causante de hipotiroidismo en el individuo, lo cual afecta la memoria y las funciones cognitivas; además se conoce que a nivel molecular, esta enfermedad causa alteraciones en la transmisión sináptica, específicamente en los receptores NMDA y de la tirosina quinasa. Igualmente se ha reportado que el hipotiroidismo causa disminución en el número de neuronas del hipocampo promoviendo la apoptosis y la gliosis en el SNC (Cortés y col., 2012). Esto fue observado en los cortes histológicos del presente estudio, donde se muestra, con las dosis utilizadas, la muerte neuronal y evidencias histológicas de gliosis en la región de neuropila del tejido hipotalámico. Estos hallazgos histológicos coinciden con otros trabajos donde se ha reportado que la apoptosis y la gliosis son cambios citológicos descritos en la enfermedad de Alzheimer y en la EP (Deng y Poretz., 2003; Perny y Nilsson, 2005; Gardoni y col., 2010).

Es importante señalar que en la literatura consultada se indica que es a partir de dosis mayores de 500 mg MZ/kg p.c., cuando se observan signos de neurotoxicidad, pero en el presente trabajo se evidenciaron señales importantes de efectos tóxicos en el tejido nervioso a partir de la administración subcrónica de la dosis de 30 mg/kg peso, durante un periodo prolongado de tiempo, entre P11 y P55. Además, es relevante indicar que los hallazgos histológicos corroboran los resultados obtenidos de comportamiento, así como neuroquímicos obtenidos en este trabajo. Igualmente, los daños morfológicos encontrados en el tejido hipotalámico estudiado se asemejan a los cambios neurológicos observados en el desarrollo del hipotiroidismo y del Síndrome Parkinsoniano, debido a la alta desmielinización de los axones hipotalámicos y a la muerte neuronal y glial encontrada en los animales expuestos (Axelstad y col., 2011; Cortés y col., 2012).

La sinaptogénesis, apoptosis y mielinización son procesos normales del desarrollo del sistema nervioso que se dan principalmente en el periodo postnatal de los mamíferos (Rice y Barone; 2000), de allí que cualquier alteración de estos procesos trae graves consecuencias en el individuo. La exposición a neurotóxicos durante estos períodos críticos del desarrollo conlleva a la aparición de desórdenes neurológicos y de comportamiento, así como el desarrollo de enfermedades neuropatológicas y envejecimiento prematuro del individuo. Los resultados

histológicos obtenidos en este trabajo corroboran los efectos negativos descritos, donde los animales expuestos a MZ presentaron daños importantes e irreversibles en el tejido hipotalámico, aún a dosis bajas.

Los procesos de mielinización y gliogénesis en los mamíferos comienza durante el nacimiento y se prolonga hasta la edad adulta joven (Rice y Barone; 2000), y cualquier daño o alteración en estos procesos tiene efectos adversos en el individuo. En este trabajo demostramos daños importantes del MZ sobre los oligodendrocitos y el proceso de mielinización durante el desarrollo postnatal tardío, adolescencia y adulto joven, así como el daño en los astrocitos y sus efectos negativos sobre las neuronas hipotalámicas, como consecuencia del estrés oxidativo y excitotoxicidad debido a la exposición a este fungicida.

www.bdigital.ula.ve

IV.2 CONCLUSIONES.

En este estudio, hemos aportado evidencias sobre los cambios en el desarrollo físico de los ratones expuestos de manera crónica a bajas dosis de los plaguicidas Atrazina y Mancozeb, durante el período de desarrollo entre la etapa prepuberal y adulto joven, que puede estar relacionado con la alteración del sistema neuroendocrino, el cual a su vez afecta el funcionamiento de la glándula tiroides.

Los ratones expuestos a la mayor dosis de Atrazina y Mancozeb mostraron una hipoactividad en comparación con los animales control, lo cual indica el efecto depresivo de Atrazina y Mancozeb sobre el Sistema Nervioso Central, que puede estar asociado no solamente con la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales comprobada por otros investigadores, sino también por los daños causados a las neuronas hipotalámicas del sistema neuroendocrino, como se ha demostrado con evidencias morfológicas en este estudio.

Con evidencias neuroquímicas, mediante el análisis de los neurotransmisores aminoacídicos excitatorios e inhibitorios, hemos demostrado que existe un estado de sobre-excitación importante en la etapa adulta de los ratones sometidos a una exposición subcrónica a la mayor dosis de Atrazina (30 mg/kg p.c.) y Mancozeb (90 mg/kg p.c.), desde la etapa prepuberal hasta adulto joven.

