

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA Y LEGISLACIÓN SANITARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Efectos del clodimeformo sobre el desarrollo de los sistemas de neurotransmisores monoaminérgicos en el sistema nervioso central de rata**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**José Manuel García Sánchez**

Directores

María José Anadón Baselga  
María Teresa Frejo Moya  
Javier del Pino Sans

**Madrid, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTOS DEL CLODIMEFORMO SOBRE EL  
DESARROLLO DE LOS SISTEMAS DE  
NEUROTRANSMISORES MONOAMINERGICOS EN  
EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA**



**TESIS DOCTORAL**  
**JOSE MANUEL GARCIA SANCHEZ**  
Madrid 2014

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTOS DEL CLODIMEFORMO SOBRE EL  
DESARROLLO DE LOS SISTEMAS DE  
NEUROTRANSMISORES MONOAMINERGICOS EN EL  
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA**

**Memoria presentada para optar al Grado de Doctor  
por la Universidad Complutense de Madrid  
Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria**

**JOSE MANUEL GARCIA SANCHEZ**

**Madrid 2014**

**Dña. MARIA JOSE ANADON BASELGA**, Profesora Titular del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Facultad de Medicina, **Dña. MARIA TERESA FREJO MOYA** Profesora Titular del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria y **D. JAVIER DEL PINO SANS** Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

**CERTIFICAN:** Que D. JOSE MANUEL GARCIA SANCHEZ ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado: “EFECTOS DEL CLODIMEFORMO SOBRE EL DESARROLLO DE LOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISORES MONOAMINERGICOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA”, el cual consideramos que reúne las condiciones y la calidad científica deseadas para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste se expide el presente certificado en Madrid, a 13 de Mayo de dos mil catorce

La Directora

La Directora

El Director

Fdo: M<sup>a</sup> José Anadón Baselga

Fdo: M<sup>a</sup> Teresa Frejo Moya

Fdo: Javier del Pino Sans

### **Deseo expresar mi agradecimiento:**

- A la Prof. Dra. María José Anadón Baselga, por la dirección de esta Memoria y por todas las enseñanzas y el apoyo recibido a lo largo de este período de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral, así como por todos los medios y consejos puestos a mi disposición.
- A la Prof. Dra. María Teresa Frejo Moya, por la dirección de esta Memoria y por todas las enseñanzas y el apoyo recibido a lo largo de este período de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.
- Al Prof. Dr. Javier del Pino Sans, por la dirección de esta Memoria y por todas las enseñanzas y el apoyo recibido a lo largo de este período de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.
- A mis padres, por estar siempre ahí. Hoy soy yo gracias a ellos.
- A todos mis grandes amigos que me han apoyado desde el comienzo, especialmente Alberto, Jenny, Beatriz, Eduardo, Santiago, Carmen, Michelo, Fernando, Paloma, Mónica, Alfonso, Francisco Javier y Javier. Compañía, cercanía, amistad y... ellos lo saben tan bien como yo.
- A mi gran amiga Isabel ( y gran Doctora también ) por todo su apoyo y por ser luz en los momentos de oscuridad.
- A la Dra. Zeballos, por su sentido del humor.
- A mis grandes amigos Emmanuel, María Milagrosa y José. Luz en el camino. Ayer, hoy y siempre.

## **LISTADO DE ACRONIMOS EMPLEADOS EN ESTA TESIS**

- 5HT: Serotonina
- 5HIAA: 5 hidroxí 3 indolacético
- NA: Noradrenalina
- DA: Dopamina
- DOPAC: Acido 3,4 dihidroxifenilacético
- HVA: Acido homovanílico
- MHPG: 3 metoxi 4 hidroxifenilglicol
- T: Testosterona
- E2: Estradiol
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- SNC: Sistema nervioso central
- pc: Peso corporal
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- EIA: Enzimoimmunoanálisis
- MAO: Monoaminoxidasas
- COMT: Catecol orto metil transferasa
- AD: Aldehído deshidrogenasa
- AR: Aldehído reductasa
- ADN: Acido desoxirribonucleico
- ARN: Acido ribonucleico
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
- ddH<sub>2</sub>O: Agua desionizada y destilada
- Ag: Antígeno
- AchE: Acetilcolinesterasa
- TH: Tirosina hidroxilasa
- TRH: Triptófano hidroxilasa
- BDH: Dopamina  $\beta$  hidroxilasa
- ESM: Error estándar de la media
- HT: Hipotálamo
- MS: Mesencéfalo
- CB: Cerebelo
- BL: Bulbo raquídeo
- MD: Médula espinal
- CF: Corteza frontal
- CE: Cuerpo estriado
- HC: Hipocampo

# **INDICE**

ABSTRACT .....	I
1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DEL TRABAJO .....	1
2. INTRODUCCION .....	4
3. REVISION BIBLIOGRAFICA .....	8
3.1. CLODIMEFORMO .....	9
3.2. RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD .....	11
3.3. MECANISMO DE ACCION .....	15
3.4. SINTOMATOLOGIA Y CUADRO CLINICO .....	23
3.5. ESPECTRO DE ACCION Y USOS .....	24
3.6. METABOLISMO .....	28
3.7. TOXICIDAD EN MAMIFEROS .....	29
3.7.1. Neurotoxicidad .....	44
4. MATERIAL Y METODOS .....	50
4.1. PROTOCOLO Y DISEÑO EXPERIMENTAL .....	51
4.2. DETERMINACION ANALITICA DE SEROTONINA (5-HT), DOPAMINA (DA), NORADRENALINA (NA) Y SUS METABOLITOS	57
4.2.1. Determinación analítica de 5-HT y su metabolito el ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA) .....	58
4.2.2. Determinación analítica de NA y de DA y sus metabolitos, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) .....	62
4.2.3. Determinación analítica del metabolito de la NA el 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) .....	64
4.3. DETERMINACION DE ESTRADIOL Y TESTOSTERONA .....	67
4.3.1. Extracción de testosterona estradiol. ....	68
4.3.2. Determinación de los niveles de testosterona y estradiol.....	69

4.4. DETERMINACION DE LA EXPRESION GENICA DE ENZIMAS QUE CATALIZAN SINTESIS Y METABOLISMO DE AMINAS BIOGENAS	70
4.4.1. Extracción del ARN: Método del Trizol. ....	71
4.4.2. Cuantificación de los ácidos nucleicos .....	72
4.4.3. Control de calidad del ARN .....	73
4.4.4. Síntesis del ADN a partir del ARN extraído. ....	74
4.4.5. Determinación de la expresión génica por PCR a tiempo real.....	74
4.5. ANALISIS DE DATOS .....	76
5. RESULTADOS.....	77
5.1 EFECTOS DEL CLODIMEFORMO SOBRE EL SNC EN RATAS DE 60 DIAS DE EDAD NACIDAS DE MADRES TRATADAS CON CLODIMEFORMO DURANTE LA PREÑEZ Y LACTANCIA.....	78
5.1.1. Efecto sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA .....	85
5.1.2. Efecto sobre el contenido de DA, DOPAC y HVA .....	101
5.1.3. Efecto sobre el contenido de NA y MHPG .....	121
5.1.4. Efecto sobre la expresión génica de enzimas que catalizan la síntesis y metabolismo de la DA, NA y 5-HT.....	137
5.2. EFECTOS DEL CLODIMEFORMO EN RATAS DE 11 DIAS NACIDAS DE MADRES TRATADAS CON CLODIMEFORMO DURANTE LA PREÑEZ Y LACTANCIA.....	146
5.2.1. Efecto del clodimeformo sobre la expresión génica de enzimas que catalizan la síntesis y metabolismo de la DA, NA y 5-HT.....	146
6. DISCUSION DE LOS RESULTADOS .....	155
7. CONCLUSIONES .....	164
8. BIBLIOGRAFIA .....	167

# **ABSTRACT**

## **TITLE**

Chlodimeform effects on the development of monoamine neurotransmitter systems in rat central nervous system.

## **JUSTIFICATION AND OBJECTIVES OF THE WORK**

Pesticides pose a growing health risk, there being a particular concern about the possible permanent effects that these compounds may have on the development of living beings. Thus, it has been described for some formamidine compounds the induction of permanent alterations on the development of the central nervous system such as those that affect monoamine neurotransmitter systems, for which it has been suggested as a possible mechanism of action the inhibition of monoamine oxidase (MAO), though other mechanisms as endocrine disruption on sex hormones that control the expression of enzymes that catalyze the synthesis and metabolism of the monoamine neurotransmitters cannot be excluded, as another possible mechanism to explain the changes of these neurotransmitter systems.

For this reason, this study seeks to ascertain whether the effects of endocrine disruption induced in the brain by chlodimeform is a fundamental mechanism in the permanent disorders on serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems observed in regions of the CNS of rats exposed to chlodimeform during dams pregnancy and during development of the newborn (breast feeding). Chlodimeform was chosen because it is the most representative compound in its group which presents a very low inhibition of MAO, allowing us to study more clearly whether the permanent changes observed on levels of monoamine neurotransmitters are due to endocrine disruption rather than inhibition of MAO.

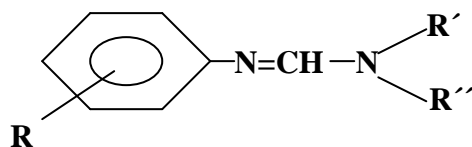
Therefore, the objectives were to determine the possible permanent alterations in serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems in rats at age 60 days, from mothers

who were given chlodimeform during the pregnancy and lactancy, and on the expression of key enzymes which catalyze the synthesis and metabolism of these neurotransmitters in the regions that were affected and the determination of the levels of the primary sex hormones, testosterone and estradiol, on postnatal day 11 in the regions CNS in which permanent disturbance of monoaminergic neurotransmitter systems during development were produced.

This work focuses its interest in providing new data of formamidines induced neurotoxicity during nervous system development as well as the determination of endocrine disruption involvement in the mechanism whereby the neurotoxic effects occur during development, because new compounds of this family are being developed with therapeutic applications for which these effects are not considered in the risk assessment of these compounds which poses a potential health hazard.

## INTRODUCTION

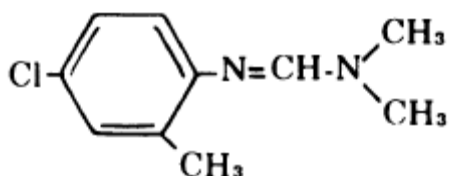
Formamidines (Figure 1), which were developed in the late 1950s and early 1960s, are composed of a broad biological activity spectrum, with bactericidal, antiprotozoal, fungicide, anthelmintic, insecticides, miticides and herbicides effects (HOLLINGWORTH, 1976).



**Figure 1.** General chemical structure of formamidines

Chlodimeform was first marketed in 1966 and used as a broad spectrum acaricide. It is active in the vapor phase and by contact. Also used as a plant protection applied to a wide variety of crops, such as fruits pipes, stone fruits, cabbage, vegetables, grapes, hops, citrus, apples, pears, cherries and strawberries (JMPR, 1998).

Chlodimeform [N2-(4-chloro-o-tolyl)-N1, N1-dimethylformamidine] (Figure 2) is a colorless crystalline solid with slight amine odor. It is very soluble in organic solvents; stable at room temperature, acidic medium but it is sensitive to light and temperature in a basic medium (VOSS et al., 1973).



**Figure 2.** Chlodimeform chemical structure (C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>Cl N<sub>2</sub>).

### **Mechanism of action**

The biological activity of chlodimeform as well as the remaining formamidines can be attributed to the following activities:

#### *Receptor $\alpha_2$ partial agonist*

WU et al. (1990) proved that chlodimeform inhibits binding of agonists and antagonists of  $\alpha$ -2 adrenergic receptor clonidine and yohimbine in rat brain *in vitro*.

### *Inhibition of the enzyme monoamine oxidase (MAO)*

Chlodimeform is a MAO inhibitor which has been proven in studies *in vivo* and *in vitro* (AZIZ and KNOWLES, 1973, BAILEY et al, 1982) .

### *Prostaglandin synthetase inhibition*

YIM et al. (1978) showed that both chlodimeform and amitraz induce inhibition of the synthesis of prostaglandin E2.

### *Antagonist effects of reserpine in vivo*

BEEMAN and MATSUMURA, (1973) found in an *in vivo* experiment that chlodimeform inhibited the effects of reserpine.

### *Endocrine disruption*

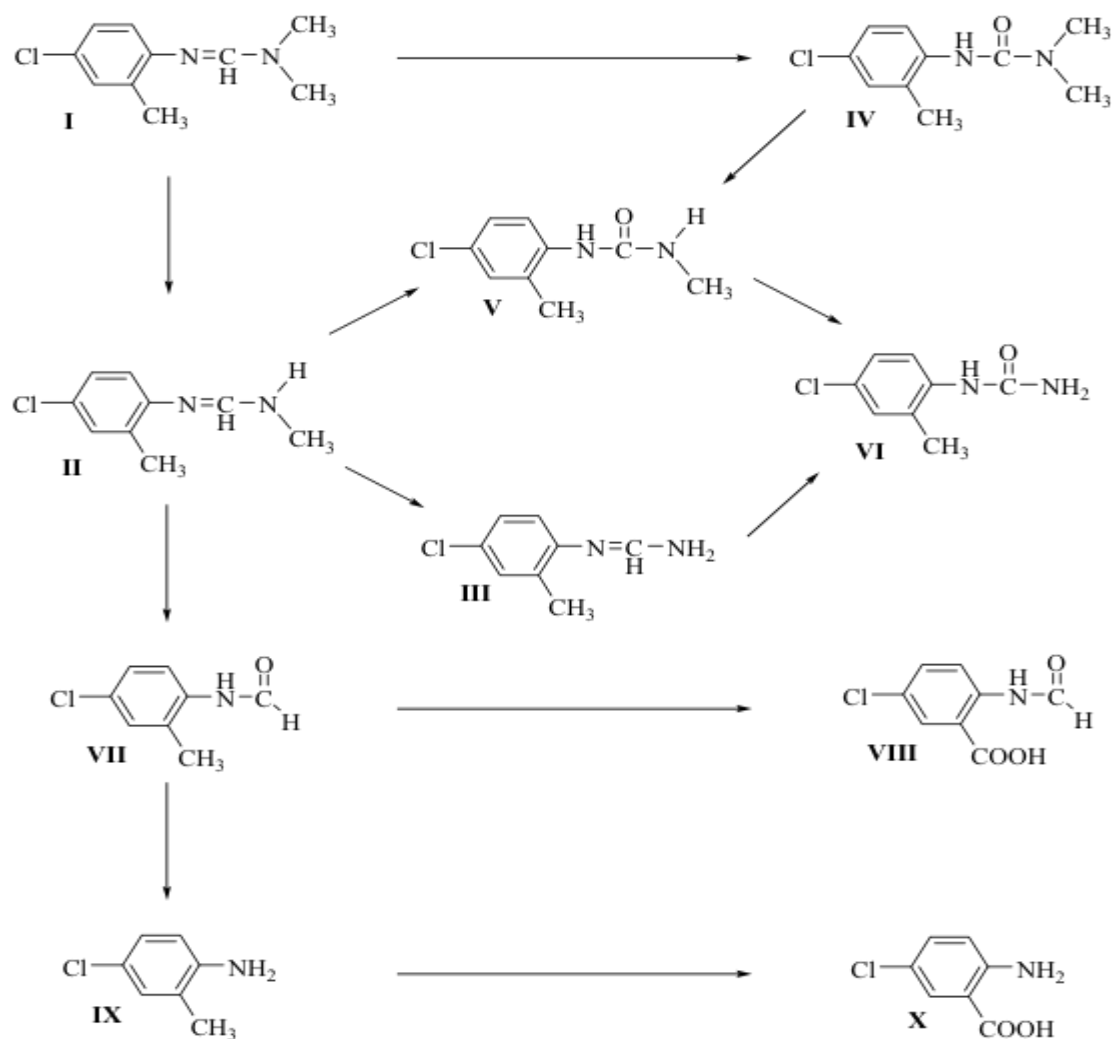
STOKER et al. (1991), determined in a study on the effects of chlodimeform in hormone release, that in rats treated with chlodimeform (20 or 50 mg / kg body weight), there is an increase in prolactin (PL), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosteroid levels (CORT) in a dose dependent manner.

## **Metabolism**

Chlodimeform is extensively metabolized in mammals forming several metabolites, among which we must highlight the N-formyl-4-chloro-o-toluidine (VII) and 4-chloro-o-toluidine (IX) which also present toxicity (Figure 3). Mammals easily absorb chlodimeform

from the gastrointestinal tract and through the skin. It is rapidly excreted, about 80 % in the urine and 10-15% in faeces. After about 10 days low residue levels are observed in all tissues and there is no evidence of bioaccumulation. (JMPR, 1998).

**Figure 4.** Chlodimeform metabolism in animals and humans.



## **Mammalian toxicity**

On trials in several species, chlodimeform administered by oral and dermal route has been shown to have moderate acute toxicity. The major metabolites have been shown to have low oral toxicity in studies performed in rats.

### *Developmental neurotoxicity*

It is known that exposure to pesticides during development can interfere with normal development of neurotransmitter systems and cause direct damage on them (RICHARDSON et al., 2006). The mechanism by which these effects are produced are not known but it is known that the neurotransmitters in the immature nervous system may act as trophic factors mediating processes during development such as cell proliferation and differentiation (RUEDIGER and BOLZ, 2007). Neurotransmitters such as catecholamines appear in the embryo of vertebrates and invertebrates even before neurons have differentiated (PENDLETON et al., 1998).

An altered level of one of the neurotransmitters may modify the development of various neurotransmitter systems (LAUDER, 1985). Experimental studies in rodents show that administration of selective inhibitors of serotonin reuptake in a critical period during development produces changes in neural circuits and behavioral changes such as increased anxiety, aggressive or depressive behavior that persist until the adult age. Similar changes result from the inhibition of the serotonin transporter or MAO involving these two regulators of serotonergic signal changes during development (BORUE et al, 2007; BALER et al, 2008.).

OLSON et al., (1978) conducted the only studies on developmental neurotoxicity of chlodimeform, which examined the effects of prenatal and postnatal exposure after ingestion

of the same dose of 0.1 mg / kg bw / day, noticing that chlodimeform produced alterations in the behavior of the treated animals. Moreover, studies by PALERMO-NETO et al., (1994, 1997) for developmental toxicity for prenatal and postnatal exposure to amitraz, another formadine of similar action to chlodimeform, showed alterations in behavior that suggests the presence of neurochemical and neurophysiological effects from exposure to formamidines during development, effects that were confirmed by DEL PINO et al. , (2011), in a study in which amitraz was administered to pregnant rats during days 6-21 gestation and lactation day 1-10 observing a sex- and region-dependent catecholamine levels alteration at 60 days of age.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Protocol and experimental design**

10 pregnant 200 g female Wistar rats of 60 days old, divided into two groups were used:

Group I (control group, 5 rats) 0.5 mL/day of corn oil was administered to each rat on days 6-21 of gestation, and during days 1-10 of lactation. Treatment was administered orally by intragastric intubation using a syringe attached to a metal cannula.

Group II (5 rats) animals received 5 mg chlodimeform/kg bw during days 6-21 of gestation, and during days 1-10 of lactation. Treatment was administered orally by intragastric intubation using a syringe attached to a metal cannula. Chlodimeform solution was prepared in corn oil at a concentration of 2 mg/ mL, administering a volume corresponding to each rat at the dose of 5 mg/kg body weight.

The dose of 5 mg/ kg was used, as it has been observed in previous studies that it is the highest dose that does not induce maternal toxicity and it does not reduce the intake of food or

water or reduced weight gain for animals during pregnancy and lactation. Moreover this dose does not induce clinical or histopathological signs of toxicity.

Control dams (Group I) and treated dams (Group II) had a litter of  $10 \pm 1$  pups. On day 1 of birth 36 rats were randomly selected (18 females and 18 males) from each group, performing the following subgroups:

- Group I<sup>1</sup> (18 males) (animals born from mother control rats)

-Group I<sup>2</sup> (18 females) (animals born from mother control rats)

-Group II<sup>1</sup> (18 males) (animals born from mother rats treated with chlodyneform)

-Group II<sup>2</sup> (18 females) (animals born from mother rats treated with chlodyneform)

On postnatal day 11 we randomly selected 6 animals for each of the subgroups mentioned and they were sacrificed by cervical dislocation followed by exsanguination and decapitation for determination of estradiol and testosterone hormones. The remaining offspring of all subgroups were maintained individually in cages until the age of 60 days feeding with the normal feed and water ad libitum. Expiry of that 60 day period, the animals were divided into two groups of 24 animals, treated and control group, and then the animals were sacrificed by cervical dislocation followed by exsanguination and decapitation.

Of slaughtered animals randomly selected tissue samples were taken from 12 rats (6 females and 6 males) from each group for each of the developed analysis, being performed the following subgroups:

-Group I<sup>1</sup> (6 males) (animals born from mother control rats)

-Group I<sup>2</sup> (6 females) (animals born from mother control rats)

-Group II<sup>1</sup> (6 males) (animals born from mother rats treated with chlodymeform)

-Group II<sup>2</sup> (6 females) (animals born from mother rats treated with chlodymeform).

Immediately after slaughter of all animals, the brain and spinal cord were isolated, always maintained at 4°C, and quickly dissecting them for areas corresponding to the hypothalamus, midbrain, brainstem, cerebellum, spinal cord, frontal cortex, hippocampus and body striatum, following the method of GLOWINSKI and IVERSEN (1966).

#### **Analytical determination of serotonin (5-HT), dopamine (DA), noradrenaline (NA) and its metabolites**

The tissue samples were processed for the extraction of biogenic amines that were analyzed by HPLC with reverse phase column and electrochemical detection (LAWRENCE et al., 2002).

#### **Analytical determination of estradiol and testosterone (EIA).**

The tissue samples were processed for extraction of the hormone testosterone and estradiol, the concentration thereof in the tissues was subsequently determined by an enzyme immunoassay reaction

## **Determination of gene expression of enzymes that catalyze synthesis and metabolism of biogenic amines.**

Each tissue sample was stored in Trizol and mRNA from the same was extracted by Trizol method, the following reverse transcription was made to obtain the cDNA and finally it was determined with the expression levels of the enzymes MAO A, catechol-O-methyltransferase (COMT), aldehyde dehydrogenase (AD), tyrosine hydroxylase (TH), tryptophan hydroxylase (TRH) and dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH) using  $\Delta\Delta C_t$  method (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001) .

### **Data analysis**

All data are expressed as the mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean) in each brain region. For determination of the effect of sex interaction with the treatment, a two-factor ANOVA was performed using the values of males and females combined. Differences were considered significant at  $P < 0.05$  (t test of Student). Statistical analysis was performed using SPSS 10.0.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The present study shows that exposure to chlodimeform (5 mg/kg/day) during pregnancy and lactation of the dams leads to alterations of the serotonergic, dopaminergic and noradrenergic system and its metabolites as well as the gene expression of enzymes COMT, AD, BDH, TH and TRH both in agender- and region-dependent way in 60 days old animals born from treated mothers rats (Table 1). Moreover, treatment with chlodimeform orally to dams during the period of gestation and during lactation affect the content of T and E2 in the regions of frontal cortex, striatum and hippocampus of the offspring rats at age 11 days.

Furthermore sex interaction was observed with treatment in the content of T and E2 in the structures of the hippocampus, frontal cortex and striatum (Table 1).

**Table 1.** Summarizes the results obtained in this investigation.

Chlodimeform Effect in rats of 60 days of age born to treated mothers (5mg/kg bw / day) during gestation days 6-21 and 1-10 days of lactation:			Chlodimeform Effect in rats of 11 days of age born to treated mothers (5mg/kg bw / day) during gestation days 6-21 and 1-10 days of lactation:
Frontal cortex	Striatum	Hippocampus	
<p>↓TH ♂ &lt; ♀</p> <p>↓TRH ♂ &lt; ♀</p>	<p>↓BDH ♂ &lt; ♀</p> <p>↓COMT, TH y TRH</p>	<p>↓TH ♂ &gt; ♀</p> <p>↑COMT ♂ &gt; ♀</p> <p>↑AD ♂ &lt; ♀</p> <p>↑TRH ♂ &gt; ♀</p>	
<p>↓5-HT: ♂ &lt; ♀</p> <p>↓5-HIAA : ♂ &gt; ♀</p> <p>♂:↓5-HT &lt;5-HIAA</p> <p>♀:↓5-HT &gt;5-HIAA</p>	<p>↓5-HT: &lt;5-HIAA:</p>	<p>↑5-HT: ♂ &gt; ♀</p> <p>↑5-HIAA : ♂ &gt; ♀</p> <p>♂:↑5-HT: &lt;5-HIAA</p> <p>♀:↑5-HT: &gt;5-HIAA</p>	<p>T: ↓ CE , CF y HC → ♂ &lt; ♀</p> <p>E2: ↓ CF y CE → ♂ &lt; ♀</p> <p>↑HC → ♂ &lt; ♀</p>
<p>↓DA, DOPAC, HVA: ♂ &lt; ♀</p> <p>♂ y ♀:↓DA &lt; DOPAC, HVA</p>	<p>↓DA: ♂ &gt; ♀</p> <p>↑DOPAC</p> <p>↓HVA</p>	<p>↓DA: ♂ &gt; ♀</p> <p>↑DOPAC: ♂ &lt; ♀</p> <p>↑HVA : ♂ &gt; ♀</p>	
<p>↓NA y MHPG : ♂ &lt; ♀</p> <p>♂ y ♀:↓NA &lt; MHPG</p>	<p>↓NA y MHPG : ♂ &lt; ♀</p> <p>♂ y ♀:↓NA &lt; MHPG</p>		<p>CE: E2 y T Dif sex → ♂ &gt; ♀</p> <p>HC: T Dif sex → ♂ &gt; ♀</p> <p>CF: E2 Dif sex → ♂ &gt; ♀</p>

Given that the affected brain regions in our study with chlodimeform (frontal cortex, striatum, and hippocampus) were the same as those affected by amitraz (DEL PINO et al., 2011) it can be inferred that the mechanism by which alter CNS development on formamidines is similar. Moreover, being important structures in controlling the processes of learning and memory (WISMAN et al., 2008) it could be considered that these processes could be compromised by exposure during gestation and lactation to formamidines. Our results suggest that the mechanism by which the changes occur in the development of these monoamine neurotransmitters is due to altered levels of estradiol and testosterone resulting in a permanent alteration of the expression of some of the enzymes that catalyze the synthesis and metabolism of monoaminergic neurotransmitters. Further studies are required to check if other hormones are also involved in these effects so as to determine whether they act directly on the expression of the enzymes involved or via the induction of other genes which may regulate its expression. We also need to make a pathologic examination in the affected regions to determine the effect on the number of neurons, to determine if there is a reduction in innervation. Currently, new molecules with therapeutic application are being developed as the N-hydroxy-N-(4-butyl-2-methylphenyl) formamidine (HET0016) with protective effects against cardiovascular and cerebrovascular diseases. Until now the risk assessment of the family of these compounds has been taken from the standpoint of carcinogenesis. In view of these results it might be appropriate to reconsider the risk assessment of the members of this family based not only on their possible carcinogenic effects but also in the neurotoxic effects during development through endocrine disruption.

## CONCLUSIONS

1. Chlodimeform in rats 60 days of age, born to mothers exposed to a dose of 5 mg/kg/day during gestation and lactation affected the content of 5-HT, DA and NA and its metabolites both sex- and region- dependent way in regions of the frontal cortex, hippocampus and striatum with no effect on the rest of nervous system structures studied.
2. In our study, Chlodimeform, at dose of 5 mg/kg/day during gestation and lactation affected the gene expression of enzymes COMT, BDH, AD, TH and TRH responsible for the synthesis and metabolism of the neurotransmitters described above in a both region- and sex- dependent way in the regions of the frontal cortex, hippocampus and striatum. Conversely no effect on the expression of the MAO A in any of the brain regions studied was observed.
3. Treatment with chlodimeform orally to dams during the gestation period from day 6 to day 21 and during lactation from day 1 to day 10, affected the content of testosterone and estradiol in a sex- and region-dependent way on the regions of frontal cortex, striatum and hippocampus of rats descendants at age 11 days.
4. Permanent effects observed on systems monoamine neurotransmitters in the frontal cortex, striatum and hippocampus were caused by permanent alterations of gene expression of the COMT, BDH, AD, TH and TRH enzymes induced by exposure to chlodimeform during pregnancy and lactation.
5. Alterations in the levels of hormones estradiol and testosterone levels in brain regions of frontal cortex, striatum and hippocampus by exposure to chlodimeform during pregnancy and lactation, induced permanent alterations on gene expression of the COMT, BDH, AD, TH and TRH enzymes.

6. MAO participation in the induction of permanent effects observed in monoaminergic neurotransmitter systems is discarded, as we used a molecule that has a very low inhibitory effect on the enzyme and since no permanent alteration in gene expression of the MAO A has been shown by exposure to chlodimeform during pregnancy and lactation period.

7. Further studies are required to determine the kinetics of chlodimeform in the brain to determine whether there is a selective accumulation of this compound in the affected regions and to see if other hormones are also involved in these effects, and whether they act directly on expression of the enzyme or via the induction of other genes which may regulate its expression.

## REFERENCES

- AZIZ, S.A. & KNOWLES, C.O. (1973). Inhibition of monoamine oxidase by the pesticide chlodimeform and related compounds. *Nature* 242: 417-418.
- BAILEY, B.A. MARTIN, R.J. & DOWNER, R.G.H. (1982). Monoamine oxidase inhibition and brain catecholamine levels in the rat following treatment with chlodimeform. *Pest Biochem Physiol* 17: 293-300.
- BALER, R.D., VOLKOW, N.D., FOWLER, J.S. & BENVENISTE, H. (2008). Is fetal brain monoamine oxidase inhibition the missing link between maternal smoking and conduct disorders?. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 33(3): 187-195.
- BEEMAN, R.W. & MATSUMURA, F. (1973). Chlodimeform: a pesticide acting upon amine regulatory mechanisms. *Nature* 242(5395): 273-274.
- BORUE, X., CHEN, J. & CONDRON, B.G. (2007). Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies. *International Journal of Developmental Neuroscience* 25(6): 341-347.
- DEL PINO, J. MARTÍNEZ, M.A. CASTELLANO, V.J. RAMOS, E. MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. ANADÓN, A. (2011). Effects of prenatal and postnatal exposure to amitraz on norepinephrine, serotonin and dopamine levels in brain regions of male and female rats. *Toxicology* 287(1-3), 145-152.
- GLOWINSKI, J. & IVERSEN, L.L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain – I. The disposition of [<sup>3</sup>H]norepinephrine, [<sup>3</sup>H] dopamine and [<sup>3</sup>H]DOPA in various regions of the brain. *Journal of Neurochemistry* 13: 655-669.
- HOLLINGWORTH, R.M. (1976). Chemistry, biological activity, and uses of formamidine pesticides. *Environmental Health Perspectives* 14: 57-69.
- JMPR (Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues) (1998). Chlodimeform Environmental Health Criteria, No 199.
- Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc199.htm#PartNumber:7>
- LAUDER, J.M. (1985). Roles for neurotransmitters in development: possible interaction with drugs during the fetal and neonatal periods. *Progress in Clinical and Biological Research* 163C: 375-380.
- LAWRENCE, N.S., BECKETT, E.L., DAVIS, J. & COMPTON, R.G. (2002). Advances in the voltammetric analysis of small biologically relevant compounds. *Analytical Biochemistry* 303: 1-16.
- LIVAK, K.J. SCHMITTGEN, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Method* 25(4):402-408.

- OLSON, K.L. BOUSH, G.M. & MATSUMURA, F. (1978). Behavioral effects of perinatal exposure of chlodimeform in rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 20(6): 760-768.
- PALERMO-NETO, J., SÁCATE, M. & FLÓRIO, J.C. (1994). Developmental and behavioral effects of prenatal amitraz exposure in rats. *Neurotoxicology and Teratology* 16(1): 65-70.
- PALERMO-NETO, J., SÁCATE, M. & FLÓRIO, J.C. (1997). Developmental and behavioral effects of postnatal amitraz exposure in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30(8): 989-997.
- PENDLETON, R.G., RASHEED, A., ROYCHOWDHURY, R. & HILLMAN, R. (1998). A new role for catecholamines: ontogenesis. *Trends in Pharmacological Sciences* 19(7): 248-251.
- RICHARDSON, J.R., CAUDLE, W.M., WANG, M., DEAN, E.D., PENNELL, K.D. & MILLER, G.W. (2006). Developmental exposure to the pesticide dieldrin alters the dopamine system and increases neurotoxicity in an animal model of Parkinson's disease. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20(10): 1695-1697.
- RUEDIGER, T. & BOLZ, J. (2007). Neurotransmitters and the development of neuronal circuits. *Advances in experimental Medicine and Biology* 621:104-15.
- STOKER, T.E. GOLDMAN, J.M. COOPER, R.L. & MCELROY, W.K. (1991). Influence of chlodimeform on alpha-adrenergic receptor-associated mechanisms of hormonal regulation in the rat: pituitary and adrenocortical secretion. *Toxicology* 69(3): 257-268.
- VOSS G., KOSSMANN K., & GEISSBÜHLER H (1973). Chlodimeform. In: *Analytical methods for pesticide plant growth regulators*. Sherma J & Zweig G (Eds), Academic Press Inc. New York, London, vol 7, pp. 211-230.
- WISMAN, L.A., SAHIN, G., MAINGA, Y.M., LEANZA, G. & KIRIK, D. (2008). Functional convergence of dopaminergic and cholinergic input is critical for hippocampus-dependent working memory. *Journal of Neuroscience* 28(31): 7797-807.
- WU D., COSTA L.G. & MURPHY S.D. (1990). [The effect of pesticides-chlodimeform and amitraz on inhibition of the binding of <sup>3</sup>H-clonidine to alpha<sub>2</sub>-adrenoreceptor in rat forebrain tissue. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 21: 17-21.
- YIM, G.R.W., HOLSAPPLE, M.P., PFISTER, W.R. & HOLLINGWORTH, R.M. (1978). Prostaglandin synthesis inhibited by formamidine pesticides. *Life Sciences* 23: 2509-2516.

**JUSTIFICACION Y OBJETIVOS**  
**DEL TRABAJO**

## **1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DEL TRABAJO**

Los plaguicidas suponen un riesgo creciente para la salud de los animales y las personas expuestas a los mismos, existiendo una especial preocupación sobre los posibles efectos permanentes que estos compuestos pueden tener sobre el desarrollo de los seres vivos. En este sentido se ha descrito para algunos compuestos formamidínicos la inducción de alteraciones permanentes sobre el desarrollo del sistema nervioso central tales como perturbaciones permanentes sobre los sistemas de neurotransmisores monoaminérgicos, para los cuales se ha sugerido como posible mecanismo la inhibición de la monoamino oxidasa (MAO), no pudiéndose descartar otros mecanismos como la disrupción endocrina de hormonas sexuales las cuales controlan la expresión de las enzimas que catalizan la síntesis y metabolismo de los neurotransmisores monoamínicos, pudiendo ser este otro posible mecanismo que explicara las alteraciones sobre estos sistemas de neurotransmisores.

Por este motivo, el presente trabajo pretende dilucidar si los efectos de la disrupción endocrina inducida a nivel cerebral por el clodimeformo son un mecanismo fundamental en las alteraciones permanentes heredadas sobre los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico en regiones del SNC de ratas expuestas al clodimeformo durante la gestación y durante la lactancia. Para ello se eligió el clodimeformo, debido a que es el compuesto más representativo del grupo para el que se ha descrito una inhibición de la MAO muy baja, lo que permite estudiar con más claridad si los cambios permanentes observados sobre los niveles de neurotransmisores monoamínicos se deben a la disrupción endocrina más que a la inhibición de la MAO.

Por lo tanto, los objetivos fueron la determinación de las posibles alteraciones permanentes heredadas en los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico en ratas a la edad de 60 días, procedentes de madres a las que se les administró clodimeformo durante el periodo de la preñez y la lactancia y sobre la expresión de las principales enzimas que catalizan la síntesis y metabolismo de estos neurotransmisores en las regiones en las que fueron afectados y la determinación de los niveles de las principales hormonas sexuales, testosterona y estradiol el día posnatal 11 en las regiones del SNC en las que se produzcan alteraciones permanentes en los sistemas de neurotransmisores monoaminérgicos durante el desarrollo.

El interés de este trabajo se centra en aportar nuevos datos sobre la neurotoxicidad inducida por las formamidinas en el desarrollo así como la determinación de la participación de la disrupción endocrina en el mecanismo por el cual se producen los efectos neurotóxicos en el desarrollo de las formamidinas, debido a que se están desarrollando nuevos compuestos de esta familia con aplicaciones terapéuticas para los cuales no se están considerando estos efectos en la evaluación del riesgo de estos compuestos lo cual supone un peligro potencial para la salud.

# **INTRODUCCION**

## **2. INTRODUCCION**

El gran desarrollo económico y social que ha tenido lugar en el mundo a partir de mediados del siglo XIX ha implicado la necesidad de mejorar los sistemas de producción y suministro de alimentos. El desarrollo agrícola y pecuario demanda un incremento en la producción con el objetivo de obtener mayores ganancias y satisfacer, al mismo tiempo, los requerimientos nutricionales necesarios de la población.

Un 90% del mundo depende para su abastecimiento de alimentos de tan sólo 15 tipos de cultivos vegetales y 7 especies de animales. A pesar de todos los esfuerzos realizados, las plagas destruyen anualmente cerca del 35% de las cosechas en todo el mundo. Incluso una vez recogidas, los insectos, los microorganismos, los roedores y las aves infligen una pérdida adicional de entre un 10 y un 20%, con lo que las pérdidas oscilan entre un 40 y un 50%. Muchas zonas del mundo se enfrentan a una grave escasez de alimentos por lo que el control de las plagas es imprescindible para conseguir una optimización del rendimiento.

Los plaguicidas han sido diseñados para matar una gran variedad de organismos vivos indeseables para el hombre. Esta clase de productos se ha utilizado en todo el mundo para la protección de cultivos y en la salud pública para el control de enfermedades transmitidas por vectores u hospedadores intermediarios.

Según la OMS, un pesticida o plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, que está destinada a combatir, matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de algunos seres vivos considerados como plaga tales como insectos, ácaros, roedores y otras especies indeseables de plantas y animales que son

perjudiciales para el hombre o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, producción de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, incluyendo también aquellos que pueden administrarse a los animales para combatir insectos arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos.

El término plaguicida está ampliamente difundido y es muy difícil erradicarlo del uso habitual de la sociedad, pero actualmente se tiende a denominar estos productos bajo dos formas más correctas, biocidas y productos de protección de plantas (PPP) o fitosanitarios. Los biocidas son plaguicidas de uso no agrícola, es decir, son las sustancias o mezcla de sustancias destinados a matar por medios químicos o biológicos, organismos vivos. Los plaguicidas que se utilizan para eliminar plagas en agricultura y que no pertenecen al grupo de biocidas son los llamados productos de protección de plantas (PPP) o fitosanitarios.

En relación con los plaguicidas, se ha afirmado que ningún otro grupo de productos conocidos por su toxicidad son utilizados tan ampliamente. El mercado global de pesticidas experimentará un crecimiento sostenido hasta el año 2016, para alcanzar los 59.000 millones de dólares en ventas.

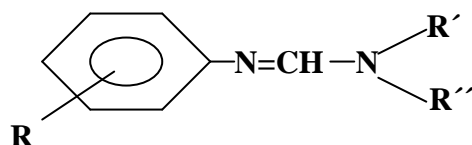
La Organización Mundial de la Salud ha estimado que cada año se producen en el mundo alrededor de un millón de intoxicaciones agudas por exposición a plaguicidas, con una letalidad entre el 0,4 y el 1,9%. Por otra parte, la exposición mantenida a bajas dosis de plaguicidas se ha relacionado con una variedad de trastornos a medio y largo plazo, incluyendo diferentes tipos de cáncer, alteraciones de la reproducción y alteraciones del sistema nervioso, entre otros.

Debido a su alta actividad biológica y en algunos casos a su persistencia en el hábitat, el uso de plaguicidas puede causar efectos adversos a la salud humana y al medio ambiente, de ahí que haya surgido la necesidad de desarrollar compuestos que presenten acción selectiva y por tanto una menor toxicidad, sobre todo para mamíferos y aves. Esto ha llevado al desarrollo de nuevas moléculas como el clodimeformo, que es un pesticida formamidínico, cuyo estudio es el objetivo de la presente tesis.

## **REVISION BIBLIOGRAFICA**

### **3. REVISION BIBLIOGRAFICA**

Las formamidinas (figura 1), desarrolladas a finales de los años 1950 y principios de los 1960, son compuestos de un amplio espectro de actividad biológica, con efectos bactericidas y antiprotozoarios, pasando por propiedades fungicidas, antihelmínticas y herbicidas, hasta acciones insecticidas y acaricidas (HOLLINGWORTH, 1976).



**Figura 1.** Estructura química general de las formamidinas

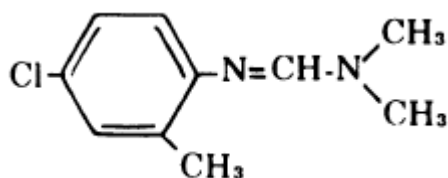
Las formamidinas son particularmente útiles para combatir plagas resistentes a los insecticidas organofosforados y carbamatos, debido a que presentan un mecanismo de acción diferente, el cual está relacionado con la interferencia en la función monoaminérgica neuronal (HOLLINGWORTH y LUND, 1982). Las formamidinas afectan específicamente al comportamiento y algunas veces al desarrollo de varios insectos y ácaros, mientras muestran una muy baja toxicidad aguda para vertebrados (BEEMAN, 1982; HOLLINGWORTH, 1976).

#### **3.1. CLODIMEFORMO**

Las dos formamidinas principalmente comercializadas y de más amplio uso son el clodimeformo y el amitraz; los efectos sobre el sistema nervioso del clodimeformo han sido ampliamente estudiados, sin embargo poco se sabe sobre la función del clodimeformo en el desarrollo del SNC de mamíferos (MOSER *et al.*, 1987). El clodimeformo fue comercializado

por primera vez en 1966 (JMPR, 1998), utilizándose como acaricida de amplio espectro que actúa principalmente contra las formas móviles de ácaros y garrapatas, así como contra los huevos y las crisálidas en estado inicial de algunos insectos del orden Lepidóptera. Es activo en la fase de vapor así como por contacto. Cuando comenzó a utilizarse, se aplicaba a productos de una amplia variedad de cultivos, tales como frutas de pipas, frutas de hueso, berzas, hortalizas, uvas, lúpulo, cítricos, manzanas, peras, cerezas y fresas. También se ha utilizado como ectoparasiticida para combatir las garrapatas del ganado. En los últimos años su uso se limitaba por lo general al algodón, aunque en algunos países se seguía aplicando al arroz. En la mayoría de los países su registro se abandonó voluntariamente en 1988/1989 debido al descubrimiento de efectos carcinógenos para el metabolito del clodimeformo la 4-cloro-*o*-toluidina y en menor medida para el clodimeformo. China fue el último país en suspender su producción en 1992 y venta en 1993 (JMPR, 1998).

El clodimeformo [ $N^2$ - (4-Cloro-*o*-tolil)- $N^1$ .  $N^1$ -dimetilformamidina] (figura 2) como ya se ha indicado, pertenece al grupo de las formamidinas, las cuales se caracterizan por la presencia de un radical fenilamidina y presentar una masa molecular de 196,7. Su número CAS (*Chemical Abstracts Service*) es 6164-98-3. Sus principales características físico-químicas se detallan en la tabla 1. El clodimeformo es un sólido cristalino incoloro y con olor ligero a amina. Es muy soluble en solventes orgánicos; estable a temperatura ambiente. El clodimeformo es una base débil con un  $pK_a$  de 6,8 en solución al 50% de metanol/agua, y forma sales estables con ácidos fuertes (VOSS *et al.*, 1973). Es estable en medio ácido pero es sensible a la luz y al medio básico (SU y ZABIK, 1972). En la tabla 2 se especifica la solubilidad del clodimeformo en distintos tipos de solventes.



**Figura 2.** Estructura química del clodimeformo (C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>Cl N<sub>2</sub>).

**Tabla 1.** Principales propiedades físico-químicas del clodimeformo (JMPR, 1998).

<b>Punto de fusión</b>	32°C
<b>Densidad</b>	1.105 g/mL a 20°C
<b>Presión de vapor</b>	5,5 x 10 <sup>-4</sup> mmHg a 20°C

**Tabla 2.** Solubilidad del clodimeformo en distintos disolventes (JMPR, 1998).

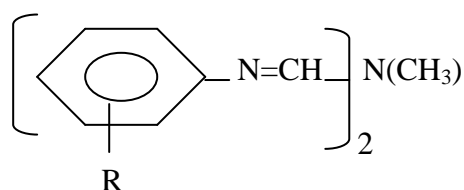
<b>Disolvente</b>	<b>Solubilidad (g/L)</b>
Agua	0,25
Acetona	>200
Benceno	>200
Metanol	>200
Cloroformo	>200
Hexano	>200

### 3.2. RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Una de las características más significativas de las formamidinas es el alto grado de especificidad para la actividad acaricida e ixodicida. Todas las moléculas son un di-sustituído-fenil derivado con una combinación de sustituyentes limitada a cloro y metilo (figura 1). Los compuestos con un solo radical en el anillo fenólico no presentaron actividad acaricida e ixodicida. Cuando en los compuestos 1,3,5-triazapenta-1,4-dienos (figura 3) es reemplazado

el grupo arilo terminal por un núcleo heterocíclico, o cuando las posiciones 2 y 4 presentan grupos alifáticos o arílicos, dan lugar a compuestos con nula o baja actividad. Los compuestos de mayor actividad llevan un metilo en posición 3 de la cadena y la sustitución de este por etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo o bencilo, da lugar a una disminución de la actividad o incluso a la eliminación completa de ésta. La actividad de estos compuestos es dependiente de la naturaleza de los sustituyentes en el anillo fenílico (HARRISON *et al.*, 1973). En particular, las estructuras más activas tienden a ser las que presentan una sustitución 2-metil-4-cloro o 2,4-dimetil en el anillo fenílico. Obviamente, hay una especificidad intrínseca para la sustitución en el anillo fenílico, la cual es ampliamente ilustrada en la tabla 3. En este sentido, aunque el 2,4-dimetil análogo (III), es altamente tóxico tanto para garrapatas como ácaros, la presencia de un grupo 3-metilo, por ejemplo, 2,3 dimetil (IV) o 2,3,4-trimetil (V), anula la actividad contra ácaros. Por otro lado, el 2,4,5-trimetil derivado (VI) es efectivo sobre ácaros pero no en garrapatas, aunque el 2,5-dimetil derivado (VII) es inactivo contra ácaros. Quizás el compuesto más sorprendente de todos es el 2-metil-4-cloro análogo (IX), el cual posee alta actividad contra la garrapata, pero no para los ácaros. La sustitución por halógenos en la posición *orto* (XI-XIII) origina actividad contra garrapatas pero no contra ácaros (HOLLINGWORTH, 1976).

**Tabla 3.** Efecto sobre *Boophilus microplus* y sobre *Tetranychus urticae* de diferentes fenilsustituyentes triazapentadienos simétricos de la familia del clodimeformo.

