

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Toxicología y Farmacología



**EFFECTOS DEL AMITRAZ SOBRE
NEUROTRANSMISORES MONOAMINÉRGICOS
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA.**

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

Javier del Pino Sans

Bajo la dirección de los doctores

María Rosa Martínez Larrañaga
Arturo Anadón Navarro

Madrid, 2010

- ISBN: 978-84-693-0711-3

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**EFFECTOS DEL AMITRAZ SOBRE
NEUROTRANSMISORES MONOAMINERGICOS
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA**

TESIS DOCTORAL

JAVIER DEL PINO SANS

Madrid, 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**EFECTOS DEL AMITRAZ SOBRE EL CONTENIDO 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 Farmacología**

JAVIER DEL PINO SANS

Madrid, 2009

Deseo expresar mi agradecimiento:

- A la Prof. Dra. María Rosa Martínez-Larrañaga, Catedrática de Toxicología y Directora del Departamento de Toxicología y Farmacología, 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.

- Al Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro, Catedrático de Toxicología, 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 compañeros del Equipo de Investigación de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid, por la ayuda recibida y muy especialmente a los profesores: Dr. Miguel Capó Martí, Dra. María Jesús Díaz Plaza, Dra. María Aranzazu Martínez, Dra. Maria Teresa Frejo Moya, Dra. Margarita Lobo Alonso, Dra. Marta Martínez Caballero, Dra. María Virginia Caballero González, Dr. Pedro Díaz Peralta, Dña. Irma Ares Lomban, D. Felipe Gamboa Ruiz, D. Frank Suárez Sánchez, Dr. René Pitta Pitta, Dña. Irene Nieto Escribano, Dña Eva Ramos Alonso, D. Pedro Ramos Segura, Dña. Rocio Vejarano Aguado, y Dña. María Angeles Corral Campos.

- A la Dra. Pilar Bringas de la Lastra, Directora-Técnica responsable del Animalario de la Universidad Complutense de Madrid (Centro de Asistencia a la Investigación), y a D. Juan José García Muñoz del Departamento de Toxicología y Farmacología de La Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por su valiosa ayuda en el cuidado y manejo de los animales utilizados en el presente trabajo.

- A mi familia y en especial a mi madre, por su apoyo incansable e inculcación del amor al conocimiento.

- A Paula, por estar a mi lado, apoyándome durante este periodo de mi vida académica aportando tu granito de arena.

ÍNDICE

| | |
|---|---------------------------|
| <u>1. INTRODUCCIÓN</u> | Página 8 |
| 1.1. AMITRAZ | 8 |
| 1.2. RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD | 12 |
| 1.3. MECANISMO DE ACCIÓN | 15 |
| 1.4. FISIOPATOLOGÍA Y CUADRO CLÍNICO | 24 |
| 1.5. ESPECTRO DE ACCIÓN Y USOS | 29 |
| 1.6. TOXICOCINÉTICA Y METABOLISMO | 33 |
| 1.7. TOXICIDAD EN MAMÍFEROS | 36 |
| 1.7.1. Neurotoxicidad | |
| 1.7.2. Toxicidad para el hombre | |
| 1.8. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO | 64 |
| <u>2. MATERIAL Y MÉTODOS</u> | 69 |
| 2.1. PROTOCOLO Y DISEÑO EXPERIMENTAL | 69 |
| 2.2. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE SEROTONINA (5-HT), DOPAMINA (DA), NORADRENALINA (NA) Y SUS METABOLITOS | 79 |
| 2.2.1. Determinación analítica de 5-HT y su metabolito el ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA) | |
| 2.2.2. Determinación analítica de NA y de DA y sus metabolitos el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA) | |
| 2.2.3. Determinación analítica del metabolito de la NA el 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) | |
| 2.3. ANÁLISIS DE DATOS | 86 |
| 2.4. REACTIVOS Y EQUIPOS | 86 |
| 2.4.1. Reactivos | |
| 2.4.2. Equipos | |