El incremento significativo en los niveles de aspartato y glutamato relativo a GABA, glicina y taurina, luego de la exposición subcrónica a Atrazina (30 mg/kg p.c.) y Mancozeb (90 mg/kg p.c.) durante el período crítico del desarrollo cerebral, se evidencia claramente en un desbalance de la relación excitación/inhibición (E/I) del circuito neural hipotalámico; este estado de desbalance entre los sistemas glutamatérgicos y GABAérgicos puede contribuir a la excitotoxicidad y la muerte neuronal.

IV.3 BIBLIOGRAFÍA

1. Alavanja C.R, Hoppin J.A, Kamel F. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Health* 2004;25:155-197
2. Albrecht J, Sidoryk-Wegrzynowicz M, Zielińska M, Aschner M. Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biol* 2010;6(4):263-276
3. Alvarado L, Serrano R. Neurotoxicidad por pesticidas. *Synapsis Boletín Universitario de Neurociencia* 2007;2(3):22-28
4. Alvarez L. Mineralización del herbicida desmetrina mediante procesos electroquímicos de oxidación avanzada. Tesis de Maestría en Ingeniería Agrícola. Escola Universidad de Ingeneria 2010:104
5. Arias P, Goroll D, Convertini V, Jarry H, Wuttke W. Effects of taurine on basal and stimulated luteinizing hormone (LH) and LH-releasing hormone secretion in ovariectomized rats: in vitro studies. *Brain Res* 1994;634(2):325-332
6. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 2003;34(4-5):325-337
7. Axelstad M, Boberg J, Nellemann C, Kiersgaard M, Jacobsen PR, Christiansen S, Hougaard KS, Hass U. Exposure to the widely used fungicide mancozeb causes thyroid hormone disruption in rat dams but no behavioral effects in the offspring. *Toxicol Sci* 2011;120(2):439-446
8. Banerjee B, Seth V, Bhattacharya A, Pasha S, Chakrabortyak. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers *Toxicol Lett* 1999;107:33-47
9. Bardullas U, Giordano M, Rodríguez VM. Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicol Teratol* 2011;33(2):263-272
10. Bear MF, Connors B, Paradiso M. Neurociencia. La exploración del cerebro. Wolters Klumer / Lippincott Williams & Wilkins, 3º Edición, 2008
11. Belloni V, Dessì-Fulgheri F, Zaccaroni M, Di Consiglio E, De Angelis G, Testai E, Santochirico M, Alleva E, Santucci D. Early exposure to low doses of atrazine affects behavior in juvenile and adult CD1 mice. *Toxicology* 2011;279(1-3):19-26
12. Benítez-Díaz P, Miranda-Contreras L. Effects of prenatal exposure to paraquat on the development of amino acid synaptic transmission in mouse cerebral parietal cortex. *Invest Clin* 2009;50(4):465-478

13. Betz H, Laube B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem* 2006;97(6):1600-1610
14. Boelens PG, Houdijk AP, de Thouars HN, Teerlink T, van Engeland MI, Haarman HJ, van Leeuwen PA. Plasma taurine concentrations increase after enteral glutamine supplementation in trauma patients and stressed rats. *Am J Clin Nutr* 2003;77(1):250-256
15. Bradford SE, Nadler JV. Aspartate release from rat hippocampal synaptosomes. *Neuroscience* 2004;128(4):751-765
16. Briz V, Galofré M, Suñol C. Reduction of glutamatergic neurotransmission by prolonged exposure to dieldrin involves NMDA receptor internalization and metabotropic glutamate receptor 5 downregulation. *Toxicol Sci* 2010;113(1):138-149
17. Broerse M, van Gestel CA. Mixture effects of nickel and chlorpyrifos on *Folsomia candida* (Collembola) explained from development of toxicity in time. *Chemosphere* 2010;79(9):953-957
18. CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention). Su fuente confiable de información sobre salud en Internet. *Revista Prevención Enfermedades Crónicas* 2005 <http://www.cdc.gov/spanish/pcd/2005.html>. Consultada 30 de Enero, 2013
19. Cecconi S, Paro R, Rossi G, Macchiarelli G. The effects of the endocrine disruptors dithiocarbamates on the mammalian ovary with particular regard to mancozeb. *Curr Pharm Des* 2007;13(29):2989-3004
20. Chizhikov V, Millen KJ. Development and malformations of the cerebellum in mice. *Mol Genet Metab* 2003;80(1-2):54-65
21. Choe KY, Olson JE, Bourque CW. Taurine release by astrocytes modulates osmosensitive glycine receptor tone and excitability in the adult supraoptic nucleus *J Neurosci* 2012;32(36):12518-72
22. Cicchetti F, Lapointe N, Roberge-Tremblay A, Saint-Pierre M, Jimenez L, Ficke B. Systemic exposure to paraquat and maneb models early parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiology* 2005;20:360-371
23. Coban A, Filipov NM. Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. *J Neurochem* 2007;100(5):1177-1187
24. Colborn T. Neurodevelopment and endocrine disruption. *Environ Health Perspect* 2004; 112:944-949