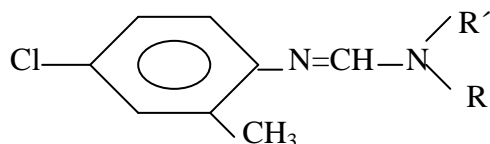


Compuesto	R	LC <sub>50</sub> , mg/L	
		<i>Boophilus microplus</i> (larva)	<i>Tetranychus urticae</i> (huevos/ larvas)
III	2,4-diCH <sub>3</sub>	3	2
IV	2,3-diCH <sub>3</sub>	40	>1000
V	2,3,4-triCH <sub>3</sub>	30	>1000
VI	2,4,5-triCH <sub>3</sub>	>500	1,3
VII	2,5-diCH <sub>3</sub>	---	>1000
VIII	2,4,6-triCH <sub>3</sub>	85	280
IX	2-CH <sub>3</sub> ,4-Cl	18	>1000
X	2-CH <sub>3</sub> ,4-F	40	>1000
XI	2-F,4-CH <sub>3</sub>	40	500
XII	2-Br,4-CH <sub>3</sub>	85	>1000
XIII	2,4-diCH <sub>3</sub> ,6-Cl	85	>1000

ABO-KHATWA y HOLLINGWORTH (1973) estudiaron la variación en la toxicidad de un número de formamidinas con distintas sustituciones en el anillo fenílico sobre los huevos del gusano *Agrotis ipsilon* y concluyeron que la toxicidad fue favorecida por la alta solubilidad lipídica, la presencia de un grupo relativamente pequeño en la posición *para* del anillo y uno voluminoso en la posición *orto* del anillo. Requerimientos bastante similares son observados para una inhibición de la MAO por estos mismos agentes, mientras que el desacoplamiento mitocondrial depende solamente de la lipofilia de la molécula. El miembro más tóxico de la serie otra vez fue el 2-metil-4-cloro, 2-metil-4-bromo, y 2,4-dimetil análogos. Teniendo en cuenta los diferentes compuestos existentes de formamidinas, todavía hay un campo de acción amplio para la variación considerable en la estructura para aumentar la toxicidad selectiva frente a insectos.

La tabla 4 muestra la variación en la sensibilidad de la especie de ácaro *Tetranychus urticae* y de garrapata *Boophilus microplus* a varios N'-4-cloro-*o*-tolil formamidinas y vemos que en la serie dialquílica (compuestos II, XIV-XVI) todos los compuestos muestran considerable actividad. El dimetil compuesto tiene mayor actividad frente a *Tetranychus urticae*. Ni el dimetil (II) ni el dipropil (XV) compuesto tienen alta actividad contra *Boophilus microplus*, pero el N-metil-N-metiltiometil análogo (h-20013, XVI) tiene mayor actividad contra *Boophilus microplus*. Entre los N-monoalquil sustituyentes (compuestos XVII-XXIII) el metil análogo XVII es el que tiene mayor actividad de todos los compuestos tanto contra *Boophilus microplus* como contra *Tetranychus urticae*. La diferencia de potencia para *Boophilus microplus* entre el compuesto II (clodimeformo) y XVII (su N-dimetil análogo) es extraordinariamente alta, aproximadamente 700 veces más alta para XVII. Aunque el N-dimetil derivado (XVII) posee mayor actividad para producir la separación de las garrapatas del hospedador, el clodimeformo (II) posee mayor toxicidad directa y acción esterilizante que el N-dimetil derivado (XVII) (KNOWLES y ROULSTON, 1973).

**Tabla 4.** Variación de la actividad frente a la garrapata *Boophilus microplus* y al ácaro *Tetranychus urticae* en relación con la estructura de las N'-4-cloro-o-tolil formamidinas (ARNDT y STEINHAUSEN, 1964; STONE., *et al*, 1974).



Compuesto	R	R'	<i>Tetranychus urticae</i> (huevos)		<i>Boophilus microplus</i> (adulto) DD <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/garrapata)
			% solución.	% mortalidad	
II	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	0,01	100	0,65
XIV	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	0,05	80	---
XV	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,05	85	0,90
XVI	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	---	---	0,012
XVII	H	CH <sub>3</sub>	0,01	100	0,0009
XVIII	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	---	---	0,03
XIX	H	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0,05	99	---
XX	H	i-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	---	---	0,40
XXI	H	n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	---	---	0,07
XXII	H	i-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,05	85	0,12
XXIII	H	s-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0,05	80	---

<sup>a</sup>Dosis la cual causa que el 50% de garrapatas se desprendan del hospedador.

### 3.3. MECANISMO DE ACCION

La actividad biológica del clodimeformo como del resto de las formamidinas puede ser atribuida por las siguientes acciones:

#### *Agonista parcial del receptor α<sub>2</sub>*

Inicialmente se estableció una hipótesis sobre el papel del receptor α<sub>2</sub> en la toxicidad neuroendocrina de estos plaguicidas en mamíferos, en base a las similitudes observadas entre estos receptores y los receptores octopaminérgicos adenilato ciclasa-dependientes, los cuales

son la diana de los pesticidas formamidínicos en insectos (COSTA y MURPHY, 1987; COSTA *et al.*, 1988). Esta hipótesis fue, subsecuentemente, reforzada por estudios experimentales, los cuales revelaron que el compuesto formamidínico amitraz provoca efectos similares a los observados con el agonista selectivo de los receptores  $\alpha_2$  clonidina (COSTA y MURPHY, 1987; COSTA *et al.*, 1988; ALTOBELLI *et al.*, 2001). Posteriormente, COSTA *et al.* (1988) mostraron que el amitraz (7,5-12,5 mg/kg) inhibe la unión de clonidina en el cerebro de rata y WU *et al.*, (1990) demostraron que el clodimeformo inhibe la unión de los agonistas y antagonistas del receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico clonidina y yohimbina en el cerebro de rata *in vitro*.

### ***Inhibición de la enzima monoamino oxidasa (MAO)***

El clodimeformo como otras formamidinas es un inhibidor de la MAO, lo cual ha sido demostrado en estudios *in vivo e in vitro* (AZIZ y KNOWLES, 1973; BEEMAN y MATSUMURA, 1973; MAITRE y GFELLER, 1975; MAITRE *et al.*, 1978; BENEZET y KONWLES, 1976; BÉNEZET *et al.*, 1978; HOLLINGWORTH *et al.*, 1979; KADIR y KNOWLES, 1981; KALOYANOVA *et al.*, 1981; BAILEY *et al.*, 1982).

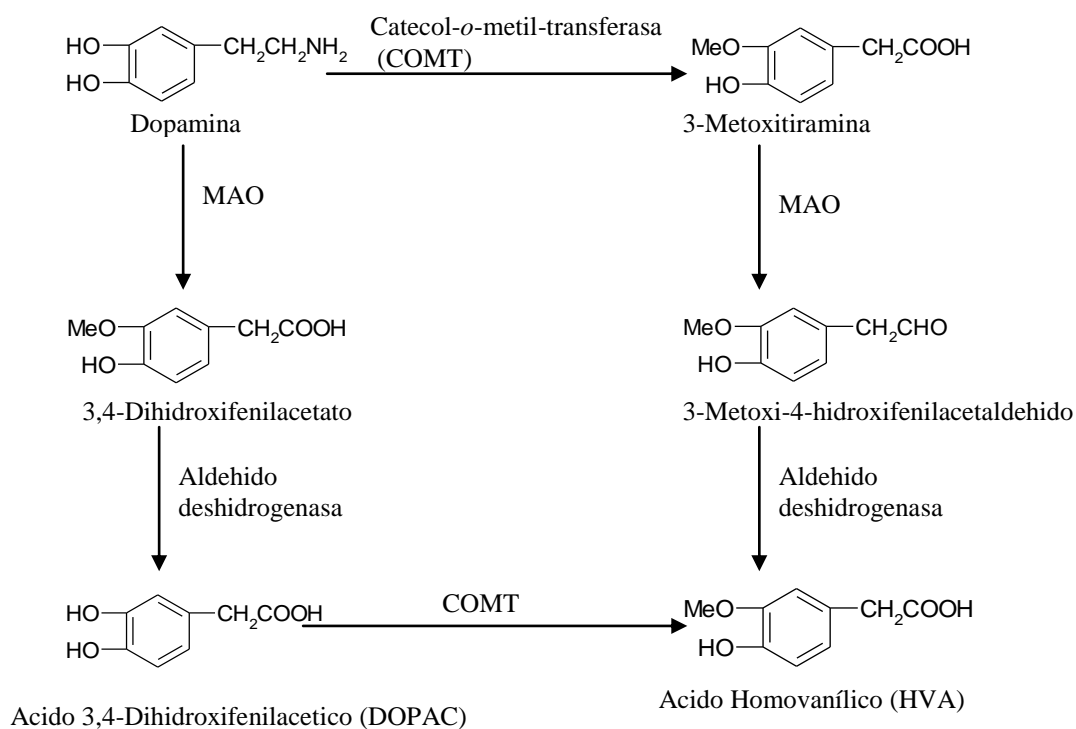
Las monoamino oxidasas son flavoproteínas integradas en la membrana externa mitocondrial de neuronas, glía y otras células que deaminan oxidativamente neurotransmisores y aminos xenobióticas (BLASCHKO *et al.*, 1937). Se han identificado dos isoformas, MAO-A y MAO-B, en función de la selectividad del sustrato y sensibilidad a inhibidores (JOHNSTON, 1968). En cerebro de roedor, la serotonina, dopamina y noradrenalina son preferentemente desaminadas por la MAO-A, las aminos feniletilamina y metilhistamina por la MAO-B y la tiramina y octopamina por ambas isoenzimas. En cerebro

humano prevalece una similar especificidad excepto en la dopamina que es sustrato de ambas isoenzimas. La MAO-A es inhibida selectivamente por clorgilina y la MAO-B por deprenilo. El papel fisiológico de las isoenzimas es doble, por una parte facilitar indirectamente la inactivación de los neurotransmisores amínicos liberados, y por otra actuar como barredores previniendo la acumulación en neuronas monoaminérgicas de varios sustratos naturales que pudieran actuar como falsos neurotransmisores (SAURA *et al.*, 1992). Ambas isoenzimas comparten un fragmento común en el sitio activo constituido por un pentapéptido conectado a un grupo prostético flavina-adenina-dinucleótido (FAD). El mecanismo de desaminación consiste en una doble sustracción de un protón y de dos electrones (TRIGO y AVENDAÑO, 1993; ESPADA y AVENDAÑO, 1993).

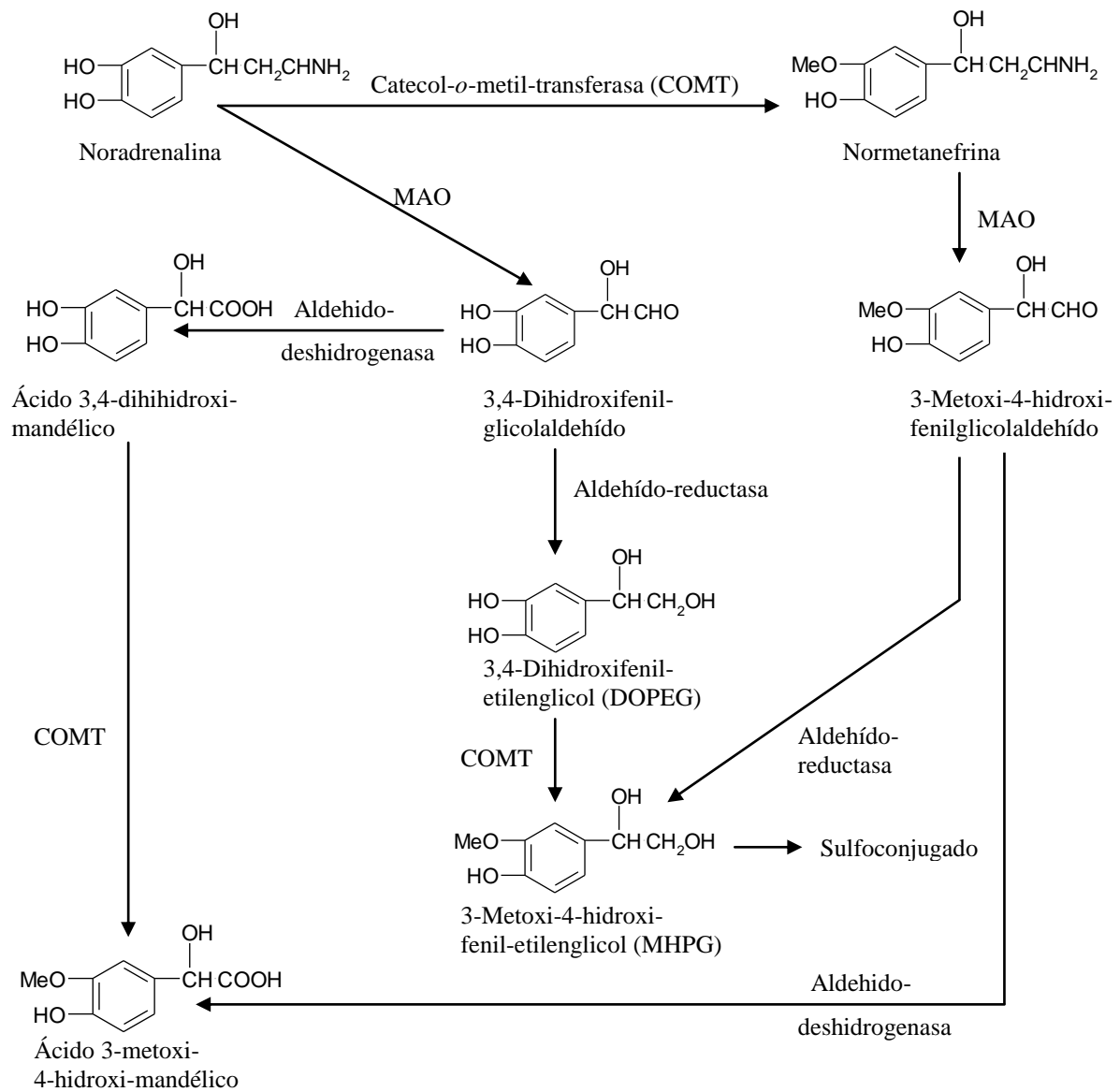
La localización de los isoenzimas MAO-A y MAO-B tanto en cerebro de rata como humano difiere marcadamente. La MAO-A se encuentra en neuronas noradrenérgicas y la MAO-B se localiza en astrocitos, neuronas serotoninérgicas y neuronas histaminérgicas y ambas isoenzimas en neuronas dopaminérgicas. La presencia de la MAO-A en neuronas noradrenérgicas, además de su papel indirecto en la inactivación de la noradrenalina liberada, podría actuar como un barredor inactivando la serotonina acumulada como un falso neurotransmisor. El papel de la MAO-B en neuronas serotoninérgicas podría ser prevenir la acumulación de varios sustratos naturales, los cuales podrían interferir con el almacenamiento, liberación, recaptación y función del receptor de serotonina. El papel de la MAO-B en los astrocitos podría ser dual: en la proximidad de los terminales nerviosos monoaminérgicos metabolizar los transmisores liberados y a lo largo del cerebro, inactivar aminorazas que si no se podrían acumular por recaptación neuronal, o también actuar como un falso neurotransmisor, o desplazar el transmisor fisiológico de su almacén vesicular (SAURA *et al.*, 1992).

Las rutas enzimáticas en las que participa la MAO en el metabolismo de los neurotransmisores dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e histamina se pueden ver en las figuras 3, 4, 5 y 6 respectivamente (MEANA y GARCÍA-SEVILLA, 1997).

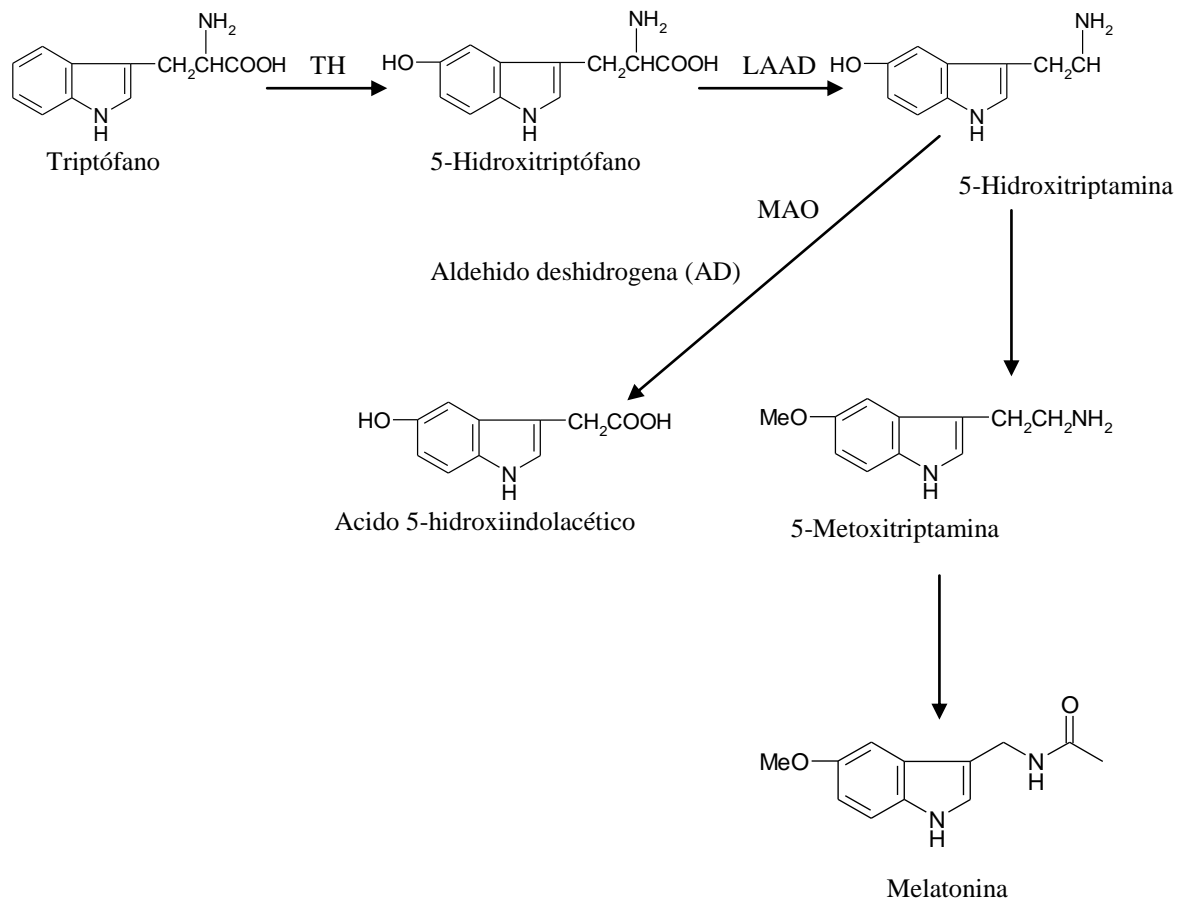
**Figura 3.** Metabolismo de la dopamina.



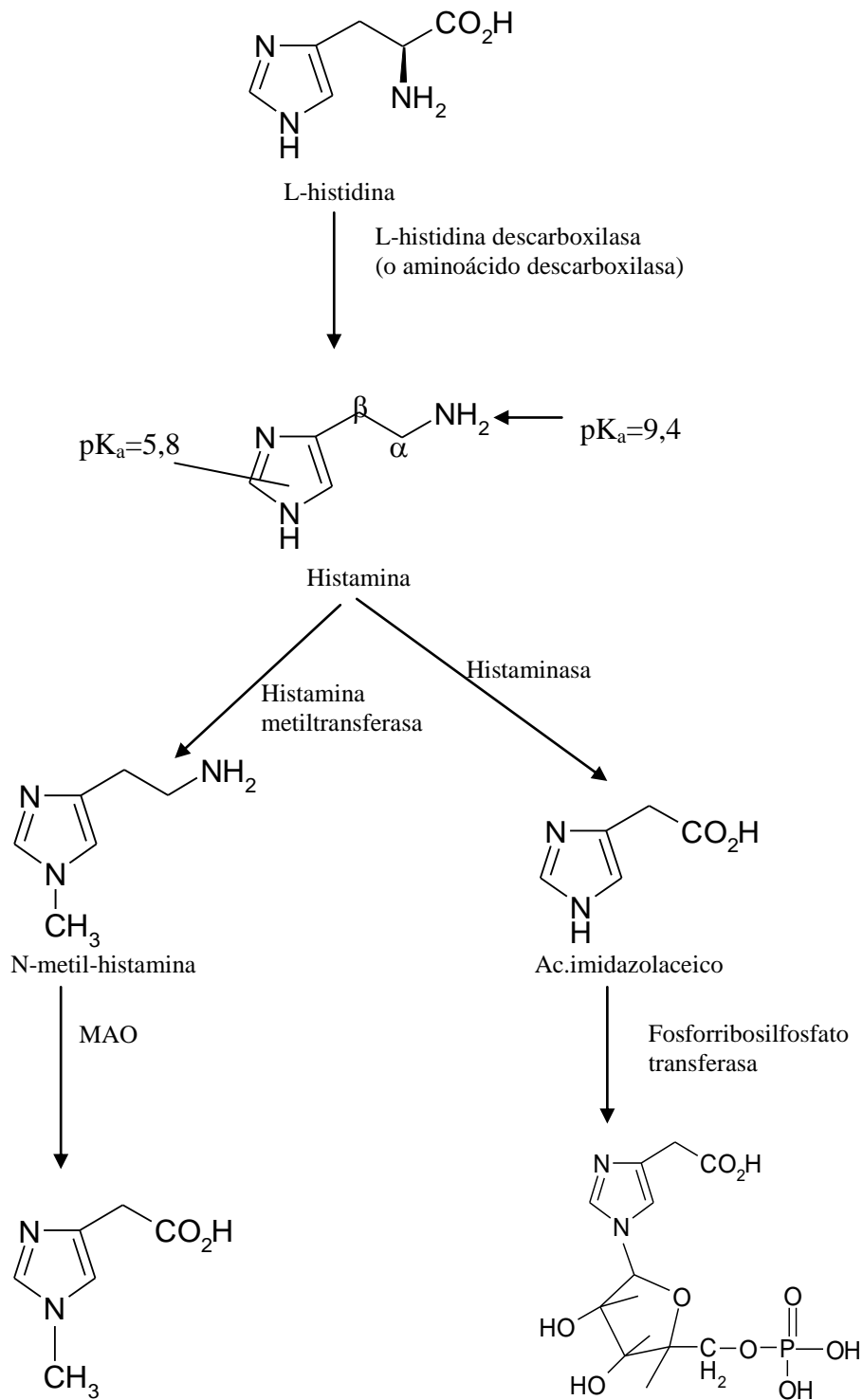
**Figura 4.** Metabolismo de la noradrenalina.



**Figura 5.** Metabolismo de la serotonina.



**Figura 6.** Metabolismo de la histamina.



### ***Inhibición de la prostaglandina sintetasa***

LUND *et al.* (1978) proponen que la toxicidad de pesticidas formamidínicos en mamíferos implica colapso cardiovascular acompañado de depresión respiratoria lo que origina una acción tipo anestésica local. Estudios efectuados en fleon de cobayo aislado revelaron para estos pesticidas un mecanismo de acción similar al ácido acetil salicílico, originando depresión de la respuesta inducida eléctricamente, que fue revertida por prostaglandina E<sub>1</sub>, pero no por naloxona (HOLSAPPLE *et al.*, 1979; EHRENPREIS *et al.*, 1976). YIM *et al.* (1978) evaluaron las actividades antipiréticas de dos formamidinas en comparación con dos conocidos antipiréticos inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, indometacina y aspirina, demostrando que el amitraz y el clodimeformo se comportan como agentes antiinflamatorios. El clodimeformo y el amitraz originaron una inhibición de la síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub>. Este resultado es de interés ya que la prostaglandina sintetasa juega un papel importante en la reproducción del insecto y los inhibidores de la prostaglandina sintetasa bloquean la ovoposición (DESTEPHANO y BRADY, 1977). De hecho se ha observado que las formamidinas reducen la fecundidad de lepidópteros y de garrapatas del ganado (HOLLINGWORTH, 1976). Existe correlación entre la inhibición de la prostaglandina sintetasa y las acciones anestésicas locales de las formamidinas.

### ***Antagonista de los efectos de la reserpina in vivo***

La reserpina produce la depleción de las aminas almacenadas en las terminales nerviosas en el SNC. BEEMAN y MATSUMURA, (1973) realizaron un experimento *in vivo* en el que se administró a ratas clodimeformo y a los 90 minutos se administró reserpina, observándose que los efectos que ésta causa como la inmovilidad o el tremor no se producían o como en el caso de la rigidez muscular eran mucho más leves.

### ***Disrrupción endocrina***

STOKER *et al.* (1991) en un estudio sobre los efectos del clodimeformo en la liberación de hormonas demostraron, en ratas tratadas con clodimeformo (20 o 50 mg/ kg de peso corporal) por vía intraperitoneal que hay un aumento en la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), de los niveles de corticosteroides (CORT) y de prolactina (PL) de una manera dependiente de la dosis. Los agonistas alfa-adrenérgicos fueron capaces de inhibir específicamente estos efectos, lo que indica que esta alteración está mediada por la actividad asociada al receptor alfa-adrenérgico.

CHOU *et al.* (2008) en un estudio sobre los efectos del amitraz sobre los niveles séricos y metabolismo microsomal hepático del 17beta-estradiol (E2) y la testosterona (T), demostraron que, en ratas tratadas con amitraz (25-50 mg/ kg de peso corporal) por vía intraperitoneal, se indujo el metabolismo hepático del estradiol y la testosterona en machos y hembras, descendiendo los niveles séricos de estradiol en las hembras e incrementándose los niveles séricos de testosterona en machos.

### **3.4. SINTOMATOLOGIA Y CUADRO CLINICO**

Los signos generales de la intoxicación con clodimeformo y amitraz son (ARIMA *et al.*, 1976; LUND *et al.*, 1978; YIM *et al.*, 1978; ROBINSON y BITTLE, 1979; HSU y KAKUK, 1984; GORDON *et al.*, 1985; GAINES y LINDER, 1986; GORDON y WATKINSON, 1988; BOYES y MOSER, 1988; GILBERT, 1988; GOLDMAN *et al.*, 1990, 1991; COOPER *et al.*, 1994, JMPR, 1998):

1. Depresión profunda del SNC (desorientación, pérdida de conciencia, coma, y convulsiones).
2. Alteración del comportamiento (hiperreactividad, agresividad).
3. Disminución de la ingesta.
4. Pérdida de reflejos, ataxia, incoordinación, tambaleamiento.
5. Miosis.
6. Disnea y depresión respiratoria.
7. Bradicardia.
8. Hipotensión o hipertensión a dosis altas.
9. Alteraciones hematológicas (agregación plaquetaria, metahemoglobinemia y hemoconcentración).
10. Hipotermia.
11. Palidez de las membranas muconasales.
12. Efecto antinociceptivo.
13. Alteración de la fertilidad y efectos sobre el desarrollo.
14. Alteraciones musculares (debilidad muscular, tremor, espasmos)

### **3.5. ESPECTRO DE ACCION Y USOS**

Las formamidinas presentan alta actividad acaricida. Los ácaros, en particular las garrapatas, en el campo de la veterinaria y en general en el campo de la horticultura, son la causa de grandes pérdidas económicas en la mayor parte del mundo. El problema del control de los ácaros es agravado por una amplia resistencia a muchos tipos de plaguicidas disponibles (HARRISON *et al.*, 1973).

Los ácaros fitófagos están entre los más importantes problemas agrícolas en todas las partes del mundo, especialmente en aquellos lugares donde se concentra la producción de frutas y vegetales. Aunque son conocidos desde hace siglos, es a partir de la Segunda Guerra Mundial cuando los ácaros se convirtieron en el mayor problema de los cultivos por originar una lesión directa sobre la superficie protectora de las hojas y también dentro de la lámina (HARRISON *et al.*, 1973). Los acaricidas que han llegado a ser de uso común incluyen (HARRISON *et al.*, 1973):

- a) Para el control de las garrapatas del ganado:
  - compuestos arsenicales (arsenito sódico)
  - compuestos organoclorados
  - compuestos organofosforados (clorpirifos, coumafos, diazinón)
  - carbamatos (carbaril)
  
- b) Para el control de ácaros fitófagos:
  - arilos con puente sulfuro (clorobenzida, tetradifón, tetrazol)
  - compuestos organoclorados
  - compuestos organofosforados
  - carbamatos
  - amidinas (clorodimeformo, formentanato)
  - derivados del dinitropentol (binapacril, dinobuton, DNOC)
  - otros ( cyhexatin, propargite, quinometionato)

Como puede verse, un amplio rango de compuestos de diferentes estructuras químicas han sido usados para el control de ácaros. Las resistencias de ácaros a sustancias químicas se han desarrollado con rapidez y se han identificado casos de resistencia a diversas sustancias, lo que llevó a la introducción del uso del clodimeformo (HARRISON *et al.*, 1973).

El clodimeformo es un acaricida de amplio espectro y es activo principalmente contra los huevos y las formas móviles de ácaros y garrapatas y contra huevos de insectos lepidópteros. El clodimeformo mata a los huevos, larvas y adultos no sólo por contacto, sino también en fase de vapor. El uso principal inicialmente era el control de los ácaros en los frutos de árboles de hoja caduca (JMPR, 1989).

En 1971 el clodimeformo se registró en muchos países para su uso en una amplia variedad de cultivos como las frutas pomáceas, frutos con hueso, cultivos de coles, verduras, uvas, lúpulo, cítricos, manzanas, peras, cerezas y fresas. El clodimeformo también tuvo usos veterinarios importantes como acaricida. En Australia, el clodimeformo fue registrado para su uso en baños de ganado para el control de garrapatas (*Boophilis mictopus*), en combinación con acaricidas organofosforados (FAO/OMS, 1972).

En 1975 se amplió el uso de clodimeformo para el control del barrenador del tallo del arroz, el control de las larvas de lepidópteros en algodón y el control de una amplia gama de las larvas de lepidópteros de repollo y tomates (FAO/OMS, 1976). En aquel momento, el control de barrenadores del tallo de arroz de regadío demostró ser uno de los usos más importantes de clodimeformo. En el caso del algodón, el clodimeformo se convirtió en uno de los sustitutos más importantes para los plaguicidas organoclorados como el DDT. El clodimeformo no ha tenido un uso significativo como fitosanitario a nivel doméstico.

En 1976 los fabricantes suspendieron temporalmente la venta de clodimeformo de todos los mercados del mundo, sobre la base de los resultados adversos de carcinogenicidad aparecidos en estudios crónicos de ratón. En 1978, después de haber completado una serie de estudios toxicológicos, de metabolismo y de residuos, los fabricantes volvieron a solicitar el

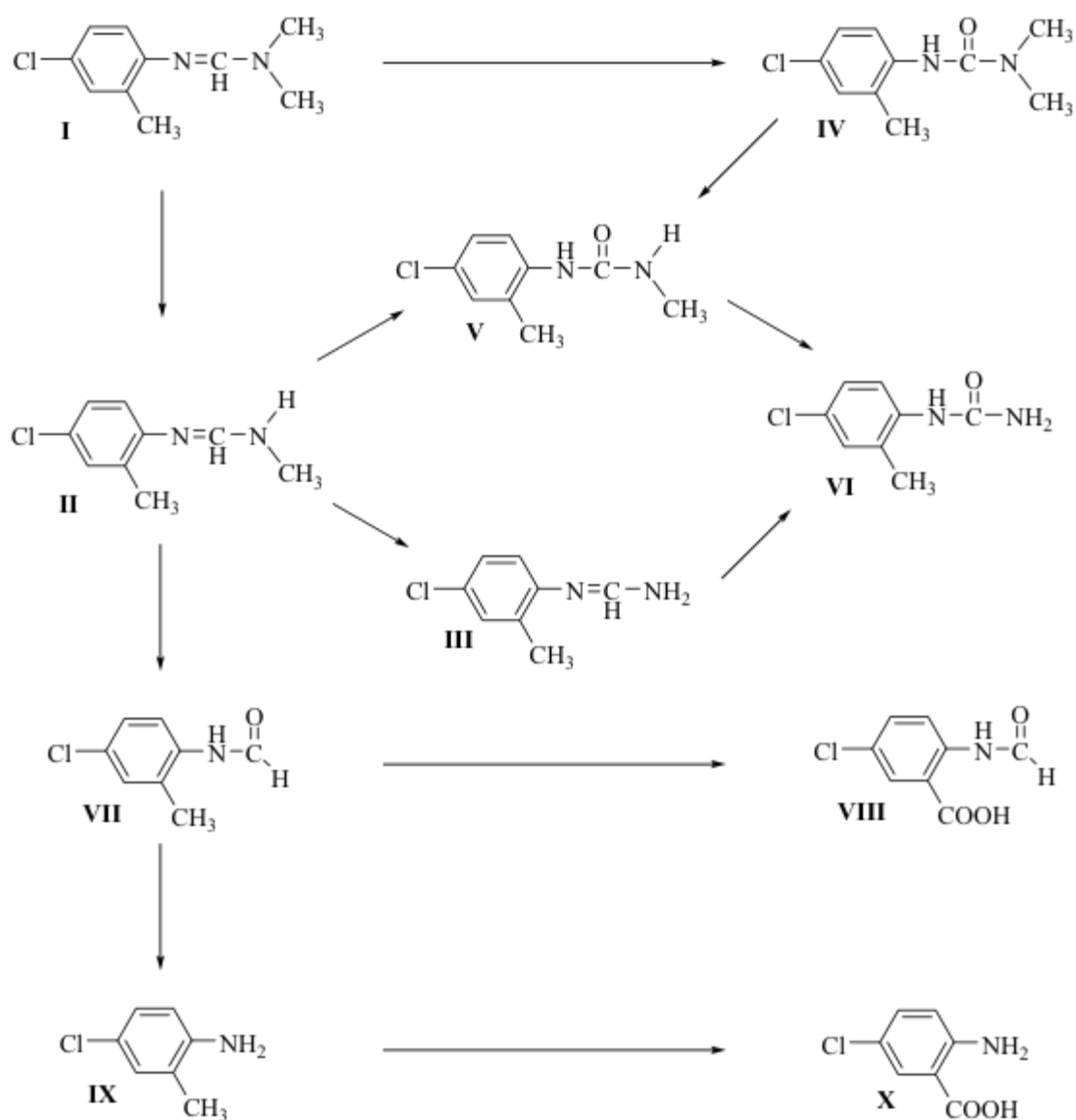
registro en un número de países para permitir el uso comercial limitado del clodimeformo sólo en los cultivos de algodón. La propuesta fue utilizar clodimeformo por aplicación aérea bajo condiciones supervisadas que limitan la absorción por los operadores y personas próximas a los cultivos. El clodimeformo fue reintroducido para el control de insectos en el algodón en EE.UU, América Central, Colombia, Israel, Australia y China. Se establecieron directrices para la manipulación y uso de clodimeformo en Australia, Colombia, Israel y EE.UU (California). Las tasas de aplicación se establecieron para reducir al mínimo la aparición de residuos en las fibras de algodón y aceite de semilla de algodón. En China, el uso extensivo de clodimeformo continuó hasta la década de 1980 para el arroz y el algodón.

El uso de clodimeformo cesó en la mayoría de países a mediados y finales de 1980. El Comité Mixto FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas (JMPR) retiró su ingesta diaria admisible temporal (ADI) en 1987 y recomendó que el clodimeformo no se utilizara si sus residuos o su metabolito, 4 -cloro-o-toluidina , pudieran llegar a los alimentos (FAO/OMS, 1988). En 1988-1989 Ciba-Geigy y Schering voluntariamente detuvieron la comercialización de clodimeformo y decidieron retirar el registro en todo el mundo. China fue el último país en dejar de comercializarse, cesando la producción a finales de 1992 y las ventas en junio de 1993 (JMPR,1989).

### 3.6. METABOLISMO

El clodimeformo se metaboliza ampliamente en mamíferos y en humanos (KNOWLES, 1970; SEN GUPTA y KNOWLES, 1970; KNOWLES y SEN GUPTA, 1970; KNOWLES y BENEZET, 1977; KOPP *et al.*, 1977; IFFLAENDER, 1977a,b; CROWDER y WHITSON, 1980; NIXON y NEAL, 1983; WATANABE y MATSUMURA, 1987). Se han realizado estudios sobre el metabolismo del clodimeformo en varias especies, incluyendo humanos, cabras, perros, ratas, y ratones. En todas las especies, el clodimeformo fue rápidamente metabolizado formándose diversos metabolitos, entre los cuales están el dimetilclodimeformo (II), didimetilclodimeformo (III), 1,1-dimetil-3-(4-cloro-*o*-tolil)urea (IV), 1-metil-3-(4-cloro-*o*-tolil) urea (V), 3-(4-cloro-*o*-tolil) urea (VI), N-formil-4-cloro-*o*-toluidina (VII), ácido N-formil-5-cloroantranílico (VIII), 4-cloro-*o*-toluidina (IX) y ácido 5-cloroantranílico (X) (Figura 6). Los mamíferos absorben fácilmente el clodimeformo por el tracto gastrointestinal y a través de la piel. Lo excretan rápidamente, alrededor del 80% por la orina y del 10-15% por las heces. Al cabo de unos 10 días se observan niveles bajos de residuos en todos los tejidos y no hay indicios de bioacumulación. Tras la administración cutánea a seres humanos se observa una excreción rápida semejante por la orina. Las principales vías metabólicas del clodimeformo en animales se resumen en la figura 7 (KNOWLES y BENEZET, 1977; JMPR, 1998).

**Figura 7.** Metabolismo del clodimeformo en animales y humanos.



### 3.7. TOXICIDAD EN MAMIFEROS

En ensayos realizados en varias especies el clodimeformo administrado por vía oral y cutánea ha mostrado tener una toxicidad aguda moderada. Los principales metabolitos han mostrado tener una toxicidad oral baja en ensayos realizados en ratas. El clodimeformo provoca solamente una ligera irritación cutánea y ocular en el conejo. Tras una exposición

breve o prolongada de ratones y ratas al clodimeformo o a sus metabolitos pueden observarse cambios asociados al tratamiento en los parámetros hematológicos y con dosis elevadas, indicios de hiperplasia del epitelio de las vías biliares y de la vejiga. El clodimeformo no aumenta la incidencia de tumores en las ratas. En los ratones, después de administrar a través de la dieta clodimeformo, N-formil-4-cloro-*o*-toluidina ó 4-cloro-*o*-toluidina, se observa, de forma relacionada con la dosis, un aumento de los tumores malignos hemorrágicos de origen vascular clasificados como hemangioendoteliomas malignos, que producen un aumento de la mortalidad asociada con la dosis. El clodimeformo no afecta a los parámetros reproductivos ni tiene potencial teratogénico (JMPR, 1998).

Se ha ensayado el clodimeformo en una amplia variedad de pruebas de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo*. No se han comunicado reacciones positivas a ninguna de esas pruebas, en las que se ensayó clodimeformo en estado puro. Además, se han comunicado varios informes esporádicos y no confirmados de actividad mutagénica inducida por la N-formil-4-cloro-*o*-toluidina y la 4-cloro-*o*-toluidina. Un informe describe una inducción de la transformación celular por efecto tanto del clodimeformo como de la 4-cloro-*o*-toluidina. En el hígado de los ratones y las ratas expuestos se producen enlaces con el ADN. Se ha observado un importante aducto hidrofóbico en los ratones en niveles mucho mayores que en las ratas (JMPR, 1998).

El clodimeformo induce diversos efectos farmacológicos y bioquímicos en los animales, tales como cambios cardiovasculares, hipotermia, hiperexcitabilidad, efectos sobre las funciones visual central y auditiva y modulación de las aminas biógenas y de las enzimas que metabolizan fármacos (JMPR, 1998).

Se ha estudiado la DL<sub>50</sub> del clodimeformo por vía intravenosa, dérmica y oral. En las tablas 5 y 6 se indican los valores de DL<sub>50</sub> para el clodimeformo y sus metabolitos respectivamente, obtenidos de informes remitidos a la Organización Mundial de la Salud (JMPR, 1998).

**Tabla 5.** Toxicidad aguda del clodimeformo.

ESPECIE	SEXO	VIA	DL <sub>50</sub> (mg/kg)	REFERENCIA
Rata	Macho/hembra	Oral	250	FAO/WHO, 1972
	Macho/hembra	Oral	340	WORTHING y WALKER, 1983
	Macho/hembra	Oral	123	ROBINSON <i>et al.</i> , 1975
	Macho/hembra	Oral	301	GAINES y LINDER, 1986
	Macho/hembra	Oral	178-220	FAO/WHO, 1972
	Macho/hembra	Oral	178	FAO/WHO, 1972
	Hembra	Oral	170-460	FAO/WHO, 1972
	Hembra	Oral	265	GAINES y LINDER, 1986
	Hembra	Oral	460	FAO/WHO, 1972
	Macho/hembra	Dérmica	640	FAO/WHO, 1972
	Macho	Dérmica	337	GAINES y LINDER, 1986
	Hembra	Dérmica	263	GAINES y LINDER, 1986
Ratón	Macho	Oral	267	GHALI y HOLLINGWORTH, 1985
	Macho/hembra	Intraperitoneal	110	FAO/WHO, 1972
Conejo	-	Oral	625	FAO/WHO, 1972
	-	Oral	625	WORTHING y WALKER, 1983
Perro	Macho	Oral	150	HURNI y SACHSSE, 1969
	Hembra	Oral	100	HURNI y SACHSSE, 1969

**Tabla 6.** Toxicidad aguda de los metabolitos del clodimeformo en la rata (FAO/WHO, 1972)

METABOLITO	SEXO	VIA	DL <sub>50</sub>
N-formil-4-cloro- <i>o</i> -toluidina	Macho/hembra	Oral	2900
4-cloro- <i>o</i> -toluidina	Macho/hembra	Oral	1000
4-cloro- <i>o</i> -toluidina-HCl	Macho/hembra	Oral	860
N-formil-4-cloro- <i>o</i> -toluidina	Macho/hembra	Dérmica (24h)	2150
4-cloro- <i>o</i> -toluidina	Macho/hembra	Dérmica (24h)	1800
4-cloro- <i>o</i> -toluidina-HCl	Macho/hembra	Dérmica (24h)	2150

## ***Genotoxicidad y carcinogenicidad***

En estudios *in vitro* el clodimeformo no ha presentado evidencia de síntesis no programada de ADN en hepatocitos de rata (niveles de dosis: 5-625 µg/ml) ni en fibroblastos humanos (niveles de dosis: 2-250 µg/ml). Por otra parte, la 4-cloro-o-toluidina sí que ha presentado evidencia de síntesis no programada de ADN al presentar un aumento dosis dependiente de ligero a moderado en el número medio de granos de plata por núcleo en hepatocitos de rata en un intervalo de dosis de 0,625-78,15 µg/ml, aunque este efecto no se ha observado en fibroblastos humanos en el intervalo de dosis de 1,25-156,25 µg/ml (JMPR, 1989).

La capacidad de unión a macromoléculas de la 4-cloro-o-toluidina en hígado de rata y de ratón también ha sido investigada por varios autores. HILL *et al.* (1979), estudiaron la unión a macromoléculas de la 4-cloro-o-toluidina *in vivo* e *in vitro*, observando *in vivo* que el hígado es el tejido con mayor unión a macromoléculas y que la unión *in vitro* era dependiente de la presencia de microsomas y NADPH. Se identificaron dos productos de enzimas microsomales el 5-cloro-2-hidroxilaminotolueno y el 4,4'-dicloro-2,2'-dimetilazobenceno de los cuales el compuesto hidroxilamino parece ser la forma más activa de la 4-cloro-o-toluidina en la formación de uniones.

La 4-cloro-o-toluidina causa roturas de la cadena de ADN en células V79 de hámster chino (ZIMMER *et al.*, 1980) .

En los estudios realizados por BENTLEY *et al.* (1986a,b), se comparó la unión covalente de macromoléculas hepáticas de ratón y de rata con la 4-cloro-o-toluidina. Tras la

administración única en cualquiera de las especies, el grado de unión disminuyó en el orden: proteína > ARN > ADN. El nivel de unión al ADN de hígado de ratón fue aproximadamente dos veces mayor que la unión a ADN de hígado de rata después de la administración ya sea única o repetida, mientras que la unión a ARN del hígado y proteínas fue mayor en la rata. Se formaron en ambas especies dos aductos principales de ADN, de los cuales uno se formó en mayor grado (6-30 veces) en ratones.

La capacidad de clodimeformo y sus metabolitos para inducir mutaciones ha sido investigado en sistemas microbianos y mamíferos. Clodimeformo dio resultados uniformemente negativos de inducción de mutaciones en *Salmonella typhimurium* (0,1-2.000 µg/ml), *Saccharomyces cerevisiae* (15-400 µg/ml) y *Escherichia coli* (250-2000 µg/ml), con o sin activación S9 microsomal, así como en un ensayo de mutación de la timidina quinasa en células de linfoma de ratón L5178Y/TK+/- con (75-3000 µg/ml) o sin activación microsomal (42,5 a 1700 µg/ml) (KALE *et al.*, 1995).

KALE *et al.* (1995) describieron que el clodimeformo a dosis de 10000 µg/ml es un potente mutágeno recesivo ligado al sexo en células pre-meióticas y meióticas de machos de *Drosophila*. El N-formil-4-cloro-o-toluidina también fue negativo en todos los ensayos de *Salmonella typhimurium* (0,1-1000 µg/ml) a excepción de la cepa TA100 con activación microsomal, en la que hubo un aumento dosis-dependiente de reversiones. Todos los ensayos en *Escherichia coli* (250-2000 µg/ml) fueron negativos. En un ensayo de mutación directa en células de linfoma de ratón L5178Y (213 y 640 µg/ml), el N-formil-4-cloro-o-toluidina dio un resultado positivo en dos de cada tres experimentos de incubación de 18 h. En un experimento con células de linfoma de ratón L5178Y (300 mg/kg), el resultado fue negativo. La 4-cloro-o-toluidina fue negativa en todos los ensayos con *Salmonella typhimurium* (10-2000 µg/ml)

excepto para las cepas TA98 y TA100 con activación S9 microsomal. Los ensayos con *Saccharomyces cerevisiae* (3,2 a 90 µg/ml) y con *Escherichia coli* (250-2000 µg/ml) fueron negativos. En un ensayo de mutación de la timidina quinasa en células de linfoma de ratón L5178Y/TK +/-, la 4-cloro-o-toluidina fue negativa sin activación S9 microsomal (31,25 a 500 µg/ml) y positiva con la activación microsomal (37,5 a 600 µg/ml). En un ensayo de mutación diferente en células de linfoma de ratón L5178Y (111 y 255 µg/ml), se obtuvo un resultado positivo en uno de cada tres experimentos de incubación de 18 h (JMPR, 1989).

Se llevaron a cabo ensayos de intercambio de cromátidas hermanas en células de médula ósea de hámster chino tras el tratamiento oral con clodimeformo (31-324 mg/kg) y la 4-cloro-o-toluidina (100-400 mg/kg). En ambos casos, el resultado fue negativo. Del mismo modo, en un ensayo de aberraciones cromosómicas en células en metafase de médula ósea de hámster chino, se obtuvo un resultado negativo después del tratamiento oral con clodimeformo ( $2 \times 60-240$  mg/kg), la N-formil-4-cloro-o-toluidina ( $2 \times 300-1200$  mg/kg) y la 4-cloro-o-toluidina ( $2 \times 100-800$  mg/kg), aunque los resultados fueron algo erráticos. En un ensayo de micronúcleos en células de médula ósea en interfase SS de hámster chino el tratamiento oral con clodimeformo ( $2 \times 60-240$  mg/kg), N-formil-4-cloro-o-toluidina ( $2 \times 300-1200$  mg/kg) y la 4-cloro-o-toluidina ( $2 \times 100-400$  mg/kg) fueron también negativos (JMPR, 1989).

Se evaluó el daño testicular cromosómico en células espermatogonias y espermatocitos de ratón. Para investigar los potenciales efectos citogenéticos en espermatogonias de ratón del clodimeformo (9-66 mg/kg), N-formil-4-cloro-o-toluidina (80-320 mg/kg) o 4-cloro-o-toluidina (85-500 mg/kg) se administraron por vía oral durante 5 días consecutivos. Los resultados fueron negativos en todos los casos. Para investigar los potenciales efectos citogenéticos en espermatocitos de ratón, clodimeformo (18-72 mg/kg), N-formil-4-cloro-o-

toluidina (80-320 mg / kg) y la 4-cloro-o-toluidina (8 -500 mg/kg) se administraron por vía oral durante 10 días en los días 0, 2, 3, 5 y 9. Los resultados fueron negativos en el caso del clodimeformo y la 4-cloro-o-toluidina, pero hubo resultado cromosómico no dosis-dependiente con N-formil-4-cloro-o-toluidina (JMPR,1989).