| | |
|---|------------|
| <u>3. RESULTADOS</u> | 91 |
| 3.1. EFECTO DEL AMITRAZ EN RATAS DE 30 DÍAS DE EDAD | 91 |
| 3.1.1. Efecto del amitraz sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el SNC | |
| 3.1.2. Efecto del amitraz sobre el contenido de DA, DOPAC y HVA en el SNC | |
| 3.1.3. Efecto del amitraz sobre el contenido de NA y MHPG en el SNC | |
| 3.2. EFECTO DEL AMITRAZ EN RATAS DE 60 DÍAS DE EDAD | 112 |
| 3.2.1. Efecto del amitraz sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el SNC | |
| 3.2.2. Efecto del amitraz sobre el contenido de DA, DOPAC y HVA en el SNC | |
| 3.2.3. Efecto del amitraz sobre el contenido de NA y MHPG en el SNC | |
| 3.3. EFECTO DEL AMITRAZ EN RATAS DE 60 DÍAS DE EDAD NACIDAS DE MADRES TRATADAS CON AMITRAZ DURANTE EL PERIODO DE PREÑEZ Y LACTACIÓN. | 132 |
| 3.3.1. Efecto del amitraz sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el SNC | |
| 3.3.2. Efecto del amitraz sobre el contenido de DA, DOPAC y HVA en el SNC | |
| 3.3.3. Efecto del amitraz sobre el contenido de NA y MHPG en el SNC | |
| <u>4. DISCUSIÓN</u> | 156 |
| <u>5. CONCLUSIONES</u> | 174 |
| <u>6. BIBLIOGRAFÍA</u> | 180 |

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. AMITRAZ

A pesar del beneficio que suponen los plaguicidas para la sociedad, se ha visto que muchas de estas sustancias constituyen un grave riesgo tóxico para el hombre, de ahí que haya surgido la necesidad de desarrollar compuestos que presenten acción selectiva sobre invertebrados y, por tanto, una menor toxicidad para los mamíferos y las aves. Esto ha llevado al desarrollo de moléculas como el amitraz, que es un pesticida formamidina. Las formamidinas (Figura 1), que fueron 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 funguicidas, antihelmínticas y herbicidas, hasta acciones insecticidas y acaricidas. Además también se ha visto que presentan actividades farmacológicas (HOLLINWORTH, 1976).

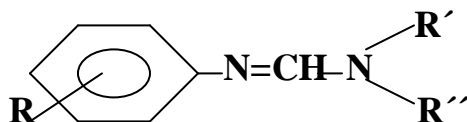


Figura 1. Estructura química general de las formamidinas

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 con 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).

Las dos formamidas principalmente comercializadas y de mas amplio uso son el clodimeformo y el amitraz; efectos sobre el sistema nervioso del clodimeformo han sido ampliamente estudiados, sin embargo poco es conocido de la función del amitraz sobre el SNC de mamíferos (MOSER *et al.*, 1987). El amitraz fue patentado por primera vez en 1971, registrado como pesticida de grado técnico en 1975 (USEPA, 1996), y comercializado en 1981. La EPA (Environmental Protection Agency) clasifica al amitraz como clase III, nocivo (USEPA, 1996). Actualmente se utiliza como insecticida, acaricida y como medicamento de uso veterinario para la prevención y tratamiento de infestaciones por ectoparásitos. Es activo por contacto, siendo efectivo contra un gran número de insectos y ácaros (HOLLINGWORTH, 1976; HOLLINGWORTH y LUND, 1982; MULLER, 1983; FARMER, y SEAWRIGHT, 1989; USEPA, 1996; BURROWS, 2000). A pesar de que el amitraz tiene una acción con cierto carácter selectivo sobre insectos, la poca experiencia y los escasos estudios sobre toxicidad publicados ha llevado a que varios autores y Agencias internacionales muestren su preocupación por los posibles efectos adversos que puede tener sobre la salud del hombre (USEPA, 1996; JMPR, 1998).

El amitraz [*N*-metilbis (2,4-xililiminometil) amina] (Figura 2) como ya se ha indicado pertenece al grupo de las formamidas, las cuales se caracterizan por la presencia de un radical fenilamida y presenta una masa molecular de 293. Su número CAS (*Chemical Abstracts Service*) es 33089-61-1, el número ONU es 1993. Sus principales características físico-químicas se detallan en la Tabla 1. El amitraz (grado técnico) es un sólido cristalino de color pajizo o color hueso y con olor ligero a amina. Es poco soluble en agua y muy soluble en solventes orgánicos; estable a temperatura ambiente. El amitraz se degrada en medio ácido formando 2,4-dimetilfenilformamida (USEPA, 1996; PIERPOINT *et al.*, 1997). En la Tabla 2 se especifica la solubilidad del amitraz en distintos tipos de solventes. En la Tabla 3 se especifican los distintos tipos de formulaciones registradas.