25. Cooper RL, Stoker TE, Tyrey L, Goldman JM, McElroy WK. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol Sci* 2000;53(2):297-307
26. Córdoba PD. Toxicología. Editorial Manual Moderno, Cuarta Edición, Bogotá, Colombia 2000;167-173
27. Cortés C, Eugenin E, Aliaga E, Carreño LJ, Bueno SM, Gonzalez PA, Gayol S, Naranjo D, Noches V, Marassi MP, Rosenthal D, Jadue C, Ibarra P, Keitel C, Wohllk N, Court F, Kalergis AM, Riedel CA. Hypothyroidism in the adult rat causes incremental changes in brain-derived neurotrophic factor, neuronal and astrocyte apoptosis, gliosis, and deterioration. *Thyroid* 2012;22(9):951-963
28. Cortes-Romero C, Galindo F, Galicia Isasmendi S, Flores A. GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Rev Neurol* 2011; 52: 665-75
29. Costa LG, Giordano G, Guizzetti M, Vitalone A. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci* 2008;13:1240-1249
30. Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol* 2009;169(8):919-926.
31. Debbarh I, Rambelomana S, Penouil F, Castaigne F, Poisot D, Moore N. Human neurotoxicity of ethylene-bis-dithiocarbamates (EBDC). *Rev Neurol* 2002;158:1175-1180
32. Decavel C, Hatton GI. Taurineimmunoreactivity in the rat supraoptic nucleus: prominent localization in glial cells. *J Comp Neurol* 1995;354(1):13-26
33. Deng W, Poretz RD. Oligodendroglia in developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2003;24(2):161-178
34. Domico LM, Zeevalk GD, Bernard LP, Cooper KR. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicology* 2006;27(5):816-825
35. Drechsel D and Patel M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Rad Biol Med* 2008;44(11):1873-1886
36. Durand D, Pampillo M, Caruso C, Lasaga M. Role of metabotropic glutamate receptors in the control of neuroendocrine function. *Neuropharmacology* 2008;55(4):577-583

37. Eskenazi B, Rosas LG, Marks AR, Bradman A, Harley K, Holland N, Johnson C, Fenster L, Barr DB. Pesticide toxicity and the developing brain. *Nordic Pharmacol Soc* 2008;102:228-236
38. European Comission. Directorate-General Environment. Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption – preparation of a candidate list of substances as a basis for priority setting, final report. BKH Consulting Engineers/TNO Nutrition and Food Research, Delft, The Netherlands 2000.
39. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). International code of conduct on the distribution and use of pesticides. Roma. FAO; 1986
40. Flores-García M, Molina-Morales Y, Balza-Quintero A, Benítez-Díaz P, Miranda-Contreras L. Residuos de plaguicidas en aguas para consumo humano en una comunidad agrícola del Estado Mérida, Venezuela. *Invest Clin* 2011;52(4):295-311
41. Fox DA, Grandjean P, de Groot D, Paule MG. Developmental origins of adult diseases and neurotoxicity: epidemiological and experimental studies. *Neurotoxicology* 2012; 33(4):810-816
42. Gammon DW, Aldous CN, Carr WC Jr, Sanborn JR, Pfeifer KF. A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects. *Pest Manag Sci* 2005; 61(4):331-355
43. García F, Pedraza C, Tornero D, Navarro J. Dopamina y neurotoxicidad. *Rev Psiq Biol* 2006;13(1):14-21
44. Gardoni F, Ghiglieri V, Luca Md, Calabresi P. Assemblies of glutamate receptor subunits with post-synaptic density proteins and their alterations in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 2010;183:169-180
45. Gasnier, B. The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflugers Arch* 2004;447:756-759
46. Goldner WS, Sandler DP, Yu F, Hoppin JA, Kamel F, Levan TD. Pesticide use and thyroid disease among women in the Agricultural Health Study. *Am J Epidemiol* 2010;171(4):455-464
47. Gonzalez R, Bello J. Evaluación química y biológica del ditiocarbamato durante sus estudios preclínicos. Estudios de estabilidad. *Rev Cubana Oncol* 1999;15(3):193-198
48. Gore A, Patisaul Heather B. Neuroendocrine Disruption: Historical Roots, Current Progress, Questions for the Future. *Front Neuroendocrinol* 2010;31(4):395–399