Se llevaron a cabo en los tres compuestos los ensayos de translocación hereditaria, el test de mutación letal dominante y el test de la mancha de mamíferos para estudiar la existencia de cambios genómicos menores o mayores. En el ensayo de translocación heredable, el clodimeformo (120 mg/kg/día), el N-formil-4-cloro-o-toluidina (100 mg/kg/día) y la 4-cloro-o-toluidina (200 mg/kg/día) se administraron por vía oral durante 49 días. No se encontró ninguna inducción de la translocación hetereditaria (JMPR, 1989).

En el ensayo de mutación letal dominante, el clodimeformo (22 o 66 mg/kg), el N-formil-4-cloro-o-toluidina (105 o 315 mg/kg) y la 4-cloro-o-toluidina (110 o 330 mg/kg) se administraron por vía oral en una sola dosis. No hubo evidencia de efectos letales dominantes en la progenie de ratones macho. En el test de manchas de mamífero, el clodimeformo (160 mg/kg), el N-formil-4-cloro-o-toluidina (100 mg/kg) y la 4-cloro-o-toluidina (100 mg/kg) se administraron por vía oral entre el día 8-10 de desarrollo embrionario. Los resultados fueron negativos, excepto en el caso de la 4-cloro-o-toluidina, que indujo una incidencia de 3,2 % de los puntos de relevancia genética en comparación con una incidencia de 0,9 % en los controles (JMPR, 1989).

En los ensayos de transformación de células llevados a cabo con clodimeformo y la 4-cloro-o-toluidina en células de ratón BALB/3T3 se observó un aumento de la incidencia de colonias de células transformadas con ambos compuestos. Con clodimeformo, el experimento

se llevó a cabo a niveles de dosis de hasta 1 µg/ml y se observó aumento de la frecuencia de transformación sólo a 0,0625 y 0,125 µg/ml. Las propiedades de transformación de clodimeformo se consideraron débiles. Con la 4-cloro-o-toluidina, tres experimentos se llevaron a cabo a niveles de dosis de hasta 36 µg/ml, y se observó un aumento significativo en la frecuencia de transformación. Las propiedades de transformación de 4-cloro-o-toluidina se consideraron definidas (JMPR, 1989).

En un estudio realizado por SUTER *et al.*, (1978), se administró con la dieta clodimeformo a concentraciones de 0, 20, 100 y 500 mg/kg durante 24 meses. Al final del experimento los animales se mantuvieron con la dieta control hasta que el 90% de los animales de un grupo murió, en cuyo momento se sacrificaron los animales restantes del grupo. No hubo signos de toxicidad aguda relacionada con el clodimeformo durante el curso del ensayo. El crecimiento y el consumo de alimentos se vieron afectados de igual forma por la presencia de clodimeformo en la dieta. La mortalidad fue significativamente mayor en las hembras después de 60 semanas a las dosis de 500 mg/kg y después de 90 semanas tanto a la dosis de 100 como de 500 mg/kg. En los machos, se observó un aumento significativo de la mortalidad después de 70 semanas a la dosis de 500 mg/kg y después de 110 semanas tanto a la dosis de 100 como de 500 mg/kg. Los animales alimentados con niveles de 100 mg/kg y superiores mostraron un aumento de la incidencia de masas de tejido hemorrágico en los tejidos subcutáneo, retroperitoneo y algunos órganos internos (riñón, hígado y bazo), que en el examen se clasificaron como hemangioendoteliomas malignos. Estos tumores, que en raras ocasiones aparecen en las poblaciones control, se encontraron principalmente a las dosis de 100 y 500 mg/kg. En algunos animales, los tumores eran de origen múltiple y se observaron metástasis en los pulmones. No se observaron otros tipos de neoplasias. Bajo las condiciones de este estudio, la dosis de 20 mg/kg parece ser el NOAEL.

En un estudio realizado por LI *et al.*, (1985), grupos de ratones (50/grupo) fueron alimentados con una dieta que contiene clodimeformo a concentraciones de 0, 20, 100, o 300 mg/kg durante un período de 18 meses. A un grupo de control positivo se le administró 300 mg/kg de 4-cloro-o-toluidina en la dieta durante 18 meses. Todos los animales fueron sacrificados al final del estudio y se evaluó la formación de tumores. El autor describió que la mayoría de las neoplasias presentadas por los animales eran como angiomas y las neoplasias malignas como angiosarcomas. Estos cambios neoplásicos fueron considerados similares a los observados en el estudio de SUTER *et al.*, (1978).

JIANG *et al.*, (1988) evaluaron la carcinogenicidad cutánea del clodimeformo en ratones. Los grupos de ratones suizos fueron tratados por vía dérmica con clodimeformo dos veces por semana a las dosis de 0, 100, 500, 2000 o 4000 mg/kg/pc durante un total de 17 a 20 tratamientos, junto con aceite de crotón. Los controles positivos recibieron brea (20 tratamientos) más aceite de crotón (30 tratamientos). Todos los animales se sacrificaron después de 18 meses y se analizó la formación de tumores. Clodimeformo indujo tumores de piel y de hígado. Los cambios observados en la piel consistieron en hiperplasia epidérmica, papilomas y carcinomas de células escamosas.

En un estudio de carcinogenicidad de SACHSSE *et al.*, (1978a), los grupos de ratones fueron alimentados con N- formil- 4-cloro-o-toluidina en la dieta en concentraciones de 0, 20, 100 y 500 mg/kg durante 24 meses. Después de este tiempo todos los animales fueron alimentados con una dieta control hasta que se concluyó el estudio cuando habían muerto el 90% de los animales en un grupo. No hubo ninguna señal de comportamiento alterado y no se observó mortalidad aguda. Se vieron afectados el crecimiento y el consumo de alimentos. No hubo diferencias significativas en la supervivencia después de un año de edad. Tanto los

machos como las hembras mostraron un aumento de la mortalidad a las dosis de 100 y 500 mg/kg después de aproximadamente un año de tratamiento. El inicio del aumento de la mortalidad se produjo antes en las hembras. El examen macroscópico y microscópico detallado de una variedad de tejidos mostró la presencia de numerosas lesiones anatómicas. Se produjo un aumento del número de masas hemorrágicas en los tejidos subcutáneos, en el retroperitoneo y en algunos órganos internos de ratones en todos los niveles de tratamiento. El examen microscópico detallado confirmó que el aumento de la incidencia de masas hemorrágicas eran tumores malignos de origen vascular. Estos tumores se clasifican histológicamente como hemangioendoteliomas malignos. Además de la aparición de los tumores, el tiempo de aparición de los mismos se redujo a medida que aumentaba la concentración en la dieta.

En un estudio de carcinogénesis en ratones realizado por SACHSSE *et al.*, (1978b), se alimentaron los animales con una dieta que contenía 4-cloro-o-toluidina en concentraciones de 0, 2, 20, 100 y 500 mg/kg durante 24 meses. Después de los 24 meses todos los animales fueron alimentados con dietas control hasta que se llegó al final del estudio, cuando murieron el 90% de los animales de un grupo. No hubo signos evidentes de toxicidad. El tratamiento no afectó ni al crecimiento ni al consumo de alimentos. Se observó en las dos dosis más altas un efecto adverso sobre la longevidad (esperanza de vida) de los animales. A la conclusión del estudio se apreció en el examen macroscópico un aumento del número de masas hemorrágicas en el tejido subcutáneo, en el retroperitoneo y en algunos órganos internos. El examen microscópico reveló una mayor incidencia de tumores malignos hemorrágicos de origen vascular a partir de la dosis de 20 mg/kg. La incidencia de tumores en el grupo control superó la incidencia observada en el grupo tratado a la dosis de 2 mg/kg. Los tumores se clasificaron histológicamente como hemangioendoteliomas malignos y, en ocasiones, se observaron

metástasis. No se observó un aumento dosis-dependiente en la incidencia total de tumores malignos, pero el tiempo hasta la aparición de tumores se redujo notablemente en los animales tratados a las dosis más altas que en los tratados a las más bajas . Se observó una variante benigna del hemangioma en todos los grupos y aunque sin las características de malignidad, causó la invasión local. Por lo tanto, los tumores benignos y malignos se han agrupado juntos. Los tumores vasculares (hemangiomas y hemangioendoteliomas ) del tipo que se produjo en los ratones parecían ser peculiares a esta especie de roedor. La aparición de otros tipos de neoplasias en el estudio no fue influenciado por la presencia de 4-cloro-o-toluidina en la dieta. Bajo las condiciones de este experimento, la dosis de 2 mg/kg en la dieta parece ser el NOAEL.

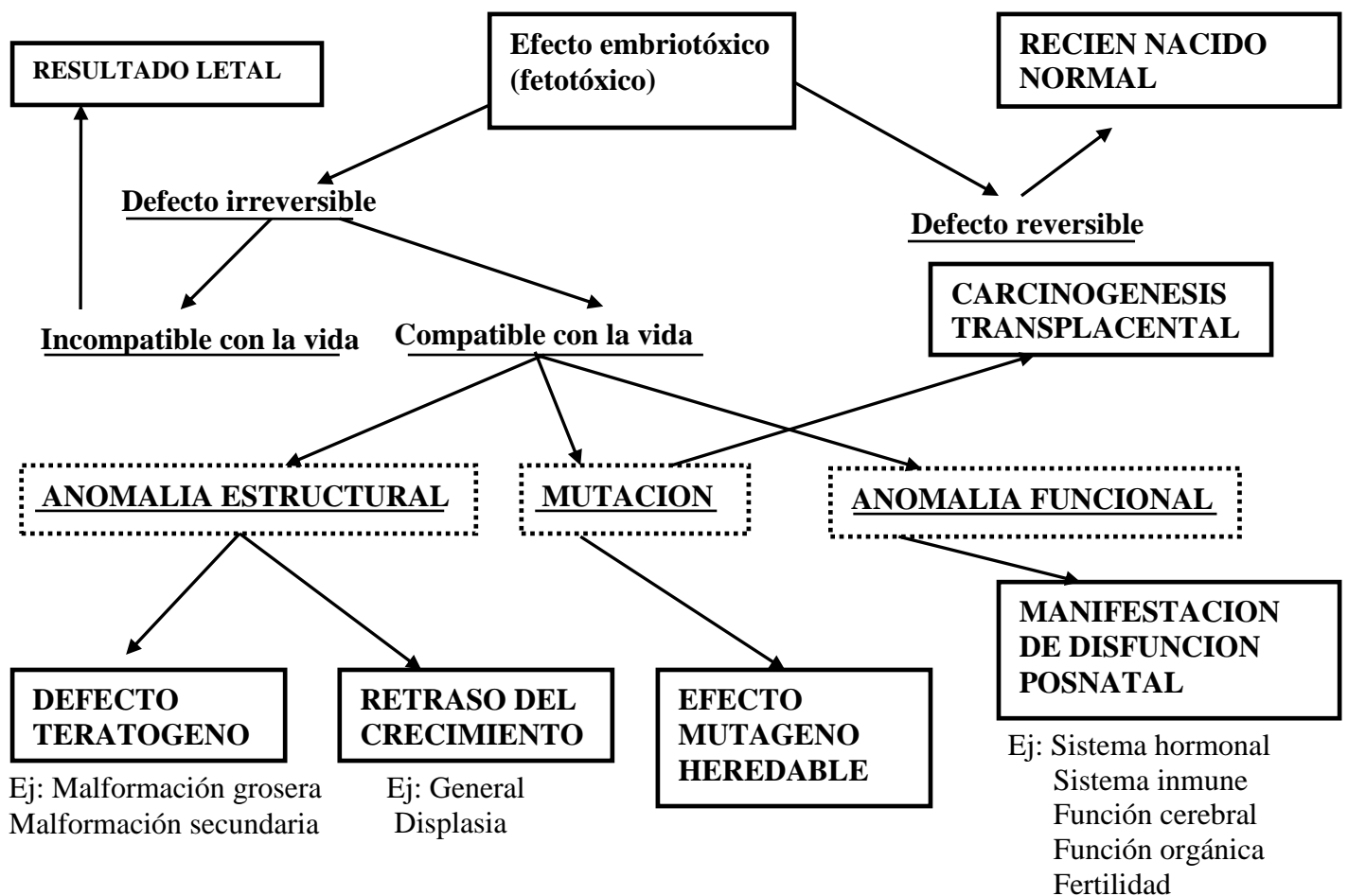
No se ha observado en ratas un aumento en la incidencia de tumores por la exposición a clodimeformo o a 4-cloro-o-toluidina (JMPR, 1989).

En un estudio de carcinogenicidad en rata realizado por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI, 1979), se trató a los grupos de ratas F344 (50 animales/sexo/dosis) con una dieta que contenía 4-cloro-o-toluidina en concentraciones de 1,250 o 5.000 mg/kg durante 107 semanas. Los grupos control contenían 20 animales por cada sexo. No hubo una tendencia relacionada con la dosis hacia una mayor mortalidad en ambos sexos. Hubo una gran variedad de cambios neoplásicos y no neoplásicos entre el control y las ratas tratadas. Hubo un pequeño aumento en los adenomas de células cromóforas de la glándula pituitaria en ratas macho y hembra en comparación con los controles. Todos estos tumores fueron benignos y son comunes en esta raza de ratas y se produjeron en el 21% de las ratas control en los laboratorios del Instituto Nacional del Cáncer. Los autores concluyeron que en la base de un examen histopatológico, 4-cloro-o-toluidina no fue carcinogénico en ratas F344.

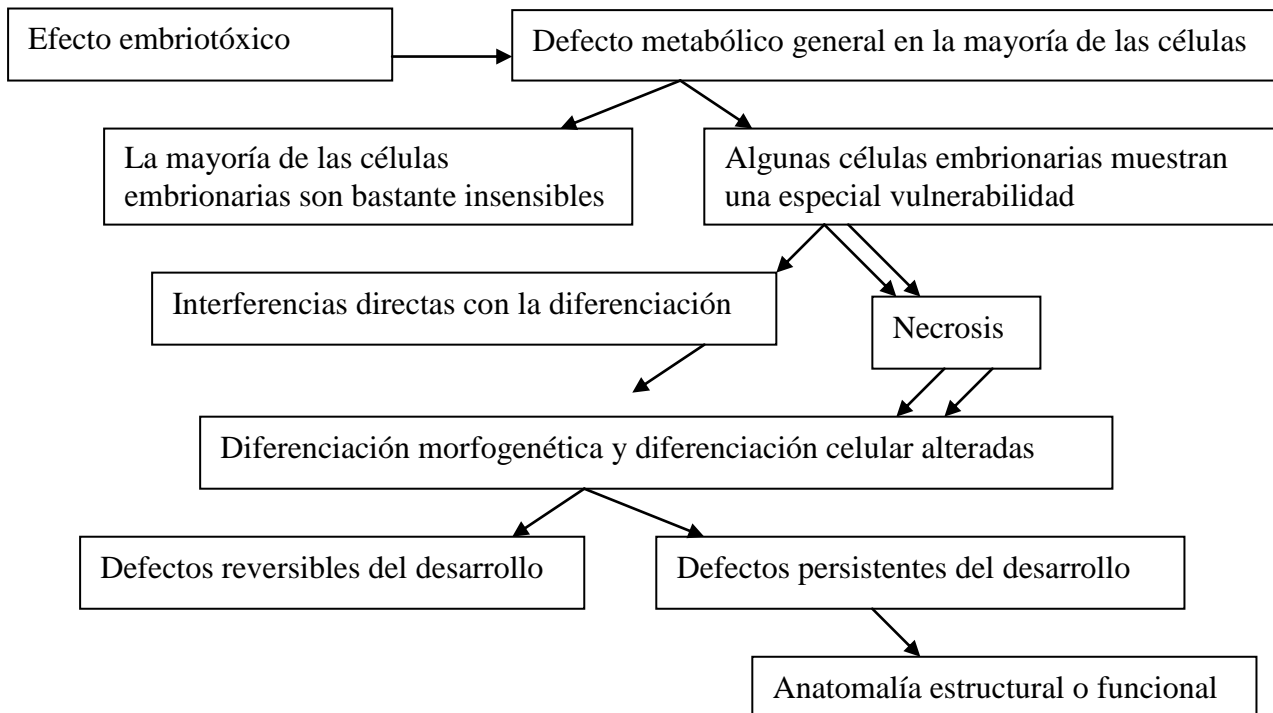
## Toxicidad para la reproducción y el desarrollo

La toxicología para la reproducción se refiere al estudio de los efectos adversos de las sustancias sobre el embrión, feto, neonato y mamífero prepúber, así como sobre los sistemas reproductor y endocrino del adulto (IUPAC, 1993). Los efectos embriotóxicos potenciales se resumen en la figura 8 (NEUBERT *et al.*, 1973, 1980; BASS *et al.*, 1977), y la figura 9 representa la secuencia de acontecimientos que conducen a una anomalía funcional o estructural (NEUBERT *et al.*, 1978).

**Figura 8.** Resultados variables de un efecto embriotóxico en mamíferos.



**Figura 9.** Representación esquemática de la secuencia de acontecimientos que conducen a una anomalía funcional o estructural.



BLACKMORE (1969a) evaluó la toxicidad para la reproducción del clodimeformo en rata. En su estudio se emplearon cuatro grupos de 10 machos y 20 hembras que fueron alimentados con una dieta que contenía 0, 100, 250 y 500 mg/kg de clodimeformo en aceite de maíz durante tres generaciones parentales y filiales de dos camadas. El peso corporal de los padres antes del apareamiento tendió a disminuir en todos los grupos de tratamiento, sobre todo en el nivel más alto de dosis. La misma tendencia fue evidente en relación con el consumo de alimentos. El índice de fertilidad, de gestación y de nacidos vivos, la proporción de sexos, el tamaño de la camada y el peso al nacer de las crías fueron similares entre los grupos tratamiento y control en todas las generaciones. A la dosis de 500 mg/kg, el índice de lactancia se redujo en las camadas F1a, F1b y F3a. El peso al destete de las crías fue disminuido en todas las crías en las dosis más altas. En los padres y las crías que murieron durante el estudio, así como en 10 machos y 10 hembras destetados de la generación F3b, se realizaron exámenes anatomopatológicos sin observarse ningún efecto

En un estudio realizado por GOLDMAN *et al.*, (1991), el tratamiento de ratas Long-Evans ovariectomizadas con una inyección única intraperitoneal de clodimeformo a las dosis de 25 o 50 mg/kg provocó una supresión completa del aumento de la hormona luteinizante. La supresión observada no persistió más allá del día de tratamiento. En un estudio más reciente por COOPER *et al.*, ( 1994 ), se examinó el efecto de la supresión en el aumento de la hormona luteínica sobre el embarazo, observándose que el clodimeformo a la dosis de 50 mg/kg originó un retraso en el amamantamiento, así como una reducción significativa en el tamaño de la camada.

LINDER *et al.*, (1992) administraron a ratas adultas macho Sprague-Dawley clodimeformo por sonda a la dosis de 200 mg/kg/pc un solo día o 50 mg/kg pc/día durante 5 días. Las ratas fueron sacrificadas el día 3 o 13 después de la última dosis. No hubo cambios en los pesos de los testículos u órganos asociados. El número de espermatozoides fue reducido después de una dosis única. No se observaron otros cambios, incluyendo la motilidad, la velocidad o la morfología del esperma.

GOLDMAN *et al.*, (1993) describieron que una sola dosis intraperitoneal de clodimeformo (75 mg/kg) es capaz de retrasar el aumento de la hormona luteinizante y alterar el momento de la liberación de ovocitos en el hámster. Las consecuencias sobre la reproducción de este efecto no se investigaron.

FRITZ (1975) estudió la embriotoxicidad del clodimeformo en ratas. Para ello administró a ratas preñadas (25 animales) clodimeformo en carboximetilcelulosa a las dosis de 0, 10, 25 o 50 mg/kg/pc/día o carboximetilcelulosa (30 animales) durante los días 6 a 15 de gestación. Sólo se observó una ligera reducción en el consumo de alimentos a partir de la

dosis intermedia. A la dosis más alta, las madres mostraron somnolencia en los 3 primeros días de tratamiento. También hubo una reducción de la ganancia de peso corporal y disminución en el consumo de alimentos a esta dosis. El examen de los fetos extraídos por cesárea el día 21 de gestación mostró que hubo un ligero retraso en el crecimiento de los fetos en las dos dosis más altas. Este efecto probablemente fue un resultado directo de la respuesta tóxica en las madres. No se observaron efectos teratogénicos en la descendencia, a pesar de la presencia de mayor incidencia de defectos de osificación esternal a la dosis de 25 mg/kg/pc.

BLACKMORE (1969b) estudió la embriotoxicidad en conejos. Para ello administró clodimeformo a las dosis de 0, 7,5 o 30 mg/kg pc/día por sonda durante los días 8 a 16 de la gestación a tres grupos de 10 conejas preñadas blancas de Nueva Zelanda. Cinco conejas por grupo fueron sacrificadas el día 28 de gestación. No se observó ningún efecto sobre la mortalidad parental, la tasa de aborto, cuerpos lúteos a la implantación, tamaño de la camada, incidencia de resorciones, mortinatos, peso fetal, longitud del feto ni de anomalías esqueléticas o del tejido. En los conejos restantes, la duración de la gestación, el tamaño de la camada y el peso de la camada fueron similares en ambos grupos de tratamiento y de control.

FRITZ (1971) estudió la embriotoxicidad en conejos. Administró oralmente a hembras de conejo preñadas clodimeformo a las dosis de 0, 10, 30 y 100 mg/kg/pc/día durante los días 6 a 18 de gestación. Los fetos fueron extraídos por cesárea el día 28 de la gestación. La administración de clodimeformo a la dosis de 100 mg/kg/pc produjo un efecto adverso sobre las madres durante los primeros 4 días de tratamiento. El examen de las madres y los fetos a los 28 días indicaron que la dosis baja no tuvo ningún efecto teratogénico o embriotóxico. En las dosis intermedia y alta se encontró que el ratio de implantación de cuerpos lúteos se redujo en comparación con los controles. A la dosis más alta, el número de osificaciones incompletas

de esternón mostró un ligero aumento con respecto a la observada en los controles. Además el número de fetos con malformaciones aumentó ligeramente a esta dosis. Estas malformaciones incluyen paladar hendido, exencefalia y onfalocele. Un examen más detallado de las malformaciones espontáneas observadas en un control acumulativo de 2.495 fetos de conejo sugirió que estas alteraciones pueden ser espontáneas y no una consecuencia de la administración de clodimeformo.

### **3.7.1. Neurotoxicidad**

Se ha descrito un perfil de efectos sobre el comportamiento, efectos neuroquímicos y fisiológicos en roedores y perros inducidos por clodimeformo que claramente implican el SNC como órgano diana para este plaguicida. Entre los principales efectos descritos para el clodimeformo se encuentran hiperreactividad y agresividad, alteración de la marcha, del estado de alerta y en la incorporación sobre las patas traseras, así como convulsiones, temblor, debilidad muscular, disminución de la ingesta entre otros (MOSER y MACPHAIL, 1986, 1989; MOSER *et al.*, 1987; BOYES y MOSER, 1987, 1988; BOYES y DYER, 1984; PFISTER y YIM, 1977; GILBERT, 1988; GILBERT y DYER, 1988; HSU y KAKUK, 1984).

Se ha descrito que el clodimeformo produce un aumento transitorio de la excitabilidad y reducción de los procesos inhibitorios en el SNC, lo cual podría ser debido a su acción agonista  $\alpha_2$ -adrenérgica, aunque también se podría deber a una modificación de la actividad gabaérgica (GILBERT y DYER, 1988). También se ha observado que la exposición al clodimeformo aumenta la susceptibilidad a las convulsiones en la rata lo cual podría ser mediado por una acción combinada de su actividad agonista  $\alpha_2$ -adrenérgica y de sus efectos anestésicos locales (GILBERT, 1988).

MOSER et al. (1988) examinaron el comportamiento de ratas utilizando una batería de observaciones funcionales tras la administración oral de una sola dosis de clodimeformo en los niveles de dosis de 0, 1, 25 y 56 mg/kg/pc. Las ratas fueron examinadas a las 1,5 y 24 h. La exposición a clodimeformo produjo una disminución en el peso y temperatura corporal junto con una disminución en la frecuencia de levantamiento de las patas traseras, la marcha y la excitación, así como un aumento dosis-dependiente en la actividad general, la excitabilidad del SNC y la capacidad de respuesta sensorial. El clodimeformo también produjo un aumento de la fuerza de agarre.

Entre otros efectos conductuales observados con clodimeformo se incluye la estimulación del apetito en ratas (PFISTER *et al.*, 1978b), la aversión a sabores tanto en ratas (MACPHAIL y LEANDER, 1980) como ratones (LEANDER *et al.*, 1984) y la alteración en el desarrollo de esquemas controlados en ratas (MACPHAIL y LEANDER, 1981), ratones (GLOWA, 1986) y palomas (LEANDER y MACPHAIL, 1980). WITKIN y LEANDER (1982) demostraron que, mientras el clodimeformo causa la estimulación del apetito en ratas, también produce una disminución dosis dependiente en el consumo de agua, en contraste con otros estimulantes del apetito.

### ***Neurotoxicidad en el desarrollo***

La neurotoxicidad en el desarrollo relaciona alteraciones en el comportamiento, neuroquímicas, neurohistológicas, y/o alteraciones morfológicas del SNC sucedidas en los descendientes de la madres expuestas durante la gestación y la lactancia (LAZARINI *et al.*, 2001). En roedores, el desarrollo de los sistemas de neurotransmisores comienza durante el último periodo fetal. Aunque el desarrollo morfológico de los sistemas de neurotransmisores

es completo al cabo de una a dos semanas después del nacimiento, el porcentaje de síntesis de algunos neurotransmisores no alcanza niveles adultos hasta, en algunos casos, aproximadamente uno o dos meses después del nacimiento (SUZUKI y MARTIN, 1994).

Se conoce que la exposición durante el desarrollo a plaguicidas puede interferir con el normal desarrollo de los sistemas de neurotransmisores y ocasionar un daño directo sobre los mismos (RICHARDSON *et al.*, 2006). En este sentido se ha visto que la exposición al plaguicida piretroide dieldrin durante el desarrollo produce alteraciones persistentes del sistema dopaminérgico y estas alteraciones inducen un estado de disfunción dopaminérgica silente, de tal manera que las neuronas dopaminérgicas son más vulnerables en la edad adulta a diversas sustancias químicas, siendo más susceptibles a posibles daños como se ha visto en ratas que fueron expuestas al dieldrin durante el desarrollo y posteriormente en la edad adulta fueron expuestas a la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) dando lugar a un incremento de la susceptibilidad al Parkinson (RICHARDSON *et al.*, 2006). También se ha visto que la exposición a clorpirifos a dosis aparentemente no tóxica en un periodo crítico del desarrollo a nivel prenatal y postnatal produce una alteración neuronal del sistema catecolaminérgico, encontrándose alteraciones en el comportamiento a largo plazo relacionadas con la función serotoninérgica (ALDRIDGE *et al.*, 2005). Además, durante la exposición a clorpirifos y en el periodo inmediato a la exposición se detectó una profunda activación de los sistemas catecolaminérgicos en el cerebro (DAM *et al.*, 1999a,b). La hiperactividad del sistema catecolaminérgico podría jugar un papel en la neurotoxicidad del clorpirifos ya que estos neurotransmisores están implicados en el daño oxidativo (BLUM *et al.*, 2001; JUNN y MOURADIAN, 2001).

El mecanismo por el que se producen estos efectos no se conoce pero se sabe que los neurotransmisores en el sistema nervioso inmaduro pueden actuar como factores tróficos que median procesos durante el desarrollo tales como diferenciación y proliferación celular. Además, estudios más recientes demuestran que los neurotransmisores también pueden mediar la dirección de migración neuronal y el crecimiento axonal durante la formación de circuitos neuronales (RUEDIGER y BOLZ, 2007). Neurotransmisores tales como catecolaminas aparecen en el embrión de animales vertebrados e invertebrados incluso antes de que las neuronas se hayan diferenciado (PENDLETON *et al.*, 1998). Muchos neurotransmisores cambian su papel funcional en el SNC durante el desarrollo. La misma molécula puede ser crucial para la diferenciación, crecimiento neuronal y el establecimiento de las redes neuronales en el SNC inmaduro, mientras que en el SNC maduro cambia su función hacia un papel modulador de la comunicación sináptica entre neuronas (HERLENIUS y LAGERCRANTZ, 2001). En este sentido se asume que los neurotransmisores monoaminérgicos juegan un papel durante el desarrollo, definido como “morfo genético” (BUZNIKOV *et al.*, 1996; LEVITT *et al.*, 1997; NICOTRA y SHATTEN, 1990; NICOTRA y SENATORI, 1989).

Una alteración en los niveles de alguno de los neurotransmisores puede modificar el desarrollo de los diferentes sistemas de neurotransmisores (LAUDER, 1985; LAKSHMANA y RAJU, 1994). La noradrenalina es esencial para el desarrollo normal del sistema nervioso. El sistema noradrenérgico regula el desarrollo de las células Cajal-Retzius, las cuales son las primeras neuronas que surgen en la corteza y se ha propuesto que juega un papel fundamental en la migración neuronal y la formación laminar (NAQUI *et al.*, 1999). La administración de 6-OH-dopamina impide la muerte celular programada natural de estas neuronas y retrasa la formación de las capas corticales. Lesiones de las proyecciones noradrenérgicas o bloqueo de

la neurotransmisión con antagonistas impiden la astrogliosis y la proliferación celular glial. La depleción de los niveles de noradrenalina durante el periodo perinatal da lugar a sutiles cambios dendríticos y posiblemente también a alteraciones en la diferenciación cortical (BERGER-SWEENEY y HOHMANN, 1997).

Un descenso en los niveles de serotonina en el cerebro del feto de rata inducido por la exposición al *para*-clorofenilalanina durante la gestación produce una alteración morfológica en el desarrollo de áreas corticales, hipocampo, núcleos del rafe y la sustancia negra, que da lugar a una alteración morfológica y funcional característica del sistema nociceptivo a la edad de 25 días (BUTKEVICH *et al.*, 2003). La serotonina juega un papel importante en la regulación del desarrollo del SNC (LAUDER, 1990; JACOBS y AZMITIA, 1992; VERNEY *et al.*, 2002; WHITAKER-AZMITIA *et al.*, 1996). La deficiencia de serotonina en una etapa temprana de la embriogénesis, cuando la serotonina tiene influencia sobre el desarrollo celular y los tejidos, causa desórdenes en la neurogénesis (LAUDER y KREBS, 1976; KHOZHAI y OTELLIN, 2006) y anomalías en el desarrollo del cerebro y sus sistemas de neurotransmisores (LAUDER y KREBS, 1976; KHOZHAI y OTELLIN, 2006). Las consecuencias de estas anomalías persisten en la etapa adulta y son acompañadas por un número de desórdenes funcionales (KHOZHAI y OTELLIN, 2006). Por otra parte, también se ha observado que el exceso de serotonina impide el desarrollo normal de la corteza somatosensorial (CASES *et al.*, 1998). Estudios experimentales en roedores muestran que la administración de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina en un periodo crítico durante el desarrollo produce cambios en los circuitos neuronales y alteraciones del comportamiento tales como aumento de la ansiedad, de la agresividad o del comportamiento depresivo que persisten hasta la edad adulta. Cambios similares resultan de la inhibición del transportador de serotonina o de la MAO, implicando a estos dos reguladores de la señal

serotoninérgica en los cambios producidos durante el desarrollo (BORUE *et al.*, 2007; BALER *et al.*, 2008).

Respecto a la neurotoxicidad en el desarrollo inducida por formamidas se han realizado estudios en los dos compuestos de la familia que han sido comercializados. OLSON *et al.*, (1978) realizaron los únicos estudios sobre el clodimeformo, en los que examinaron los efectos de la exposición prenatal y postnatal tras la ingesta del mismo a la dosis de 0,1 mg/kg pc/día. Evaluaron el desarrollo temprano (natación y el reflejo de enderezamiento) en crías de rata los días posnatales de 7 a 17. Encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y control siendo la más afectada la prueba de la natación, observándose un retraso en la maduración en el grupo tratado con clodimeformo. Por otra parte, los estudios realizados por PALERMO-NETO *et al.*, (1994, 1997) de toxicidad en el desarrollo por exposición prenatal y postnatal al amitraz, la otra formamida de acción similar al clodimeformo que todavía se comercializa, pusieron de manifiesto alteraciones en el comportamiento lo que sugiere la presencia de efectos neuroquímicos y neurofuncionales por la exposición a formamidas durante el desarrollo, efectos que fueron confirmados por DEL PINO *et al.*, (2011), en un estudio en el que se administró amitraz a ratas preñadas durante los días 6 a 21 de gestación y 1 a 10 de lactancia observándose una alteración región y sexo-dependiente en los niveles de catecolaminas a la edad de 60 días. DEL PINO *et al.*, (2011) apunta a que estos efectos pudieran ser debidos, entre otros mecanismos, a una alteración de los niveles de catecolaminas durante el desarrollo por la inhibición de la MAO o también debidos a una alteración a largo plazo de la expresión de las enzimas que catalizan la síntesis y metabolismo de estos neurotransmisores, mediada por una modificación de las hormonas sexuales que controlan el desarrollo del sistema nervioso.

## **MATERIAL Y METODOS**

## **4. MATERIAL Y METODOS**

### **4.1. PROTOCOLO Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se utilizaron un total de 82 ratas Wistar, 10 hembras preñadas de 60 días de edad, 36 machos de 60 días de edad y 36 hembras de 60 días de edad, crías de las ratas preñadas. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales de policarbonato, con un lecho de serrín y alimentadas con una dieta para roedores y agua *ad libitum*. La temperatura del animalario fue de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  y la humedad relativa del  $50 \pm 10\%$ . Los animales, en estas condiciones, se mantuvieron con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luz de 8:00 a 20:00) y aire purificado.

La elección de la rata como modelo animal experimental se justifica, en general, en que los roedores poseen una serie de ventajas para los estudios toxicológicos, como son su pequeño tamaño, fácil manejo, resistencia a infecciones, corto ciclo de vida y de gestación, y grandes camadas (en número). Además, es un modelo animal aceptado para proporcionar datos que pueden ser incorporados a la evaluación del riesgo para el hombre de pesticidas. En los estudios de niveles de neurotransmisores en el SNC, la rata tiene la ventaja añadida de que por el tamaño de su encéfalo permite una buena localización de las distintas regiones encefálicas. Además, a fecha de hoy existen distintos atlas que detallan la anatomía de su sistema nervioso y la distribución de las sustancias neuroactivas (PAROXINOS y WATSON, 1998; TOHYAMA y TAKATSUJI, 1998).

## **Experimento:**

Se utilizaron 10 ratas Wistar hembra preñadas de 60 días de edad de 200 gramos de peso corporal, divididas en 2 grupos:

Grupo I (grupo control, 5 ratas): se le administró a cada rata 0,5 mL/día de aceite de maíz, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia. El tratamiento se administró por vía oral mediante intubación intragástrica utilizando una jeringa acoplada a una cánula metálica.

Grupo II (5 ratas): los animales recibieron 5 mg clodimeformo/kg/pc durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia. El tratamiento se administró por vía oral mediante intubación intragástrica utilizando una jeringa acoplada a una cánula metálica. Se preparó una solución de clodimeformo en aceite de maíz a una concentración de 2 mg/mL, administrando el volumen correspondiente a cada rata para la dosis de 5 mg/kg/pc, es decir, 0,5 mL por cada 200 g de peso corporal.

Durante el experimento, el agua y el alimento se dispusieron *ad libitum* para el período completo de duración del ensayo. Previamente a la administración del tratamiento diario con clodimeformo o en los animales control con el vehículo, se retiraba el alimento durante 6 horas, volviéndose a colocar una hora después del mismo. En el estudio se determinó el consumo diario de alimento y la evolución diaria del peso corporal de cada animal. Se les observó diariamente por si pudiera aparecer algún signo de toxicidad.

Se ha usado la dosis de 5 mg/kg porque se ha observado en estudios previos que es la dosis más alta que no reduce la ingesta de agua o alimento o reduce la ganancia de peso para los animales durante la gestación y la lactancia. Además esta dosis no induce modificaciones

hematológicas u otros signos clínicos o histopatológicos de toxicidad.

Las ratas madre control (Grupo I) y las ratas madre tratadas (Grupo II) tuvieron una camada de  $10 \pm 1$  crías. En el día 1 del nacimiento se seleccionaron al azar 36 ratas (18 hembras y 18 machos) de cada grupo, realizándose los siguientes subgrupos (figura 10):

- Grupo I<sup>1</sup> (18 machos) (animales nacidos de ratas madre control)
- Grupo I<sup>2</sup> (18 hembras) (animales nacidos de ratas madre control)
- Grupo II<sup>1</sup> (18 machos) (animales nacidos de ratas madre tratadas con clodimeformo)
- Grupo II<sup>2</sup> (18 hembras) (animales nacidos de ratas madre tratadas con clodimeformo)

**Figura 10.** Representación esquemática de la distribución al azar de las crías en los subgrupos del estudio.



El día posnatal 11 se eligieron al azar 6 animales por cada uno de los subgrupos citados y se sacrificaron por dislocación cervical, seguida de exanguinación y decapitación para la determinación de las hormonas estradiol y testosterona. El resto de las crías de todos

los subgrupos se mantuvieron individualmente en jaulas hasta la edad de 60 días alimentándose con pienso normal y agua *ad libitum*. Trascurrido este periodo de 60 días se dividieron los animales en dos grupos de 24 animales control y tratados por grupo y a continuación se sacrificaron por dislocación cervical, seguida de exanguinación y decapitación (Figura 11).

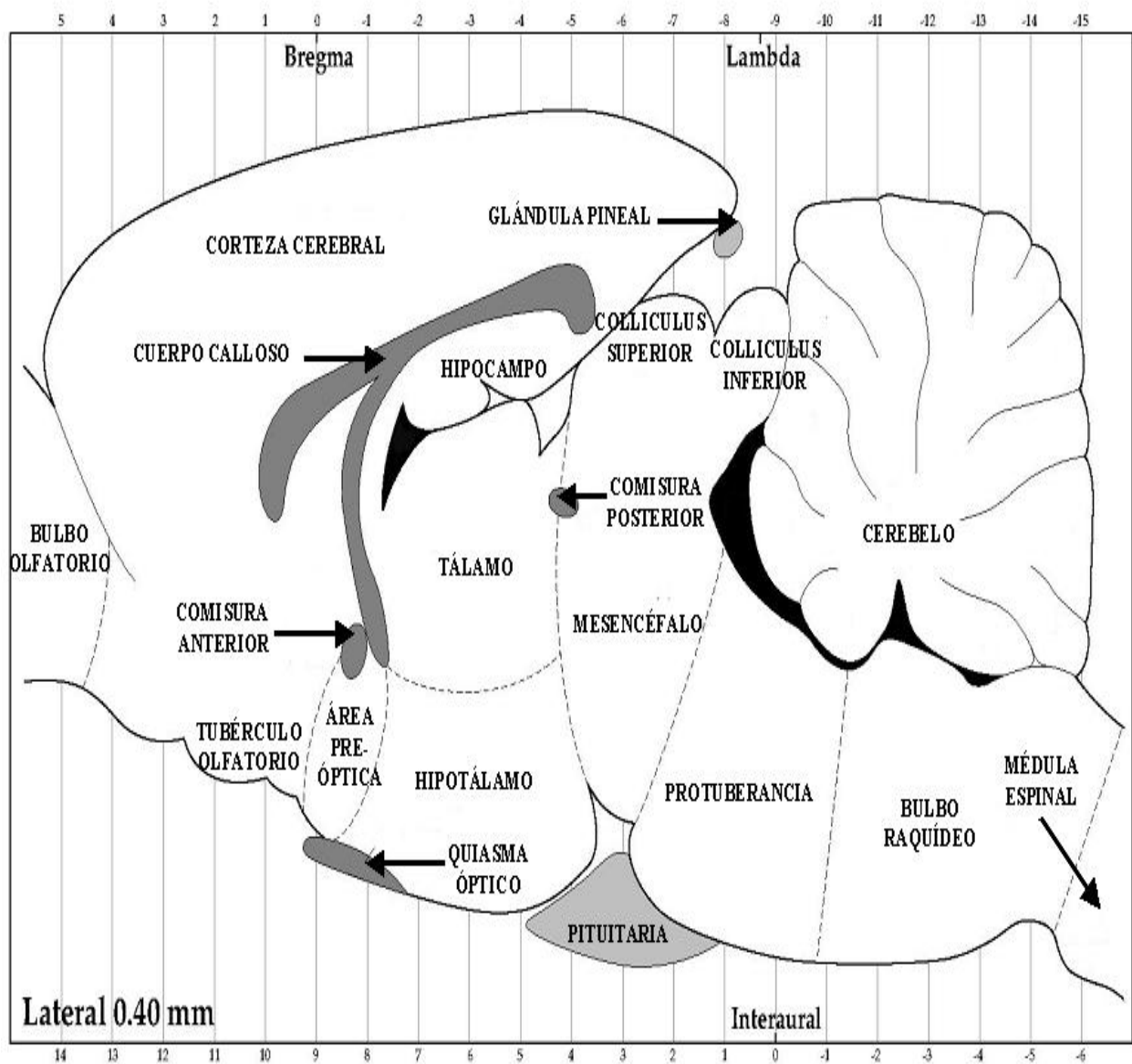
**Figura 11.** Representación esquemática del procedimiento experimental del estudio y sacrificio de los animales.



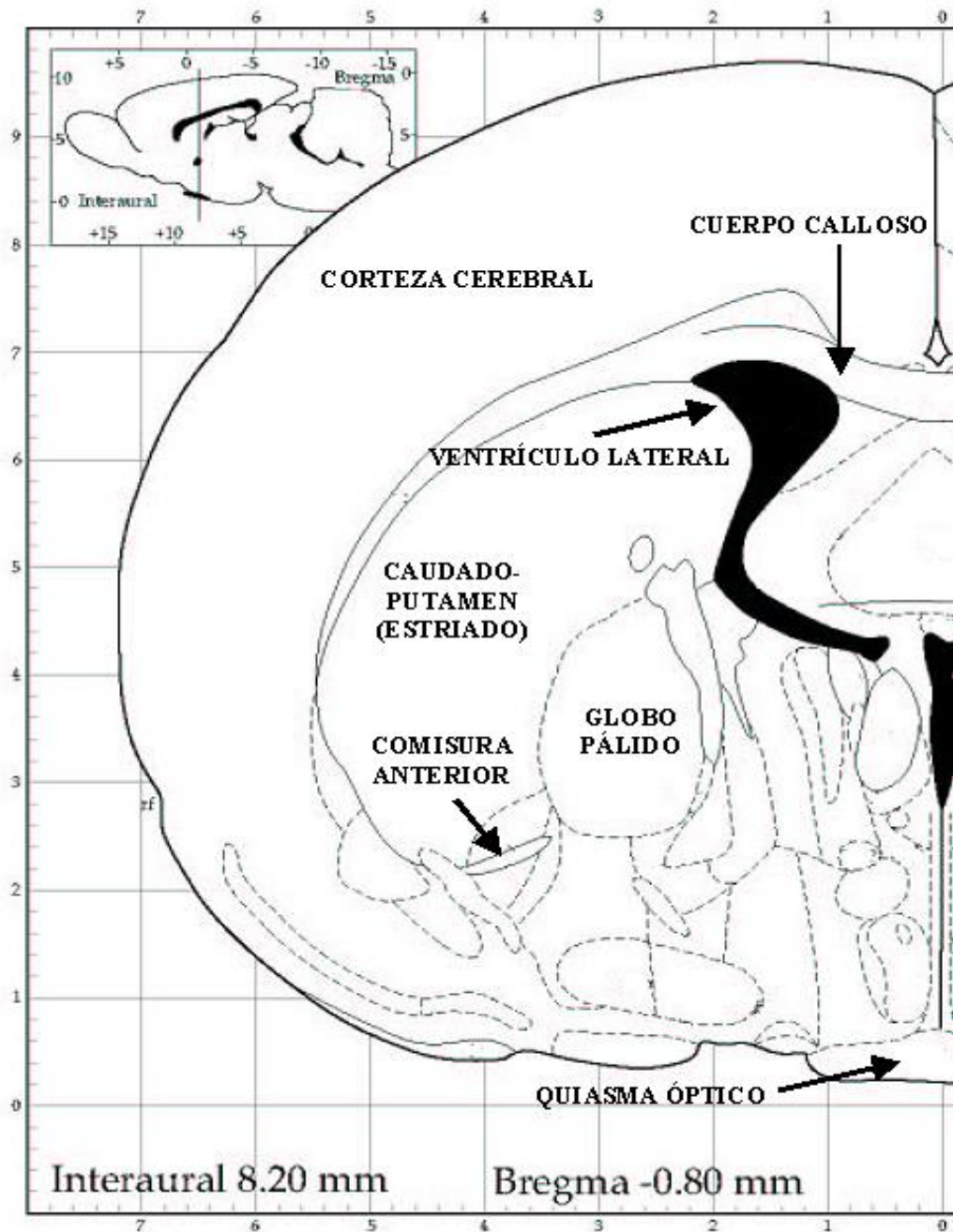
Inmediatamente tras el sacrificio de todos los animales se aislaron el encéfalo y la médula espinal, manteniéndose siempre a 4°C y diseccionándose rápidamente para obtener las áreas correspondientes al hipotálamo, mesencéfalo, bulbo raquídeo, cerebelo, médula espinal, corteza frontal, hipocampo y cuerpo estriado, siguiendo el método de GLOWINSKI e IVERSEN (1966). En primer lugar se separó por un corte transverso el romboencéfalo, obteniéndose mediante disección la médula espinal, con cuidado de no cortar el bulbo raquídeo y el cerebelo, que se separaron a continuación (Figuras 12 y 13). Seguidamente se diseccionó el hipotálamo, mediante un corte transversal a nivel del quiasma óptico hasta la comisura anterior, que se tomó como referencia horizontal. Se continuó tomando una muestra

de la corteza frontal y se procedió a la separación del cuerpo estriado, mesencéfalo e hipocampo. Para la disección del cuerpo estriado se tomaron las paredes externas de los ventrículos laterales como límite interno y el cuerpo calloso como límite externo. Finalmente, se separaron el mesencéfalo y el hipocampo.

**Figura 12.** Representación de las distintas partes del encéfalo de la rata Wistar en un corte en el plano sagital (0,40 mm con respecto a la medial). Modificada de PAROXINOS y WATSON (1998).



**Figura 13.** Representación de un corte en el plano coronal del encéfalo de la rata Wistar (Bregma  $-0,80$  mm) en el que se aprecia el estriado (no visible en la Figura anterior). Modificada de PAROXINOS y WATSON (1998).



## **4.2. DETERMINACION ANALITICA DE SEROTONINA (5-HT), DOPAMINA (DA), NORADRENALINA (NA) Y SUS METABOLITOS**

De los animales sacrificados se seleccionaron al azar las muestras de tejido tomadas de 12 ratas (6 hembras y 6 machos) de cada grupo, realizándose los siguientes subgrupos:

- Grupo I<sup>1</sup> (6 machos) (animales nacidos de ratas madre control)
- Grupo I<sup>2</sup> (6 hembras) (animales nacidos de ratas madre control)
- Grupo II<sup>1</sup> (6 machos) (animales nacidos de ratas madre tratadas con clodimeformo)
- Grupo II<sup>2</sup> (6 hembras) (animales nacidos de ratas madre tratadas con clodimeformo)

Cada muestra de tejido se pesó en una balanza electrónica (Sartorius ER 182), guardándose separadamente en tubos Eppendorf debidamente identificados. Las muestras se homogenizaron por ultrasonidos con un sonicador Labsonic U-Braun, durante 4 minutos a velocidad constante, manteniendo la temperatura de 4°C (tubos dentro de un recipiente con hielo picado), en solución de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) 0,4M y metabisulfito sódico (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) al 0,1% (p/v), y en volúmenes que variaron en función del tejido: 300 µL (hipotálamo, hipocampo y cuerpo estriado); 500 µL (corteza frontal, mesencéfalo y médula espinal); 700 µL (cerebelo); y 800 µL (bulbo raquídeo). Posteriormente se centrifugaron a 12.000 r.p.m. en una centrífuga refrigerada RC5C de Sorwall Instruments Dupont con rotor para tubos Eppendorf a 4 °C durante 20 minutos. Se recogió el sobrenadante en tubos Eppendorf y todas las muestras se conservaron a -80°C hasta el análisis del contenido de neurotransmisores monoaminérgicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Existen distintos métodos analíticos para la separación y cuantificación de DA, 5-HT, NA y sus metabolitos en tejidos del SNC y en otros tejidos y fluidos biológicos.

Actualmente, el método más utilizado para el análisis de indolaminas y catecolaminas en muestras biológicas es el de la HPLC con columnas de fase reversa y con detección electroquímica (COLADO *et al.*, 1988, 1993a, 1997, 1999; LAWRENCE *et al.*, 2002). En nuestro caso, el método HPLC utilizado es el descrito por COLADO *et al.* (1993b), con modificaciones realizadas por FERNANDEZ *et al.*, 1995, metodología escogida por su linealidad, repetitividad intra e inter día y sensibilidad (límite de detección y cuantificación). Para el análisis del principal metabolito de la noradrenalina el 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenglicol (MHPG) en muestras biológicas, el método más utilizado es el de la HPLC con columnas de fase reversa y con detección por fluorescencia (ARTIGAS *et al.*, 1986).

#### **4.2.1. Determinación analítica de 5-HT y su metabolito el ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA)**

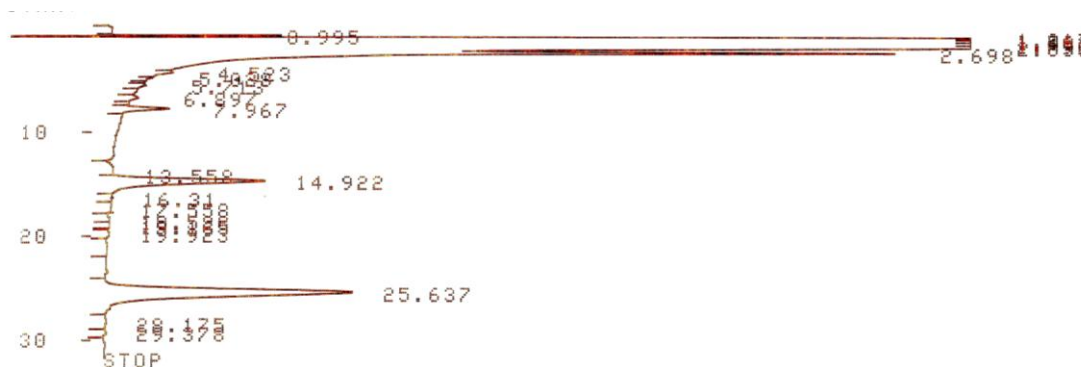
Se tomaron 20  $\mu$ L de los sobrenadantes de los homogeneizados de cada una de las regiones del SNC almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , que se inyectaron en un sistema cromatográfico con columna de fase reversa Teknokroma Nucleosil 120 C<sub>18</sub> de 5  $\mu$ m (partícula de relleno), 12,5 cm de largo y 0,4 cm de diámetro interno. El sistema cromatográfico (HPLC) utilizado fue un Shimadzu modelo LC-9A equipado con un detector electroquímico Shimadzu L-ECD-6A y un integrador con procesador de datos Shimadzu Chromatopac C-R6A. Como fase móvil se utilizó una mezcla de monofosfato disódico dihidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0,1 M, ácido cítrico monohidratado 0,1 M (pH=3,5) y metanol (400:500:70 v:v:v); EDTA 0,9 mM y ácido 1-octanosulfónico (sal sódica) 1,6 mM. La fase móvil se preparó diariamente. El flujo utilizado fue de 1,0 mL/min. El eluyente de la columna se monitorizó por detección electroquímica a un potencial fijado de +0,63 V entre el electrodo de trabajo (Glassy carbon) y el de referencia

(Ag/AgCl). Las áreas de los picos de los cromatogramas se cuantificaron utilizando la técnica del estándar externo mediante el uso de soluciones estándar de referencia de 5-HT y 5-HIAA. Estas soluciones estándar se prepararon en una solución de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 0,4M conteniendo 0,1% (p/v) de metabisulfito sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ).

Para las muestras estudiadas de tejido de SNC, las curvas fueron lineales para concentraciones en el rango de 5 ng/mL hasta 500 ng/mL para 5-HT y 5-HIAA, los coeficientes de variación intra-día y los coeficientes de variación inter-día fueron inferiores al 4%. El método fue selectivo para los compuestos estudiados 5-HT y 5-HIAA, no observándose en los cromatogramas ninguna interferencia con otros compuestos endógenos propios de las muestras biológicas estudiadas (figuras 14 y 15).



**Figura 15.** Cromatograma de una muestra de médula extraída en un volumen final de 500 µL; volumen de inyección 20 µL.



CHROMATOGRAM 3 MEMORIZED

CHROMATOPAC C-R6A  
 SAMPLE NO 0  
 REPORT NO 1689

FILE 1  
 METHOD 464  
 SAMPLE WT 100

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.995	17755				
2	1.217	1765471	E			
3	1.36	5785836	VE			
4	1.483	10154812	VE			
5	1.798	1455114	V			
6	2.053	903629	V			
7	2.698	586606	V			
8	4.523	41677	V			
9	5.028	7149	V			
10	5.713	1462				
11	6.897	2543				
12	7.967	15400				
13	13.558	10974				
14	14.922	125945	SV	1	1.7466	SHIAA
15	16.31	1021	T			
16	17.558	2550	TV			
17	18.598	2693	T			
18	19.165	2297	TV			
19	19.923	2076	TV			
20	25.637	240268		2	3.5571	5HT
21	28.175	2237	V			
22	29.378	1083				
TOTAL		21128584			5.3036	

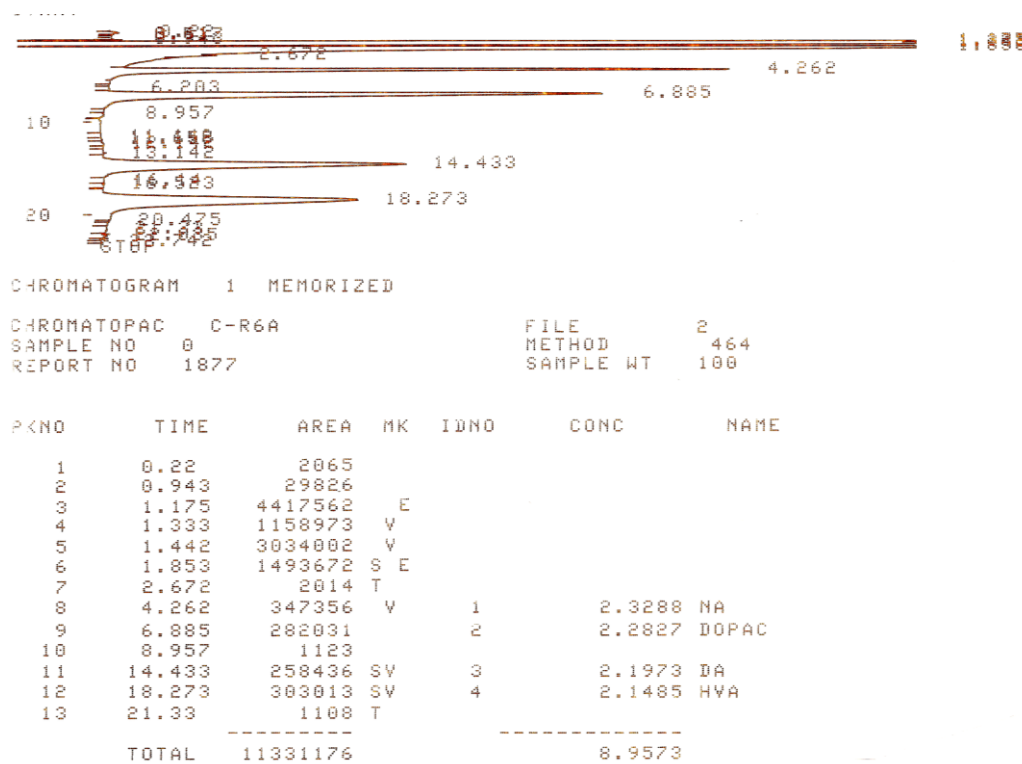
#### **4.2.2. Determinación analítica de NA y de DA y sus metabolitos, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA)**

Se tomaron 20 µL de los sobrenadantes de los homogeneizados de cada una de las regiones del SNC estudiadas y almacenadas a -80°C, las cuales se inyectaron en un sistema cromatográfico con columna en fase reversa Teknokroma Nucleosil 120 C<sub>18</sub> de 5 µm (partícula de relleno), 12,5 cm de largo y 0,4 cm de diámetro interno. El sistema cromatográfico (HPLC) utilizado fue un Shimadzu modelo LC-9A equipado con un detector electroquímico Shimadzu L-ECD-6A y un integrador con procesador de datos Shimadzu Chromatopac C-R6A. Como fase móvil se utilizó una mezcla de monofosfato disódico dihidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) 0,1 M, ácido cítrico monohidratado 0,1 M (pH=3,5) y metanol (400:500:70 v:v:v); EDTA 0,9 mM y ácido 1-octanosulfónico (sal sódica) 1,6 mM. La fase móvil se preparó diariamente. El flujo utilizado fue de 1,0 mL/min. El eluyente de la columna se monitorizó por detección electroquímica a un potencial fijado de +0,80 V entre el electrodo de trabajo (Glassy carbon) y el de referencia (Ag/AgCl). Las áreas de los picos de los cromatogramas se cuantificaron utilizando la técnica del estándar externo mediante el uso de soluciones estándar de referencia de NA, DA, DOPAC y HVA. Estas soluciones estándar se prepararon en una solución de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) 0,4M conteniendo 0,1% (p/v) de metabisulfito sódico (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

Para las muestras de tejido de SNC estudiadas, las curvas fueron lineales para concentraciones en el rango de 1 ng/mL hasta 300 ng/mL para NA, DOPAC y HVA; y en el rango de 1 ng/mL hasta 1000 ng/mL para DA. Los coeficientes de variación intra-día y los coeficientes de variación inter-día fueron inferiores al 4%. El método fue selectivo para NA, DA, DOPAC y HVA, no observándose en los cromatogramas ninguna interferencia con otros

compuestos endógenos, propios de las muestras biológicas (figuras 16 y 17).

**Figura 16.** Cromatograma de una mezcla de estándar que contiene NA, DA, DOPAC y HVA.

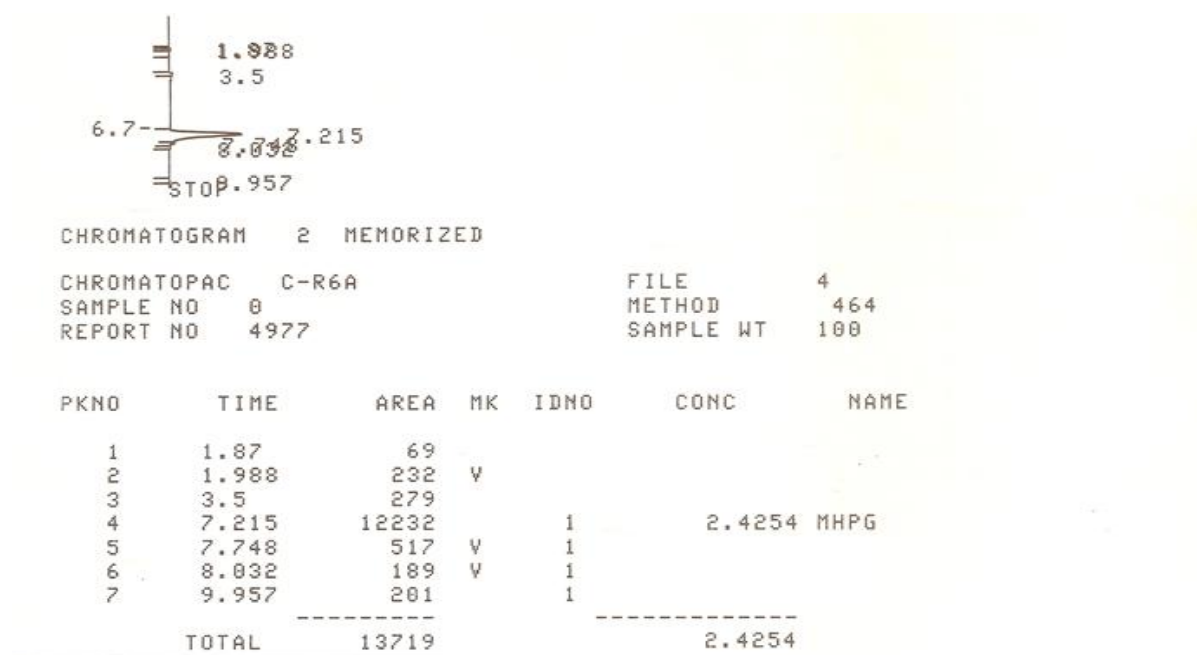




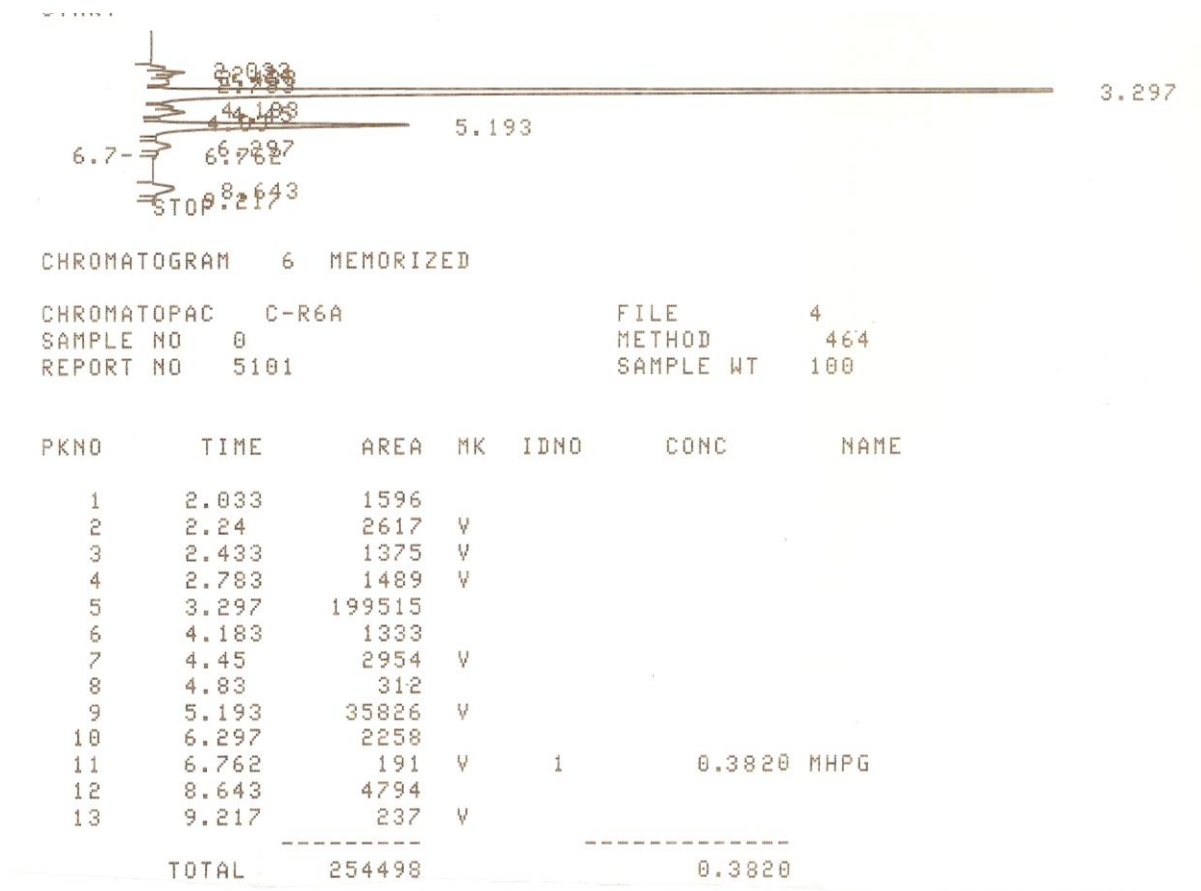
continuación se retiraron 75 mL de la solución y se añadieron 75 mL de metanol mezclándose suavemente. El flujo utilizado fue de 1,0 mL/min. El eluyente de la columna se monitorizó por detección fluorimétrica con una longitud de onda de excitación de 275 nm y una longitud de onda de emisión de 315 nm. Las áreas de los picos de los cromatogramas se cuantificaron utilizando la técnica del estándar externo mediante el uso de soluciones estándar de referencia de MHPG. Estas soluciones estándar se prepararon en una solución de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 0,4M conteniendo 0,1% (p/v) de metabisulfito sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ).

Para las muestras estudiadas de tejido de SNC las curvas fueron lineales para concentraciones en el rango de 1 ng/mL hasta 300 ng/mL para MHPG. Los coeficientes de variación intra-día e inter-día fueron inferiores al 4%. En las muestras tisulares de SNC, la recuperación analítica media fue del 100% para el MHPG. El método fue selectivo para MHPG no observándose en los cromatogramas ninguna interferencia con otros compuestos endógenos, propios de las muestras biológicas (figura 18 y 19).

**Figura 18.** Cromatograma de un estándar de MHPG.



**Figura 19.** Cromatograma de una muestra de corteza frontal extraída en un volumen final de 300  $\mu$ L; volumen de inyección 20  $\mu$ L.



#### 4.3. DETERMINACION ANALITICA DE ESTRADIOL Y TESTOSTERONA (EIA)

De los animales sacrificados se seleccionaron al azar las muestras de tejido tomadas de 12 ratas (6 hembras y 6 machos) de cada grupo, realizándose los siguientes subgrupos:

- Grupo I<sup>1</sup> (6 machos) (animales nacidos de ratas madre control)
- Grupo I<sup>2</sup> (6 hembras) (animales nacidos de ratas madre control)
- Grupo II<sup>1</sup> (6 machos) (animales nacidos de ratas madre tratadas con clodimeformo)
- Grupo II<sup>2</sup> (6 hembras) (animales nacidos de ratas madre tratadas con clodimeformo)

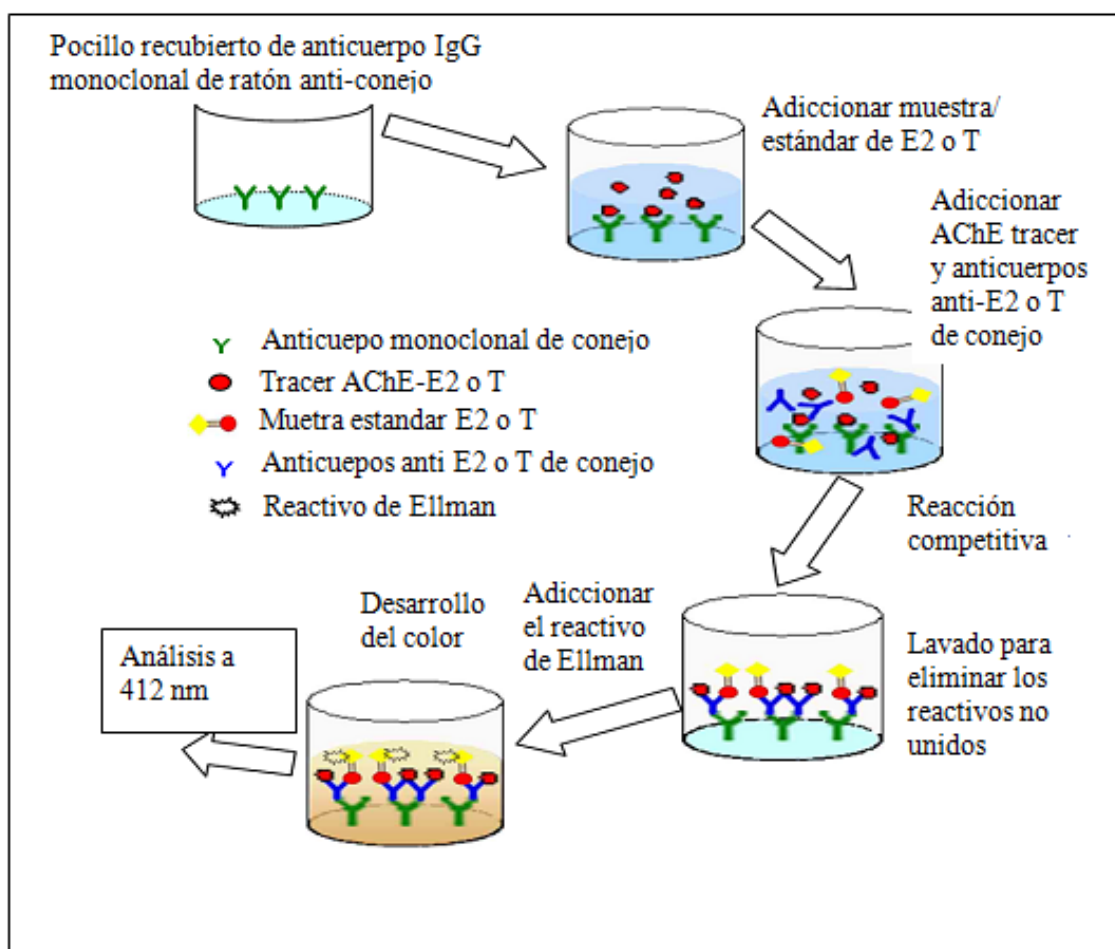
#### **4.3.1. Extracción de la testosterona y estradiol.**

Cada muestra de tejido se pesó en una balanza electrónica (Sartorius ER 182), guardándose separadamente en tubos Eppendorf debidamente identificados. Las muestras se homogenizaron en buffer SPO4 (sacarosa 250 mM/fosfato potásico 50 mM) por disrupción mecánica con un Tissue-Tearor de Biospec durante 2 minutos a velocidad constante, manteniendo la temperatura de 4°C (tubos dentro de un recipiente con hielo picado), en solución y en volúmenes que variaron en función del tejido: 300 µL (hipocampo y cuerpo estriado); 500 µL (corteza frontal). Posteriormente se añadió a las muestras 3 ml de dietiléter y se mezcló con un vórtex durante 30 segundos y se centrifugaron a 2.100 r.p.m. en una centrífuga Eppendorf durante 5 minutos a 40°C. La mezcla resultante se incubó en un baño de hielo seco y metanol hasta la solidificación de la fase acuosa (fondo) y la fase orgánica fue eluida en un tubo nuevo. Este paso de extracción fue repetido 2 veces sobre la fase acuosa. Por último, el eluido orgánico fue secado en un baño a 50°C y el residuo fue resuspendido en 120µl EIA buffer. El eluido se purificó a continuación pasándolo a través de cartuchos C18-SD (Empore) previamente acondicionados con 250µl de metanol 100% y equilibrados dos veces con 250µl de agua desionizada y destilada (ddH<sub>2</sub>O) con una bomba de presión de succión 12-port Visiprep (Supelco). Después de la elución con cada muestra, las columnas fueron reeluidas dos veces con 250µl de ddH<sub>2</sub>O para eliminar los compuestos hidrofóbicos y a continuación se eluyeron con metanol al 90% para extraer los esteroides y este último eluido se evaporó en un baño a 50°C y el residuo se resuspendió en 120µl EIA buffer para la determinación de los niveles de testosterona y estradiol con los kits T y E2 EIA (Cayman Chemical). Todas las muestras se conservaron a -20°C hasta el análisis del contenido de testosterona y estradiol por inmunoensayo específico EIA.

### 4.3.2. Determinación de los niveles de testosterona y estradiol

El EIA competitivo es un enzimoimmunoanálisis que se basa en la competición entre el antígeno presente en la muestra problema y una cantidad fija de antígeno conjugado con acetilcolinesterasa (Ag-AchE) por una cantidad conocida de anticuerpo monoclonal. La cantidad de Ag-AchE que se unirá al anticuerpo monoclonal será inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra problema. Este tipo de ensayo ha sido empleado en el presente trabajo para determinar los niveles de E2 y T, siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante (Figura 20) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU; sensibilidad: 200 pg/ml). A las placas de 96 pocillos se les ha adherido previamente un anticuerpo monoclonal de ratón. En estas placas se incuban a la vez la muestra en estudio o el estándar de E2 o T, el antígeno conjugado con acetilcolinesterasa (E2 o T-AchE) y el anticuerpo anti-E2 o T de conejo. Tras incubar durante una hora a temperatura ambiente en un agitador orbital KS260 Basic (Thermo Fisher Scientific Inc. Wilmington, USA), se lava la placa y el complejo formado por anticuerpo-E2 o T (libre o conjugada con AchE) quedará unido al anticuerpo monoclonal de conejo. Una vez lavada la placa, se añade el reactivo de Ellman que contiene acetilcolina y ácido 2-nitrobenzoico. La tiocolina, producida por la degradación de la acetilcolina por la AchE, reacciona con el ácido 2-nitrobenzoico dando lugar a un compuesto de color amarillo (5-tio-2-nitrobenzoico). Por lo tanto, la intensidad de color amarillo será inversamente proporcional a la cantidad de E2 o T libre en el pocillo. La intensidad del color amarillo se midió a 412 nm en un lector de multiplaca (modelo Vmax, Molecular Dynamics, Menlo Park, CA).

**Figura 20.** Protocolo de análisis de la T y E2 con el Cayman Chemical EIA kit.



#### 4.4. DETERMINACION DE LA EXPRESION GENICA DE ENZIMAS QUE CATALIZAN LAS SINTESIS Y METABOLISMO DE AMINAS BIOGENAS

De los animales sacrificados se seleccionaron al azar las muestras de tejido tomadas de 12 ratas (6 hembras y 6 machos) de cada grupo, realizándose los siguientes subgrupos:

- Grupo I<sup>1</sup> (6 machos) (animales nacidos de ratas madre control)
- Grupo I<sup>2</sup> (6 hembras) (animales nacidos de ratas madre control)
- Grupo II<sup>1</sup> (6 machos) (animales nacidos de ratas madre tratadas con clodimeformo)
- Grupo II<sup>2</sup> (6 hembras) (animales nacidos de ratas madre tratadas con clodimeformo)

Cada muestra de tejido se guardó en trizol y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

#### **4.4.1. Extracción del ARN: Método del Trizol.**

El Trizol® (Invitrogen, California, USA) es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que es capaz de mantener la integridad del ARN mientras lisa las células y disuelve los compuestos celulares permitiendo así la extracción de dicho ácido nucleico.

El protocolo de extracción fue el indicado por el fabricante con pequeñas modificaciones. Consta de los siguientes pasos:

- Homogenización de los cortes de tejido congelado en frío usando Trizol® (1ml) y un homogeneizador mecánico (“Ultra Turrax T8 (S8N-5G)”. Rose Scientific Ltd, Canadá).
- Separación del homogeneizado mediante cloroformo (200µl x ml de Trizol®) y centrifugación (13000rpm durante 10’) obteniéndose tres fases: acuosa (ARN), orgánica (restos celulares y ADN) y fenólica (restos de Trizol® y cloroformo).
- Precipitación del ARN disuelto en la fase acuosa mediante isopropanol (600µl x ml de Trizol®) durante toda la noche y centrifugación (13000rpm durante 30’), seguido de lavado con etanol al 75% (para eliminar impurezas y restos de sales).
- Resuspensión del ARN en H<sub>2</sub>O libre de ARNasas (Quiagen. Hilden, Estados unidos). Una parte del volumen de ARN obtenido de cada muestra fue sometido posteriormente a tratamiento con ADNasa y purificación en columnas (“RNeasy Micro Kit”. Qiagen, Hilden, Alemania) para eliminar cualquier rastro de

contaminación con ADN genómico. En este proceso se siguieron fielmente los protocolos indicados por el fabricante que aparecen resumidos a continuación:

- Unión del ARN (45µg) a la matriz de la columna. Incorporación de 45µg de ARN + 350µl Buffer RLT-(β-ME) + 250µl EtOH al interior de la columna y posterior centrifugación (10.000 rpm durante 15’’).
- Incubación de la membrana de la columna con ADNasa (30 unidades) + Buffer RDD (70µl) durante 15’.
- Elución del ARN con H2O libre de ARNasas, tras lavados con dos Bufferes (RW1 y RLT) y con EtOH al 80%.

#### **4.4.2. Cuantificación de los ácidos nucleicos.**

La cantidad de ADN y ARN obtenido así como su pureza (ratio 260/280 para descartar la contaminación con proteínas y ratio 260/230 para descartar la existencia de restos de sales), se evaluaron mediante uso del espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc. Wilmington, USA) en 1µl de muestra. La concentración de los ácidos nucleicos se obtuvo mediante la medición de la absorbancia y aplicación de la fórmula:

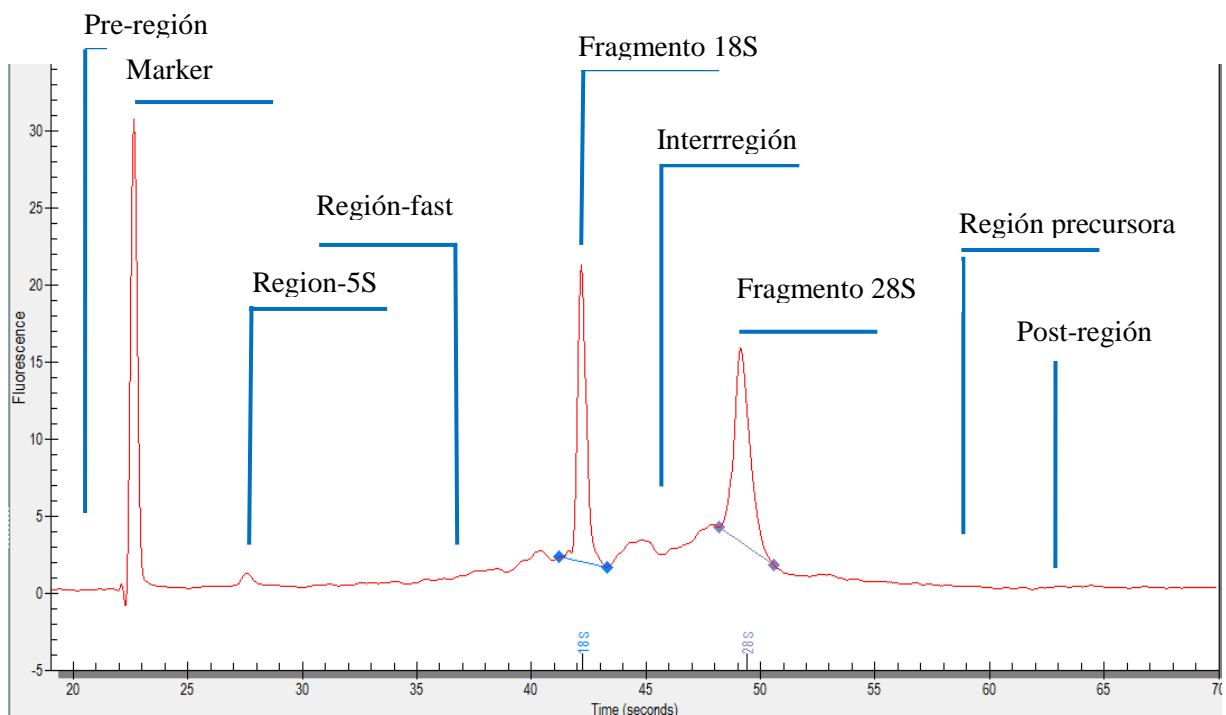
$$C = (A \times E) / D$$

Donde “C” es la concentración (ng/µl); “A” es la absorbancia ( $\lambda$ 260nm); “E” es el coeficiente de extinción molar (50 en el caso del ADN y 40 en el caso de ARN); y “D” es la dilución de la muestra.

#### 4.4.3. Control de calidad del ARN

La degradación de la molécula de ARN afecta a los niveles de expresión del ARN mensajero. La valoración de la calidad (o integridad) del ARN se llevó a cabo utilizando métodos microfluídicos (“Bioanalyzer 2100”. Agilent Technologies, Palo Alto, USA) en combinación con el software “RNA Integrity Number (RIN)”. Este software integra, mediante algoritmos matemáticos, diversos parámetros del perfil del ARN (Figura 21) y proporciona un valor (en una escala del 0-10, en donde el 0 indica degradación completa) que refleja la calidad de la muestra (IMBEAUD *et al.*, 2005; GRAUDENS *et al.*, 2006).

**Figura 21.** Electroferograma obtenido por el “Bioanalyzer 2100” en el que se indican las regiones que son utilizadas para calcular el valor del RIN.



#### **4.4.4. Síntesis del ADN a partir del ARN extraído.**

El ADNc fue sintetizado a partir de 1 µg de ARN total libre de ADN. Las mezclas de reacción contenían 4 µl del tampón de reacción 5X, 2 µl de solución de dNTPs 10 mM, 2 µl de DTT 100 mM, 1 µl (50U) de la enzima transcriptasa inversa “Expand Reverse Transcriptase 50 U/µl” (Roche, Alemania), 3 µl de Cebadores Aleatorios (“Random Primers”) a 200 µg/ml (Promega, Estados Unidos) y agua DEPC en un volumen final de reacción de 20 µl. El programa de transcripción inversa consistió en un ciclo de 10 minutos a 30°C (hibridación), un ciclo de 45 minutos a 42°C (transcripción inversa) y parada a 4°C y se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemania). El ADNc así obtenido se conservó a -20°C.

#### **4.4.5. Determinación de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real.**

La cuantificación por PCR a tiempo real permite monitorizar la reacción de PCR al mismo tiempo que ésta tiene lugar. Una vez obtenido el ADNc y comprobada su integridad, se amplificó mediante PCR a tiempo real con SYBR Green I utilizando las parejas de cebadores, correspondientes a los genes codificadores de la B-ACTINA y de las enzimas monoamino oxidasa A (MAOA), catecol-o-metiltransferasa (COMT), aldehído deshidrogenasa (AD), tirosina hidroxilasa (TH), triptófano hidroxilasa (TRH) y dopamina-β-hidroxilasa (DBH) diseñados y validados por SABiosciences. Los números de catálogo junto a la referencia entre paréntesis de la secuencia de los genes B-ACTINA, MAO A, COMT, AD, TH, THR y DBH procedentes del banco de secuencias del National Center for Biotechnology Information, referencias de los cebadores para estos genes fueron PPR06570C (NM\_031144), PPR46359A (NM\_033653), PPR06789A (NM\_012531), PPR43520B (NM\_022407), PPR45220F (NM\_012740), PPR48244A (NM\_173839), PPR52652A

(NM\_013158) respectivamente.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real Stratagene MX3000P (Agilent Technologies, Estados Unidos), utilizando la mezcla maestra “SYBR® Green PCR Master Mix” (SABiosciences, Estados Unidos). Esta mezcla incluye, en las cantidades adecuadas y listo para su uso, la enzima ADN Polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y el tampón de PCR, e incorpora, como su nombre indica, el colorante SYBR Green I, que detecta ADN de doble hélice, por lo que no es necesario el uso de sondas específicas. Las muestras se amplificaron por duplicado en placas de 96 pocillos para reacciones ópticas (Bio Rad, Estados Unidos). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 µl con los siguientes elementos: 5 µl de la mezcla maestra “SYBR® Green PCR Master Mix”, 3.6 µl de agua Mili-Q, 0.4 µl de la mezcla de cebadores 10 µM y 1 µl de ADN. Las condiciones térmicas de la amplificación eran las siguientes: un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C (activación enzimática), seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C (desnaturalización y extensión).

Los resultados de las reacciones de PCR cuantitativa se expresan como el incremento de la señal de fluorescencia de la molécula química empleada en cada caso. El aumento de esta señal es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR en la reacción. En los ciclos iniciales de la reacción hay un cambio muy leve en la señal de fluorescencia. Este estado define la línea base (“threshold”) de la amplificación y el parámetro más importante para el análisis de los datos, el valor CT, que representa el ciclo en el cual la emisión de fluorescencia excede la línea base marcada. Los valores de CT se usaron para calcular la cantidad relativa de los genes estudiados normalizados con el valor de CT de la B-ACTINA que es el usado como “housekeeping” o gen cuya expresión no se altera por la exposición al tratamiento. El método del  $\Delta\Delta C_t$  se usó para analizar los datos (Livak and Schmittgen, 2001).

#### **4.5. ANALISIS DE DATOS**

Todos los datos obtenidos se expresan como el valor medio  $\pm$  ESM (error estándar de la media) de cada región cerebral. Para la determinación de la existencia de efecto del sexo de los animales con el tratamiento se realizó una ANOVA bifactorial utilizando los valores de machos y hembras combinados. Las diferencias fueron consideradas significativas a  $P < 0,05$  (test de la  $t$  de Student). El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS 10.0 para Windows mediante la aplicación del test  $t$  de Student.

# **RESULTADOS**

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. EFECTO DEL CLODIMEFORMO EN RATAS DE 60 DIAS NACIDAS DE MADRES TRATADAS CON CLODIMEFORMO DURANTE EL PERIODO DE LA PREÑEZ Y LA LACTANCIA.**

Con el objeto de evaluar una posible neurotoxicidad en el desarrollo, ratas gestantes se trataron por vía oral con clodimeformo disuelto en aceite de maíz (5 mg clodimeformo/kg pc/día, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia). El tratamiento con clodimeformo no produjo ningún efecto sobre la ingesta de alimento ni sobre la ganancia de peso corporal en las madres gestantes, así como en sus crías. Tampoco se observaron alteraciones del comportamiento de las madres gestantes.

Las ratas de 60 días de edad nacidas de las ratas tratadas con 5 mg clodimeformo/kg pc/día, durante los días 6 a día 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia, no mostraron ningún efecto en la ganancia o el incremento del peso corporal con respecto a las ratas control nacidas de ratas tratadas con el vehículo (tablas 7 y 8). Tampoco se observó ningún efecto sobre el peso de los tejidos (regiones cerebrales) ni en la relación peso tejido/peso corporal (%) con respecto a los animales control. El peso de cada región del SNC aislada para cada animal se detalla en las tablas 9, 10, 11 y 12.

**Tabla 7.** Peso de ratas macho y hembra de 60 días de edad (12 animales, 6 machos y 6 hembras), grupo control (Grupo I).

<b>Número de animal</b>	<b>Grupo I<sup>1</sup> Peso de ratas macho a los 60 días de edad (g)</b>	<b>Grupo I<sup>2</sup> Peso de ratas hembra a los 60 días de edad (g)</b>
<b>I<sub>1</sub></b>	202	149
<b>I<sub>2</sub></b>	192	140
<b>I<sub>3</sub></b>	185	142
<b>I<sub>4</sub></b>	189	133
<b>I<sub>5</sub></b>	190	139
<b>I<sub>6</sub></b>	192	141
<b>Media ± ESM</b>	<b>192 ± 2</b>	<b>141 ± 2</b>

Grupo I<sup>1</sup>. Ratas macho control (no tratadas con clodimeformo).

Grupo I<sup>2</sup>. Ratas hembra control (no tratadas con clodimeformo).

**Tabla 8.** Peso de ratas macho y hembra de 60 días de edad (12 animales, 6 machos y 6 hembras), grupo tratado (Grupo II).

<b>Número de animal</b>	<b>Grupo I<sup>1</sup> Peso de ratas macho a los 60 días de edad (g)</b>	<b>Grupo I<sup>2</sup> Peso de ratas hembra a los 60 días de edad (g)</b>
<b>I<sub>1</sub></b>	236,00	178,5
<b>I<sub>2</sub></b>	233,00	168,5
<b>I<sub>3</sub></b>	236,00	167,2
<b>I<sub>4</sub></b>	237,00	167
<b>I<sub>5</sub></b>	234,00	173
<b>I<sub>6</sub></b>	232,00	165
<b>Media ± ESM</b>	<b>235 ± 1</b>	<b>170 ± 2</b>

Grupo II<sup>1</sup>. Ratas macho tratadas vía materna durante el desarrollo embrionario y lactancia (20 mg clodimeformo/kg pc/día, durante 5 días).

Grupo II<sup>2</sup>. Ratas hembra tratadas vía materna durante el desarrollo embrionario y lactancia (20 mg clodimeformo/kg pc/día, durante 5 días).

**Tabla 9.** Peso (mg) de las regiones del SNC aisladas en ratas macho de 60 días de edad (6 animales), grupo control (Grupo I<sup>1</sup>).

Número de animal	Regiones del SNC (mg)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	45,6	304,7	291,6	170,3	48	97,2	77,4	89,3
I <sub>2</sub>	31,4	243,1	281,1	150,4	71,5	98	88,6	130,3
I <sub>3</sub>	35,1	178,3	266,3	199,4	94,8	129,8	58,1	150,4
I <sub>4</sub>	40,2	215,4	275,3	147,4	90,6	151,3	64,8	136,2
I <sub>5</sub>	41,2	192,1	266,3	181,9	112,3	99,1	66,4	110,2
I <sub>6</sub>	39,4	169,5	255,7	168,7	95,3	98,3	59,8	115,8

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

**Tabla 10.** Peso (mg) de las regiones del SNC aisladas en ratas hembra de 60 días de edad (6 animales), grupo control (Grupo I<sup>2</sup>).

Número de animal	Regiones del SNC (mg)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	31,5	221,1	289,9	271,3	99,1	88,8	64,4	128,2
I <sub>2</sub>	29	186,7	284,1	230,9	91,3	77,2	44	149,4
I <sub>3</sub>	37,2	191,6	269,9	228,1	100,4	93,5	60	92,5
I <sub>4</sub>	46,2	166,9	273	181,8	85,2	104,7	70,9	107,2
I <sub>5</sub>	35,1	178,5	259,1	174,2	91,3	89,5	68,5	131,2
I <sub>6</sub>	33,4	186,4	276,4	158,3	90,1	86,5	71,6	123,5

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

**Tabla 11.** Peso (mg) de las regiones del SNC aisladas de ratas macho de 60 días de edad (6 animales) tratadas vía materna durante el desarrollo embrionario y lactancia (20 mg clodimeformo/kg pc/día, durante 5 días) (Grupo II<sup>1</sup>).

Número de animal	Regiones del SNC (mg)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
II <sub>1</sub>	37,7	190,8	286,1	176,2	61,5	97	90,6	98,5
II <sub>2</sub>	35,1	179,8	289,5	136,4	30,1	119,9	111,1	133
II <sub>3</sub>	59	216,4	330,7	139,6	55,4	91,3	85,2	145,2
II <sub>4</sub>	30,3	233,7	331,5	142,5	66,9	99,8	108,1	128,2
II <sub>5</sub>	34,5	221,1	256,1	140,1	61,2	136,5	75,1	107,5
II <sub>6</sub>	38,6	192,4	271,2	142,9	51,2	115	82,7	91,9

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

**Tabla 12.** Peso (mg) de las regiones del SNC aisladas de ratas hembra de 60 días de edad (6 animales) tratadas vía materna durante el desarrollo embrionario y lactancia (20 mg clodimeformo/kg pc/día, durante 5 días) (Grupo II<sup>2</sup>).

Número de animal	Regiones del SNC (mg)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	33,1	169,6	257,8	88,4	78,7	113,2	81,9	94,4
I <sub>2</sub>	31,9	149,2	260,8	107,9	80	147,4	78,7	101,5
I <sub>3</sub>	32	135,6	237,6	134,6	77,2	104,1	83,6	126,7
I <sub>4</sub>	30,4	201	199,8	127,4	67,2	79,4	71,2	100,8
I <sub>5</sub>	30,2	179,7	252,1	128	81,2	119	90,2	90,9
I <sub>6</sub>	30,6	149,5	261	118,7	75,2	88	61,2	73

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

### 5.1.1. Efecto del clodimeformo sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el SNC

El tratamiento con clodimeformo por vía oral a ratas madre durante el periodo de gestación desde el día 6 al día 21 y durante la lactancia desde el día 1 al día 10 afectó al contenido de 5-HT y de su metabolito 5-HIAA en la corteza frontal, cuerpo estriado e hipocampo de las ratas descendientes a la edad de 60 días. El contenido de 5-HT (ng/g de tejido) en las regiones estudiadas del SNC en los animales de los grupos control y de los grupos tratados se presenta en las tablas 13, 14, 15 y 16. El contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido) en las regiones estudiadas del SNC en los animales de los grupos control y de los grupos tratados se presenta en las tablas 17, 18, 19 y 20. La tasa de recambio de la 5-HT en las regiones estudiadas del SNC en los animales de los grupos control y de los grupos tratados se presenta en las tablas 21, 22, 23 y 24. La tabla 25 representa el contenido de 5-HT (ng/g de tejido), 5-HIAA (ng/g de tejido) y la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) en las regiones estudiadas del SNC del grupo control y del grupo tratado sin distinción por sexo. La tabla 26 representa el contenido de 5-HT (ng/g de tejido), 5-HIAA (ng/g de tejido) y la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) de los grupos control y de los grupos tratados en las regiones estudiadas del SNC donde hubo interacción por sexo estadísticamente significativa.

Los resultados expresados en las tablas 25 y 26 demuestran que:

- En las ratas de 60 días de edad nacidas de ratas madre tratadas durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días de lactancia 1 a 10 se produjo una pérdida estadísticamente significativa del contenido de 5-HT y 5-HIAA en cuerpo estriado y corteza frontal y un incremento del contenido de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo respecto a los animales control, existiendo en la corteza frontal e hipocampo,

interacción por sexo en el efecto del tratamiento. En el cuerpo estriado la pérdida en el contenido de 5-HT fue de un 15,75% ( $P<0,001$ ) y de un 20,92% ( $P<0,001$ ) para el 5-HIAA. En la corteza frontal la pérdida en el contenido de la 5-HT fue de un 16,99% ( $P<0,001$ ) y de un 31,01% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente y la pérdida en el contenido de la 5-HIAA fue de un 31,56% ( $P<0,001$ ) y de un 21,44% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente. En el hipocampo el incremento en el contenido de la 5-HT fue de un 31,05% ( $P<0,001$ ) y de un 19,77% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente y el incremento en el contenido de la 5-HIAA fue de un 37,44% ( $P<0,001$ ) y de un 13,49% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente. La tasa de recambio sufrió una disminución estadísticamente significativa de un 18,02% ( $P<0,01$ ) en la corteza frontal en machos y de un 5,08% ( $P<0,001$ ) en el hipocampo en hembras y un aumento de un 4,89% ( $P<0,01$ ) en el hipocampo en machos y de un 13,92% ( $P<0,001$ ) en hembras en la corteza frontal.

**Tabla 13.** Contenido de 5-HT (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas macho de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>1</sup>).

Número de animal	5-HT (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	2105,72	2601,99	141,35	769,62	860,61	1177,10	445,99	543,76
I <sub>2</sub>	2102,33	2697,99	103,22	656,21	877,71	1061,81	389,76	542,23
I <sub>3</sub>	2351,62	2645,86	153,34	749,58	813,54	1078,54	362,86	519,05
I <sub>4</sub>	2104,42	2663,56	142,56	613,52	864,06	1289,69	413,85	531,45
I <sub>5</sub>	2251,86	2598,56	143,23	626,03	800,45	1094,48	332,39	534,54
I <sub>6</sub>	2356,69	2612,56	139,36	716,52	836,29	1242,82	384,68	545,56
<b>Media ± ESM</b>	<b>2212,11 ± 50,63</b>	<b>2636,75 ± 16,13</b>	<b>137,18 ± 7,08</b>	<b>1230,72 ± 14,19</b>	<b>842,11 ± 12,49</b>	<b>1157,41 ± 38,51</b>	<b>853,98 ± 3,88</b>	<b>536,10 ± 4,09</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

$$\text{Contenido de 5-HT (ng/g de tejido)} = \frac{\text{Contenido de 5-HT (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$$

**Tabla 14.** Contenido de 5-HT (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas hembra de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>2</sup>).