49. Gore A. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 2008;29(3):358-374
50. Gore A. Neuroendocrine targets of endocrine disruptors. *Hormones (Athens)* 2010;9(1):16-27
51. Graymore M, Stagnitti F, Allinson G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ Int* 2001;26(7-8):483-49
52. Gutiérrez M. Urgencias toxicologicas. Capítulo 1, Triazinas. CIATOX 2005. <http://www.encolombia.com/medicina/Urgencias/toxicologicas/Triazinas.htm>. Revisado 02 de Enero, 2013
53. Guzmán C, Zambrano E. Compuestos disruptores endocrinos y su participación en la programación del eje reproductivo. *Rev Inv Clin* 2007;59(1):73-81
54. Hagar HH. The protective effect of taurine against cyclosporine A-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Toxicol Lett* 2004;15;151(2):335-343
55. Hardingham GE, Bading H. Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochim Biophys Acta* 2002;1600(1-2):148-153
56. Harrison A, Chou E, Gray J, Pokrywka N, Raley-Susman K. Mancozeb-induced behavioral deficits precede structural neural degeneration. *Neurotoxicology* 2012;34: 74-81
57. Hayes TB, Anderson LL, Beasley VR, de Solla SR, Iguchi T, Ingraham H, Kestemont P, Kniewald J, Kniewald Z, Langlois VS, Luque EH, McCoy KA, Muñoz-de-Toro M, Oka T, Oliveira CA, Orton F, Ruby S, Suzawa M, Tavera-Mendoza LE, Trudeau VL, Victor-Costa AB, Willingham E. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;127(1-2):64-73
58. Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haefele C, Haston K, Lee M, Mai VP, Marjua Y, Parker J, Tsui M. Pesticide mixtures, endocrine disruption and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environ Health Perspect* 2006;114(1):40-50
59. Hayes TB, Khoury V, Narayan A, Nazir M, Park A, Brown T, Adame L, Chan E, Buchholz D, Stueve T, Gallipeau S. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proc Natl Acad Sci* 2010;107(10):4612-461
60. Hensch TK, Fagiolini M. Excitatory-inhibitory balance and critical period plasticity in developing visual cortex. *Prog Brain Res* 2005;147:115-1124

61. Hernández AF, Lacasaña M, Gil F, Rodríguez-Barranco M, Pla A, López-Guarnido O. Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene-environment interaction perspective. *Toxicology* 2012;1:16-35
62. Hernández M, Morgante V, Avila M, Villalobos P, Miralles P, González M, Reiff C, Moore E, Seeger M. Novel s-triazine degrading bacteria isolated from agricultural soils of central Chile for herbicide bioremediation. *Electron J Biotechnol* 2008;11(5):1-8
63. Hernández M. Study of microbial communities in simazine treated agricultural soils and their biotechnological potential. Tesis Doctoral en Ciencias de Recursos Naturales, Universidad de la Frontera, Chile, 2010:175
64. Hotchkiss K, Rider V, Blystone R, Wilson S, Hartig C, Ankley T, Foster M, Gray L, Gray LE. Fifteen years after "Wingspread"--environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol Sci* 2008;105(2):235-259
65. Howdeshell KL. A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system. *Environ Health Perspect*. 2002;110 Suppl 3:337-348
66. Hrabovszky E, Liposits Z. Novel aspects of glutamatergicsignalling in the neuroendocrine system *J Neuroendocrinol* 2008;20(6):743-751
67. Hulbert AJ. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2000;75(4):519-631
68. Hussy N, Deleuze C, Desarménien MG, Moos FC. Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Prog Neurobiol* 2000;62(2):113-134
69. Huxtable RJ Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. *ProgNeurobiol* 1989;32(6):471-533
70. Jacobsen PR, Christiansen S, Boberg J, Nellemann C, Hass U. Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition, causes pup mortality and affects sexual differentiation in rats. *Int J Androl* 2010;33(2):434-442
71. Jacobson JL, Jacobson SW. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N Engl J Med* 1996;335:783-789
72. Kackar R, Srivastava M, Raizada R. Studies on rat thyroid after oral administration of mancozeb: morphological and biochemical evaluations. *J Appl Toxicol* 1997;17(6):369-75