Número de animal	5-HT (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	2278,43	2534,43	154,32	1194,42	897,35	1186,67	857,34	543,23
I <sub>2</sub>	2244,52	2504,76	103,27	1291,76	932,69	1194,65	834,65	517,08
I <sub>3</sub>	2252,34	2569,45	113,18	1023,56	849,14	1197,91	830,47	523,73
I <sub>4</sub>	2106,40	2672,95	122,40	1207,15	873,18	1182,67	854,92	543,81
I <sub>5</sub>	2254,34	2567,43	123,56	1163,12	827,68	1174,76	844,34	521,96
I <sub>6</sub>	2131,65	2598,45	143,76	1185,95	872,90	1193,76	834,91	541,67
<b>Media ± ESM</b>	<b>2211,28 ± 29,72</b>	<b>2574,58 ± 23,67</b>	<b>126,75 ± 7,78</b>	<b>1177,66 ± 35,68</b>	<b>875,49 ± 14,99</b>	<b>1188,40 ± 8,72</b>	<b>842,77 ± 4,62</b>	<b>531,91 ± 5,00</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

Contenido de 5-HT (ng/g de tejido)	—	$\frac{\text{Contenido de 5-HT (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$
---------------------------------------	---	---

**Tabla 15.** Contenido de 5-HT (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas macho de 60 días de edad nacidas de madres tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia (Grupo II<sup>1</sup>).

Número de animal	5-HT (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>II<sub>1</sub></b>	2217,43	2634,76	166,71	1184,53	818,45	961,33	712,67	724,98
<b>II<sub>2</sub></b>	2184,34	2637,56	135,72	1313,35	802,59	951,49	701,56	700,28
<b>II<sub>3</sub></b>	2441,40	2636,76	153,71	1165,86	837,61	965,45	732,65	698,56
<b>II<sub>4</sub></b>	2329,68	2601,54	119,46	1328,39	932,76	968,87	722,56	701,54
<b>II<sub>5</sub></b>	2099,01	2685,56	152,72	1276,63	883,85	963,75	702,65	704,45
<b>II<sub>6</sub></b>	2271,76	2719,56	122,82	1127,72	873,57	953,76	732,65	685,67
<b>Media ± ESM</b>	<b>2257,27 ±48,75</b>	<b>2652,62 ±17,29</b>	<b>141,86 ±7,70</b>	<b>1232,75 ±34,35</b>	<b>858,14 ±19,62</b>	<b>960,77 ±2,78</b>	<b>717,46 ±5,72</b>	<b>702,58 ±5,21</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

	Contenido de 5-HT (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de 5-HT (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de 5-HT (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 16.** Contenido de 5-HT (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas hembra de 60 días de edad nacidas de madres tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia) (Grupo II<sup>2</sup>).

Número de animal	5-HT (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
II <sub>1</sub>	2243,77	2554,87	153,54	1025,57	846,10	835,82	712,45	632,65
II <sub>2</sub>	2344,15	2546,12	132,93	1224,45	814,28	824,71	709,45	628,26
II <sub>3</sub>	2234,41	2532,89	122,12	1019,20	924,77	827,04	712,34	600,33
II <sub>4</sub>	2043,65	2651,76	135,76	1265,76	944,08	803,81	687,98	683,70
II <sub>5</sub>	2313,91	2639,56	143,76	1324,67	863,29	795,39	728,76	632,95
II <sub>6</sub>	2234,43	2598,56	101,56	1226,89	896,52	832,16	721,54	644,63
<b>Media ± ESM</b>	<b>2235,72 ±42,75</b>	<b>2587,29 ±20,59</b>	<b>131,61 ±7,39</b>	<b>1181,09 ±52,33</b>	<b>881,51 ±20,10</b>	<b>819,82 ±6,68</b>	<b>712,09 ±5,64</b>	<b>637,09 ±11,10</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

Contenido de 5-HT (ng/g de tejido)	-	$\frac{\text{Contenido de 5-HT (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$
---------------------------------------	---	---

**Tabla 17.** Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas macho de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>1</sup>).

Número de animal	5-HIAA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	1176,32	1709,38	135,45	812,43	498,65	683,71	738,51	473,78
I <sub>2</sub>	1340,54	1712,51	118,71	820,07	439,13	691,83	749,71	467,92
I <sub>3</sub>	1107,36	1732,71	133,66	844,40	451,83	684,81	754,54	456,45
I <sub>4</sub>	1090,13	1729,54	109,40	869,67	418,85	682,91	716,44	467,33
I <sub>5</sub>	1073,40	1721,45	114,38	849,61	414,82	671,73	735,86	476,92
I <sub>6</sub>	1183,90	1724,77	115,71	852,39	469,67	661,23	749,67	456,93
<b>Media ± ESM</b>	<b>1161,94 ±40,23</b>	<b>1721,73 ±3,78</b>	<b>121,22 ±4,40</b>	<b>841,43 ±8,74</b>	<b>448,82 ±13,01</b>	<b>679,37 ±4,49</b>	<b>740,79 ±5,69</b>	<b>466,56 ±3,45</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido)	—	$\frac{\text{Contenido de 5-HIAA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$
---	---	---

**Tabla 18.** Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas hembra de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>2</sup>).

Número de animal	5-HIAA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	1273,91	1743,56	104,56	883,71	443,14	603,75	698,45	503,39
I <sub>2</sub>	1034,93	1698,87	115,76	854,23	462,34	618,82	703,65	458,10
I <sub>3</sub>	1310,69	1689,76	113,54	833,90	455,83	604,87	712,53	489,49
I <sub>4</sub>	1153,44	1776,41	103,74	812,74	448,88	605,67	732,65	471,73
I <sub>5</sub>	1143,68	1674,78	121,37	729,94	469,09	616,34	693,65	467,73
I <sub>6</sub>	1223,49	1749,76	110,73	894,41	455,86	602,95	729,61	505,40
<b>Media ± ESM</b>	<b>1190,02 ±40,93</b>	<b>1722,19 ±16,33</b>	<b>111,62 ±2,76</b>	<b>834,82 ±24,36</b>	<b>455,86 ±3,77</b>	<b>608,73 ±6,96</b>	<b>711,76 ±6,65</b>	<b>482,64 ±8,04</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido)	—	$\frac{\text{Contenido de 5-HIAA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$
---	---	---

**Tabla 19.** Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas macho de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia) (Grupo II<sup>1</sup>).

Número de animal	5-HIAA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
II <sub>1</sub>	1074,04	1734,76	132,65	890,24	510,16	459,42	627,54	632,87
II <sub>2</sub>	1268,70	1733,60	122,76	776,39	464,65	496,59	643,54	639,34
II <sub>3</sub>	1234,59	1734,43	108,87	894,12	472,17	456,42	632,54	645,76
II <sub>4</sub>	1112,05	1712,54	126,34	804,97	445,84	433,55	624,61	652,65
II <sub>5</sub>	1358,47	1698,54	132,65	910,79	423,43	479,88	647,42	634,45
II <sub>6</sub>	1084,38	1743,43	122,34	834,64	402,40	463,91	632,98	642,45
<b>Media ± ESM</b>	<b>1188,71 ±47,34</b>	<b>1726,22 ±6,94</b>	<b>124,27 ±3,60</b>	<b>851,86 ±22,30</b>	<b>453,11 ±15,55</b>	<b>464,96 ±8,78</b>	<b>634,77 ±3,65</b>	<b>641,25 ±3,01</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

	Contenido de 5-HIAA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de 5-HIAA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 20.** Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas hembra de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia) (Grupo II<sup>2</sup>).

Número de animal	5-HIAA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
II <sub>1</sub>	1109,34	1667,56	113,34	836,75	404,51	486,45	503,54	554,72
II <sub>2</sub>	1341,36	1775,45	125,61	824,87	488,54	475,82	512,65	542,54
II <sub>3</sub>	1223,49	1699,67	98,45	865,31	487,12	473,78	519,74	552,72
II <sub>4</sub>	1347,86	1745,56	109,56	875,92	405,60	483,67	529,54	542,12
II <sub>5</sub>	1243,82	1773,59	113,56	795,23	497,86	481,75	515,65	551,61
II <sub>6</sub>	1123,91	1683,65	143,51	837,43	477,89	467,89	502,65	542,75
<b>Media ± ESM</b>	<b>1231,63 ±41,76</b>	<b>1724,25 ±19,13</b>	<b>117,34 ±6,33</b>	<b>839,25 ±11,80</b>	<b>460,25 ±17,65</b>	<b>478,23 ±2,84</b>	<b>513,96 ±4,15</b>	<b>547,74 ±2,39</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

	Contenido de 5-HIAA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de 5-HIAA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 21.** Tasa de recambio de 5-HT en las regiones del SNC aisladas en ratas macho de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>1</sup>).

Número de animal	Tasa de recambio de 5-HT							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	0,56	0,66	0,96	0,64	0,58	0,58	0,86	0,87
I <sub>2</sub>	0,64	0,63	1,15	0,65	0,50	0,65	0,89	0,86
I <sub>3</sub>	0,47	0,65	0,87	0,68	0,56	0,63	0,87	0,88
I <sub>4</sub>	0,52	0,65	0,77	0,70	0,48	0,53	0,84	0,88
I <sub>5</sub>	0,48	0,66	0,80	0,72	0,52	0,61	0,85	0,89
I <sub>6</sub>	0,50	0,66	0,83	0,71	0,56	0,53	0,89	0,84
<b>Media ± ESM</b>	<b>0,53 ±0,026</b>	<b>0,65 ±0,004</b>	<b>0,90 ±0,058</b>	<b>0,68 ±0,013</b>	<b>0,53 ±0,015</b>	<b>0,59 ±0,021</b>	<b>0,87 ±0,008</b>	<b>0,87 ±0,008</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

$$\text{Tasa de recambio de 5-HT} = \frac{\text{Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido)}}{\text{Contenido de 5-HT (ng/g de tejido)}}$$

**Tabla 22.** Tasa de recambio de 5-HT en las regiones del SNC aisladas en ratas hembra de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>2</sup>).

Número de animal	Tasa de recambio de 5-HT							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	0,56	0,69	0,68	0,74	0,49	0,51	0,81	0,93
I <sub>2</sub>	0,46	0,68	1,12	0,66	0,50	0,52	0,84	0,89
I <sub>3</sub>	0,58	0,66	1,00	0,81	0,54	0,50	0,86	0,93
I <sub>4</sub>	0,55	0,66	0,85	0,67	0,51	0,51	0,86	0,87
I <sub>5</sub>	0,51	0,65	0,98	0,63	0,57	0,52	0,82	0,90
I <sub>6</sub>	0,57	0,67	0,77	0,75	0,52	0,51	0,87	0,93
<b>Media ± ESM</b>	<b>0,54 ±0,019</b>	<b>0,67 ±0,01</b>	<b>0,90 ±0,067</b>	<b>0,71 ±0,028</b>	<b>0,52 ±0,011</b>	<b>0,51 ±0,01</b>	<b>0,84 ±0,009</b>	<b>0,91 ±0,011</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

$$\text{Tasa de recambio de 5-HT} = \frac{\text{Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido)}}{\text{Contenido de 5-HT (ng/g de tejido)}}$$

**Tabla 23.** Tasa de recambio de 5-HT en las regiones del SNC aisladas de ratas macho de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días 1 a 10 de lactancia (Grupo II<sup>1</sup>).

Número de animal	Tasa de recambio de 5-HT							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>II<sub>1</sub></b>	0,48	0,66	0,80	0,75	0,62	0,48	0,88	0,87
<b>II<sub>2</sub></b>	0,58	0,66	0,90	0,59	0,58	0,52	0,92	0,91
<b>II<sub>3</sub></b>	0,51	0,66	0,71	0,77	0,56	0,47	0,86	0,92
<b>II<sub>4</sub></b>	0,48	0,66	1,06	0,61	0,48	0,45	0,86	0,93
<b>II<sub>5</sub></b>	0,65	0,63	0,87	0,71	0,48	0,50	0,92	0,90
<b>II<sub>6</sub></b>	0,48	0,64	1,00	0,74	0,46	0,49	0,86	0,94
<b>Media ± ESM</b>	<b>0,029 ±0,27</b>	<b>0,005± -0,34</b>	<b>0,89 ±0,052</b>	<b>0,69 ±0,031</b>	<b>0,53 ±0,027</b>	<b>0,48 ±0,010</b>	<b>0,89 ±0,01</b>	<b>0,91 ±0,010</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

		Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido)
Tasa de recambio de 5-HT	—	—————
		Contenido de 5-HT (ng/g de tejido)

**Tabla 24.** Tasa de recambio de 5-HT en las regiones del SNC aisladas de ratas hembra de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días 1 a 10 de lactancia (Grupo II<sup>2</sup>).

Número de animal	Tasa de recambio de 5-HT							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>II<sub>1</sub></b>	0,49	0,65	0,74	0,82	0,48	0,58	0,71	0,88
<b>II<sub>2</sub></b>	0,57	0,70	0,94	0,67	0,60	0,58	0,72	0,86
<b>II<sub>3</sub></b>	0,55	0,67	0,81	0,85	0,53	0,57	0,73	0,92
<b>II<sub>4</sub></b>	0,66	0,66	0,81	0,69	0,43	0,60	0,77	0,79
<b>II<sub>5</sub></b>	0,54	0,67	0,79	0,60	0,58	0,61	0,71	0,87
<b>II<sub>6</sub></b>	0,50	0,65	1,41	0,68	0,53	0,56	0,70	0,84
<b>Media ± ESM</b>	<b>0,55 ±0,024</b>	<b>0,67 ±0,01</b>	<b>0,92 ±0,103</b>	<b>0,72 ±0,039</b>	<b>0,52 ±0,026</b>	<b>0,58 ±0,007</b>	<b>0,72 ±0,01</b>	<b>0,86 ±0,017</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

		Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido)
Tasa de recambio de 5-HT	—	————— Contenido de 5-HT (ng/g de tejido)

**Tabla 25.** Contenido de 5-HT (ng/g de tejido), 5-HIAA (ng/g de tejido) y 5-HIAA/5-HT (ng/g de tejido) en regiones del SNC en ratas control de 60 días de edad y en ratas de 60 días de edad nacidas de ratas madre tratadas con clodimeformo durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia.

	5-HT (ng/g de tejido)		5-HIAA (ng/g de tejido)		5-HIAA/5-HT (ng/g de tejido)	
	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado
<b>HT</b>	2211,69 ± 39,58	2246,49 ± 43,96	1175,98 ± 39,15	1210,17 ± 43,53	0,53 ± 0,02	0,54 ± 0,03
<b>MS</b>	2605,67 ± 23,42	2619,96 ± 22,86	1721,96 ± 11,30	1725,23 ± 13,72	0,66 ± 0,01	0,66 ± 0,01
<b>CB</b>	131,96 ± 7,43	136,73 ± 7,52	116,42 ± 4,06	120,80 ± 5,12	0,90 ± 0,06	0,90 ± 0,08
<b>BL</b>	1204,19 ± 28,25	1206,92 ± 43,62	838,13 ± 17,51	845,56 ± 17,22	0,70 ± 0,02	0,71 ± 0,03
<b>MD</b>	858,80 ± 14,96	869,82 ± 19,58	452,34 ± 9,25	456,68 ± 15,93	0,53 ± 0,01	0,53 ± 0,03
<b>CF</b>	1172,90 ± 26,90	<sup>b</sup> 890,30 ± 30,44	644,05 ± 15,48	<sup>b</sup> 471,59 ± 6,84	0,55 ± 0,02	<sup>b</sup> 0,53 ± 0,02
<b>CE</b>	848,38 ± 4,72	714,77 ± 5,54*** <sup>a</sup> (-15,75)	726,27 ± 8,55	574,37 ± 26,03*** <sup>a</sup> (-20,92)	0,86 ± 0,01	0,80 ± 0,04
<b>HC</b>	534,01 ± 4,45	<sup>b</sup> 669,83 ± 16,23	474,60 ± 6,82	<sup>b</sup> 594,50 ± 20,10	0,89 ± 0,01	<sup>b</sup> 0,89 ± 0,02

Valor medio ± ESM (n=6).

<sup>a</sup>Entre paréntesis se indica la diferencia (disminución) en porcentaje, con respecto al grupo control.

<sup>b</sup>Tratamiento con interacción por sexo estadísticamente significativa.

Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  y \*\*\* $P < 0,001$ .

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal;

CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

**Tabla 26.** Contenido de 5-HT, 5-HIAA y 5-HIAA/5-HT (ng/g de tejido) en regiones del SNC en ratas control de 60 días de edad y en ratas de 60 días de edad nacidas de ratas madre tratadas con clodimeformo durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia con interacción por sexo estadísticamente significativa.

	5-HT (ng/g de tejido)		5-HIAA (ng/g de tejido)		5-HIAA/5-HT (ng/g de tejido)	
	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado
<b>CF<sup>1</sup></b>	1157,41 ± 38,51	960,77 ± 2,78*** <sup>a</sup> (-16,99%)	679,37 ± 4,49	464,96 ± 8,78*** <sup>a</sup> (-31,56%)	0,59 ± 0,021	0,48 ± 0,010*** <sup>a</sup> (-18,02%)
<b>CF<sup>2</sup></b>	1188,40 ± 8,72	819,82 ± 6,68*** <sup>a</sup> (-31,01%)	608,73 ± 6,96	478,23 ± 2,84*** <sup>a</sup> (-21,44%)	0,51 ± 0,01	0,58 ± 0,007*** <sup>a</sup> (13,92%)
<b>HC<sup>1</sup></b>	536,10 ± 4,09	702,58 ± 5,21*** <sup>a</sup> (31,05%)	466,56 ± 3,45	641,25 ± 3,01*** <sup>a</sup> (37,44%)	0,87 ± 0,008	0,91 ± 0,010*** <sup>a</sup> (4,89%)
<b>HC<sup>2</sup></b>	531,91 ± 5,00	637,09 ± 11,10*** <sup>a</sup> (19,77%)	482,64 ± 8,04	547,74 ± 2,39*** <sup>a</sup> (13,49%)	0,91 ± 0,011	0,86 ± 0,017*** <sup>a</sup> (-5,08%)

Valor medio ± ESM (n=6).

<sup>a</sup>Entre paréntesis se indica la diferencia (aumento y/o disminución) en porcentaje, con respecto al grupo control.

Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  y \*\*\* $P < 0,001$ .

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal;

CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

### 5.1.2. Efecto del clodimeformo sobre el contenido de DA, DOPAC y HVA en el SNC

El tratamiento con clodimeformo por vía oral a ratas madre durante el periodo de gestación desde el día 6 al día 21 y durante la lactancia desde el día 1 al día 10 afectó al contenido de DA y de sus metabolitos DOPAC y HVA en las regiones de corteza frontal, cuerpo estriado e hipocampo de las ratas descendientes a la edad de 60 días. El contenido de DA (ng/g de tejido) en las regiones estudiadas del SNC en los animales de los grupos control y de los grupos tratados se presenta en las tablas 27, 28, 29 y 30. El contenido de DOPAC (ng/g de tejido) en las regiones estudiadas del SNC en los animales de los grupos control y de los grupos tratados se presenta en las tablas 31, 32, 33 y 34. El contenido de HVA (ng/g de tejido) en las regiones estudiadas del SNC en los animales de los grupos control y de los grupos tratados se presenta en las tablas 35, 36, 37 y 38. La tasa de recambio de la DA en las regiones estudiadas del SNC en los animales de los grupos control y de los grupos tratados se presenta en las tablas 39, 40, 41 y 42. La tabla 43 representa el contenido de DA (ng/g de tejido), DOPAC (ng/g de tejido), HVA (ng/g de tejido) y la tasa de recambio  $((DOPAC+HVA)/DA)$  en las regiones estudiadas del SNC del grupo control y del grupo tratado sin distinción por sexo. La tabla 44 representa el contenido de DA (ng/g de tejido), DOPAC (ng/g de tejido), HVA (ng/g de tejido) y la tasa de recambio  $((DOPAC+HVA)/DA)$  de los grupos control y de los grupos tratados en las regiones estudiadas del SNC donde hubo interacción por sexo estadísticamente significativa.

Los resultados expresados en las tablas 43 y 44 demuestran que:

- En las ratas de 60 días de edad nacidas de ratas madre tratadas durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días de lactancia 1 a 10 se produjo una pérdida estadísticamente significativa del contenido de DA en el cuerpo estriado, corteza

frontal e hipocampo y del contenido de DOPAC en la corteza frontal y del contenido de HVA en la corteza frontal y cuerpo estriado. Además se produjo un incremento del contenido de DOPAC en el cuerpo estriado e hipocampo y de HVA solo en el hipocampo, respecto a los animales control, existiendo en el cuerpo estriado interacción por sexo en el efecto del tratamiento sobre el contenido de DA y en la corteza frontal e hipocampo sobre el contenido de DA y sus metabolitos y la tasa de recambio. En el cuerpo estriado la pérdida en el contenido de DA fue de un 13,35% ( $P<0,001$ ) y de un 11,45% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente y de HVA de un 16,98% ( $P<0,001$ ) y el incremento del contenido de DOPAC fue de un 36,15% ( $P<0,001$ ). En la corteza frontal la pérdida en el contenido de la DA fue de un 14,50% ( $P<0,001$ ) y de un 33,28% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente, la pérdida en el contenido de DOPAC fue de un 18,33% ( $P<0,001$ ) y de un 35,92% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente y la pérdida del contenido de HVA fue de un 18,98% ( $P<0,001$ ) y de un 35,28% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente. En el hipocampo la pérdida en el contenido de la DA fue de un 28,27% ( $P<0,001$ ) y de un 12,16% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente, el incremento en el contenido de DOPAC fue de un 10,88% ( $P<0,001$ ) y de un 34,32% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente y el incremento en el contenido de HVA fue de un 76,92% ( $P<0,001$ ) y de un 44,55% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente. La tasa de recambio sufrió una disminución estadísticamente significativa de un 4,77% ( $P<0,001$ ) y de un 3,53% ( $P<0,05$ ) en machos y hembras respectivamente en la corteza frontal, un incremento de un 31,12% ( $P<0,001$ ) en el cuerpo estriado y un incremento de un 84,76% ( $P<0,05$ ) y de un 56,72% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente en el hipocampo.

**Tabla 27.** Contenido de DA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>1</sup>).

Número de animal	DA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	1279,05	1396,40	92,63	309,72	468,84	496,34	7238,32	493,29
I <sub>2</sub>	1324,50	1242,54	90,39	296,45	454,72	501,29	7198,49	487,10
I <sub>3</sub>	1287,73	1324,40	94,57	310,73	478,91	510,63	7193,56	477,81
I <sub>4</sub>	1284,54	1304,03	91,54	301,56	471,83	509,63	7209,56	471,95
I <sub>5</sub>	1328,43	1297,45	90,72	309,56	469,29	495,61	7112,76	483,61
I <sub>6</sub>	1294,65	1253,65	94,19	294,81	473,91	514,29	7234,43	489,32
<b>Media ± ESM</b>	<b>1299,82 ± 8,69</b>	<b>1303,08 ± 22,59</b>	<b>92,34 ± 0,72</b>	<b>303,81 ± 2,92</b>	<b>469,58 ± 3,33</b>	<b>504,63 ± 3,24</b>	<b>7197,85 ± 18,59</b>	<b>483,85 ± 3,20</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

$$\text{Contenido de DA (ng/g de tejido)} = \frac{\text{Contenido de DA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$$

**Tabla 28.** Contenido de DA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>2</sup>).

Número de animal	DA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	1286,54	1227,65	94,46	310,45	474,54	477,45	7243,56	532,67
I <sub>2</sub>	1269,17	1136,95	90,34	303,44	461,83	482,75	7234,65	568,31
I <sub>3</sub>	1294,97	1265,49	91,17	297,55	465,52	478,21	7312,56	546,81
I <sub>4</sub>	1296,39	1215,60	89,80	311,45	458,61	483,91	7287,72	550,38
I <sub>5</sub>	1283,54	1287,54	91,64	301,59	443,87	492,71	7223,56	541,29
I <sub>6</sub>	1326,54	1195,79	90,81	305,93	452,73	503,91	7324,56	530,54
<b>Media ± ESM</b>	<b>1292,86 ± 7,83</b>	<b>1221,50 ± 53,25</b>	<b>91,37 ± 0,67</b>	<b>305,07 ± 2,17</b>	<b>459,52 ± 4,32</b>	<b>486,49 ± 4,14</b>	<b>7271,10 ± 17,51</b>	<b>545,00 ± 5,63</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

$$\text{Contenido de DA (ng/g de tejido)} = \frac{\text{Contenido de DA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$$

**Tabla 29.** Contenido de DA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad (6 animales) nacidas de madres tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días 1 a 10 de lactancia (Grupo II<sup>1</sup>).

Número de animal	DA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
II <sub>1</sub>	1326,45	1282,38	89,39	301,56	474,91	431,83	1092,74	356,38
II <sub>2</sub>	1264,21	1321,43	94,54	297,39	473,53	435,72	1108,82	332,90
II <sub>3</sub>	1310,54	1394,04	93,72	321,63	479,92	421,90	1108,71	341,71
II <sub>4</sub>	1324,43	1253,54	91,18	302,56	467,97	429,38	1096,38	353,47
II <sub>5</sub>	1338,53	1326,54	94,08	292,51	473,61	439,54	1143,96	339,50
II <sub>6</sub>	1298,53	1342,76	92,63	317,63	477,82	430,36	1120,94	358,52
<b>Media ± ESM</b>	<b>1310,45 ± 10,83</b>	<b>1320,12 ± 19,90</b>	<b>92,59 ± 0,81</b>	<b>305,55 ± 4,71</b>	<b>474,63 ± 1,68</b>	<b>431,46 ± 2,45</b>	<b>1111,93 ± 7,61</b>	<b>347,08 ± 4,26</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

	Contenido de DA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de DA (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de DA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 30.** Contenido de DA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad (6 animales) nacidas de madres tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días 1 a 10 de lactancia (Grupo II<sup>2</sup>).

Número de animal	DA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
II <sub>1</sub>	1342,65	1232,65	91,31	321,34	466,12	334,83	6456,76	470,56
II <sub>2</sub>	1281,21	1226,75	91,54	291,56	463,72	321,85	6419,80	465,61
II <sub>3</sub>	1325,54	1314,65	90,34	320,45	471,83	331,63	6453,56	487,91
II <sub>4</sub>	1278,51	1160,82	96,46	303,19	463,94	328,49	6435,76	475,20
II <sub>5</sub>	1299,61	1231,45	90,48	305,65	456,81	316,93	6428,50	486,40
II <sub>6</sub>	1284,54	1234,46	92,42	301,56	463,46	313,81	6439,00	486,73
<b>Media ± ESM</b>	<b>1302,01 ± 10,80</b>	<b>1233,46 ± 19,93</b>	<b>92,09 ± 0,93</b>	<b>307,29 ± 4,73</b>	<b>464,31 ± 1,98</b>	<b>324,59 ± 3,43</b>	<b>6438,90 ± 5,82</b>	<b>478,73 ± 3,91</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

	Contenido de DA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de DA (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de DA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 31.** Contenido de DOPAC (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>1</sup>).

Número de animal	DOPAC (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	107,85	66,33	22,43	21,76	10,76	46,78	813,82	9,64
I <sub>2</sub>	108,40	59,41	22,69	21,56	10,49	44,47	804,76	9,71
I <sub>3</sub>	117,51	61,31	21,65	21,71	10,63	47,31	832,73	9,77
I <sub>4</sub>	104,34	63,74	22,45	21,93	11,63	44,81	799,63	9,89
I <sub>5</sub>	108,40	60,43	21,65	21,52	9,62	45,96	812,93	9,74
I <sub>6</sub>	111,87	52,65	21,54	22,29	11,84	46,73	826,66	10,17
<b>Media ± ESM</b>	<b>109,73 ± 1,84</b>	<b>60,65 ± 4,65</b>	<b>22,07 ± 0,21</b>	<b>21,80 ± 0,12</b>	<b>10,83 ± 0,33</b>	<b>46,01 ± 0,47</b>	<b>815,09 ± 5,15</b>	<b>9,82 ± 0,08</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

ND: no detectado.

	Contenido de DOPAC (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de DOPAC (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de DOPAC (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 32.** Contenido de DOPAC (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>2</sup>).

Número de animal	DOPAC (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	111,54	59,43	21,65	20,34	10,34	45,86	823,59	8,95
I <sub>2</sub>	103,91	60,43	20,32	20,16	10,79	46,81	812,76	9,51
I <sub>3</sub>	110,43	59,74	22,66	21,62	11,57	47,49	803,71	9,81
I <sub>4</sub>	116,54	59,31	23,53	20,42	10,78	45,92	874,29	8,52
I <sub>5</sub>	109,20	61,19	23,65	20,56	10,57	44,30	835,65	9,28
I <sub>6</sub>	112,84	58,72	21,96	20,45	11,48	45,90	821,69	9,61
<b>Media ± ESM</b>	<b>110,74 ± 1,71</b>	<b>59,80 ± 0,88</b>	<b>22,29 ± 0,51</b>	<b>20,59 ± 0,21</b>	<b>10,92 ± 0,20</b>	<b>46,05 ± 0,44</b>	<b>828,62 ± 10,13</b>	<b>9,28 ± 0,19</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

ND: no detectado.

	Contenido de DOPAC (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de DOPAC (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de DOPAC (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 33.** Contenido de DOPAC (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad nacidas de madres tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días 1 a 10 de lactancia (Grupo II<sup>1</sup>).

Número de animal	DOPAC (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
II <sub>1</sub>	113,43	62,65	22,43	21,45	11,85	38,79	1092,74	10,93
II <sub>2</sub>	106,54	62,78	23,36	21,23	10,96	36,86	1108,82	10,43
II <sub>3</sub>	118,53	57,12	20,43	21,75	10,63	37,82	1108,71	10,74
II <sub>4</sub>	103,64	62,90	22,51	22,29	9,49	37,45	1096,38	11,42
II <sub>5</sub>	120,72	59,34	21,43	21,49	11,67	37,83	1143,96	10,98
II <sub>6</sub>	102,46	62,60	22,65	22,89	10,56	36,72	1120,94	10,83
<b>Media ± ESM</b>	<b>110,89 ± 3,18</b>	<b>61,23 ± 0,99</b>	<b>22,14 ± 0,42</b>	<b>21,85 ± 0,26</b>	<b>10,86 ± 0,35</b>	<b>37,58 ± 0,31</b>	<b>1111,93 ± 7,61</b>	<b>10,89 ± 0,13</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo. ND: no detectado.

	Contenido de DOPAC (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de DOPAC (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de DOPAC (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 34.** Contenido de DOPAC (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad nacidas de madres tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días 1 a 10 de lactancia (Grupo II<sup>2</sup>).

Número de animal	DOPAC (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
II <sub>1</sub>	108,54	60,43	21,01	20,56	11,58	29,31	1098,13	13,75
II <sub>2</sub>	98,45	59,54	20,76	20,45	10,55	29,49	1123,35	11,61
II <sub>3</sub>	113,54	58,83	22,73	20,96	9,89	30,51	1131,95	12,72
II <sub>4</sub>	116,76	63,72	24,51	21,79	11,78	29,62	1154,61	11,74
II <sub>5</sub>	122,85	60,64	23,15	20,36	10,72	28,94	1109,78	12,34
II <sub>6</sub>	109,87	59,54	21,73	20,57	11,56	29,17	1138,52	12,63
<b>Media ± ESM</b>	<b>111,67 ± 3,38</b>	<b>60,45 ± 0,71</b>	<b>22,31 ± 0,58</b>	<b>20,78 ± 0,22</b>	<b>11,01 ± 0,30</b>	<b>29,51 ± 0,22</b>	<b>1126,06 ± 8,28</b>	<b>12,47 ± 0,32</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo. ND: no detectado.

Contenido de DOPAC (ng/g de tejido)	=	$\frac{\text{Contenido de DOPAC (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$
--	---	--

**Tabla 35.** Contenido de HVA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>1</sup>).

Número de animal	HVA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>II<sub>1</sub></b>	41,54	31,75	11,45	11,36	9,61	22,10	543,77	8,43
<b>II<sub>2</sub></b>	39,34	33,31	11,54	10,83	10,00	23,71	552,86	8,21
<b>II<sub>3</sub></b>	37,97	34,43	11,53	10,51	9,74	22,73	569,41	8,39
<b>II<sub>4</sub></b>	34,54	32,43	11,29	11,59	9,92	22,83	533,69	8,93
<b>II<sub>5</sub></b>	40,32	32,49	12,74	11,23	9,73	23,71	559,52	8,35
<b>II<sub>6</sub></b>	42,95	31,54	10,52	10,37	9,56	21,89	540,39	8,49
<b>Media ± ESM</b>	<b>39,44 ± 1,21</b>	<b>32,66 ± 0,44</b>	<b>11,51 ± 0,29</b>	<b>10,98 ± 0,20</b>	<b>9,76 ± 0,07</b>	<b>22,83 ± 0,32</b>	<b>549,94 ± 5,39</b>	<b>8,47 ± 0,10</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

ND: no detectado.

	Contenido de HVA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de HVA (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de HVA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 36.** Contenido de HVA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>2</sup>).

Número de animal	HVA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>II<sub>1</sub></b>	34,32	39,53	11,48	11,72	10,53	21,94	558,67	6,53
<b>II<sub>2</sub></b>	37,91	36,51	11,45	10,54	9,34	22,73	543,67	6,95
<b>II<sub>3</sub></b>	38,43	38,86	10,30	10,73	9,92	21,69	543,71	6,49
<b>II<sub>4</sub></b>	37,60	32,83	11,26	12,06	9,30	22,81	551,72	6,39
<b>II<sub>5</sub></b>	33,59	34,92	10,29	11,19	9,84	21,71	563,66	6,95
<b>II<sub>6</sub></b>	36,54	33,37	11,08	10,81	9,29	22,38	539,45	6,52
<b>Media ± ESM</b>	<b>36,40 ± 0,82</b>	<b>36,00 ± 1,14</b>	<b>10,98 ± 0,22</b>	<b>11,17 ± 0,25</b>	<b>9,70 ± 0,20</b>	<b>22,21 ± 0,20</b>	<b>550,15 ± 3,90</b>	<b>6,64 ± 0,10</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

ND: no detectado.

	Contenido de HVA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de HVA (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de HVA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 37.** Contenido de HVA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad nacidas de madres tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días 1 a 10 de lactancia (Grupo II<sup>1</sup>).

Número de animal	HVA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	37,89	33,58	11,44	11,74	9,72	27,52	457,62	4,83
I <sub>2</sub>	39,54	31,21	12,98	10,67	10,14	28,53	437,95	4,99
I <sub>3</sub>	37,20	33,15	10,86	10,26	9,39	27,89	464,56	4,93
I <sub>4</sub>	41,31	34,51	11,62	10,57	9,82	28,54	467,85	4,76
I <sub>5</sub>	40,94	30,41	11,45	11,57	9,64	28,91	448,77	4,35
I <sub>6</sub>	37,54	31,46	10,59	10,72	9,64	27,66	466,73	4,85
<b>Media ± ESM</b>	<b>39,07 ± 0,73</b>	<b>32,39 ± 0,65</b>	<b>11,49 ± 0,34</b>	<b>10,92 ± 0,24</b>	<b>9,72 ± 0,10</b>	<b>28,17 ± 0,23</b>	<b>457,25 ± 4,83</b>	<b>4,79 ± 0,09</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo. ND: no detectado.

	Contenido de HVA
	(ng totales presentes en el volumen total de extracción)
	—
Contenido de HVA (ng/g de tejido)	Peso de tejido (g)

**Tabla 38.** Contenido de HVA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad (6 animales) nacidas de madres tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días 1 a 10 de lactancia (Grupo II<sup>2</sup>).

Número de animal	HVA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	36,86	37,14	10,62	11,11	9,76	31,81	443,65	4,73
I <sub>2</sub>	34,24	35,14	10,43	10,84	9,53	34,91	452,77	4,62
I <sub>3</sub>	34,88	37,94	10,34	10,59	9,63	35,38	453,56	4,49
I <sub>4</sub>	35,79	34,71	11,43	11,74	9,56	33,14	465,77	4,37
I <sub>5</sub>	37,54	34,55	11,54	10,73	9,72	34,73	448,67	4,73
I <sub>6</sub>	38,29	34,23	11,34	11,86	9,49	35,94	471,55	4,61
<b>Media ± ESM</b>	<b>36,27 ± 0,64</b>	<b>35,62 ± 1,54</b>	<b>10,95 ± 0,22</b>	<b>11,15 ± 0,22</b>	<b>9,62 ± 0,04</b>	<b>34,32 ± 0,63</b>	<b>456,00 ± 4,32</b>	<b>4,59 ± 0,06</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo. ND: no detectado.

	Contenido de HVA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de HVA (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de HVA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 39.** Tasa de recambio de DA en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>1</sup>).

Número de animal	Tasa de recambio de DA							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>I<sub>1</sub></b>	0,11	0,07	0,37	0,11	0,04	0,15	0,19	0,03
<b>I<sub>2</sub></b>	0,11	0,07	0,39	0,11	0,05	0,15	0,19	0,03
<b>I<sub>3</sub></b>	0,12	0,07	0,34	0,10	0,04	0,15	0,19	0,03
<b>I<sub>4</sub></b>	0,11	0,08	0,37	0,11	0,05	0,14	0,18	0,03
<b>I<sub>5</sub></b>	0,11	0,07	0,36	0,11	0,04	0,15	0,19	0,03
<b>I<sub>6</sub></b>	0,12	0,07	0,34	0,11	0,05	0,14	0,19	0,03
<b>Media ± ESM</b>	<b>0,11 ± 0,00</b>	<b>0,07 ± 0,00</b>	<b>0,36 ± 0,01</b>	<b>0,11 ± 0,00</b>	<b>0,04 ± 0,00</b>	<b>0,15 ± 0,001</b>	<b>0,19 ± 0,00</b>	<b>0,03 ± 0,00</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

$$\text{Tasa de recambio de DA} = \frac{\text{Contenido de DOPAC (ng/g de tejido)} + \text{Contenido de HVA (ng/g de tejido)}}{\text{Contenido de DA (ng/g de tejido)}}$$

**Tabla 40.** Tasa de recambio de DA en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>2</sup>).

Número de animal	Tasa de recambio de DA							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>I<sub>1</sub></b>	0,12	0,08	0,34	0,10	0,04	0,16	0,19	0,03
<b>I<sub>2</sub></b>	0,11	0,08	0,34	0,10	0,04	0,17	0,19	0,02
<b>I<sub>3</sub></b>	0,11	0,08	0,36	0,11	0,05	0,17	0,18	0,03
<b>I<sub>4</sub></b>	0,12	0,08	0,39	0,10	0,04	0,16	0,20	0,02
<b>I<sub>5</sub></b>	0,11	0,07	0,38	0,10	0,05	0,16	0,19	0,03
<b>I<sub>6</sub></b>	0,11	0,08	0,37	0,11	0,05	0,16	0,19	0,03
<b>Media ±</b>	<b>0,11 ±</b>	<b>0,08 ±</b>	<b>0,36 ±</b>	<b>0,10 ±</b>	<b>0,04 ±</b>	<b>0,17 ±</b>	<b>0,19 ±</b>	<b>0,03 ±</b>
<b>ESM</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	<b>0,00</b>	<b>0,001</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

	$\frac{\text{Contenido de DOPAC (ng/g de tejido)} + \text{Contenido de HVA (ng/g de tejido)}}{\text{Contenido de DA (ng/g de tejido)}}$
Tasa de recambio de DA	-

**Tabla 41.** Tasa de recambio de DA en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad nacidas de madres tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días 1 a 10 de lactancia (Grupo II<sup>1</sup>).

Número de animal	Tasa de recambio de DA							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>II<sub>1</sub></b>	0,12	0,07	0,38	0,11	0,05	0,14	0,25	0,05
<b>II<sub>2</sub></b>	0,12	0,07	0,37	0,11	0,04	0,14	0,25	0,06
<b>II<sub>3</sub></b>	0,12	0,07	0,34	0,10	0,04	0,14	0,25	0,06
<b>II<sub>4</sub></b>	0,10	0,08	0,37	0,11	0,04	0,14	0,25	0,06
<b>II<sub>5</sub></b>	0,12	0,07	0,36	0,11	0,05	0,14	0,26	0,06
<b>II<sub>6</sub></b>	0,11	0,07	0,36	0,10	0,04	0,14	0,26	0,05
<b>Media ± ESM</b>	<b>0,11 ± 0,00</b>	<b>0,07 ± 0,00</b>	<b>0,36 ± 0,01</b>	<b>0,11 ± 0,00</b>	<b>0,04 ± 0,00</b>	<b>0,14 ± 0,001</b>	<b>0,25 ± 0,00</b>	<b>0,06 ± 0,00</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

	$\frac{\text{Contenido de DOPAC (ng/g de tejido)} + \text{Contenido de HVA (ng/g de tejido)}}{\text{Contenido de DA (ng/g de tejido)}}$
Tasa de recambio de DA	=

**Tabla 42.** Tasa de recambio de DA en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad nacidas de madres tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días 1 a 10 de lactancia (Grupo II<sup>2</sup>).

Número de animal	Tasa de recambio de DA							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>II<sub>1</sub></b>	0,11	0,08	0,36	0,10	0,05	0,15	0,24	0,04
<b>II<sub>2</sub></b>	0,11	0,08	0,35	0,11	0,04	0,16	0,25	0,04
<b>II<sub>3</sub></b>	0,11	0,07	0,37	0,10	0,04	0,16	0,25	0,04
<b>II<sub>4</sub></b>	0,12	0,08	0,37	0,11	0,05	0,16	0,25	0,04
<b>II<sub>5</sub></b>	0,12	0,08	0,37	0,10	0,05	0,16	0,24	0,04
<b>II<sub>6</sub></b>	0,11	0,08	0,36	0,10	0,04	0,16	0,25	0,04
<b>Media ±</b>	<b>0,11 ±</b>	<b>0,08 ±</b>	<b>0,36 ±</b>	<b>0,10 ±</b>	<b>0,04 ±</b>	<b>0,16 ±</b>	<b>0,25 ±</b>	<b>0,04 ±</b>
<b>ESM</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,001</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

	$\frac{\text{Contenido de DOPAC (ng/g de tejido)} + \text{Contenido de HVA (ng/g de tejido)}}{\text{Contenido de DA (ng/g de tejido)}}$
Tasa de recambio de DA	=

**Tabla 43.** Contenido de DA, DOPAC, HVA y (DOPAC+HVA)/DA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en ratas control de 60 días de edad y en ratas de 60 días de edad nacidas de ratas madre tratadas con clodimeformo durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia.

	DA (ng/g de tejido)		DOPAC (ng/g de tejido)		HVA (ng/g de tejido)		(DOPAC+HVA)/DA (ng/g de tejido)	
	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado
<b>HT</b>	1296,34 ± 8,02	1306,23 ± 10,47	110,24 ± 1,71	111,28 ± 3,13	37,67 ± 0,89	37,92 ± 1,18	0,11 ± 0,00	0,1 ± 0,00
<b>MS</b>	1262,29 ± 27,37	1276,79 ± 26,49	60,22 ± 1,31	60,84 ± 0,84	34,00 ± 0,92	34,33 ± 1,09	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00
<b>CB</b>	91,86 ± 0,69	92,34 ± 0,84	22,18 ± 0,38	22,22 ± 0,49	11,22 ± 0,30	11,24 ± 0,27	0,36 ± 0,01	0,36 ± 0,00
<b>BL</b>	304,44 ± 2,47	306,42 ± 4,52	21,19 ± 0,30	21,32 ± 0,32	11,03 ± 0,23	11,08 ± 0,22	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,00
<b>MD</b>	464,55 ± 4,26	469,47 ± 2,81	10,88 ± 0,26	10,94 ± 0,31	9,67 ± 0,08	9,73 ± 0,14	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
<b>CF</b>	495,56 ± 5,25	<sup>b</sup> 378,02 ± 22,96	46,03 ± 0,43	<sup>b</sup> 33,54 ± 1,74	31,25 ± 1,39	<sup>b</sup> 22,52 ± 0,29	0,16 ± 0,00	<sup>b</sup> 0,15 ± 0,00
<b>CE</b>	7234,48 ± 23,25	<sup>b</sup> 6337,99 ± 43,89	821,85 ± 8,19	1118,99 ± 8,16*** <sup>a</sup> (36,15%)	550,04 ± 4,49	456,62 ± 4,38*** <sup>a</sup> (-16,98%)	0,19 ± 0,00	0,25 ± 0,00*** <sup>a</sup> (31,12%)
<b>HC</b>	514,42 ± 13,75	<sup>b</sup> 412,91 ± 28,34	9,55 ± 0,18	<sup>b</sup> 11,68 ± 0,41	4,69 ± 0,08	<sup>b</sup> 7,55 ± 0,40	0,03 ± 0,00	<sup>b</sup> 0,05 ± 0,00

Valor medio ± ESM (n=6).

<sup>a</sup>Entre paréntesis se indica la diferencia (aumento) en porcentaje, con respecto al grupo control.

<sup>b</sup>Tratamiento con interacción por sexo estadísticamente significativo.

Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  y \*\*\* $P < 0,001$ .

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

**Tabla 44.** Contenido de DA, DOPAC, HVA y (DOPAC+HVA)/DA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en ratas control de 60 días de edad y en ratas de 60 días de edad nacidas de ratas madre tratadas con clodimeformo durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia con interacción por sexo estadísticamente significativa.

	DA (ng/g de tejido)		DOPAC (ng/g de tejido)		HVA (ng/g de tejido)		(DOPAC+HVA)/DA (ng/g de tejido)	
	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado
<b>CF<sub>1</sub></b>	504,63 ± 3,24	431,46 ± 2,45*** <sup>a</sup> (-14,50%)	46,01 ± 0,47	37,58 ± 0,31*** <sup>a</sup> (-18,33%)	28,17 ± 0,23	22,83 ± 0,32*** <sup>a</sup> (-18,98%)	0,15 ± 0,001	0,14 ± 0,001*** <sup>a</sup> (-4,77%)
<b>CF<sub>2</sub></b>	486,49 ± 4,14	324,59 ± 3,43*** <sup>a</sup> (-33,28%)	46,05 ± 0,44	29,51 ± 0,22*** <sup>a</sup> (-35,92%)	34,32 ± 0,63	22,21 ± 0,20*** <sup>a</sup> (-35,28%)	0,17 ± 0,00	0,16 ± 0,00* <sup>a</sup> (-3,53%)
<b>CE<sub>1</sub></b>	7197,85 ± 18,59	6237,08 ± 11,46*** <sup>a</sup> (-13,35%)	-	-	-	-	-	-
<b>CE<sub>2</sub></b>	7271,10 ± 17,51	6438,90 ± 5,82*** <sup>a</sup> (-11,45%)	-	-	-	-	-	-
<b>HC<sub>1</sub></b>	483,85 ± 3,20	347,08 ± 4,26*** <sup>a</sup> (-28,27%)	9,82 ± 0,08	10,89 ± 0,13*** <sup>a</sup> (10,88%)	4,79 ± 0,09	8,47 ± 0,10*** <sup>a</sup> (76,92%)	0,03 ± 0,00	0,06 ± 0,00* <sup>a</sup> (84,76%)
<b>HC<sub>2</sub></b>	545,00 ± 5,63	478,73 ± 3,91*** <sup>a</sup> (-12,16%)	9,28 ± 0,19	12,47 ± 0,32*** <sup>a</sup> (34,32%)	4,59 ± 0,06	6,64 ± 0,10*** <sup>a</sup> (44,55%)	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00*** <sup>a</sup> (56,72%)

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (aumento y/o disminución) en porcentaje, con respecto al grupo control.

Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  y \*\*\*  $P < 0,001$ .

(-) Datos que no tuvieron interacción por sexo estadísticamente significativa.