73. Kamel F, Hoppin J. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Env Health Perspect* 2004;112(9):950-958
74. Kandell E, Schwartz H, Jessell T. *Principios de Neurociencia*, 4a edición, Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid, España, 2001; 890
75. Klaassen CD, Watkins III JB. *Manual de Toxicología*, 5a Edición, MacGraw-Hill Interamericana, 2001, 981
76. Kooistra L, Crawford S, Baar A.L. Neonatal effects of maternal hypothyroxinemia during early pregnancy. *Pediatric* 2006;117:161-167
77. Kucka M, Pogrmic-Majkic K, Fa S, Stojilkovic SS, Kovacevic R. Atrazine acts as an endocrine disrupter by inhibiting cAMP-specific phosphodiesterase-4. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;265(1):19-26
78. Kumari N, Prentice H, Wu JY. Taurine and its neuroprotective role. *Adv Exp Med Biol.* 2013;775:19-27
79. Laetz CA, Baldwin DH, Collier TK, Hebert V, Stark JD, Scholz NL. The synergistic toxicity of pesticide mixtures: implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon. *Environ Health Perspect* 2009;117(3):348-53
80. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* 2010;460(2):525-542
81. Legendre, P. The glycinergic inhibitory synapse. *Cell. Mol. Life* 2001;58:760-793
82. Levin E, Timofeeva O, Yang L, Petro A, Ryde I, Wrench N, Seidler F, Slotkin T. Early postnatal parathion exposure in rats causes sex-selective cognitive impairment and neurotransmitter defects which emerge in aging. *Behav Brain Res* 2010;208(2):319-27
83. Li AA, Lowe, KA, McIntosh LJ, Mink PJ. Evaluation of epidemiology and animal data for risk assessment: Chlорpyrifos developmental and neurobehavioral outcomes. *J Toxicol Env Health, Part B* 2012;15:109-184
84. Li YF, Jackson KL, Stern JE, Rabeler B, Patel KP. Interaction between glutamate and GABA systems in the integration of sympathetic outflow by the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(6):H2847-2856
85. Liu J, A. Morrow L, Devaud L, Grayson D, Lauder J. GABA_A receptors mediate trophic effects of GABA on embryonic brainstem monoamine neurons in vitro. *J Neurosci* 1997;17(7):2420-2428

86. Liu J, A. Morrow L, Devaud L, Grayson D, Lauder J. Regulation of GABA_A receptor subunit mRNA expression by the pesticide dieldrin in embryonic brainstem cultures: A quantitative, competitive reverse transcription-polymerase chain reaction study. *J Neurosci* 1998;49(5):645–653
87. Maffucci JA, Gore AC. Chapter 2: hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA. *Int Rev Cell Mol Biol* 2009;274:69-127
88. Mallick HN, Kondoh T, Nishijo H, Ono T, Torii K. Glycine enhances glutamate-induced excitation in ventromedial hypothalamic neurons in awake rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 2010;54(4):355-360
89. Marcaggi P , Hirji N , D Attwell . La liberación de L-aspartato por inversión de los transportadores de glutamato. *Neurofarmacología* 2005;49(6):843-849
90. Marsillach J, Richter RJ, Kim JH, Steven RC, MacCoss MJ, Tomazela D, Suzuki SM, Schopfer LM, Lockridge O, Furlong CE. Biomarkers of organophosphate (OP) exposures in humans. *Neurotoxicology* 2011;32:656-660
91. Martínez TN, Greenamyre JT. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 2012;16(9):920-34
92. Martínez C, Vargas C, Rivas S. Estrés oxidativo en neurodegeneración. *Rev Fac Med. UNAM* 2003;46(6):229-235
93. Matés J. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000;153:83-104
94. Mcintre, S. L.; Reimer, R. J.; Schuske, K.; Edwards, Jorgensen, E. M. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 1997;389: 870-876
95. Miller P.C, Sánchez I.E, Mucio R.S, Mendoza S.J, Leon O.M. Los contaminantes ambientales bifenilos policlorinados (PCB) y sus efectos sobre el sistema nervioso y la salud. *Salud Mental* 2009; 32: 335-346
96. Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceño RV, Palacios-Prü EL. Levels of monoamine and amino acid neurotransmitters in the developing male mouse hypothalamus and in histotypic hypothalamic cultures *Int J Dev Neurosci.* 1998;16(5):403-412
97. Miranda-Contreras L, Benítez-Díaz PR, Peña-Contreras Z, Mendoza Briceño RV, Palacios Pru EL. Levels of amino acid neurotransmitters during neurogenesis and in histotypic cultures of mouse spinal cord. *Dev Neurosci* 2002;24:59–70