### 5.1.3. Efecto del clodimeformo sobre el contenido de NA y MHPG en el SNC

El tratamiento con clodimeformo por vía oral a ratas madre durante el periodo de gestación desde el día 6 al día 21 y durante la lactancia desde el día 1 al día 10, afectó al contenido de NA y de su metabolito MHPG en las regiones de corteza frontal y cuerpo estriado de las ratas descendientes a la edad de 60 días. El contenido de NA (ng/g de tejido) en las regiones estudiadas del SNC en los animales de los grupos control y de los grupos tratados se presenta en las tablas 45, 46, 47 y 48. El contenido de MHPG (ng/g de tejido) en las regiones estudiadas del SNC en los animales de los grupos control y de los grupos tratados se presenta en las tablas 49, 50, 51 y 52. La tasa de recambio de la NA en las regiones estudiadas del SNC en los animales de los grupos control y de los grupos tratados se presenta en las tablas 53, 54, 55 y 56. La tabla 57 representa el contenido de NA (ng/g de tejido), MHPG (ng/g de tejido) y la tasa de recambio (MHPG/NA) en las regiones estudiadas del SNC del grupo control y del grupo tratado sin distinción por sexo. La tabla 58 representa el contenido de DA (ng/g de tejido), MHPG (ng/g de tejido) y la tasa de recambio (MHPG/NA) de los grupos control y de los grupos tratados en las regiones estudiadas del SNC donde hubo interacción por sexo estadísticamente significativa.

Los resultados expresados en las tablas 57 y 58 demuestran que:

- En las ratas de 60 días de edad nacidas de ratas madre tratadas durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días de lactancia 1 a 10 se produjo una pérdida estadísticamente significativa del contenido de NA y MHPG en la corteza frontal y el cuerpo estriado con interacción por sexo. En la corteza frontal la pérdida en el contenido de la NA fue de un 19,46% ( $P < 0,001$ ) y de un 26,57% ( $P < 0,001$ ) en machos y hembras respectivamente y la pérdida del contenido de MHPG fue de un 21,55% ( $P < 0,001$ ) y de un 35,63% ( $P < 0,001$ ) en

machos y hembras respectivamente. En el cuerpo estriado la pérdida en el contenido de NA fue de un 11.18% ( $P<0,001$ ) y de un 20,54% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente y la pérdida del contenido de MHPG fue de un 16,80% ( $P<0,001$ ) y 36,08% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente. La tasa de recambio sufrió una disminución estadísticamente significativa de un 2,59% ( $P<0,05$ ) y de un 12,33% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente en la corteza frontal y de un 6,35% ( $P<0,01$ ) y de un 19,58% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente en el cuerpo estriado.

**Tabla 45.** Contenido de NA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>1</sup>).

Número de animal	NA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>I<sub>1</sub></b>	1324,50	619,54	230,68	253,66	422,76	245,61	172,65	263,92
<b>I<sub>2</sub></b>	1311,85	573,18	240,91	228,63	432,87	239,00	170,32	237,04
<b>I<sub>3</sub></b>	1375,88	558,99	246,14	236,49	435,88	243,65	171,54	228,13
<b>I<sub>4</sub></b>	1359,41	632,65	237,43	251,79	421,74	247,34	173,45	249,58
<b>I<sub>5</sub></b>	1306,45	612,56	234,45	243,70	458,96	242,94	178,76	209,81
<b>I<sub>6</sub></b>	1362,30	634,65	241,54	249,51	385,49	243,72	173,65	253,71
<b>Media ±</b>	<b>1340,06±</b>	<b>605,26±</b>	<b>238,52±</b>	<b>243,96±</b>	<b>426,28±</b>	<b>243,71±</b>	<b>173,40±</b>	<b>240,36±</b>
<b>ESM</b>	<b>12,00</b>	<b>12,96</b>	<b>2,25</b>	<b>3,99</b>	<b>9,83</b>	<b>1,15</b>	<b>1,19</b>	<b>7,98</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

$$\text{Contenido de NA (ng/g de tejido)} = \frac{\text{Contenido de NA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$$

**Tabla 46.** Contenido de NA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>2</sup>).

Número de animal	NA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	1323,28	574,76	225,23	242,63	387,85	227,45	157,56	234,29
I <sub>2</sub>	1304,95	525,78	227,48	245,61	432,76	223,56	159,43	213,22
I <sub>3</sub>	1343,56	563,90	238,65	244,51	408,41	224,45	150,54	244,43
I <sub>4</sub>	1352,64	528,65	221,22	243,71	396,73	225,72	162,76	275,40
I <sub>5</sub>	1324,59	542,38	220,34	248,65	435,79	223,71	157,56	243,73
I <sub>6</sub>	1378,34	592,65	231,46	241,76	428,65	225,34	160,56	253,84
<b>Media ± ESM</b>	<b>1337,89± 10,59</b>	<b>554,69± 10,94</b>	<b>227,40± 2,80</b>	<b>244,48± 1,00</b>	<b>415,03± 8,26</b>	<b>225,04± 0,60</b>	<b>158,07± 1,71</b>	<b>244,15± 8,42</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

	Contenido de NA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de NA (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de NA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 47.** Contenido de NA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia (Grupo II<sup>1</sup>).

Número de animal	NA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>II<sub>1</sub></b>	1388,45	651,90	243,43	259,63	423,65	194,34	151,65	249,34
<b>II<sub>2</sub></b>	1385,34	544,78	215,13	243,83	427,51	192,67	153,65	245,81
<b>II<sub>3</sub></b>	1362,72	605,25	258,33	241,75	433,95	199,52	153,65	261,70
<b>II<sub>4</sub></b>	1342,90	552,47	242,25	220,61	441,64	197,39	155,61	231,95
<b>II<sub>5</sub></b>	1370,17	643,76	261,51	239,83	417,84	198,27	152,53	251,73
<b>II<sub>6</sub></b>	1306,25	683,34	221,68	247,59	445,42	195,52	156,98	219,73
<b>Media ± ESM</b>	<b>1359,31± 12,57</b>	<b>613,58± 22,94</b>	<b>240,39± 7,68</b>	<b>242,21± 5,19</b>	<b>431,67± 4,35</b>	<b>196,29± 1,05</b>	<b>154,01± 0,80</b>	<b>243,38± 6,16</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

Contenido de NA (ng/g de tejido)	-	$\frac{\text{Contenido de NA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$
-------------------------------------	---	---

**Tabla 48.** Contenido de NA (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia (Grupo II<sup>2</sup>).

Número de animal	NA (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>II<sub>1</sub></b>	1361,32	521,67	218,09	252,37	454,63	162,76	125,56	268,29
<b>II<sub>2</sub></b>	1389,26	582,76	231,85	243,31	410,54	165,56	126,78	269,41
<b>II<sub>3</sub></b>	1250,58	582,39	232,41	238,62	394,62	163,39	124,63	245,26
<b>II<sub>4</sub></b>	1332,90	526,41	237,01	241,94	432,76	165,40	125,27	279,00
<b>II<sub>5</sub></b>	1394,22	561,87	234,61	243,77	406,73	164,98	124,66	203,04
<b>II<sub>6</sub></b>	1376,60	593,87	224,79	254,73	431,56	169,41	126,66	225,00
<b>Media ± ESM</b>	<b>1350,81± 21,99</b>	<b>561,49± 12,59</b>	<b>229,79± 2,88</b>	<b>245,79± 2,58</b>	<b>421,81± 8,92</b>	<b>165,25± 0,95</b>	<b>125,59± 0,39</b>	<b>248,33± 12,09</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

Contenido de NA (ng/g de tejido)	-	$\frac{\text{Contenido de NA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$
-------------------------------------	---	---

**Tabla 49.** Contenido de MHPG (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>1</sup>).

Número de animal	MHPG (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	45,44	45,71	23,76	27,54	23,71	52,56	81,54	34,79
I <sub>2</sub>	48,76	46,57	25,18	28,39	23,84	51,62	80,45	33,81
I <sub>3</sub>	46,43	45,84	22,67	28,68	23,48	52,34	84,81	34,91
I <sub>4</sub>	50,29	47,34	22,55	29,64	24,85	52,51	82,99	34,83
I <sub>5</sub>	47,90	46,43	24,37	28,27	24,61	53,83	80,44	33,91
I <sub>6</sub>	48,12	45,76	22,45	28,54	22,14	51,70	81,66	34,48
<b>Media ± ESM</b>	<b>47,82± 0,70</b>	<b>46,28± 0,26</b>	<b>23,50± 0,46</b>	<b>28,51± 0,28</b>	<b>23,77± 0,39</b>	<b>52,43± 0,33</b>	<b>81,98± 0,68</b>	<b>34,46± 0,20</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

Contenido de MHPG (ng/g de tejido)	—	$\frac{\text{Contenido de MHPG (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$
---------------------------------------	---	---

**Tabla 50.** Contenido de MHPG (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>2</sup>).

Número de animal	MHPG (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	46,35	45,32	25,54	28,49	23,64	53,41	80,54	35,88
I <sub>2</sub>	49,45	42,76	24,65	28,85	23,72	54,71	78,56	34,40
I <sub>3</sub>	51,47	44,65	23,93	29,19	22,65	52,94	81,04	33,83
I <sub>4</sub>	48,17	43,31	25,54	27,61	22,81	50,75	79,24	35,71
I <sub>5</sub>	48,56	44,34	25,65	28,43	23,94	52,69	80,92	34,95
I <sub>6</sub>	50,71	42,00	26,45	27,80	22,74	53,80	79,96	35,81
<b>Media ± ESM</b>	<b>49,12± 0,75</b>	<b>43,73± 0,51</b>	<b>25,29± 0,36</b>	<b>28,40± 0,25</b>	<b>23,25± 0,24</b>	<b>53,05± 0,54</b>	<b>80,04± 0,40</b>	<b>35,10± 0,35</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

Contenido de MHPG (ng/g de tejido)	—	$\frac{\text{Contenido de MHPG (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$
---------------------------------------	---	---

**Tabla 51.** Contenido de MHPG (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia (Grupo II<sup>1</sup>).

Número de animal	MHPG (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>II<sub>1</sub></b>	50,43	47,43	23,43	29,56	25,84	40,89	69,76	35,61
<b>II<sub>2</sub></b>	46,32	46,83	24,48	29,18	24,12	41,13	68,65	33,74
<b>II<sub>3</sub></b>	47,32	46,07	24,14	28,63	23,71	40,78	65,56	34,71
<b>II<sub>4</sub></b>	47,54	47,43	23,49	28,94	22,73	41,84	69,22	35,41
<b>II<sub>5</sub></b>	49,81	47,54	22,43	26,26	23,74	40,92	68,39	34,91
<b>II<sub>6</sub></b>	46,54	45,42	23,53	29,52	24,52	41,21	67,66	33,80
<b>Media ± ESM</b>	<b>47,99± 0,70</b>	<b>46,79± 0,36</b>	<b>23,58± 0,29</b>	<b>28,68± 0,51</b>	<b>24,11± 0,42</b>	<b>41,13± 0,16</b>	<b>68,21± 0,60</b>	<b>34,70± 0,32</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

	Contenido de 5-HIAA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de 5-HIAA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 52.** Contenido de MHPG (ng/g de tejido) en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia (Grupo II<sup>2</sup>).

Número de animal	MHPG (ng/g de tejido)							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>II<sub>1</sub></b>	51,34	44,64	23,76	29,85	23,68	34,81	50,54	34,83
<b>II<sub>2</sub></b>	52,59	44,43	25,49	28,56	24,53	34,90	51,65	35,81
<b>II<sub>3</sub></b>	49,12	44,43	26,12	27,84	22,84	33,73	50,45	34,84
<b>II<sub>4</sub></b>	48,89	43,42	27,49	28,72	21,98	34,85	52,56	35,93
<b>II<sub>5</sub></b>	50,41	44,87	25,17	28,83	24,92	33,10	51,33	35,94
<b>II<sub>6</sub></b>	48,46	43,54	24,93	28,17	23,51	33,49	50,56	34,92
<b>Media ± ESM</b>	<b>50,14± 0,66</b>	<b>44,22± 0,24</b>	<b>25,49± 0,51</b>	<b>28,66± 0,28</b>	<b>23,58± 0,44</b>	<b>34,15± 0,33</b>	<b>51,18± 0,34</b>	<b>35,38± 0,23</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

	Contenido de 5-HIAA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)
Contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido)	$= \frac{\text{Contenido de 5-HIAA (ng totales presentes en el volumen total de extracción)}}{\text{Peso de tejido (g)}}$

**Tabla 53.** Tasa de recambio de NA en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>1</sup>).

Número de animal	Tasa de recambio de NA							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>I<sub>1</sub></b>	0,03	0,07	0,10	0,11	0,06	0,21	0,47	0,13
<b>I<sub>2</sub></b>	0,04	0,08	0,10	0,12	0,06	0,22	0,47	0,14
<b>I<sub>3</sub></b>	0,03	0,08	0,09	0,12	0,05	0,21	0,49	0,15
<b>I<sub>4</sub></b>	0,04	0,07	0,09	0,12	0,06	0,21	0,48	0,14
<b>I<sub>5</sub></b>	0,04	0,08	0,10	0,12	0,05	0,22	0,45	0,16
<b>I<sub>6</sub></b>	0,04	0,07	0,09	0,11	0,06	0,21	0,47	0,14
<b>Media ± ESM</b>	<b>0,04± 0,001</b>	<b>0,08± 0,00</b>	<b>0,10± 0,00</b>	<b>0,12± 0,002</b>	<b>0,06± 0,00</b>	<b>0,22± 0,001</b>	<b>0,47± 0,01</b>	<b>0,14± 0,005</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

		Contenido de MHPG (ng/g de tejido)
Tasa de recambio de NA	—	_____
		Contenido de NA (ng/g de tejido)

**Tabla 54.** Tasa de recambio de NA en las regiones del SNC aisladas en ratas de 60 días de edad, grupo control (Grupo I<sup>2</sup>).

Número de animal	Tasa de recambio de NA							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
I <sub>1</sub>	0,04	0,08	0,11	0,12	0,06	0,23	0,51	0,15
I <sub>2</sub>	0,04	0,08	0,11	0,12	0,05	0,24	0,49	0,16
I <sub>3</sub>	0,04	0,08	0,10	0,12	0,06	0,24	0,54	0,14
I <sub>4</sub>	0,04	0,08	0,12	0,11	0,06	0,22	0,49	0,13
I <sub>5</sub>	0,04	0,08	0,12	0,11	0,05	0,24	0,51	0,14
I <sub>6</sub>	0,04	0,07	0,11	0,11	0,05	0,24	0,50	0,14
<b>Media ± ESM</b>	<b>0,04± 0,00</b>	<b>0,08± 0,00</b>	<b>0,11± 0,002</b>	<b>0,12± 0,00</b>	<b>0,06± 0,001</b>	<b>0,24± 0,003</b>	<b>0,51± 0,01</b>	<b>0,14± 0,00</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

$$\text{Tasa de recambio de NA} = \frac{\text{Contenido de MHPG (ng/g de tejido)}}{\text{Contenido de NA (ng/g de tejido)}}$$

**Tabla 55.** Tasa de recambio de NA en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia (Grupo II<sup>1</sup>).

Número de animal	Tasa de recambio de NA							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>II<sub>1</sub></b>	0,04	0,07	0,10	0,11	0,06	0,21	0,46	0,14
<b>II<sub>2</sub></b>	0,03	0,09	0,11	0,12	0,06	0,21	0,45	0,14
<b>II<sub>3</sub></b>	0,03	0,08	0,09	0,12	0,05	0,20	0,43	0,13
<b>II<sub>4</sub></b>	0,04	0,09	0,10	0,13	0,05	0,21	0,44	0,15
<b>II<sub>5</sub></b>	0,04	0,07	0,09	0,11	0,06	0,21	0,45	0,14
<b>II<sub>6</sub></b>	0,04	0,07	0,11	0,12	0,06	0,21	0,43	0,15
<b>Media ± ESM</b>	<b>0,04± 0,0005</b>	<b>0,08± 0,00</b>	<b>0,10± 0,00</b>	<b>0,12± 0,003</b>	<b>0,06± 0,00</b>	<b>0,21± 0,001</b>	<b>0,44± 0,00</b>	<b>0,14± 0,004</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

<p>Tasa de recambio de NA</p> <p style="text-align: right;">Contenido de MHPG (ng/g de tejido)</p> <p style="text-align: right;">Contenido de NA (ng/g de tejido)</p>	<p>—</p> <hr style="width: 50%; margin: auto;"/>
---	--

**Tabla 56.** Tasa de recambio de NA en las regiones del SNC aisladas de ratas de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia (Grupo II<sup>2</sup>).

Número de animal	Tasa de recambio de NA							
	HT	MS	CB	BL	MD	CF	CE	HC
<b>II<sub>1</sub></b>	0,04	0,09	0,11	0,12	0,05	0,21	0,40	0,13
<b>II<sub>2</sub></b>	0,04	0,08	0,11	0,12	0,06	0,21	0,41	0,13
<b>II<sub>3</sub></b>	0,04	0,08	0,11	0,12	0,06	0,21	0,40	0,14
<b>II<sub>4</sub></b>	0,04	0,08	0,12	0,12	0,05	0,21	0,42	0,13
<b>II<sub>5</sub></b>	0,04	0,08	0,11	0,12	0,06	0,20	0,41	0,18
<b>II<sub>6</sub></b>	0,04	0,07	0,11	0,11	0,05	0,20	0,40	0,16
<b>Media ± ESM</b>	<b>0,04± 0,00</b>	<b>0,08± 0,00</b>	<b>0,11± 0,001</b>	<b>0,12± 0,00</b>	<b>0,06± 0,002</b>	<b>0,21± 0,003</b>	<b>0,41± 0,00</b>	<b>0,14± 0,01</b>

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal; CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

		Contenido de MHPG (ng/g de tejido)
Tasa de recambio de NA	—	Contenido de NA (ng/g de tejido)

**Tabla 57.** Contenido de NA, MHPG y MHPG/NA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en ratas control de 60 días de edad y en ratas de 60 días de edad nacidas de ratas madre tratadas con clodimeformo durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia.

	NA (ng/g de tejido)		MHPG (ng/g de tejido)		MHPG/NA (ng/g de tejido)	
	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado
<b>HT</b>	1338,98± 10,80	1355,06± 17,17	48,47± 0,75	49,06± 0,79	0,04± 0,00	0,04± 0,00
<b>MS</b>	579,97± 15,72	587,54± 20,84	45,00± 0,67	45,50± 0,62	0,08± 0,00	0,08± 0,00
<b>CB</b>	232,96± 3,39	235,09± 5,97	24,40± 0,55	24,54± 0,57	0,10± 0,00	0,10± 0,00
<b>BL</b>	244,22± 2,77	244,00± 3,98	28,45± 0,25	28,67± 0,39	0,12± 0,00	0,12± 0,00
<b>MD</b>	420,66± 8,99	426,74± 7,01	23,51± 0,33	23,84± 0,43	0,06± 0,00	0,06± 0,00
<b>CF</b>	234,37± 4,08	<sup>b</sup> 180,77± 6,69	52,74± 0,45	<sup>b</sup> 37,64± 1,51	0,23± 0,00	<sup>b</sup> 0,21± 0,00
<b>CE</b>	165,73± 3,56	<sup>b</sup> 139,80± 6,09	81,01± 0,68	<sup>b</sup> 59,69± 3,66	0,49± 0,01	<sup>b</sup> 0,43± 0,01
<b>HC</b>	242,26± 7,86	245,86± 9,21	34,78± 0,30	35,04± 0,30	0,14± 0,00	0,14± 0,01

Valor medio ± ESM (n=6).

<sup>b</sup>Tratamientos con interacción por sexo estadísticamente significativas.

Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  y \*\*\* $P<0,001$ .

HT: hipotálamo; MS: mesencéfalo; CB: cerebelo; BL: bulbo raquídeo; MD: médula espinal; CF: corteza frontal;

CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

**Tabla 58.** Contenido de NA, MHPG y MHPG/NA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en ratas control de 60 días de edad y en ratas de 60 días de edad nacidas de ratas madre tratadas con clodimeformo durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia con interacción por sexo estadísticamente significativo.

	NA (ng/g de tejido)		MHPG (ng/g de tejido)		MHPG/NA (ng/g de tejido)	
	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado	Grupo I Control	Grupo II Tratado
<b>CF<sup>1</sup></b>	243,71± 1,15	196,29± 1,05*** <sup>a</sup> (-19,46%)	52,43± 0,33	41,13± 0,16*** <sup>a</sup> (-21,55%)	0,22± 0,001	0,21± 0,001* <sup>a</sup> (-2,59%)
<b>CF<sup>2</sup></b>	225,04± 0,60	165,25± 0,95*** <sup>a</sup> (-26,57%)	53,05± 0,54	34,15± 0,33*** <sup>a</sup> (-35,63%)	0,24± 0,003	0,21± 0,003*** <sup>a</sup> (-12,33%)
<b>CE<sup>1</sup></b>	173,40± 1,19	154,01± 0,80*** <sup>a</sup> (-11,18%)	81,98± 0,68	68,21± 0,60*** <sup>a</sup> (-16,80%)	0,47± 0,01	0,44± 0,00*** <sup>a</sup> (-6,35%)
<b>CE<sup>2</sup></b>	158,07± 1,71	125,59± 0,39*** <sup>a</sup> (-20,54%)	80,04± 0,40	51,18± 0,34*** <sup>a</sup> (-36,06%)	0,51± 0,01	0,41± 0,00*** <sup>a</sup> (-19,58%)

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (disminución) en porcentaje, con respecto al grupo control.

Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  y \*\*\*  $P < 0,001$ .

<sup>1</sup>Machos

<sup>2</sup>Hembras

#### **5.1.4. Efecto del clodimeformo sobre la expresión génica de enzimas que catalizan la síntesis y metabolismo de la DA, NA y 5-HT.**

Todas las muestras de ARN extraído alcanzaron el criterio mínimo de calidad exigido ( $RIN \geq 7.5$ ). La calidad de los ARN fue muy elevada obteniéndose un RIN medio de 8.9 (en una escala de 0-10) con un mínimo de 7.5 y un máximo de 10 (figura 26 y tabla 64).

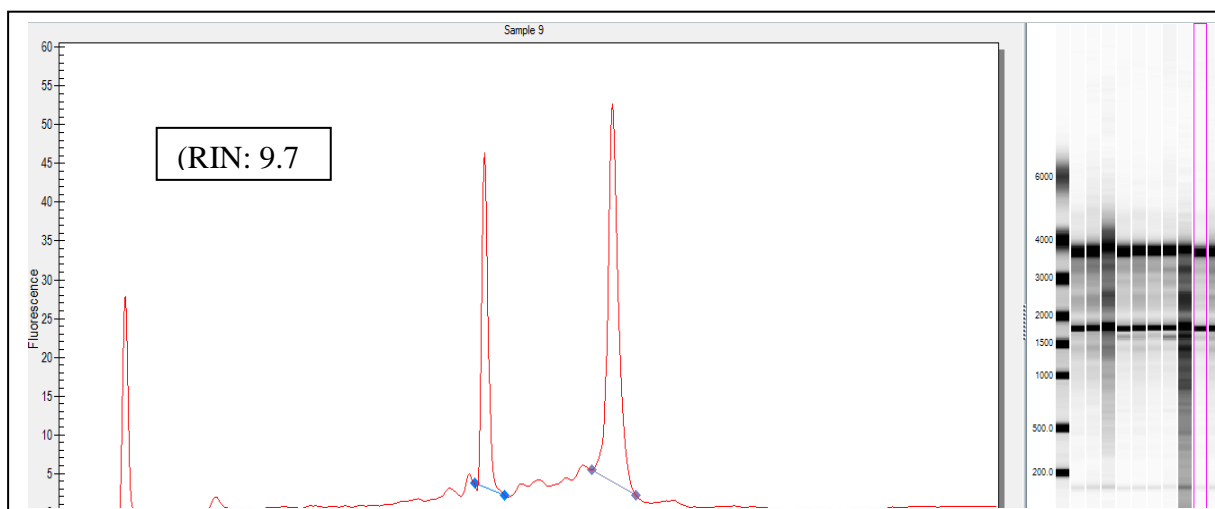
El tratamiento con clodimeformo por vía oral a ratas madres durante el periodo de gestación desde el día 6 al día 21 y durante la lactancia desde el día 1 al día 10, afectó a la expresión génica de las enzimas COMT, TH y TRH en la región del cuerpo estriado y del hipocampo y también alteró la expresión de la enzima AD en el hipocampo y de la enzima BDH en la región del cuerpo estriado de las ratas descendientes a la edad de 60 días (figuras 27, 28 y 29). También el tratamiento con clodimeformo produjo interacción por sexo en la expresión génica de la enzima BDH en la corteza frontal de las enzimas COMT, AD, TH y TRH en el hipocampo y de las enzimas TH y TRH en la corteza frontal (figuras 30,31 y 32).

En las ratas de 60 días de edad nacidas de ratas madre tratadas durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días de lactancia 1 a 10 se produjo una disminución en la expresión de las enzimas COMT, BDH, TH y TRH en el cuerpo estriado así como de la enzima TH en el hipocampo respecto a los animales control. También se produjo un aumento de la expresión de las enzimas COMT, AD y TRH en el hipocampo y de las enzimas TH y TRH en la corteza frontal respecto a los animales control. En el cuerpo estriado el descenso en la expresión de la COMT fue de un 23,35% ( $P < 0,01$ ), de la expresión de la BDH fue de un 26,15% ( $P < 0,01$ ) y 60,64% ( $P < 0,001$ ) en machos y hembras respectivamente, el descenso de la expresión de la TH fue de un 29,46% ( $P < 0,01$ ) y la disminución de la expresión de la TRH fue de un 43,24% ( $P < 0,01$ ) respecto a los animales control (Figura 28). En el hipocampo el aumento en la expresión de la COMT fue de un 67,39% ( $P < 0,001$ ) y de un 45,71% ( $P < 0,001$ )

en machos y hembras respectivamente, de la expresión de la AD fue de un 24,62% ( $P<0,01$ ) y 39,54% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente, de la expresión de la TRH fue de un 52,72% ( $P<0,001$ ) y 26,75% ( $P<0,01$ ) en machos y hembras respectivamente y la disminución de la expresión de la TH fue de un 63,45% ( $P<0,001$ ) y 26,35% ( $P<0,01$ ) en machos y hembras respectivamente respecto a los animales control (Figura 30). En la corteza frontal el tratamiento con clodimeformo no alteró la expresión de las enzimas MAO, COMT, AD, BDH, TH y TRH.

En las ratas de 60 días de edad nacidas de ratas madre tratadas durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días de lactancia 1 a 10 se produjo una mayor expresión de la enzima BDH en las hembras que en los machos en un 44,65% ( $P<0,001$ ) en el cuerpo estriado, así como también de la expresión de las enzimas COMT, AD, TH y TRH en las hembras que en los machos de un 58,83% ( $P<0,001$ ), 46,74% ( $P<0,001$ ), 43,65% ( $P<0,001$ ) y 37,85% ( $P<0,001$ ) respectivamente en el hipocampo. En la corteza frontal por el contrario hubo una mayor expresión de las enzimas TH y TRH en los machos que en las hembras de un 35,66% ( $P<0,001$ ) y 42,14% ( $P<0,001$ ) respectivamente.

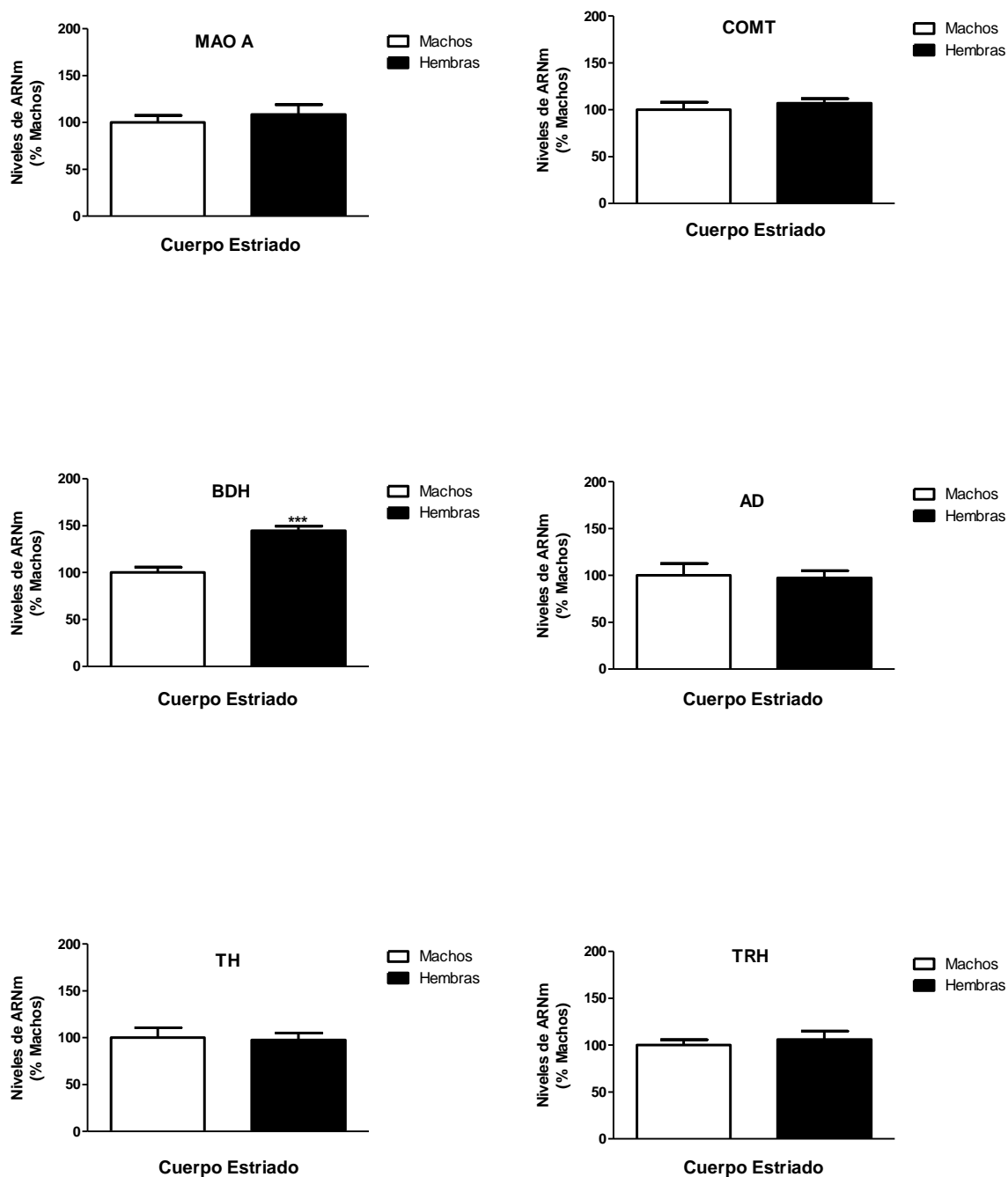
**Figura 26.** Representación de la calidad de las muestras de ARN seleccionados para el estudio. Muestras con un límite superior de calidad al aceptado (RIN: 7.5) para el estudio.



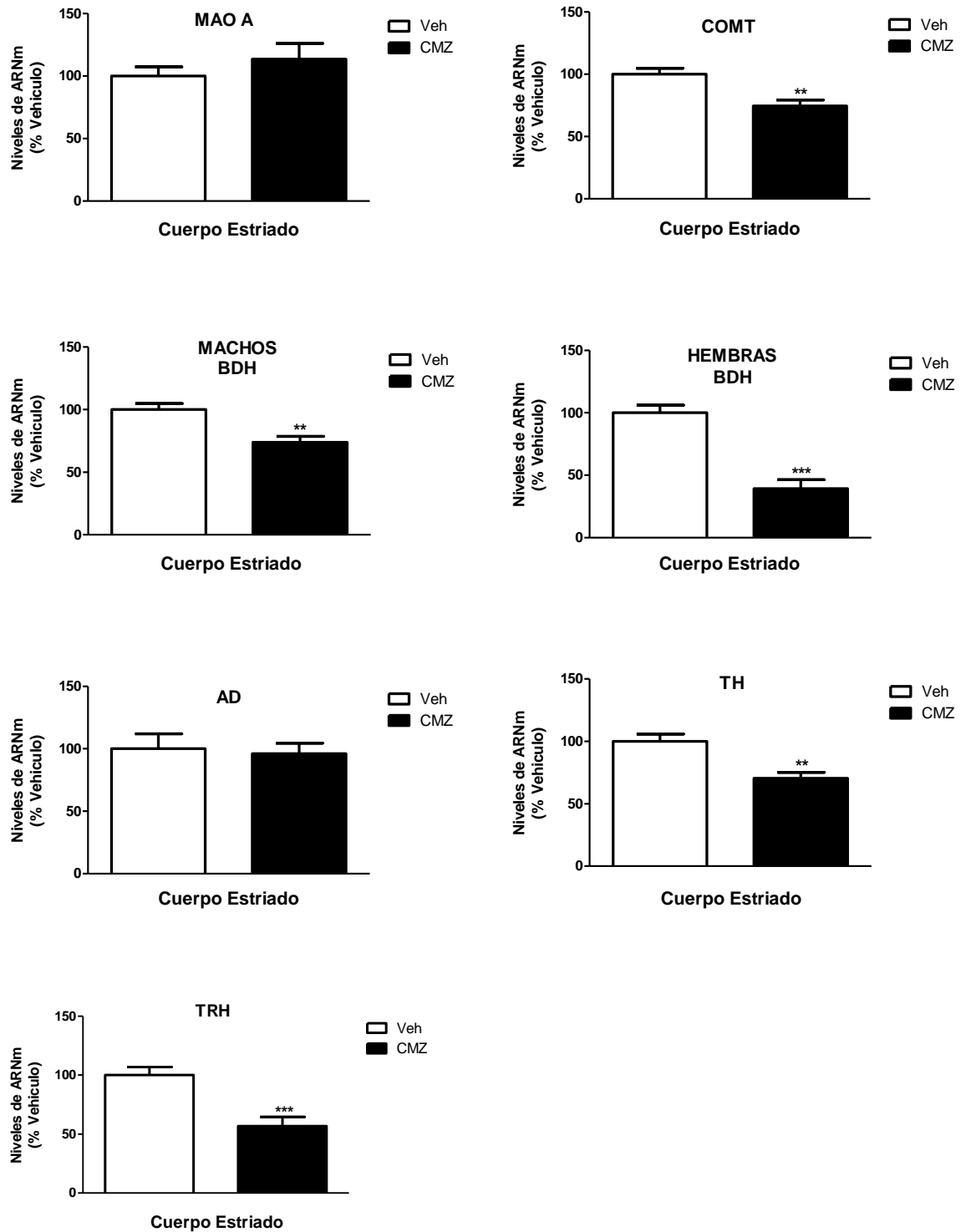
**Tabla 64.** Valores del índice de calidad (RIN) del ARN extraído de las regiones hipocampo, corteza frontal y cuerpo estriado de ratas macho y hembra de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con vehículo y con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.

<b>HIPOCAMPO</b>				
<b>Número de animal</b>	<b>Grupo Control Machos</b>	<b>Grupo Tratado Machos</b>	<b>Grupo Control Hembras</b>	<b>Grupo Tratado Hembras</b>
<b>1</b>	8,1	8,3	8,5	8,8
<b>2</b>	8,9	8,2	7,8	8,3
<b>3</b>	7,8	8,9	8,9	8,9
<b>4</b>	9,1	7,9	9,6	7,9
<b>5</b>	9,2	9,3	9,1	9,4
<b>6</b>	8,2	8,7	8,4	9,3
<b>CORTEZA FRONTAL</b>				
<b>Número de animal</b>	<b>Grupo Control Machos</b>	<b>Grupo Tratado Machos</b>	<b>Grupo Control Hembras</b>	<b>Grupo Tratado Hembras</b>
<b>1</b>	7,9	8,4	9,3	8,5
<b>2</b>	7,8	7,9	8,4	8,3
<b>3</b>	9,5	8,9	8,2	9,3
<b>4</b>	9,8	9,2	8,7	7,5
<b>5</b>	9,7	8,3	8,9	9,4
<b>6</b>	7,9	8,8	7,7	8,7
<b>CUERPO ESTRIADO</b>				
<b>Número de animal</b>	<b>Grupo Control Machos</b>	<b>Grupo Tratado Machos</b>	<b>Grupo Control Hembras</b>	<b>Grupo Tratado Hembras</b>
<b>1</b>	8,5	8,4	9,5	7,9
<b>2</b>	7,8	9,4	9,1	8,8
<b>3</b>	8,2	8,2	7,8	9,1
<b>4</b>	7,9	8,6	8,9	9,6
<b>5</b>	8,8	9,3	9,1	8,7
<b>6</b>	9,4	7,9	8,3	8,5

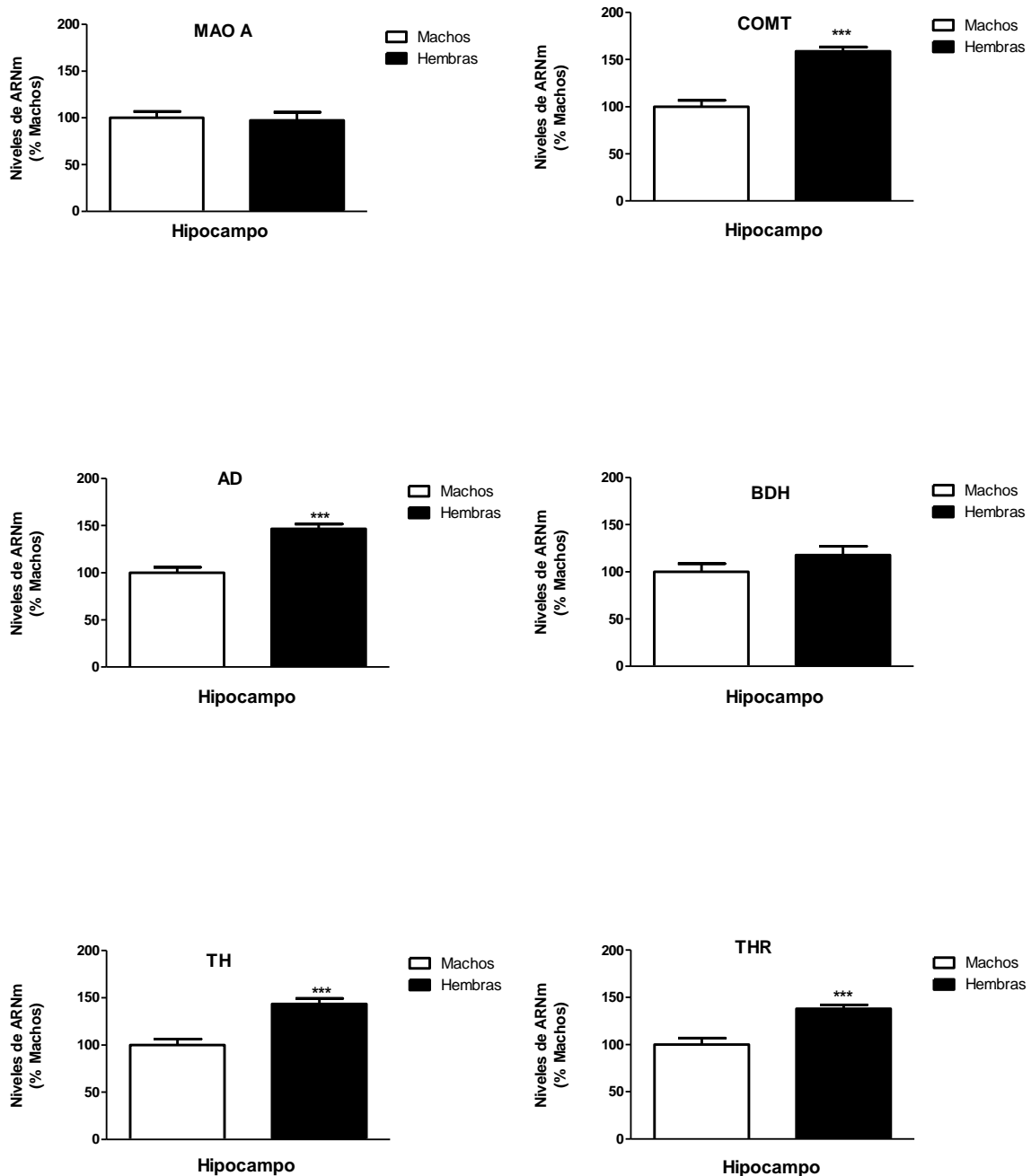
**Figura 27.** Diferencias en los niveles de ARN (% machos) de las enzimas MAOA, COMT, BDH, AD, TH y TRH en la región del cuerpo estriado entre ratas macho y hembra de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.



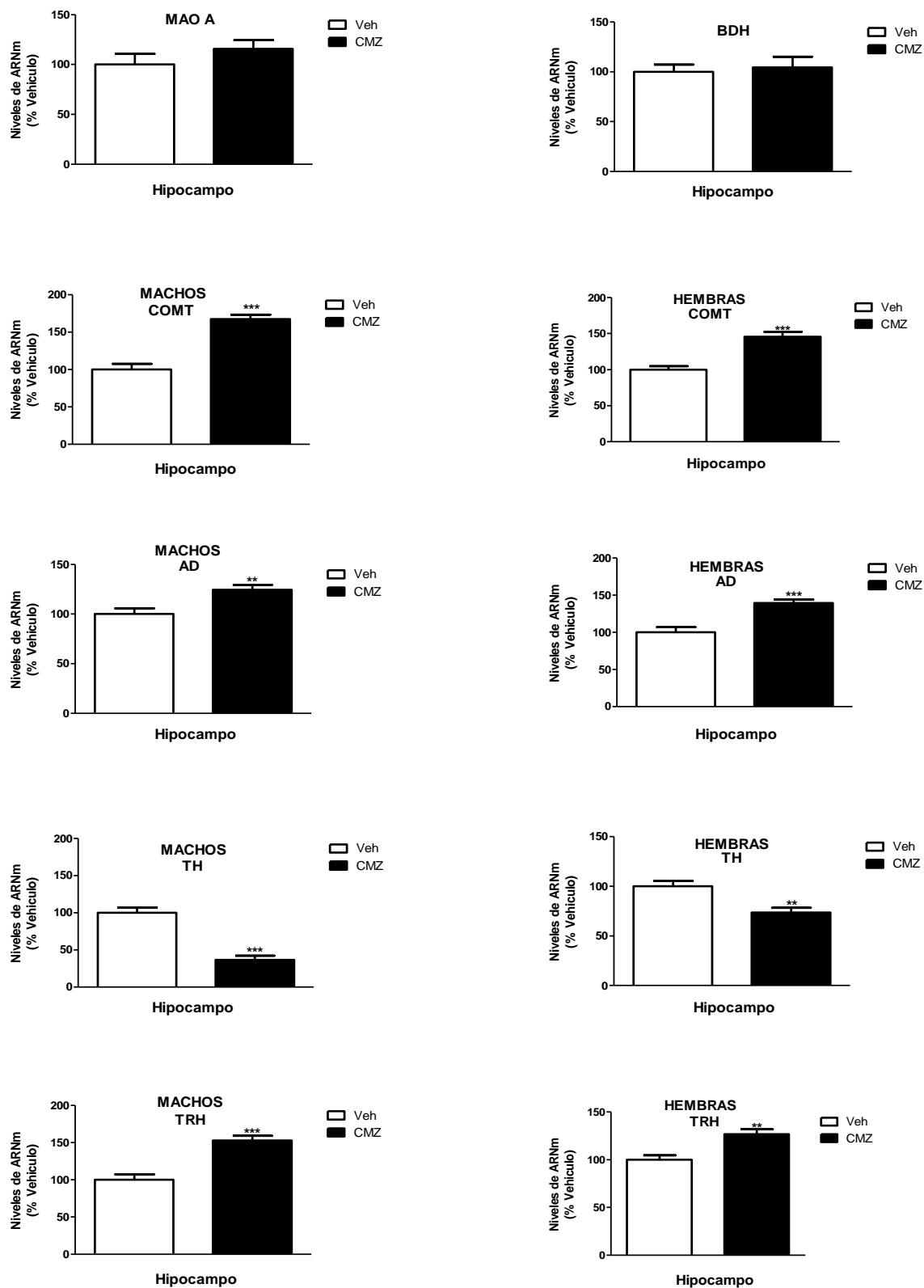
**Figura 28.** Niveles de ARN (% vehículo) de las enzimas MAOA, COMT, BDH, AD, TH y TRH en la región del cuerpo estriado en ratas de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con vehículo o clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.



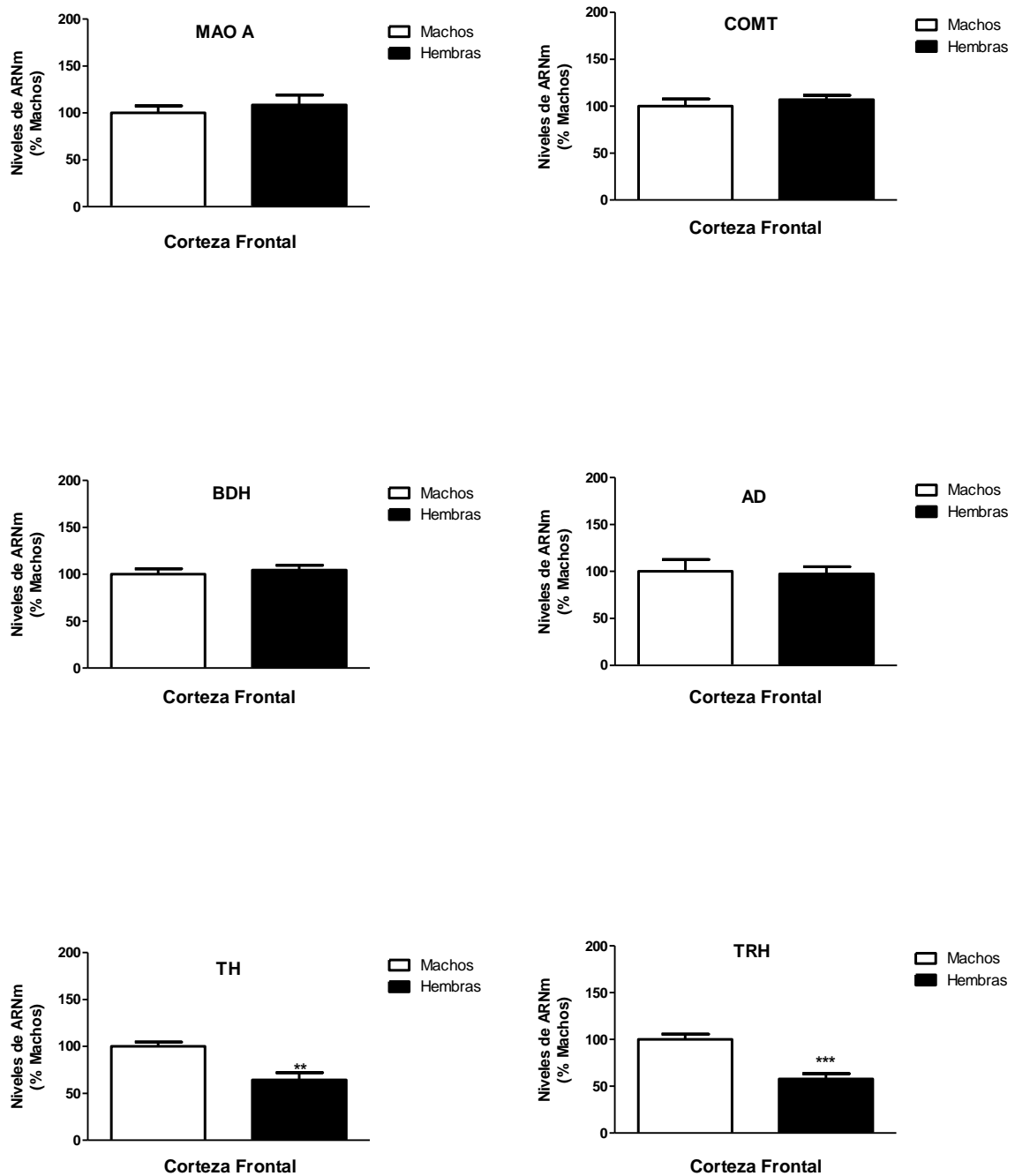
**Figura 29.** Diferencias en los niveles de ARN (% machos) de las enzimas MAOA, COMT, BDH, AD, TH y TRH en la región del hipocampo entre ratas macho y hembra de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.