98. Miranda-Contreras L, Dávila-Ovalles R, Benítez-Díaz P, Peña-Contreras Z, Palacios-Prü E. Effects of prenatal paraquat and mancozeb exposure on amino acid synaptic transmission in developing mouse cerebellar cortex. *Dev Brain Res* 2005;160:19-27
99. Mnif W, Hassine AI, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. *Int J Environ Res Public Health* 2011;8(6):2265–2303
100. Möhler H, Crestani F, Rudolph U. GABA(A)-receptor subtypes: a new pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1(1):22-25
101. Molina-Morales Y, Flores-García M, Balza-Quintero A, Benítez-Díaz P, Miranda-Contreras L. Niveles de plaguicidas en aguas superficiales de una región agrícola del estado Mérida, Venezuela, entre 2008 y 2010. *Rev Int Contam Amb* 2012;28(4):289-301
102. Montiel, L. Noyola G, Rodríguez Córdova M. Alteraciones en los sistemas dopaminérgicos por exposición subcrónica al herbicida atrazina en ratones c57bl/6. Verano de la ciencia 12 2010.
<http://www.veranos.ugto.mx/Memorias/12VeranoCienciaRegionCentro/documentos/250.pdf>
103. Morales C, Rodriguez N. El Clorpirifos: posible disruptor endocrino en bovinos de leche. *Rev Col Cienc Pec* 2004;17(3):255-266
104. Morato GS, Lemos T, Takahashi RN. Acute exposure to maneb alters some behavioral functions in the mouse. *Neurotoxicol Teratol* 1989;11(5):421-425
105. Mordel J, Karnas D, Inyushkin A, Challet E, Pévet P, Meissl H. Activation of glycine receptor phase-shifts the circadian rhythm in neuronal activity in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Physiol* Mordel J, Karnas D, Inyushkin A, Challet E, Pévet P, Meissl H. Activation of glycine receptor phase-shifts the circadian rhythm in neuronal activity in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Physiol.* 2011;589:2287-300
106. Negga R, Rudd DA, Davis NS, Justice AN, Hatfield HE, Valente AE, Fields AS, Fitsanakis VA. Exposure to Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate and glyphosate pesticides leads to neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology* 2011;32(3):331-341
107. OLCA. Observatorio Latinoamericano de Conflictos Ambientales. www.olca.cl./olca/index.htm. Consultada en 12 de Septiembre, 2012.
108. OMS (Organización Panamericana de la Salud). Nuestro planeta, nuestra salud. Informe de la Comisión de Salud y Medio Ambiente de la OMS. Publicación Científica No 544. Washington DC, USA, 1993

109. Oray B, Lu Hs, Gracy RW. High performance liquid chromatographic separation of Dns-amino acid derivaties and applicaions to peptide and protein structural studies. *J Chromatogr* 1983; 270: 253-266
110. Ortega J, Ferris J, Canovas A, Apolinar E, Crehúa E, García J, Carmona M. Neurotóxicos medioambientales (I). Pesticidas: efectos adversos en el sistema nervioso fetal y postnatal. *Acta Pediatr Esp* 2005;63:140-149
111. Palacios-Prü EL, Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceño RV, Lozano-Hernández JR. Hypothalamic synaptogenesis and its relationship with the maturation of hormonal secretion. *Cell Mol Neurobiol*. 1998;18(2):267-84 Review
112. Palma P, Palma VL, Fernandes RM, Soares AM, Barbosa IR. Endosulfan sulphate interferes with reproduction, embryonic development and sex differentiation in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009;72(2) ;344-350
113. Panganiban N, Cortes-Maramba C, Dioquino ML, Suplido H, Ho A, Francisco-Rivera A, Manglicmot Y. Correlation between blood ethylenethiourea and thyroid gland disorders among banana plantation workers in the Philippines. *Environ Health Perspect* 2004;112:42-45
114. Panzica C, Panzica V, Ottinger M. Introduction: neurobiological impact of environmental estrogens. *Brain Res Bull* 2005;65:187-191
115. Pardo B, Rodrigues TB, Contreras L, Garzo' M, Llorente-Folch I, Kobayashi K , Saheki T, Cerdan S, Satru' J. Brain glutamine synthesis requires neuronal-born aspartate as amino donor for glial glutamate formation. *J Cerebr Blood Flow Metab* 2011; (31): 90–101
116. Parent AS, Naveau E, Gerard A, Bourguignon JP, Westbrook GL. Early developmental actions of endocrine disruptors on the hypothalamus, hippocampus, and cerebral cortex. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2011;14(5-7):328-345
117. Payán R.R, Garibay C.G, Rangel A.R, Preciado M.V, Muñoz I.L, Beltrán M.C, Mena M.S, Jave S.L, Feria V.A, De Celis R. Effect of chronic pesticide exposure in farm workers of a Mexico community. *Env Occup Health* 2013; 67 (1): 22-30
118. Pelch K, Beeman J, Niebruegge B, Winkeler S, Nagel S. Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in mammals. En: *Hormones and Reproduction of Vertebrates*, Elsevier 2011;329-371
119. Pérez J, Domingues I, Monteiro M, Soares M, Loureiro S. Synergistic effects caused by atrazine and terbutylazine on chlorpyrifos toxicity to early-life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Environ Sci Pollut Res* 2013; 1-10
120. Perny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005;50(4):427-34

121. Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011;155(3):219 -230
122. Ramírez J, Lacasaña M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor* 2001;4(2):67-75
123. Ramón J.R. Radicales libres y antioxidantes en clínica humana. IDEPSA, España, 1993
124. Represa A, Ben-Ari Y. Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* 2005; 28: 278-83
125. Rice D, Barone J. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 2000;108(3):511-533
126. Ripps H, Shen W. Review: taurine: a "very essential" amino acid. *Mol Vis.* 2012;18:2673-2686
127. Rodriguez V, Thiruchelvam M, Cory-Slechta D. Sustained Exposure to the Widely Used Herbicide Atrazine: Altered Function and Loss of Neurons in Brain Monoamine Systems. *Environ Health Perspect* 2005;113(6):708-715
128. Rodríguez VM, Limón-Pacheco JH, Mendoza-Trejo MS, González-Gallardo A, Hernández-Plata I, Giordano M. Repeated exposure to the herbicide atrazine alters locomotor activity and the nigrostriatal dopaminergic system of the albino rat. *Neurotoxicology* 2013;34:82-94
129. Sáez, G.T. Biopatología de los radicales libres. En: Mecanismos Moleculares y Neuroendocrinos del Balance Energético: Patologías. Eds, Ana María Pascual Leone, Real Academia de Farmacia de Madrid 2005;201-224
130. Salvador A, Donderis S, Olivares C, Guaita M, Espinosa O, Rodríguez J, Fondos M, Guillermo T. El estrés oxidativo en la patología degenerativa. Mecanismos de acción y marcadores de lesión molecular. *Rev Quím Clín* 2003; 25: 49-57
131. Sarkar R, Mohanakumar KP, Chowdrury M. Effects of an organophosphate pesticide, quinalphos, on the hypothalamus-pituitary-gonadal axis in adult male rats. *J Reprod Fertil* 2000;118:29-38
132. Schöne C, Burdakov D. Glutamate and GABA as rapid effectors of hypothalamic "peptidergic" neurons. *Front Behav Neurosci* 2012;6:81-98
133. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 2013;106-107:1-16

134. Slotkin T, Levin E, Seidler F. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphate insecticides: effects on brain development are separable from systemic toxicity. *Environ Health Perspect* 2006;114(5):746-751
135. Slotkin T, Levin E, Seidler FJ. Developmental neurotoxicity of parathion: progressive effects on serotonergic systems in adolescence and adulthood. *Neurotoxicol Teratol* 2009;31(1):11-17
136. Soldin OP, Aschner M. Effects of manganese on thyroid hormone homeostasis: potential links. *Neurotoxicology* 2007;28(5):951-956
137. Spyker J. Assessing the impact of low chemicals on development: behavioral and latent effects. *Fed Proc* 2000;34:1835-1844
138. Stoker TE, Guidici DL, Laws SC, Cooper RL. The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male Wistar rat. *Toxicol Sci* 2002;67(2):198-206
139. Stoscheck CM. Quantitation of protein. En Deutscher MP (Ed), *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press, Vol 182, pp 50-68.
140. Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB, Cory-Slechta DA. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res.* 2000;873(2):225-234
141. Thiruchelvam M, Richfield EK, Goodman BM, Baggs RB, Cory-Slechta DA. Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype. *Neurotoxicology* 2002;23(4-5):621-633
142. Thiruchelvam M, Prokopenko O, Cory-Slechta DA, Buckley B, Mirochnitchenko O. Overexpression of superoxide dismutase or glutathione peroxidase protects against the paraquat +maneb-induced Parkinson disease phenotype. *Biol Chem.* 2005;280(23):2530-2539
143. Thrash B, Uthayathas S, Karuppagounder SS, Suppiramaniam V, Dhanasekaran M. Paraquat and maneb induced neurotoxicity. *Proc West Pharmacol Soc* 2007;50:31-42
144. Tilson H.A. Developmental neurotoxicology of endocrine disruptors and pesticides: identification of information gaps and research needs. *Env Health Perspect* 1998;106(3):807-811
145. Timofeeva OA, Roegge CS, Seidler FJ, Slotkin TA, Levin ED. Persistent cognitive alterations in rats after early postnatal exposure to low doses of the organophosphate pesticide, diazinon. *Neurotoxicol Teratol* 2008;30:38-45