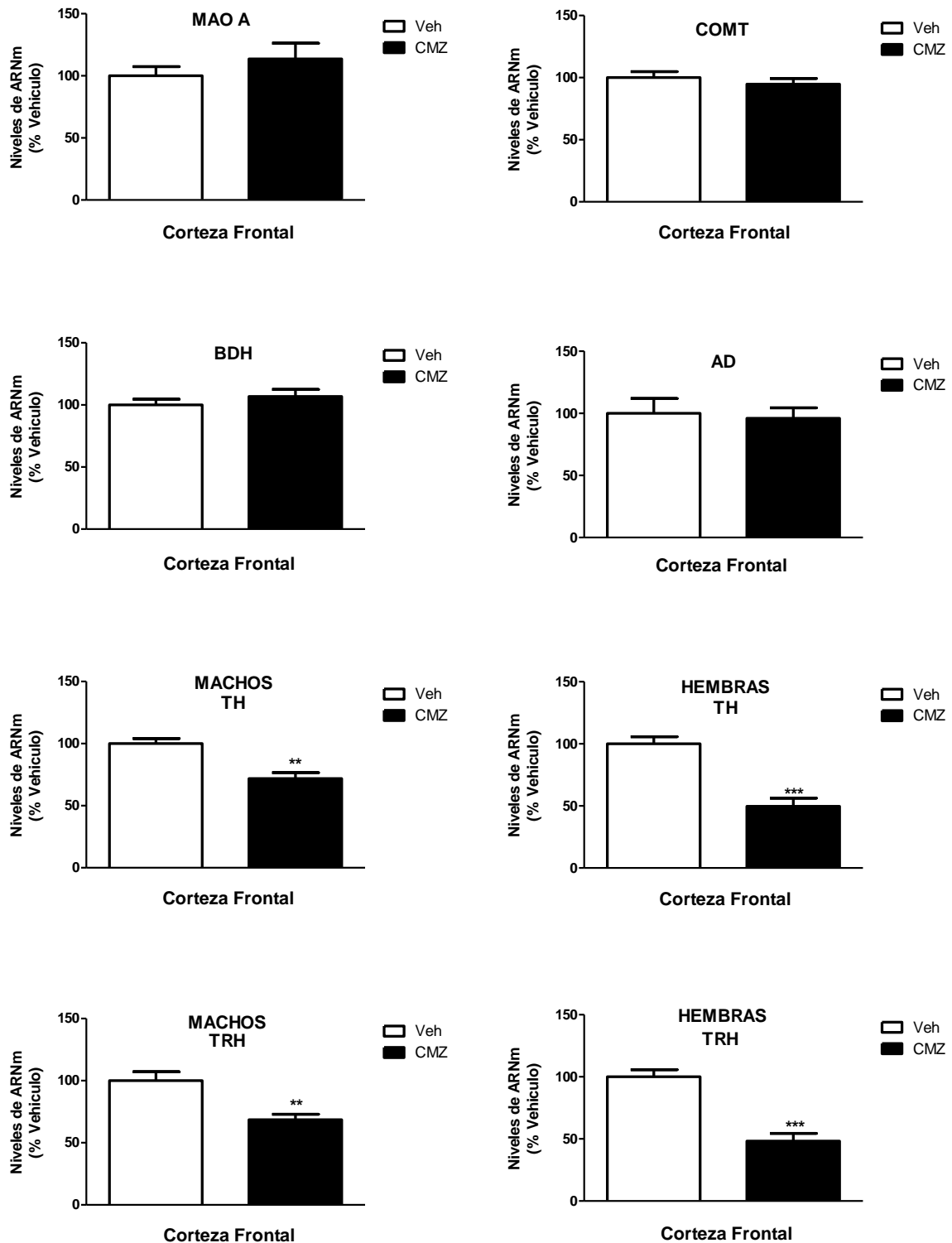
**Figura 30.** Niveles de ARN (% vehículo) de las enzimas MAOA, COMT, BDH, AD, TH y TRH en la región del hipocampo en ratas de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con vehículo o clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.



**Figura 31.** Diferencias en los niveles de ARN (% machos) de las enzimas MAOA, COMT, BDH, AD, TH y TRH en la región de la corteza frontal entre ratas macho y hembra de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.



**Figura 32.** Niveles de ARN (% vehículo) de las enzimas MAOA, COMT, BDH, AD, TH y TRH en la región de la corteza frontal en ratas de 60 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con vehículo o clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.



## **5.2. EFECTO DEL CLODIMEFORMO EN RATAS DE 11 DIAS NACIDAS DE MADRES TRATADAS CON CLODIMEFORMO DURANTE EL PERIODO DE LA PREÑEZ Y LA LACTANCIA.**

### **5.2.1. Efecto del clodimeformo sobre el contenido de testosterona y estradiol en el SNC**

El tratamiento con clodimeformo por vía oral a ratas madre durante el periodo de gestación desde el día 6 al día 21 y durante la lactancia desde el día 1 al día 10 afectó al contenido de T y E2 en las regiones de corteza frontal, cuerpo estriado e hipocampo de las ratas descendientes a la edad de 11 días. El contenido de T (ng/g de tejido) en las regiones de hipocampo, corteza frontal y cuerpo estriado en el grupo control y del grupo tratado se presenta en las tablas 59, 60 y 61. El contenido de E2 (ng/g de tejido) en las regiones de hipocampo, corteza frontal y cuerpo estriado del grupo control y de los grupos tratados se presenta en las tablas 62, 63 y 64.

Los resultados expresados en las tablas 59, 60, 61, 62, 63 y 64 demuestran que:

En las ratas de 11 días de edad nacidas de ratas madre tratadas durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días de lactancia 1 a 10 se produjo una pérdida estadísticamente significativa del contenido de E2 en el cuerpo estriado y corteza frontal, así como un incremento en el hipocampo respecto a los animales control. También se produjo una disminución del contenido de T en el hipocampo, corteza frontal y cuerpo estriado respecto a los animales control. En el hipocampo el incremento en el contenido de E2 fue de un 39,08% ( $P < 0,001$ ) y de un 68,13% ( $P < 0,001$ ) en machos y hembras respectivamente y el descenso del contenido de T fue de un 16,97% ( $P < 0,001$ ) y 22,97% ( $P < 0,001$ ) en machos y hembras respectivamente (Figura 33). En la corteza frontal la pérdida en el contenido de E2 fue de un

46,53% ( $P<0,01$ ) y de un 57,39% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente, la pérdida en el contenido de T fue de un 13,44% ( $P<0,001$ ) y de un 20,70% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente (figura 34). En el hipocampo la pérdida en el contenido de E2 fue de un 48,01% ( $P<0,001$ ) y de un 58,95% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente, el descenso en el contenido de T fue de un 17,71% ( $P<0,001$ ) y de un 28,50% ( $P<0,001$ ) en machos y hembras respectivamente (Figura 35). Se observó una interacción por sexo con el tratamiento en el contenido de T y E2, en las estructuras del hipocampo, corteza frontal y cuerpo estriado (Figura 36).

**Tabla 59.** Contenido de T (pg/ml) en la región del hipocampo aislada de ratas de 11 días de edad, machos y hembras nacidos de hembras tratadas oralmente con vehículo y con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.

<b>HIPOCAMPO</b>				
<b>Número de animal</b>	<b>Grupo Control Machos</b>	<b>Grupo Tratado Machos</b>	<b>Grupo Control Hembras</b>	<b>Grupo Tratado Hembras</b>
<b>1</b>	301,43	253,57	305,87	232,65
<b>2</b>	296,87	256,18	298,76	231,67
<b>3</b>	309,65	254,84	296,16	226,86
<b>4</b>	295,96	248,76	302,87	229,76
<b>5</b>	310,65	247,87	294,76	228,87
<b>6</b>	304,74	249,36	301,76	236,81
<b>Media ± ESM</b>	<b>303,22±2,55***</b>	<b>251,76±1,44*** (-16,97)</b>	<b>300,03±1,73***</b>	<b>231,10±1,41*** (-22,97)</b>

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (disminución) en porcentaje, con respecto al grupo control.

Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  y \*\*\* $P<0,001$ .

**Tabla 60.** Contenido de T (pg/ml) en la región de la corteza frontal aislada de ratas de 11 días de edad, machos y hembras nacidos de hembras tratadas oralmente con vehículo y con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.

<b>CORTEZA FRONTAL</b>				
<b>Número de animal</b>	<b>Grupo Control Machos</b>	<b>Grupo Tratado Machos</b>	<b>Grupo Control Hembras</b>	<b>Grupo Tratado Hembras</b>
<b>1</b>	397,56	344,56	403,76	310,56
<b>2</b>	401,45	348,62	395,91	321,65
<b>3</b>	385,87	341,67	387,76	306,75
<b>4</b>	396,74	338,59	389,56	311,39
<b>5</b>	399,50	331,99	408,75	318,95
<b>6</b>	388,71	345,81	401,64	323,84
<b>Media ± ESM</b>	<b>394,97±2,54***</b>	<b>341,87±2,43*** (-13,44%)</b>	<b>397,90±3,38***</b>	<b>315,52±2,81*** (-20,70)</b>

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (disminución) en porcentaje, con respecto al grupo control.

Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  y \*\*\* $P<0,001$ .

**Tabla 61.** Contenido de T (pg/ml) en la región del cuerpo estriado aislada de ratas de 11 días de edad, machos y hembras nacidos de hembras tratadas oralmente con vehículo y con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.

<b>CUERPO ESTRIADO</b>				
<b>Número de animal</b>	<b>Grupo Control Machos</b>	<b>Grupo Tratado Machos</b>	<b>Grupo Control Hembras</b>	<b>Grupo Tratado Hembras</b>
<b>1</b>	201,87	164,87	213,69	152,84
<b>2</b>	210,55	175,98	206,77	143,98
<b>3</b>	209,70	172,79	209,31	156,42
<b>4</b>	213,73	178,56	201,71	147,33
<b>5</b>	205,96	169,45	216,76	149,87
<b>6</b>	215,91	173,28	206,68	146,87
<b>Media ± ESM</b>	<b>209,62±1,88***</b>	<b>172,49±1,97*** (-17,71%)</b>	<b>209,15±2,20***</b>	<b>149,55±1,84*** (-28,50%)</b>

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (disminución) en porcentaje, con respecto al grupo control.

Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  y \*\*\* $P<0,001$ .

**Tabla 62.** Contenido de E2 (pg/ml) en la región del hipocampo aislado de ratas de 11 días de edad, machos y hembras nacidos de hembras tratadas oralmente con vehículo y con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.

<b>HIPOCAMPO</b>				
<b>Número de animal</b>	<b>Grupo Control Machos</b>	<b>Grupo Tratado Machos</b>	<b>Grupo Control Hembras</b>	<b>Grupo Tratado Hembras</b>
<b>1</b>	83,40	132,34	75,67	124,76
<b>2</b>	93,43	125,45	83,31	128,74
<b>3</b>	101,34	136,26	77,51	135,82
<b>4</b>	92,61	129,71	81,75	132,87
<b>5</b>	103,41	132,45	73,93	137,75
<b>6</b>	96,45	137,43	78,54	131,78
<b>Media ± ESM</b>	<b>95,10±2,92***</b>	<b>132,27±1,79*** (39,08%)</b>	<b>78,45±1,46***</b>	<b>131,9±1,93*** (68,13%)</b>

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (disminución) en porcentaje, con respecto al grupo control.

Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  y \*\*\* $P<0,001$ .

**Tabla 63.** Contenido de E2 (pg/ml) en la región de la corteza frontal aislada de ratas de 11 días de edad, machos y hembras nacidos de hembras tratadas oralmente con vehículo y con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.

<b>CORTEZA FRONTAL</b>				
<b>Número de animal</b>	<b>Grupo Control Machos</b>	<b>Grupo Tratado Machos</b>	<b>Grupo Control Hembras</b>	<b>Grupo Tratado Hembras</b>
<b>1</b>	132,56	73,98	128,65	55,44
<b>2</b>	133,65	69,44	125,74	51,76
<b>3</b>	136,59	64,32	131,78	48,87
<b>4</b>	129,54	75,93	129,75	60,76
<b>5</b>	128,65	72,59	134,87	57,53
<b>6</b>	131,72	67,62	126,64	56,89
<b>Media ± ESM</b>	<b>132,12±1,17***</b>	<b>70,65±1,76*** (-46,53%)</b>	<b>129,57±1,38***</b>	<b>55,21 ±1,74*** (-57,39%)</b>

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (disminución) en porcentaje, con respecto al grupo control.

Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  y \*\*\* $P<0,001$ .

**Tabla 64.** Contenido de E2 (pg/ml) en la región del cuerpo estriado aislado de ratas de 11 días de edad, machos y hembras nacidos de hembras tratadas oralmente con vehículo y con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.

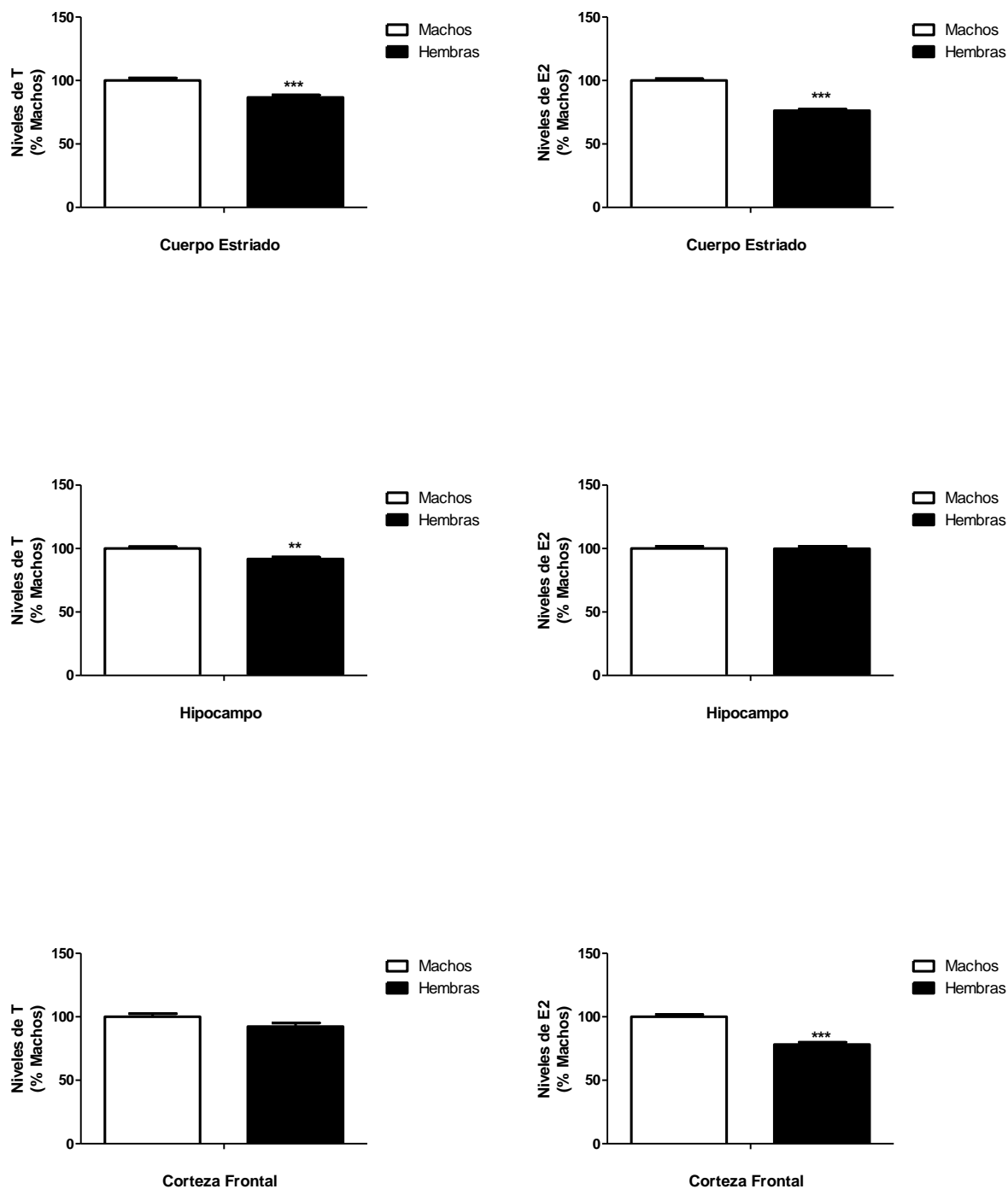
<b>CUERPO ESTRIADO</b>				
<b>Número de animal</b>	<b>Grupo Control Machos</b>	<b>Grupo Tratado Machos</b>	<b>Grupo Control Hembras</b>	<b>Grupo Tratado Hembras</b>
<b>1</b>	67,84	36,87	60,76	21,87
<b>2</b>	64,88	38,33	68,94	24,81
<b>3</b>	59,98	29,76	59,64	27,98
<b>4</b>	63,85	35,91	68,64	30,34
<b>5</b>	68,98	31,94	63,81	26,95
<b>6</b>	73,29	34,55	62,76	25,93
<b>Media ± ESM</b>	<b>66,47±1,88***</b>	<b>34,56±1,30*** (-48,01%)</b>	<b>64,09±1,60***</b>	<b>26,31±1,18*** (-58,95%)</b>

Valor medio ± ESM (n=6).

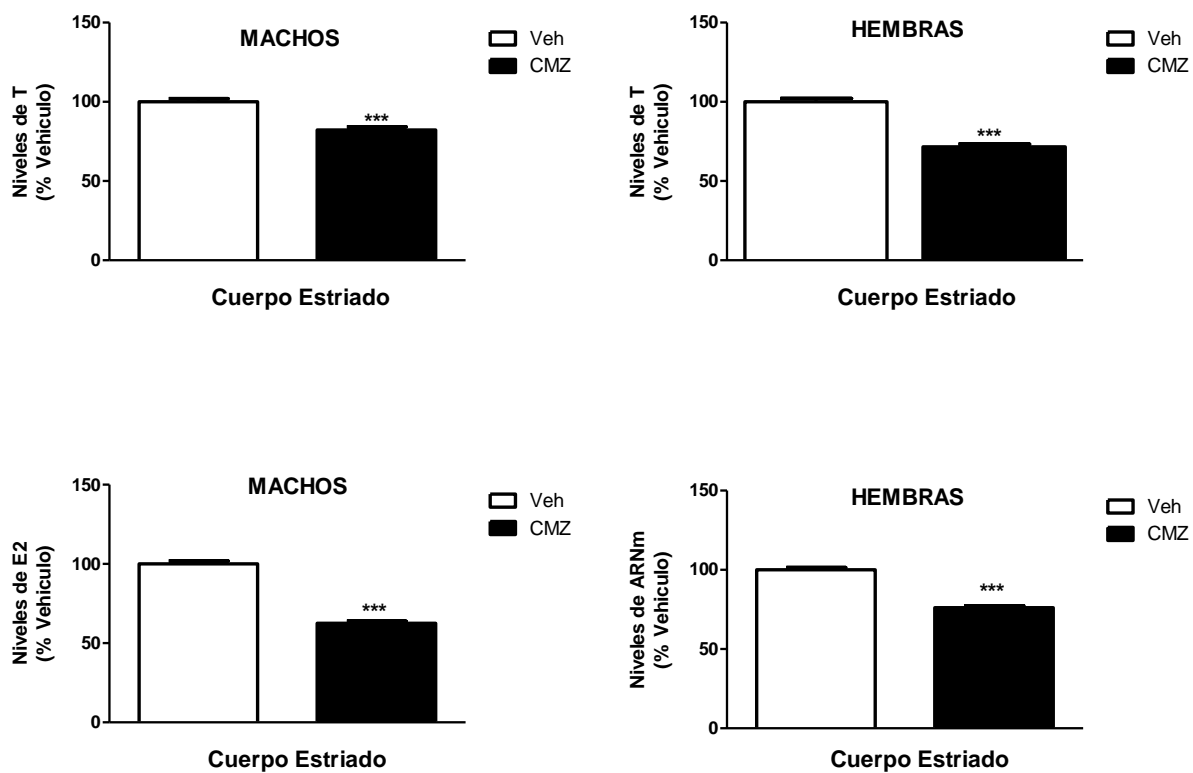
Entre paréntesis se indica la diferencia (disminución) en porcentaje, con respecto al grupo control.

Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  y \*\*\* $P < 0,001$ .

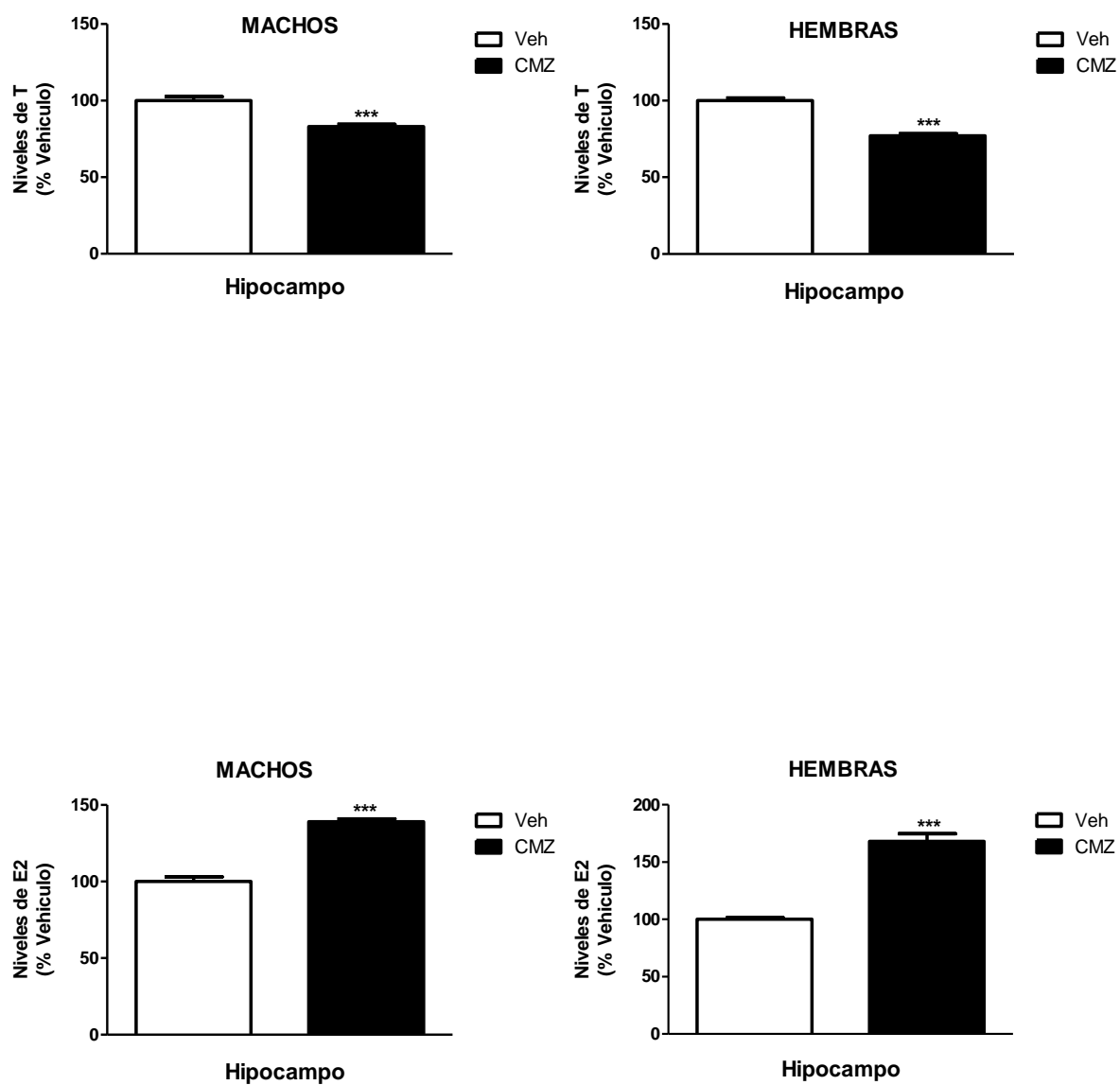
**Figura 33.** Diferencias en los niveles de T y E2 (pg/ml) en las regiones del hipocampo, corteza frontal y cuerpo estriado entre ratas macho y hembra de 11 días de edad nacidas de hembras tratadas oralmente con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.



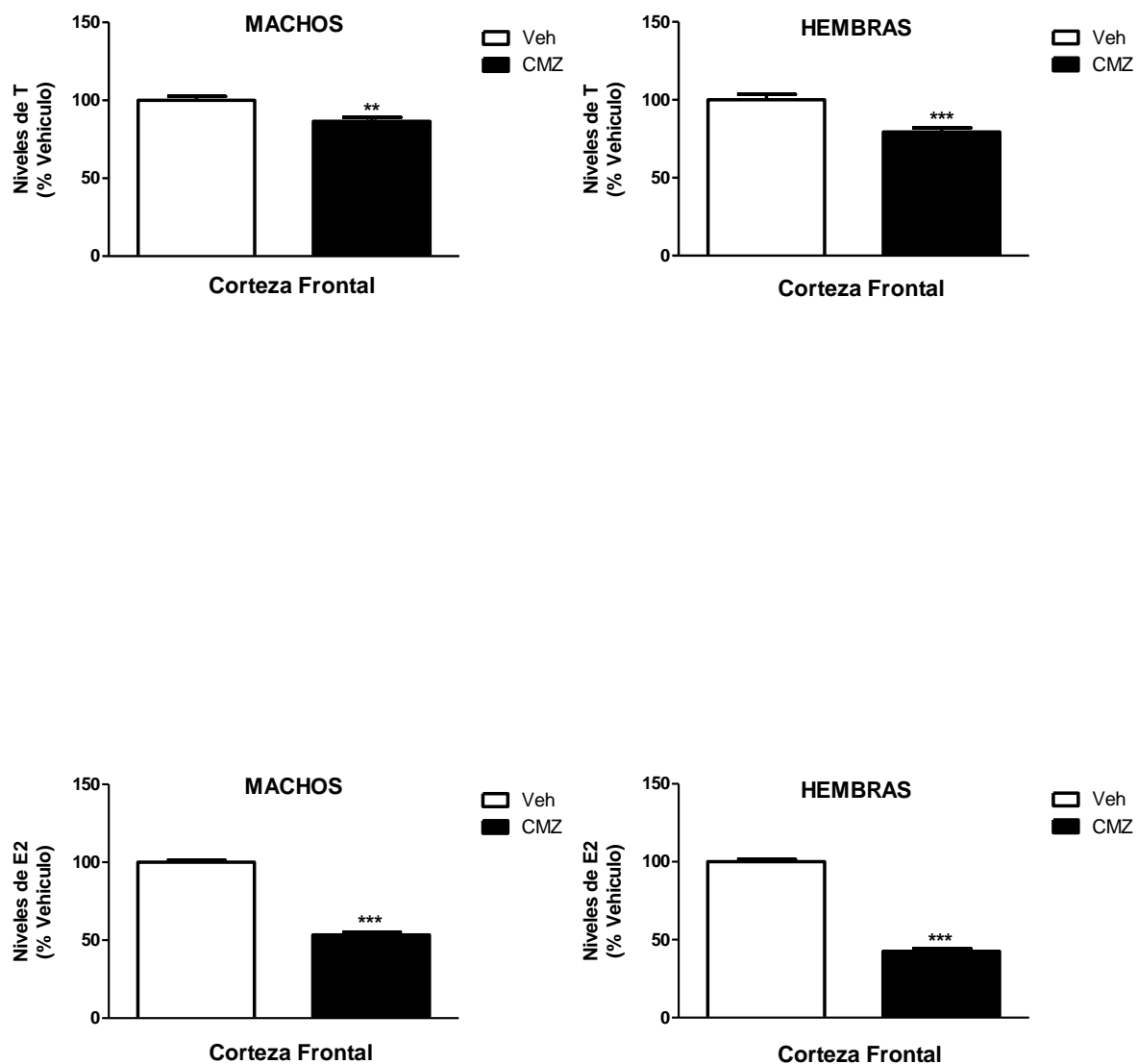
**Figura 34.** Niveles de T y E2 (pg/ml) en la región del cuerpo estriado aislado de ratas de 11 días de edad, machos y hembras nacidos de hembras tratadas oralmente con vehículo y con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.



**Figura 35.** Niveles de T y E2 (pg/ml) en la región del hipocampo aislado de ratas de 11 días de edad, machos y hembras nacidos de hembras tratadas oralmente con vehículo y con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.



**Figura 36.** Niveles de T y E2 (pg/ml) en la región de la corteza frontal aislada de ratas de 11 días de edad, machos y hembras nacidos de hembras tratadas oralmente con vehículo y con clodimeformo, durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia.



## **DISCUSION DE LOS RESULTADOS**

## **6. DISCUSION**

Uno de los principales problemas que ha llevado al interés por conocer los posibles efectos neurotóxicos de las distintas sustancias químicas comercializadas y de uso diverso es la complejidad del sistema nervioso y la poca capacidad de reparación, una vez que se ha producido el efecto. La elevada complejidad del sistema nervioso se debe a que las distintas regiones están relacionadas entre sí de forma anatómica y funcional, de manera que los efectos en una zona se pueden manifestar en distintas partes del sistema nervioso (TOGA, 1997).

El clodimeformo es un plaguicida del grupo de las formamidinas que presenta elevada actividad frente a ácaros y garrapatas, pero que actualmente no se comercializa, debido a la observación de la relación entre la exposición a este plaguicida y la presencia de efectos carcinógenos (JMPR, 1989). Se conoce desde hace tiempo que este plaguicida presenta efectos neurotóxicos (MOSER y MACPHAIL, 1986, 1989; MOSER *et al.*, 1987; BOYES y MOSER, 1987, 1988; BOYES y DYER, 1984; PFISTER y YIM, 1977; GILBERT, 1988; GILBERT y DYER, 1988; HSU y KAKUK, 1984), pero nada se conoce sobre sus posibles efectos neurotóxicos en el desarrollo, efectos que se han descrito en otro plaguicida de la misma familia, el amitraz, y que presenta efectos similares al clodimeformo (DEL PINO *et al.*, 2011). El presente estudio ha investigado los efectos potenciales del pesticida clodimeformo sobre los niveles de catecolaminas y de ARNm de las enzimas MAOA, COMT, AD, BDH, TH y TRH en el SNC en ratas de 60 días de edad nacidas de ratas madre expuestas oralmente a clodimeformo durante el periodo de la preñez y durante la lactancia, así como sobre los niveles de T y E2 en las regiones cerebrales afectadas por el clodimeformo de ratas de 11 días de edad nacidas de ratas madre expuestas oralmente a clodimeformo durante el periodo de la preñez y durante la lactancia, con el fin de poder determinar el mecanismo

por el cual se producen las posibles alteraciones en el desarrollo de los sistemas de neurotransmisores monoaminérgicos por exposición a formamidas.

La neurotoxicidad en el desarrollo relaciona alteraciones en el comportamiento, neuroquímicas y morfológicas en el SNC sucedidas en los animales nacidos como resultado de la exposición a sustancias químicas de la madre durante la gestación y/o durante la lactancia (LAZARINI *et al.*, 2001). El SNC durante su desarrollo es especialmente susceptible a los efectos tóxicos de xenobióticos (SPYKER, 1975; STANTON y SPEAR, 1990, WINNEKE, 1992). La exposición materna a muchos xenobióticos durante la gestación y/o la lactancia puede causar neurotoxicidad en el desarrollo y/o cambios en el comportamiento en los animales nacidos, que podrían persistir a través de la vida del animal (CASTRO y PALERMO-NETO, 1988; CASTRO *et al.*, 1989).

En el presente estudio se ha evaluado la exposición prenatal y posnatal (gestación y lactación) a través de las ratas madre a clodimeformo, estudiando el efecto potencial sobre los niveles de los neurotransmisores serotonina, dopamina y noradrenalina en las ratas nacidas a los 60 días de edad. El presente trabajo demuestra que la exposición a clodimeformo (5 mg/kg/día) durante la preñez y la lactación de las ratas madre conduce a alteraciones del sistema serotoninérgico, dopaminérgico y noradrenérgico de forma sexo y región dependiente en los animales nacidos y transcurridos 60 días después del nacimiento, es decir a los 60 días de edad. El clodimeformo afectó al contenido de 5-HT, DA y NA solamente en las regiones de la corteza frontal, hipocampo y cuerpo estriado, mostrando una interacción por sexo para la 5-HT y DA en el hipocampo y corteza frontal y para la NA en el cuerpo estriado y corteza frontal. Los efectos observados en nuestro estudio incluyen una disminución significativa de los niveles de serotonina y noradrenalina en las regiones cerebrales corteza frontal y cuerpo

estriado, así como también una disminución significativa de los niveles de dopamina en las regiones cerebrales hipocampo, corteza frontal y cuerpo estriado.

Con respecto a los metabolitos, la exposición al clodimeformo originó un aumento significativo del metabolito de serotonina, el 5-HIAA, en hipocampo y un descenso en corteza frontal y cuerpo estriado. Con respecto al sistema noradrenérgico, la exposición al clodimeformo originó un descenso en el metabolito MHPG en corteza frontal y cuerpo estriado. También se reflejó en el sistema dopaminérgico un aumento estadísticamente significativo en el contenido de los metabolitos DOPAC y HVA en hipocampo y un aumento del contenido de DOPAC así como una disminución del contenido de HVA en el cuerpo estriado, pero por el contrario se observó un descenso en el contenido de estos dos metabolitos de la dopamina en la región cerebral corteza frontal.

Por otra parte, el tratamiento con clodimeformo por vía oral a ratas madre durante el periodo de gestación desde el día 6 al día 21 y durante la lactancia desde el día 1 al día 10 afectó al contenido de T y E2 en las regiones de corteza frontal, cuerpo estriado e hipocampo de las ratas descendientes a la edad de 11 días. Los efectos observados por la exposición al clodimeformo fueron de un descenso estadísticamente significativo del contenido de E2 en el cuerpo estriado y corteza frontal, así como un incremento en el hipocampo respecto a los animales control. También se produjo una disminución del contenido de T en el hipocampo, corteza frontal y cuerpo estriado respecto a los animales control. Además se observó una interacción por sexo con tratamiento en el contenido de T y E2 en las estructuras del hipocampo, corteza frontal y cuerpo estriado.

Por último, el tratamiento con clodimeformo por vía oral a ratas madre durante el

periodo de gestación desde el día 6 al día 21 y durante la lactancia desde el día 1 al día 10, afectó a la expresión génica de las enzimas COMT, TH y TRH en la región del cuerpo estriado y del hipocampo y también alteró la expresión de la enzima AD en el hipocampo y de la enzima BDH en la región del cuerpo estriado de las ratas descendientes a la edad de 60 días. Además, el tratamiento con clodimeformo produjo interacción por sexo en la expresión génica de la enzima BDH en la corteza frontal, de las enzimas COMT, AD, TH y TRH en el hipocampo y de las enzimas TH y TRH en la corteza frontal. Los efectos observados por la exposición al clodimeformo fueron de una disminución en la expresión de las enzimas COMT, BDH, TH y TRH en el cuerpo estriado así como de la enzima TH en el hipocampo respecto a los animales control. También se produjo un aumento de la expresión de las enzimas COMT, AD y TRH en el hipocampo y de las enzimas TH y TRH en la corteza frontal respecto a los animales control. En la corteza frontal el tratamiento con clodimeformo no alteró la expresión de las enzimas MAOA, COMT, AD, BDH, TH y TRH. Los efectos observados sobre las diferencias por sexo en la expresión génica demuestran que las ratas presentaron una mayor expresión de la enzima BDH en las hembras que en los machos en el cuerpo estriado, así como también de la expresión de las enzimas COMT, AD, TH y TRH en las hembras que en los machos en el hipocampo. En la corteza frontal por el contrario hubo una mayor expresión de las enzimas TH y TRH en los machos que en las hembras.

Teniendo en cuenta que las regiones cerebrales afectadas en nuestro estudio por clodimeformo (corteza frontal, cuerpo estriado, e hipocampo), fueron las mismas que las afectadas por el amitraz (DEL PINO *et al.*, 2011) se puede afirmar que el mecanismo por el cual las formamidinas alteran el desarrollo del SNC es similar. Por otra parte, al ser estructuras importantes en el control de los procesos de aprendizaje y memoria (ROLLS, 1994; KIM *et al.*, 1995; PRADO-ALCALA, 1995; RIDLEY *et al.*, 1996; BURGESS *et al.*,

2002; COMPTON, 2004; DUNNET *et al.*, 2005; BERRY *et al.*, 1994; CRUSIO y SCHWEGLER, 2005; LAPIZ y MORILAK, 2006; BANDYOPADHYAY y HABLITZ, 2007; CIFARIELLO *et al.*, 2007; SHAPOVALOVA y KAMKINA, 2008; OLVERA-CORTÉS *et al.*, 2008; WISMAN *et al.*, 2008) se podría considerar que estos procesos se podrían ver comprometidos por la exposición durante la gestación y la lactancia a las formamidinas.

Estos resultados pueden deberse a una acción de inhibición de la MAO (BENEZET y KNOWLES, 1976; BERRY *et al.*, 1994) y como consecuencia de la hiperestimulación catecolaminérgica como se ha sugerido para efectos similares por exposición al amitraz durante la gestación y la lactancia (DEL PINO *et al.*, 2011). Se han realizado estudios en ratas sobre los efectos de la exposición gestacional a inhibidores de la MAO, sobre la densidad de la inervación de serotonina y dopamina (WHITAKER-AZMITIA *et al.*, 1994). La administración de clorgilina y deprenilo durante la gestación así como también diversos días tras el nacimiento, originan en las ratas nacidas, a los 30 días después del nacimiento, alteraciones en el comportamiento así como una reducción significativa de la inervación de serotonina en corteza frontal, sin observarse cambios en el sistema dopaminérgico (WHITAKER-AZMITIA *et al.*, 1994). Es claro que los neurotransmisores monoaminérgicos son importantes en el desarrollo del cerebro inmaduro de mamíferos, antes de asumir su propio papel como neurotransmisores (HERLENIUS y LAGERCRANTZ, 2004). Dado que los niveles endógenos de estos transmisores son regulados altamente por la MAOA, cualquier cambio en esta enzima puede afectar profundamente al desarrollo del cerebro y por ello es propio que el tratamiento con clodimeformo incluso a dosis bajas a través de la gestación y lactación pueda afectar al desarrollo de los sistemas serotoninérgico, dopaminérgico y noradrenérgico originando una disfunción persistente en los animales, incluso hasta su

periodo adulto, mecanismo que podría ser la causa del efecto observado en nuestro estudio en los animales a los 60 días de edad. Sin embargo, a pesar de que el clodimeformo es un inhibidor de la MAO A y B relativamente débil (NEUMANN y VOSS, 1977; ROBINSON y SMITH, 1977; HOLLINGWORTH *et al.*, 1979), se ha descrito que altera significativamente los niveles de neurotransmisores monoaminérgicos en el cerebro y el plasma de ratas (MAITRE *et al.*, 1978; BENEZET *et al.*, 1978; BAILEY *et al.*, 1982) lo que sugiere que la inhibición de la MAO no es el mecanismo principal por el cual produce sus efectos. Por tanto, otros posibles mecanismos de los efectos observados podrían ser una acción directa del clodimeformo sobre la replicación celular neuronal, diferenciación, axonogénesis y sinaptogénesis y al desarrollo funcional de los sistemas de neurotransmisores, efectos que bien podrían culminar en las alteraciones del comportamiento observadas en ciertos pesticidas organofosforados (BARONE *et al.*, 2000; CASIDA y QUISTAD, 2004; GUPTA, 2004; POPE, 1999; QIAO *et al.*, 2002, 2003; YANAI *et al.*, 2002). De hecho, se han observado alteraciones a largo plazo tras la exposición fetal y/o neonatal a clorpirifos, confinadas a una amplia variedad de neurotransmisores y notablemente a la serotonina (ALDRIDGE *et al.*, 2003, 2004; DAM *et al.*, 1999a,b; RAINES *et al.*, 2001; SLOTKIN, 1999, 2004; SLOTKIN *et al.*, 2002). Estos efectos también pueden deberse a una alteración en la expresión modulada por hormonas sexuales esteroideas de las enzimas TH, BDH, TRH, MAOA, COMT y AD. Nuestros resultados han mostrado que el clodimeformo altera los niveles de E2 y T en las regiones afectadas durante el día 11 posnatal que es cuando se produce un pico de secreción de testosterona gonadal y se produce una alteración a largo plazo en los niveles de ARNm de estas enzimas que catalizan la síntesis y metabolismo de los neurotransmisores monoaminérgicos. La testosterona en el SNC puede ser metabolizada por la aromatasa para formar estradiol o por la reductasa para formar dihidrotestosterona (DHT) dependiendo de la región (CASTELLI *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2008), por esta razón, el efecto final de la

contribución de la testosterona podría no ser mediado sólo por la testosterona, sino también por el estradiol o la DHT. Por otro lado, además de la contribución de las hormonas sexuales gonadales también hay una síntesis endógena en el SNC de estradiol y testosterona cuya contribución en el efecto final depende de la región y de la hormona sexual esteroidea (HOJO *et al.*, 2009; ROBEL *et al.*, 1987; ZWAIN y, YEN, 1999a y b). El estradiol ejerce su efecto sobre los sistemas monoaminérgicos a través de múltiples mecanismos de regulación. Por ejemplo el E2 altera los niveles de las enzimas que sintetizan DA, NA y 5-HT, así como aquellos que degradan estos neurotransmisores (DONNER *et al.*, 2009; SEROVA *et al.*, 2002;. LUINE *et al.*, 1973; LUINE y RHODES, 1983; SCARDAPANE y CARDINALI, 1977). El estradiol también regula los niveles de transportadores de monoaminas y de los receptores de la recaptación de serotonina (SAUX *et al.*, 2006; ÖSTERLUND *et al.*, 2000; SUMNER *et al.*, 1999; McQUEEN *et al.*, 1997; BIEGON *et al.*, 1983), y el acoplamiento de receptores para sistemas de segundos mensajeros intracelulares (MIZE y ALPER, 2002, MIZE *et al.*, 2001). La administración intravenosa de estradiol eleva los niveles de ARNm de la tirosina hidroxilasa (TH), que es la principal enzima limitante de la velocidad de biosíntesis de catecolaminas, en el locus coeruleus (LC) y el núcleo del tracto solitario (NTS) de ratas hembra ovariectomizadas (OVX) (LUINE *et al.*, 1998; SEROVA *et al.*, 2002, 2004). DONNER y HANDA, (2009) mostraron que el E2 incrementa significativamente la expresión de TRH-2 en los núcleos del rafe dorsal. La testosterona y la DHT también regulan la síntesis y el metabolismo de las monoaminas. PURVES-TYSON *et al.*, (2012) describieron que los andrógenos (T y DHT) aumentan los niveles de proteínas, de TH y aumentan los niveles de ARNm de las enzimas COMT, MAO A y MAO B en la sustancia negra de ratas macho puberales. Los esteroides androgénicos anabólicos aumentan el metabolismo dopaminérgico y serotoninérgico en el cerebro de rata macho (THIBLIN *et al.*, 1999). El tratamiento de animales gonadectomizados con propionato de dihidrotestosterona inhibe el recambio de

neurotransmisores como DOPAC/DA, MHPG/NE, y 5-HIAA/5-HT en la corteza prefrontal medial (HANDA *et al.*, 1999).

En resumen, nuestros resultados sugieren que el mecanismo a través del cual se producen las alteraciones en el desarrollo de estos neurotransmisores monoaminérgicos se debe a una alteración de los niveles de estradiol y testosterona lo que produjo una alteración permanente de la expresión de algunas de las enzimas que catalizan la síntesis y metabolismo de los neurotransmisores monoaminérgicos. Se requieren posteriores estudios para comprobar si otras hormonas están también implicadas en estos efectos así como para averiguar si actúan de forma directa sobre la expresión de las enzimas afectadas o es a través de la inducción de otros genes que puedan regular su expresión. También es necesario hacer un estudio anatomopatológico en las regiones afectadas para determinar el efecto sobre el número de neuronas, para determinar si hay una reducción en la innervación. Actualmente, se están desarrollando nuevas moléculas con aplicación terapéutica como el N-hidroxi-N-(4-butil-2-metilfenil) formamidina (HET0016) con efectos protectores contra patologías cardiovasculares y cerebrovasculares. Hasta ahora se ha planteado la evaluación del riesgo de la familia de estos compuestos desde el punto de vista de la carcinogénesis. A la vista de estos resultados podría ser conveniente replantear la evaluación del riesgo de los miembros de esta familia basada no solo en sus posibles efectos carcinógenos, sino también en los efectos neurotóxicos durante el desarrollo mediados a través de disrupción endocrina.

## **CONCLUSIONES**

## **7. CONCLUSIONES**

1. El clodimeformo en ratas de 60 días de edad, nacidas de madres expuestas a una dosis de 5 mg/kg/día durante la gestación y la lactancia afectó al contenido de 5-HT, DA y NA y sus metabolitos de manera sexo y región dependiente en las regiones de la corteza frontal, hipocampo y cuerpo estriado de manera estadísticamente significativa sin verse afectadas el resto de las estructuras del sistema nervioso estudiadas

2. En nuestro estudio el clodimeformo a dosis de 5 mg/kg/día durante la gestación y la lactancia, afectó a la expresión génica de las enzimas COMT, BDH, AD, TH y TRH responsables del metabolismo de los neurotransmisores anteriormente descritos de una forma sexo y región dependiente en las regiones de la corteza frontal, hipocampo y cuerpo estriado. Por el contrario no se observó ningún efecto sobre la expresión de la MAO A en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas.

3. El tratamiento con clodimeformo por vía oral a ratas madre durante el periodo de gestación desde el día 6 al día 21 y durante la lactancia desde el día 1 al día 10, afectó al contenido de testosterona y estradiol de manera sexo y región dependiente en las regiones de corteza frontal, cuerpo estriado e hipocampo de las ratas descendientes a la edad de 11 días.

4. Los efectos permanentes observados sobre los sistemas de neurotransmisores monoaminérgicos en la corteza frontal, cuerpo estriado e hipocampo fueron ocasionados por las alteraciones permanentes de la expresión génica de las enzimas COMT, BDH, AD, TH y TRH inducidas por exposición al clodimeformo durante el periodo de preñez y lactancia.

5. Las alteraciones de los niveles de hormonas estradiol y testosterona en las regiones cerebrales de corteza frontal, cuerpo estriado e hipocampo por exposición al clodimeformo durante el periodo de preñez y lactancia indujo alteraciones permanentes de la expresión génica de las enzimas COMT, BDH, AD, TH y TRH.

6. La participación de la MAO en la inducción de los efectos permanentes observados en los sistemas de neurotransmisores monoaminérgicos es descartada al utilizarse una molécula que presenta una inhibición muy baja sobre dicha enzima y al no producirse ninguna alteración permanente en la expresión génica de la MAO A por exposición al clodimeformo durante el periodo de preñez y lactancia.

7. Se requieren posteriores estudios para determinar la cinética del clodimeformo a nivel cerebral para determinar si existe una acumulación selectiva de este compuesto en las áreas afectadas, así como comprobar si otras hormonas están también implicadas en estos efectos y si éstas actúan de forma directa sobre la expresión de las enzimas afectadas o es a través de la inducción de otros genes que puedan regular su expresión.