146. Torres-Altoro MI, Mathur BN, Drerup JM, Thomas R, Lovinger DM, O'Callaghan JP, Bibb JA. Organophosphates dysregulate dopamine signaling, glutamatergic neurotransmission, and induce neuronal injury markers in striatum. *J Neurochem* 2011;119(2):303-313
147. Van den Pol AN, Gores T. Glycine and glycine receptor immunoreactivity in brain and spinal cord. *J Neurosci* 1988;8(2):472-492
148. Vanhoutte P, Bading H. Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. *Curr Opin Neurobiol* 2003;13(3):366-371
149. Vera V, Chinopoulos C. Bionergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27(12):639-645
150. Weiss B. The intersection of neurotoxicology and endocrine disruption. *Neurotoxicology* 2011;33(6):1410-1419
151. Wenthold, R. Y Hunter, C. Immunochemistry of glycine and glycine receptors in the central auditory system. En: Glycine neurotransmission.(Ottersen OP, Storm-Mathisen J eds) 1990; 391-415. John Wiley, Chichester
152. Whybrow P, Bauer M. Behavioral and psychiatric aspects of hypothyroidism. En: Braverman LE, Utiger RD, Eds, *The Thyroid*, 9th Edition, 2005;837-842
153. Yamamoto M, Shirai M, Tamura A. Effects of maternal exposure to a low dose of diethylstilbestrol on sexual dimorphic nucleus volume and male reproductive system in rat offspring. *J Toxicol Sci* 2005;30:7-18
154. Yen P. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 2001;81:1097-1142
155. Zoeller RT, Dowling ALS, Herzig CTA, Iannacone EA, Gauger KJ, Bansal R. Thyroid hormone, brain development, and the environment. *Environ Health Perspect* 2002; 110:355-361

IV.4 ANEXOS

www.bdigital.ula.ve

ANEXO 1

Dosis acumulada de Atrazina en ratones machos expuestos durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P55.

EDAD	10 mg AT/kg p.c.			30 mg AT/kg p.c.		
	Nº de Inyecciones	Peso (g)	*Dosis de AT Acumulada	Nº de Inyecciones	Peso (g)	*Dosis de AT Acumulada
11	1	7,86	0,08	1	5,6	0,17
13	2	7,89	0,16	2	6,0	0,35
15	3	8,47	0,24	3	6,2	0,53
18	4	9,17	0,33	4	6,8	0,74
20	5	10,10	0,43	5	7,5	0,96
22	6	11,48	0,55	6	9,1	1,24
25	7	14,50	0,69	7	11,2	1,57
27	8	18,02	0,87	8	13,4	1,98
29	9	19,84	1,07	9	15,8	2,45
32	10	23,73	1,31	10	17,0	2,96
34	11	26,38	1,57	11	19,6	3,55
36	12	28,03	1,85	12	21,1	4,18
39	13	26,99	2,12	13	19,9	4,78
41	14	29,74	2,42	14	23,4	5,48
43	15	29,93	2,72	15	24,3	6,21
46	16	31,29	3,03	16	25,1	6,96
48	17	31,54	3,35	17	25,4	7,73
50	18	32,46	3,67	18	26,0	8,50
53	19	32,87	4,00	19	27,3	9,32
55	20	33,57	4,34	20	23,9	10,04

* Dosis acumulada expresada en mg de Atrazina.

ANEXO 2

Dosis acumulada de Mancozeb en ratones machos expuestos durante el desarrollo postnatal tardío hasta adulto joven, entre P11 y P60.

EDAD	30 mg MZ/kg p.c.			90 mg MZ/kg p.c.		
	Nº de Inyecciones	Peso (g)	□ Dosis de MZ Acumulada	Nº de Inyecciones	Peso (g)	□ Dosis de MZ Acumulada
11	1	5,6	0,2	1	6,6	0,6
13	2	7,0	0,4	2	6,9	1,2
15	3	7,4	0,6	3	6,4	1,8
18	4	8,4	0,9	4	7,8	2,5
20	5	9,3	1,1	5	10,0	3,4
22	6	10,9	1,5	6	11,8	4,5
25	7	15,0	1,9	7	16,1	5,9
27	8	12,8	2,3	8	18,6	7,6
29	9	18,4	2,8	9	17,1	9,1
32	10	22,6	3,5	10	19,7	10,9
34	11	23,7	4,2	11	22,5	12,9
36	12	25,4	5,0	12	24,1	15,1
39	13	27,0	5,8	13	23,1	17,2
41	14	28,6	6,7	14	27,0	19,6
43	15	28,1	7,5	15	28,8	22,2
46	16	28,9	8,4	16	24,7	24,4
48	17	29,9	9,3	17	29,3	27,0
50	18	31,5	10,2	18	27,6	29,5
53	19	32,1	11,2	19	25,5	31,8
55	20	32,1	12,1	20	32,8	34,8

*Dosis acumulada expresada en mg de Mancozeb.