## **BIBLIOGRAFIA**

## **8. BIBLIOGRAFIA**

- ABO-KHATWA, N. & HOLLINGWORTH, R.M. (1973). Chlordimeform: Uncoupling activity against rat liver mitochondria. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 3: 358.
- ALDRIDGE, J.E., SEIDLER, F.J., MEYER, A., THILLAI, I. & SLOTKIN, T.A. (2003). Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: effects during different critical periods. *Environmental Health Perspectives* 111(14): 1736-1743.
- ALDRIDGE, J.E., SEIDLER, F.J. & SLOTKIN, T.A. (2004). Developmental exposure to chlorpyrifos elicits sex-selective alterations of serotonergic synaptic function in adulthood: critical periods and regional selectivity for effects on the serotonin transporter, receptor subtypes, and cell signaling. *Environmental Health Perspectives* 112(2): 148-155.
- ALDRIDGE, J.E., MEYER, A., SEIDLER, F.J. & SLOTKIN, T.A. (2005). Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure. *Environmental Health Perspectives* 113(8): 1027-1031.
- ALI, S.F., CHANG, L.W. & SLIKKER, W. (1991). Biogenic amines as biomarkers for neurotoxicity. *Biomedical and Environmental Sciences* 4(1-2): 207-216.
- ALTOBELLI, D., MARTIRE, M., MAURIZI, S. & PREZIOSI, P. (2001). Interaction of formamidine pesticides with the presynaptic  $\alpha$ 2-adrenoceptor regulating [H3] noradrenaline release from rat hypothalamic synaptosomes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 172: 179-185.
- ARIMA T., MOROOKA H., TANIGAWA T., IMAI M., TSUNASHIMA T. & KITA S. (1976). Methemoglobinemia induced by chlorphenamide. *Acta Medica Okayama* 30: 57-60.
- ARNDT, H. & STEINHAUSEN, W. (1964). Acaricidal agents. *Chemical abstracts* 61: 11274.
- ARTIGAS, F., SARRIAS, M.J., ADELL, A. & GELPI, E. (1986). Quantitation of total MHPG in the rat brain using a non enzymatic hydrolysis procedure. *Effects of drugs. Life Sciences* 39(17): 1571-1578.
- ASH, A.S.F. & SCHILD, H.O. (1966). Receptors mediating some actions of histamine. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 27: 427-439.
- AZIZ, S.A. & KNOWLES, C.O. (1973). Inhibition of monoamine oxidase by the pesticide chlordimeform and related compounds. *Nature* 242: 417-418.
- BAILEY, B.A. MARTIN, R.J. & DOWNER, R.G.H. (1982). Monoamine oxidase inhibition and brain catecholamine levels in the rat following treatment with chlordimeform. *Pest Biochem Physiol* 17: 293-300.
- BALER, R.D., VOLKOW, N.D., FOWLER, J.S. & BENVENISTE, H. (2008). Is fetal brain monoamine oxidase inhibition the missing link between maternal smoking and conduct disorders?. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 33(3): 187-195.
- BANDYOPADHYAY, S. & HABLITZ, J.J. (2007). Dopaminergic modulation of local network

- activity in rat prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology* 97(6): 4120-4128.
- BASS, R., BOCHERT, G., MERKER, H.J. & NEUBERT, D. (1977). Some aspects of teratogenesis and mutagenesis in mammalian embryos. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 2: 1353-1374.
- BARONE, S., DAS, K.P., LASSITER, T.L. & WHITE LD. (2000). Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods. *Neurotoxicology* 21(1-2):15-36.
- BEEMAN, R.W. & MATSUMURA, F. (1973). Chlordimeform: a pesticide acting upon amine regulatory mechanisms. *Nature* 242(5395): 273-274.
- BEEMAN, R.W. (1982). Recent advances in mode of action of insecticides. *Annual Review of Entomology* 27: 253-281.
- BENEZET, H.J. & KNOWLES, C.O. (1976). Inhibition of rat brain monoamine oxidase by formamidines and related compounds. *Neuropharmacology* 15: 369-373.
- BENEZET, H.J., CHANG, K.M. & KNOWLES, C.O. (1978). Formamidin pesticides-Metabolic aspects of neurotoxicity. In: *Pesticide and Venom Neurotoxicity*. Shankland, D.C. Hollingworth, R.M. & Smith, T. (Eds), Plenum Press, New York, pp. 189-206.
- BENTLEY, P. BIERI, F. MUECKE, W. WAECHTER, F. & STAUBLI, W. (1986a). Species differences in toxicity of p-chloro-o-toluidine to rats and mice: Covalent binding to hepatic macromolecules and hepatic non-parenchymal cell DNA and an investigation of effects upon the incorporation of [3H]-thymidine into capillary endothelial cells. *Chemico-Biological Interaction* 57: 27-40.
- BENTLEY, P. WAECHTER, F. BIERI, F. STAUBLI, W. & MUECKE, W. (1986b). Species differences in the covalent binding of p-chloro-o-toluidine to DNA. *Archives of Toxicology* 9(suppl): 163-166.
- BERGER-SWEENEY, J. & HOHMANN, C.F. (1997). Behavioral consequences of abnormal cortical development: insights into developmental disabilities. *Behavioural Brain Research* 86(2): 121-142.
- BERRY, M.D., JUORIO, A.V. & PATERSON, I.A. (1994). Possible mechanisms of action of (-)deprenyl and other MAO-B inhibitors in some neurologic and psychiatric disorders. *Progress in Neurobiology* 44(2): 141-161.
- BIEGON, A. RECHES, A. SNYDER, L. & MCEWEN, B.S. (1983). Serotonergic and noradrenergic receptors in the rat brain: modulation by chronic exposure to ovarian steroids. *Life Sciences* 32: 2015-2021.
- BLACKMORE, R.H. (1969a). Chlorphenamide (Schering 36268): 24-month repeated feeding study in rats (Project No. 728-126). Falls Church, Virginia, Hazleton Laboratories Inc. (Unpublished report submitted to the 1971 Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues.

- BLACKMORE, R.H. (1969b). Chlorphenamidine (Schering 36268). Segment II: Teratology Study -Rabbits (Project No. 728-157). Falls Church, Virginia, Hazleton Laboratories Inc. (Unpublished report submitted to the 1971 Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues).
- BLASCHKO, H., RICHTER, D. & SCHLOSSMANN, H. (1937). The inactivation of adrenaline. *Journal of Physiology* 90: 1-17.
- BLUM, D., TORCH, S., LAMBENG, N., NISSOU, M., BENABID, A.L., SADOUL, R. & VERNA, J.M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 65(2): 135-172.
- BORUE, X., CHEN, J. & CONDRON, B.G. (2007). Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies. *International Journal of Developmental Neuroscience* 25(6): 341-347.
- BOYES, W.K. & MOSER, V.C. (1987). Investigations of amitraz neurotoxicity in rats. II. Effects on visual evoked potentials. *Fundamental and Applied Toxicology* 9: 140-153.
- BOYES W.K. & MOSER V.C. (1988). An alpha 2-adrenergic mode of action of chlordimeform on rat visual function. *Toxicology and Applied Pharmacology* 92: 402-418.
- BOYES W.K. & DYER R.S. (1984). Chlordimeform produces profound, selective, and transient changes in visual evoked potentials of hooded rats. *Experimental Neurology* 86: 434-447.
- BURGESS, N., MAGUIRE, E.A. & O'KEEFE, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35(4): 625-641.
- BUTKEVICH, I.P., KHOZHAI, L.I., MIKHAILENKO, V.A. & OTELLIN, V.A. (2003). Decreased serotonin level during pregnancy alters morphological and functional characteristics of tonic nociceptive system in juvenile offspring of the rat. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 96-103.
- BUZNIKOV, G.A., SHMUKLER, Y.B. & LAUDER, J.M. (1996). From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development?. *Cellular and Molecular Neurobiology* 16(5): 533-559.
- CASES, O., LEBRAND, C., GIROS, B., VITALIS, T., DE MAEYER, E., CARON, M.G., PRICE, D.J., GASPARD, P. & SEIF, I. (1998). Plasma membrane transporters of serotonin, dopamine, and norepinephrine mediate serotonin accumulation in atypical locations in the developing brain of monoamine oxidase A knock-outs. *Journal of Neuroscience* 18(17): 6914-27.
- CASÍDA, J.E. & QUISTAD, G.B. (2004). Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chemical Research in Toxicology* 17(8): 983-998.
- CASTELLI, M.P. CASTI, A. CASU, A. FRAU, R. BORTOLATO, M. SPIGA, S. & ENNAS, M.G. (2012). Regional distribution of 5 $\alpha$ -reductase type 2 in the adult rat brain: An immunohistochemical analysis. *Psychoneuroendocrinology* doi:org/10.1016/j.psyneuen.2012.06.008.

- CASTRO, V.L. & PALERMO-NETO, J. (1988). Alterations in the behavior of young and adult rats exposed to aldrin during lactation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 21(5): 987-990.
- CASTRO, V.L., BERNARDI, M.M. & PALERMO-NETO, J. (1989). Evaluation of prenatal aldrin intoxication in rats. *Archives of Toxicology* 66(2): 149-152.
- CHINN, C., LUND, A.E. & YIM, G.K.W. (1977). The central actions of lidocaine and a pesticide, chlordimeform. *Neuropharmacology* 16(12): 867-872.
- CHOU, C.P. LU, S.Y. & UENG, T.H. (2008). Modulation of serum concentrations and hepatic metabolism of 17 $\beta$ -estradiol and testosterone by amitraz in rats. *Archives of Toxicology* 82(10): 729-737.
- CIFARIELLO, A., POMPILI, A. & GASBARRI, A. (2007). 5-HT(7) receptors in the modulation of cognitive processes. *Behavioural Brain Research* 195(1): 171-179.
- COLADO, M.I., ARNEDO, A., PERALTA, E. & DEL RÍO, J. (1988). Unilateral dorsal rhizotomy decreases monoamine levels in the rat spinal cord. *Neuroscience Letters* 87: 302-306.
- COLADO, M.I., MURRAY, T.K. & GREEN, A.R. (1993a). 5-HT loss in rat brain following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), *p*-chloroamphetamine and fenfluramine administration and effects of chlormethiazole and dizocilpine. *British Journal of Pharmacology* 108: 583-589.
- COLADO, M.I., ORMAZABAL, M.J., ALFARO, M.J. & MARTIN, M.I. (1993b). Effect of Bay K 8644 on the synthesis and metabolism of dopamine and 5-hydroxytryptamine in various brain areas of the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 45: 220-222.
- COLADO, M.I., O'SHEA, E., GRANADOS, R., MURRAY, T.K. & GREEN, A.R. (1997). *In vivo* evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ("ecstasy") and *p*-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. *British Journal of Pharmacology* 121: 889-900.
- COLADO, M.I., O'SHEA, E., GRANADOS, R., ESTEBAN, B., MARTÍN, A.B. & GREEN, A.R. (1999). Studies on the role of dopamine in the degeneration of 5-HT nerve endings in the brain of Dark Aouti rats following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy") administration. *British Journal of Pharmacology* 126: 911-924.
- COMPTON, D.M. (2004). Behavior strategy learning in rat: effects of lesions of the dorsal striatum or dorsal hippocampus. *Behavioural Processes* 67(3): 335-342.
- COOPER R.L., BARRETT M.A., GOLDMAN J.M., REHNBERG G.L., MCELROY W.K. & STOKER T.E. (1994). Pregnancy alterations following xenobiotic-induced delays in ovulation in the female rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 22: 474-480.
- COSTA, L. G. & MURPHY, S.D. (1987). Interaction of the pesticide chlordimeform with adrenergic by amitraz, a formamidine pesticide. *Toxicology Letters* 28: 99-104.

- COSTA, L.G., OLIBET, G., WU, D. & MURPHY, S.D. (1988).  $\alpha_2$ -adrenoceptor as a target for formamidine pesticides: in vitro and in vivo studies in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 93: 319-328.
- CROWDER L.A. & WHITSON R.S. (1980). Fate of toxaphene, methyl parathion, and chlordimeform combinations in the mouse. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 24: 444-451.
- CRUSIO, W.E. & SCHWEGLER, H. (2005). Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behavioral and Brain Functions* 1(1): 3.
- DAM, K., GARCIA, S.J., SEIDLER, F.J. & SLOTKIN, T.A. (1999a). Neonatal chlorpyrifos exposure alters synaptic development and neuronal activity in cholinergic and catecholaminergic pathways. *Developmental Brain Research* 116(1): 9-20.
- DAM, K., SEIDLER, F.J. & SLOTKIN, T.A. (1999b). Chlorpyrifos releases norepinephrine from adult and neonatal rat brain synaptosomes. *Developmental Brain Research* 118(1-2): 129-133.
- DEL PINO, J. MARTÍNEZ, M.A. CASTELLANO, V.J. RAMOS, E. MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. ANADÓN, A. (2011). Effects of prenatal and postnatal exposure to amitraz on norepinephrine, serotonin and dopamine levels in brain regions of male and female rats. *Toxicology* 287(1-3), 145-152.
- DEL PINO, J. MARTÍNEZ, M.A. CASTELLANO, V.J. RAMOS, E. MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. ANADÓN, A. (2013). Effects of exposure to amitraz on noradrenaline, serotonin and dopamine levels in brain regions of 30 and 60 days old male rats. *Toxicology* 308(1), 88-95.
- DESTEPHANO, D.B. & BRADY, U.E. (1977). Prostaglandin and prostaglandin synthetase in the cricket, *Acheta domesticus*. *Journal of Insect Physiology* 23 (7): 905-911.
- DONNER, N. HANDA, R.J. (2009). Estrogen receptor-beta regulates the expression of tryptophan hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei. *Neuroscience* 163: 705-718.
- DOUGLAS, W.W. (1980). Histamine and 5-hydroxytryptamine (serotonina) and their antagonist. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Gilman, A.F., Goodman, L.S. & Gilman, A.I. (Eds), Macmillan, New York, pp. 609-646.
- DUCLOS, D.D., JEFFERS, J.G. & SHANLEY, K.J. (1994). Prognosis for treatment of adult-onset demodicosis in dogs: 34 cases (1979-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 204 (4): 616-619.
- DUNNET, S.B., MELDRUM, A. & MUIR, J.L. (2005). Frontal-striatal disconnection disrupts cognitive performance of the frontal-type in the rat. *Neuroscience* 135: 1055-1065.

- EHRENPREIS, S., GREENBERG, J. & COMATY, J.E. (1976). Block of electrically induced contractions of guinea pig longitudinal muscle by prostaglandin synthetase and receptor inhibitors. *European Journal of Pharmacology* 39 (2): 331-340.
- ESPADA, P. & AVENDAÑO, C. (1993). Inhibidores enzimáticos II. Inhibidores enzimáticos como farmacodinámicos. En: *Introducción a la Química Farmacéutica*. Avendaño, C. (Ed), Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid, pp. 275-311.
- FAO/WHO (1972) Chlordimeform. In: *1971 Evaluation of some pesticide residues in food*. World Health Organization (Eds), Geneva pp 3-45 (WHO Pesticide Series, No. 1).
- FAO/WHO (1976) Chlordimeform. In: *1975 Evaluation of some pesticide residues in food*. Geneva, World Health Organization, pp 85-104 (WHO Pesticide Residues Series, No. 5).
- FAO/WHO (1988) Chlordimeform. In: *Pesticide residues in food - 1987: Evaluations, Part II - Toxicology*. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp 25-26 (FAO Plant Production and Protection Paper 86/2).
- FERNÁNDEZ, M.C., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., DÍAZ, M.J., FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L., BRINGAS, P., MARTÍNEZ, M.A. & ANADÓN, A. (1995). Efecto del piretroide deltametrina sobre los niveles de monoaminas en diferentes regiones del encéfalo de rata. *Revista de Toxicología* 12: 20-23.
- FRITZ, H. (1971). Reproduction study on C8514 (chlorphenamide) technical in rabbit-Segment II: Test for teratogenic and embryotoxic effects (Experiment No. 10071 004). Basel, Switzerland, Ciba-Geigy Ltd (Unpublished report).
- FRITZ, H. (1975). Reproduction study on C8514 (chlorphenamide) technical in rat- segment II: Test for teratogenic and embryotoxic effects (Experiment No. 227533). Basel, Switzerland, Ciba-Geigy Ltd (Unpublished report).
- GAINES T.B. & LINDER R.E. (1986) Acute toxicity of pesticides in adult and weanling rats. *Fundamental and Applied Toxicology* 7: 299-308.
- GHALI GZ & HOLLINGWORTH RM (1985) Influence of mixed function oxygenase metabolism on the acute neurotoxicity of the pesticide chlordimeform in mice. *Neurotoxicology* 6: 215-238.
- GILBERT, M.E. (1988). Formamidine pesticides enhance susceptibility to kindled seizures in amygdala and hippocampus of the rat. *Neurotoxicology and Teratology* 10(3): 221-227.
- GILBERT, M.E. & DYER, R.S. (1988). Increased Hippocampal Excitability Produced by Amitraz. *Neurotoxicology and Teratology* 10: 229-235.
- GLOWINSKI, J. & IVERSEN, L.L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain – I. The disposition of [<sup>3</sup>H]norepinephrine, [<sup>3</sup>H] dopamine and [<sup>3</sup>H]DOPA in various regions of the brain. *Journal of Neurochemistry* 13: 655-669.
- GLOWA, J.R. (1986). Acute and sub-acute effects of deltamethrin and chlordimeform on schedule-controlled responding in the mouse. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*

8(1): 97-102.

- GOLDMAN J.M., COOPER R.L., LAWS S.C., REHNBERG G.L., EDWARDS T.L., MCELROY W.K. & HEIN J.F. (1990). Chlordimeform-induced alterations in endocrine regulation within the male rat reproductive system. *Toxicology and Applied Pharmacology* 104: 25-35.
- GOLDMAN J.M., COOPER R.L., EDWARDS T.L., REHNBERG G., MCELROY W.K. & HEIN J.F. (1991). Suppression of the luteinizing hormone surge by chlordimeform in ovariectomized, steroid-primed female rats. *Pharmacology and Toxicology* 68: 131-136.
- GOLDMAN, J.M. STOKER, T.E. PERREAULT, S.D. COOPER, R.L. & CRIDER, M.A. (1993). Influence of the formamidine pesticide chlordimeform on ovulation in the female hamster. Dissociable shifts in the luteinizing hormone surge and oocyte release. *Toxicology and Applied Pharmacology* 121: 279-290.
- GORDON C.J. & WATKINSON W.P. (1988). Behavioral and autonomic thermoregulation in the rat following chlordimeform administration. *Neurotoxicology and Teratology* 10: 215-219.
- GORDON C.J., LONG M.D. & STEAD A.G. (1985). Thermoregulation in mice following acute chlordimeform administration. *Toxicology Letters* 28: 9-15.
- GRAUDENS, E. BOULANGER, V. MOLLARD, C. MARIAGE-SAMSON, R. BARLET, X. GRÉMY, G. COUILLAUT, C. LAJÉMI, M. PIATIER-TONNEAU, D. ZABORSKI, P. EVENO, E. AUFRAY, C. & IMBEAUD S. (2006). Deciphering cellular states of innate tumor drug responses. *Genome Biology* 7(3):R19.
- GUPTA, R.C. (2004). Brain Regional Heterogeneity and Toxicological Mechanisms of Organophosphates and Carbamates. *Toxicology Mechanisms and Methods* 14(3): 103-143.
- HANDA, R.J. HEJNA, G.M. & LORENS, S.A. (1997). Androgen inhibits neurotransmitter turnover in the medial prefrontal cortex of the rat following exposure to a novel environment. *Brain Research* 751(1), 131-138.
- HERLENIUS, E. & LAGERCRANTZ, H. (2001). Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Early Human Development* 65(1): 21-37.
- HERLENIUS, E. & LAGERCRANTZ, H. (2004). Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology* 190(1): 8-21.
- HILL, D.L. SHIH, T-W. & STRUCK, R.F. (1979). Macromolecular binding and metabolism of the carcinogen 4-chloro-2-methylaniline. *Cancer Research* 39(7 pt1): 2528-2531.
- HOJO, Y. HIGO, S. ISHII, H. OOISHI, Y. MUKAI, H. MURAKAMI, G. KOMINAMI, T. KIMOTO, T. HONMA, S. POIRIER, D. KAWATO, S. (2009). Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology* 150(11): 5106-5112.

- HOLSAPPLE, M.P., BLAKE, D.E. & YIM, W.K.W. (1979). Reversible depression of electrically-induced contractions of guinea pig longitudinal muscle by a reversible inhibitor of prostaglandin synthetase. *Prostaglandins and Medicine* 3(4): 215-221.
- HOLLINGWORTH, R.M. (1976). Chemistry, biological activity, and uses of formamidine pesticides. *Environmental Health Perspectives* 14: 57-69.
- HOLLINGWORTH, R.M. LEISTER, J. & GHALI, G. (1979). Mode of action of formamidine pesticides: an evaluation of monoamine oxidase as the target. *Chemico-Biological Interaction* 24(1): 35-49.
- HOLLINGWORTH, R.M. & LUND, A.E. (1982). Biological and neurotoxic effects of amidine pesticide. In: *Insecticide Mode of Action*. Coast, J.R. (Ed), Academic Press, New York, pp. 189-227.
- HSU, W.H. & KAKUK, T.J. (1984). Effect of amitraz and chlordimeform on heart rate and pupil diameter in rats: mediated by  $\alpha_2$ -adrenoceptor. *Toxicology and Applied Pharmacology* 73: 411-415.
- HURNI H. & SACHSSE K. (1969). Report on the determination of the acute oral LD<sub>50</sub> to the dog of chlorfenamidin technical. Sisseln, Switzerland, Tierfarm AG (Unpublished report).
- IFFLAENDER U. (1977a). Distribution, degradation and excretion of chlordimeform (CDF) in mice and rats. Basel, Switzerland, Ciba-Geigy Ltd (Unpublished report No. 38/77).
- IFFLAENDER U. (1977b). Comparison of the urinary metabolite pattern of mice and rats after oral application of <sup>14</sup>C-chlordimeform. Basel, Switzerland, Ciba-Geigy Ltd (Unpublished report No. 39/77).
- IMBEAUD, S. GRAUDENS, E. BOULANGER, V. BARLET, X. ZABORSKI, P. EVENO, E. MUELLER, O. SCHROEDER, A. & AUFRAY, C. (2005). Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Research* 33(6):e56.
- IUPAC (International Union on Pure and Applied Chemistry). Commission of Toxicology. (1993). Glossary for chemists of terms used in toxicology. *Pure and Applied Chemistry* 65: 2003-2122.
- JACOBS, B.L. & AZMITIA, E.C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews* 72(1): 165-229.
- JIANG, J.K. XU, W.Y. XU, S.Q. LI, J.L. ZHOU, F.D. YANG, S.X. ZHONG, S.L. & ZHU, R.L. (1985). Survey on the hygienic status on spraying chlordimeform with fine mist sprayer. *Laboral Medicine*, 2: 4-6
- JOHNSTON, J.P. (1968). Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochemical Pharmacology* 17: 1285-1297.
- JMPR (Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues) (1998).

*Chlordimeform Environmental Health Criteria, No 199.*

Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc199.htm#PartNumber:7>

- JUNN, E. & MOURADIAN, M.M. (2001). Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases. *Journal of Neurochemistry* 78(2): 374-383.
- KADIR, H.A. & KNOWLES, C.O. (1981). Inhibition of rat brain monoamine oxidase by insecticides, acaricides and related compounds. *General Pharmacology* 12(4): 239-247.
- KALE, P.G. PETTY, B.T. WALKER, S. FORD, J.B. DEHKORDI, N. TARASÍA, S. TASÍE, B.O. KALE, R. & SOHNI, Y.R. (1995). Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 25(2): 148-153.
- KALOYANOVA, F. BAINOVA, A. & ZAPRIANOV, Z. (1981). Inhibition of monoamine oxidase activity after combined action of chlordimeform with the antidepressant, nialamide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 10(1): 1-8
- KNOWLES, C.O. (1970). Metabolism of two acaricidal chemicals, N'-(4-chloro-o-tolyl)-N, N-dimethylformamidine (chlorphenamidine) and m-(((dimethylamino)methylene)amino)phenyl-carbamate hydrochloride (formetanate). *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 18: 1038-1047.
- KNOWLES, C.O. & BENEZET, H.J.(1977). Mammalian metabolism of chlordimeform: Formation of metabolites containing the urea moiety. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 25: 1022-1026.
- KNOWLES, C.O. & ROULSTON, W.J. (1973). Toxicity to *Bophilus microplus* of formamidine acaricides and related compounds, and modification of toxicity by certain insecticide synergists. *Journal of Economic Entomology* 66 (6): 1245- 1251.
- KNOWLES, C.O. & SEN GUPTA, A.K. (1970). N'-(4-chloro-o-tolyl)-N, N-dimethylformamidine-<sup>14</sup>C(Galecron) and 4-chloro-o-toluidine-<sup>14</sup>C metabolism in the white rat. *Journal of Economic Entomology* 63: 856-859.
- KOPP, R., HUMPE, L M., KUHNE, G., FUCHS, R. & RZADKIEWICZ, M. (1977). Pharmacokinetics of chlordimeform following single and repeated oral administration of 0.03 and 3 mg in female mice (1.2 and 120 mg/kg). Basel, Switzerland, Ciba-Geigy Ltd (Unpublished report).
- LAKSHMANA, M. & RAJU, T.R. (1994). Endosulfan induces small but significant changes in the levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the developing rat brain and deficits in the operant learning performance. *Toxicology* 91(2): 139-150.
- LAPIZ, M.D. & MORILAK, D.A. (2006). Noradrenergic modulation of cognitive function in rat medial prefrontal cortex as measured by attentional set shifting capability. *Neuroscience* 137: 1039-1049.

- LAUDER, J.M. & KREBS, H. (1976). Effects of p-chlorophenylalanine on time of neuronal origin during embryogenesis in the rat. *Brain Research* 107(3): 638-644.
- LAUDER, J.M. (1985). Roles for neurotransmitters in development: possible interaction with drugs during the fetal and neonatal periods. *Progress in Clinical and Biological Research* 163C: 375-380.
- LAUDER, J.M. (1990). Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Annals of the New York Academy of Sciences* 600: 297-313.
- LAUDER, J.M., LIU, J., DEVAUD, L. & MORROW, A.L. (1998). GABA as a trophic factor for developing monoamine neurons. *Perspectives on Developmental Neurobiology* 5(2-3): 247-259.
- LAWRENCE, N.S., BECKETT, E.L., DAVIS, J. & COMPTON, R.G. (2002). Advances in the voltammetric analysis of small biologically relevant compounds. *Analytical Biochemistry* 303: 1-16.
- LAZARINI, C.A., FLÓRIO, J.C., LEMONICA, I.P. & BERNARDI, M.M. (2001). Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. *Neurotoxicology and Teratology* 23(6): 665-673.
- LEANDER, J. & MACPHAIL, R.C. (1980). Effect of chlordimeform (a formamidine pesticide) on schedule-controlled responding of pigeons. *Neurobehavioral Toxicology* 2(1): 315-321.
- LEANDER, J.D. TOMLINSON, W.T. BALSTER, R.L. & MACPHAIL, R.C. (1984). Some effects of the formamidine pesticide chlordimeform on the behaviour of mice. *Neurotoxicology* 5(2): 91-100.
- LEVITT, P., HARVEY, J.A., FRIEDMAN, E., SIMANSKY, K. & MURPHY, E.H. (1997). New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends in Neurosciences* 20(6): 269-274.
- LI, F. XUE, S.Z. WANG, Y.L. ZHU, S.Y. & HU, R.F. (1985). Carcinogenic action of chlordimeform given orally to mice in a lifetime experiment. *Chinese Journal of Preventive Medicine* 19(3): 154-156.
- LINDER, R.E. STRADER, L.F. SLOTT, V.L. & SUAREZ, J.D. (1992). Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology* 6(6): 491-505.
- LIVAK, K.J. SCHMITTGEN, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup>. *Method* 25(4):402-408.
- LUINE, V.N. KHYLCHEVSKAYA, R.I. & MCEWEN, B.S. (1973). Effect of gonadal steroids on activities of monoamine oxidase and choline acetylase in rat brain. *Brain Research* 86: 293-306.
- LUINE, V.N. & RHODES, J.C. (1983). Gonadal hormone regulation of MAO and other enzymes in hypothalamic areas. *Neuroendocrinology* 36: 235-241.

- LUINE, V.N. RICHARDS, S.T. WU, V.Y. & BECK, K.D. (1998). Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Hormones and Behavior* 34(2): 149-162.
- LUND, A.E., SHANKLAND, D.L., CHINN, C. & YIM, G.K.W. (1978). Similar cardiovascular toxicity of the pesticide chlordimeform and lidocaine. *Toxicology and Applied Pharmacology* 44 (2): 357-365.
- MACPHAIL, R.C. & LEANDER, J.D. (1980). Flavor aversions induced by chlordimeform. *Neurobehavioral Toxicology* 2: 363-365.
- MACPHAIL, R.C. & LEANDER, J.D. (1981). Chlordimeform effects on schedule-controlled behavior in rats. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology* 3: 19-26.
- MCQUEEN, J.K. WILSON, H. & FINK, G. (1997). Estradiol-17 $\beta$  increases serotonin transporter (SERT) mRNA levels and the density of SERT-binding sites in female rat brain. *Molecular Brain Research* 45(1): 13-23.
- MAITRE, L. & GFELLER, W. (1975). Influence of Compound 8514 (chlordimeform) on the brain and liver monoamine oxidase of rats. Unpublished report from Ciba-Geigy Pharmaceutical Division submitted to the World Health Organization by Ciba-Geigy Ltd., Basel, Switzerland.
- MAITRE, L. FELNER, A. WALDMEIER, P. & KEHR, W. (1978). Monoamine oxidase inhibition in brain and liver of rats treated with chlordimeform. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26(2): 442-446.
- MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. DEL PINO, J., MARTÍNEZ, M.A., DÍAZ, M.J. & ANADÓN, A. (2009). Developmental exposure to amitraz alters the dopamine system. *Toxicological Sciences* 108(sup1): 241.
- MEANA, J.J. & GARCÍA-SEVILLA, J.A. (1997). Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos. En: *Farmacología Humana. 3ª Edición*. Flórez, J., Armijo, J.A. & Mediavilla, A. (Eds.), Masson, S.A., Barcelona, pp. 235-260.
- MIZE, A.L. POISNER, A.M. & ALPER, R.H. (2001). Estrogens act in rat hippocampus and frontal cortex to produce rapid, receptor-mediated decreases in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor function. *Neuroendocrinology* 73, 166-174.
- MIZE, A.L. & ALPER, R.H., (2002). Rapid uncoupling of serotonin-1A receptors in rat hippocampus by 17-estradiol in vitro requires protein kinases A and C. *Neuroendocrinology* 76, 339-347.
- MOSER, V.C. & MACPHAIL, R. (1986). Differential effects of formamidine pesticides on fixed-interval behavior in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 84(2): 315-324.
- MOSER, V.C., BOYES, W.K. & MACPHAIL, R.C. (1987). Investigations of amitraz neurotoxicity in rats. I. Effects on operant performance. *Fundamental and Applied Toxicology* 9: 131-139.

- MOSER, V.C. & MACPHAIL, R. (1989). Investigations of amitraz neurotoxicity in rats. III. Effects on motor activity and inhibition of monoamine oxidase. *Fundamental and Applied Toxicology* 12(1): 12-22.
- NAQUI, S.Z., HARRIS, B.S., THOMAIDOU, D. & PARNAVELAS, J.G. (1999). The noradrenergic system influences the fate of Cajal-Retzius cells in the developing cerebral cortex. *Brain Research. Developmental Brain Research* 113(1-2): 75-82.
- NCI (1979) Bioassay of 4-chloro-o-toluidine hydrochloride for possible carcinogenicity. Bethesda, Maryland, National Cancer Institute (Technical Report Series No. 165).
- NEUBERT, D. ZENS, P. ROTHENWALLNER, A. & MERKER, H.J. (1973). A survey of the embryotoxic effects of TCDD in mammalian species. *Environmental Health Perspectives* 5: 67-79.
- NEUBERT, D. HINZ, N. BAUMANN, I. & BARRACH, H.J. (1978). Attempt upon a quantitative evaluation of the degree of differentiation of or the degree of interference with development in organ culture. In: Role of Pharmacokinetics in Prenatal and Perinatal Toxicology. Neubert, D., Merker, H.J., Nau, H. & Langman, J. (Eds), Georg Thieme Publications, Stuttgart, pp. 337-349.
- NEUBERT, D. BARRACH, H.J. & MERKER, H.J. (1980). Drug-induced damage to the embryo or fetus (molecular and multilateral approach to prenatal toxicology). Current Topics in Pathology. *Ergebnisse der Pathologie* 69: 241-331.
- NEUMANN, R. & VOSS, G. (1977). MAO inhibition, an unlikely mode of action for chlordimeform. *Experientia* 33: 23-24.
- NICOTRA, A. & SENATORI, O. (1989). Some characteristics of mitochondrial monoamine oxidase activity in eggs of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology. C* 92(2): 401-404.
- NICOTRA, A. & SCHATTEN, G. (1990). Propranolol, a beta-adrenergic receptor blocker, affects microfilament organization, but not microtubules, during the first division in sea urchin eggs. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 16(3): 182-189.
- NIXON W.B. & NEAL B.E. (1983). Chlordimeform residues in human urine following dermal application. Greensboro, North Carolina, Ciba-Geigy Corporation (Unpublished report No. ABR-83017).
- OLSON, K.L. BOUSH, G.M. & MATSUMURA, F. (1978). Behavioral effects of perinatal exposure of chlordimeform in rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 20(6): 760-768.
- OLVERA-CORTÉS, M.E., ANGUIANO-RODRÍGUEZ, P., LÓPEZ-VÁZQUEZ, M.A. & ALFARO, J.M. (2008). Serotonin/dopamine interaction in learning. *Progress in Brain Research* 172: 567-602.
- ÖSTERLUND, M.K. HALLDIN, C. & HURD, Y.L. (2000). Effects of chronic 17-estradiol

- treatment on the serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA and binding levels in the rat brain. *Synapse* 35: 39–44.
- KHOZHAI, L.I. & OTELLIN, V.A. (2006). Formation of the neocortex in mice developing in conditions of prenatal serotonin deficiency. *Neuroscience and behavioral physiology* 36(5): 513-517.
- PALERMO-NETO, J., SÁCATE, M. & FLÓRIO, J.C. (1994). Developmental and behavioral effects of prenatal amitraz exposure in rats. *Neurotoxicology and Teratology* 16(1): 65-70.
- PALERMO-NETO, J., SÁCATE, M. & FLÓRIO, J.C. (1997). Developmental and behavioral effects of postnatal amitraz exposure in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30(8): 989-997.
- PARADIS, M. (1999). New approaches to the treatment of canine demodicosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 29 (6): 1425-1436.
- PAROXINOS, G. & WATSON, C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. 4<sup>th</sup> Edition, Academic Press, California.
- PENDLETON, R.G., RASHEED, A., ROYCHOWDHURY, R. & HILLMAN, R. (1998). A new role for catecholamines: ontogenesis. *Trends in Pharmacological Sciences* 19(7): 248-251.
- PFISTER, W.R. & YIM, G.K.W. (1977). Formamidine induced feeding and behavioural alteration in the rat. *Federation Proceedings* 36: 352.
- PFISTER, W.R., CHINN, C., NOLAND, V. & YIM, G.K.W. (1977). Antipyretic-analgesic actions of the formamidine Similar pesticide chlordimeform *Pharmacologist* 19: 216.
- PRADO-ALCALA, R.A. (1995). Serial and parallel processing during memory consolidation. In: *Plasticity in the central nervous system: learning and memory*. McGaugh, G.L., Bermudez-Rattoni, F. & Prado-Alcalca, R.A. (Eds), Erlbaum, Mahwah, New Jersey, pp. 57–65.
- POPE, C.N. (1999). Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity?. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B. Critical Reviews* 2(2): 161-181.
- PURVES-TYSON, T.D. HANDELSMAN, D.J. DOUBLE, K.L. OWENS, S.J. BUSTAMANTE, S. & WEICKERT, C.S. (2012). Testosterone regulation of sex steroid-related mRNAs and dopamine-related mRNAs in adolescent male rat substantia nigra. *BMC Neuroscience*. doi:10.1186/1471-2202-13-95.
- QIAO, D. SEIDLER, F.J. PADILLA, S. & SLOTKIN, T.A. (2002). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: what is the vulnerable period?. *Environmental Health Perspectives* 110(11): 1097-1103.
- QIAO, D., SEIDLER, F.J., TATE, C.A., COUSINS, M.M. & SLOTKIN, T.A. (2003). Fetal chlorpyrifos exposure: adverse effects on brain cell development and cholinergic biomarkers

emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. *Environmental Health Perspectives* 111(4): 536-544.

RAINES, K.W., SEIDLER, F.J. & SLOTKIN, T.A. (2001). Alterations in serotonin transporter expression in brain regions of rats exposed neonatally to chlorpyrifos. *Brain research. Developmental Brain Research* 130(1): 65-72.

RICHARDSON, J.R., CAUDLE, W.M., WANG, M., DEAN, E.D., PENNELL, K.D. & MILLER, G.W. (2006). Developmental exposure to the pesticide dieldrin alters the dopamine system and increases neurotoxicity in an animal model of Parkinson's disease. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20(10): 1695-1697.

RIDLEY, R.M., BAKER, H.F., HARDER, J.A. & PEARSON, C. (1996). Effects of lesions of different parts of the septo-hippocampal system in primates on learning and retention of information acquired before or after surgery. *Brain Research Bulletin* 40(1):21-32.

ROBEL, P. BOURREAU, E. CORPÉCHOT, C. DANG, D.C. HALBERG, F. CLARKE, C. HAUG, M. SCHLEGEL, M.L. SYNGUELAKIS, M. VOURCH, C. (1987). Neuro-steroids: 3 beta-hydroxy-delta 5-derivatives in rat and monkey brain. *Journal of Steroid Biochemistry* 27(4-6): 649-655.

ROBINSON, C.P. & BITTLE, I.(1979). Vascular effects of demethylchlordimeform, a metabolite of chlordimeform. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 11(1): 55-46.

ROBINSON .CP., SMITH P.W., ZELENSKI J.D. & ENDECOTT B.R. (1975). Lack of an effect of interference with amine mechanisms on the lethality of chlordimeform in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 33: 380-383.

ROBINSON, C.P. & SMITH, P.W. (1977). Lack of involvement of monoamine oxidase inhibition in the lethality of acute poisoning by chlordimeform. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 3(3): 565-568.

ROLLS, E.T. (1994). Neurophysiology and cognitive functions of the striatum. *Revue Neurologique* 150(8-9):648-660.

RUEDIGER, T. & BOLZ, J. (2007). Neurotransmitters and the development of neuronal circuits. *Advances in experimental Medicine and Biology* 621:104-15.

SAURA, J., KETTLER, R., DA PRADA, M. & RICHARDS, J.G. (1992). Quantitative enzyme radioautography with <sup>3</sup>H-Ro 41-1049 and <sup>3</sup>H-Ro 19-6327 in vitro: localization and abundance of MAO-A and MAO-B in rat CNS, peripheral organs, and human brain. *Journal of Neuroscience* 12(5): 1977-1999.

SACHSSE, K. SUTER, P. ZAK, F. & HESS, R. (1978a). Lifespan feeding study in mice with N-formyl-4-chloro-o-toluidine-Final report (Project No. Siss M 4762/1. Basel, Switzerland, Ciba-Geigy Ltd (Unpublished report).

SACHSSE, K. SUTER, P. ZAK, F. & HESS, R. (1978b). Lifespan feeding study in mice with 4-chloro-o-toluidine-HCl-Final report (Project No. Siss M 04760/1). Basel, Switzerland, Ciba-Geigy Ltd (Unpublished report).

- LE SAUX, M. MORISSETTE, M. & DI PAOLO, T. (2006). ER beta mediates the estradiol increase of D-2 receptors in rat striatum and nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 50(4): 451–457.
- SCARDAPANE, L. & CARDINALI, D.P. (1977). Effect of estradiol and testosterone on catechol-methyl transferase activity of rat superior cervical ganglion, pineal gland, anterior hypophysis and hypothalamus. *Journal of Neurotransmission* 40: 81–86.
- SEN GUPTA, A.K. & KNOWLES, C.O. (1970). Galecron <sup>14</sup>C(N'-(4-chloro-o-tolyl)-N,N-dimethylformamidine) metabolism in the dog and goat. *Journal of Entomology* 63: 951-956.
- SEROVA, L. RIVKIN, M. NAKASHIMA, A. & SABBAN, E.L. (2002). Estradiol stimulates gene expression of norepinephrine biosynthetic enzymes in rat locus coeruleus. *Neuroendocrinology* 75: 193–200.
- SEROVA, L.I. MAHARJAN, S. HUANG, A. SUN, D. KALEY, G. & SABBAN, E.L. (2004). Response of tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase I gene expression to estrogen in brain catecholaminergic regions varies with mode of administration. *Brain Research* 1015: 1–8.
- SHAPOVALOVA, K.B. & KAMKINA, Y.V. (2008). Motor and cognitive functions of the neostriatum during bilateral blockade of its dopamine receptors. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 38(1): 71-79.
- SHIPSTONE, M. (2000). Generalised demodicosis in dogs, clinical perspective. *Australian Veterinary Journal* 78(4): 240-242.
- SLOTKIN, T.A. (1999). Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environmental Health Perspectives*. 107(1): 71-80.
- SLOTKIN, T.A. (2004). Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicology and Applied Pharmacology* 198(2): 132-151.
- SLOTKIN, T.A., TATE, C.A., COUSINS, M.M. & SEIDLER, F.J. (2002). Functional alterations in CNS catecholamine systems in adolescence and adulthood after neonatal chlorpyrifos exposure. *Brain Research. Developmental Brain Research* 133(2): 163-173.
- SPYKER, J.M. (1975). Assessing the impact of low level chemicals on development: behavioral and latent effects. *Federation Proceedings* 34(9): 1835-1844.
- STANTON, M.E. & SPEAR, L.P. (1990). Workshop on the qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity, Work Group I report: comparability of measures of developmental neurotoxicity in humans and laboratory animals. *Neurotoxicology and Teratology* 12(3): 261-267.
- STOKER, T.E. GOLDMAN, J.M. COOPER, R.L. & MCELROY, W.K. (1991). Influence of chlordimeform on alpha-adrenergic receptor-associated mechanisms of hormonal regulation

- in the rat: pituitary and adrenocortical secretion. *Toxicology* 69(3): 257-268.
- STONE, B.F., ATKINSON, P.W. & KNOWLES, C.O. (1974) Formamidine structure and detachment of the cattle tick *Bhoophilus microplus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 4: 407.
- SU, G.C. & ZABIK, M.J. (1972). Photochemistry of bioactive compounds: Photolysis of arylamidine derivatives in water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20: 320-323.
- SUMNER, B.E.H. GRANT, K.E. ROSIE, R. HEGELE-HARTUNG, C. FRITZEMEIER, K.H. & FINK, G. (1999). Effects of tamoxifen on serotonin transporter and 5-hydroxytryptamine 2A-receptor binding sites and mRNA levels in the brain of ovariectomized rats with or without acute estradiol replacement. *Molecular Brain Research* 73: 119–128.
- SUTER, P. ZAK, F. SACHSSE, K. & HESS, R. (1978). Lifespan feeding study in mice with chlordimeform-HC1-Final report (Project No. Siss. M 04761/1). Basel, Switzerland, Ciba-Geigy Ltd (Unpublished report).
- SUZUKI, K. & MARTIN, P.M. (1994). Neurotoxicants and Developing Brain In: *Developmental Neurotoxicology*. Harry, G.J. (Ed), Boca Raton, CRC Press, pp. 9-32.
- THIBLIN, I. FINN, A. ROSS, S.B. & STENFORS C. (1999). Increased dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic activities in male rat brain following long-term treatment with anabolic androgenic steroids. *British Journal Pharmacology* 126(6): 1301–1306.
- TRIGO, G.G. & AVENDAÑO, C. (1993). Inhibición enzimática como objetivo en el diseño de fármacos (I). Agentes quimioterápicos. En: *Introducción a la Química Farmacéutica*. Avendaño, C. (Ed), Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid, pp. 229-273.
- TOHYAMA, M. & TAKATSUJI, K. (1998). *Atlas of Neuroactive Substances and their Receptors in the Rat*. Tohyama, M. & Takatsuji, K. (Eds), Oxford University Press, New York.
- TOGA, A.W. (1997). Brain-mapping neurotoxicity and neuropathology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 820:1-13.
- VERNEY, C., LEBRAND, C. & GASPARD, P. (2002). Changing distribution of monoaminergic markers in the developing human cerebral cortex with special emphasis on the serotonin transporter. *Anatomical Record* 267(2): 87-93.
- VOSS G., KOSSMANN K., & GEISSBÜHLER H (1973). Chlordimeform. In: *Analytical methods for pesticide plant growth regulators*. Sherma J & Zweig G (Eds), Academic Press Inc. New York, London, vol 7, pp. 211-230.
- WANG, C.M. NARAHASHI, T. & FUKAMI, J. (1975). Mechanism of neuromuscular block by chlordimeform. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 5(2): 119-125.
- WATANABE Y. & MATSUMURA F. (1987). Comparative metabolism of sulfamidine and chlordimeform in rats. *Journal of Food Chemistry* 35: 379-384.

- WINNEKE, G. (1992). Cross species extrapolation in neurotoxicology: neurophysiological and neurobehavioral aspects. *Neurotoxicology* 13(1): 15-25.
- WISMAN, L.A., SAHIN, G., MAINGA, Y.M., LEANZA, G. & KIRIK, D. (2008). Functional convergence of dopaminergic and cholinergic input is critical for hippocampus-dependent working memory. *Journal of Neuroscience* 28(31): 7797-807.
- WITKIN, J.M. & LEANDER, J.D. (1982). Effects of the appetite stimulant chlordimeform on food and water consumption of rats: Comparison with chlordiazepoxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 223: 130-134.
- WHITAKER-AZMITIA, P.M., ZHANG, X. & CLARKE, C. (1994). Effects of gestational exposure to monoamine oxidase inhibitors in rats: preliminary behavioral and neurochemical studies. *Neuropsychopharmacology* 11(2): 125-132.
- WHITAKER-AZMITIA, P.M., DRUSE, M., WALKER, P. & LAUDER, J.M. (1996). Serotonin as a developmental signal. *Behavioural Brain Research* 73(1-2): 19-29.
- WORTHING, C.R. & WALKER, S.B. (1983). The Pesticide manual. 7<sup>th</sup> Edition. British Crop Protection Council, Croydon.
- WU D., COSTA L.G. & MURPHY S.D. (1990).[The effect of pesticides-chlordimeform and amitraz on inhibition of the binding of <sup>3</sup>H-clonidine to alpha<sub>2</sub>-adrenoreceptor in rat forebrain tissue. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 21: 17-21.
- YANAI, J., VATURY, O. & SLOTKIN, T.A. (2002). Cell signaling as a target and underlying mechanism for neurobehavioral teratogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 965: 473-478.
- YIM, G.R.W., HOLSAPPLE, M.P., PFISTER, W.R. & HOLLINGWORTH, R.M. (1978). Prostaglandin synthesis inhibited by formamidine pesticides. *Life Sciences* 23: 2509-2516.
- ZWAIN, I.H.YEN, S.S. (1999a). Dehydroepiandrosterone: biosynthesis and metabolism in the brain. *Endocrinology* 140(2):880-887.
- ZWAIN, I.H.YEN, S.S. (1999b). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140(8): 3843-3852.
- ZHAO, C. FUJINAGA, R. YANAI, A. KOKUBU, K. TAKESHITA, Y. WATANABE, Y. & SHINODA, K. (2008). Sex-steroidal regulation of aromatase mRNA expression in adult male rat brain: a quantitative non-radioactive in situ hybridization study. *Cell and Tissue Research* 332(3): 381-391.
- ZIMMER, D. MAZUREK, J. PETZOLD, G. & BHUYAN, B.K. (1980). Bacterial mutagenicity and mammalian cell DNA damage by several substituted anilines. *Mutation Research* 77(4): 317-326.