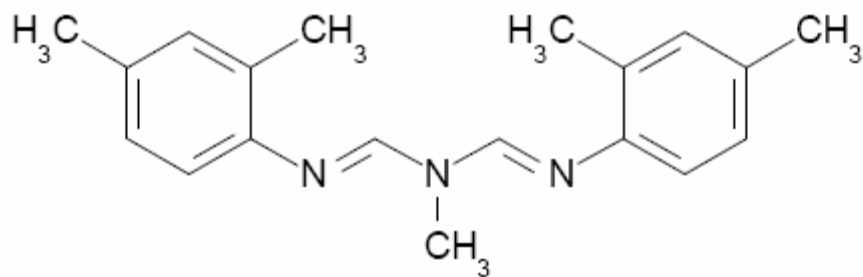


Figura 2. Estructura química del amitraz (C₁₉H₂₃N₃).

Tabla 1. Principales propiedades físico-químicas del amitraz (USEPA, 1996).

| | |
|-------------------------|----------------------------------|
| Punto de fusión | 86 – 87°C |
| Densidad | 1.128 g/mL a 20°C |
| Presión de vapor | 3.4 x 10 ⁻⁴ Pa a 25°C |

Tabla 2. Solubilidad del amitraz en distintos disolventes (USEPA, 1996; JMPR, 1998).

| Disolvente | Solubilidad (g/L) |
|-------------------|--------------------------|
| Agua | < 1 µg/mL |
| Acetona | 500 |
| xileno | 666 |
| Metanol | 23,8 |

Tabla 3. Tipos de formulaciones registradas (USEPA, 1996)

| Tipos de formulación |
|---|
| Formulación sólida inespecífica para manufacturación: 97% |
| Concentrado emulsificable: 12,5% y 19,8% |
| Polvos humectables: 50% |
| Collar impregnado: 9% |

Una propiedad muy significativa de las formamidas es su carácter básico. El amitraz es una base débil y el intento de formación de sales no ha sido exitoso, conduciendo a su descomposición. En general, se acepta que en las formamidas la protonación tiene lugar en el nitrógeno imínico (HARRISON *et al.*, 1973; HOLLINGWORTH, 1976).

La descomposición en agua (hidrólisis) del amitraz ha sido estudiada con detalle. El amitraz a continua agitación sobre un rango de pH de 2 a 12 y a 20°C muestra el modelo de hidrólisis mostrado en la Tabla 4 (HARRISON *et al.*, 1973).

Tabla 4. Descomposición del amitraz en agua.

| pH | Periodo de agitación | % Descomposición |
|-----------|-----------------------------|-------------------------|
| 2 | 1 día | 86 |
| 4 | 2,5 días | 80 |
| 6 | 12 semanas | 20 |
| 8 | 12 semanas | 5 |
| 10 | 12 semanas | 15 |
| 12 | 12 semanas | 20 |

La descomposición mostrada a pH neutro, aunque muy pequeña, puede sin embargo resultar en cambios observables en la forma física del material sólido almacenado durante un periodo de tiempo. La reacción de hidrólisis tiene lugar sobre la superficie de materiales que contienen trazas de humedad, dando como resultado la formación de una fase superficial de menor punto de ebullición y un incremento del contenido en agua. La prevención de la descomposición por la presencia de trazas de agua en los materiales puede ser conseguida por la adición de un agente estabilizante tal como sílice gel, o paraformaldehído. En el caso de concentrados emulsionables, la inclusión de epiclorhidrina, previene la hidrólisis (HARRISON *et al.*, 1973). Los compuestos 1,3,5-triazapenta-1,4-dienos (Figura 3), como el amitraz, también reaccionan con alcoholes (particularmente con metanol y etanol) a elevadas temperaturas. Pueden dar reacciones de hidrólisis, alcoholisis y aminolisis (HARRISON *et al.*, 1973).

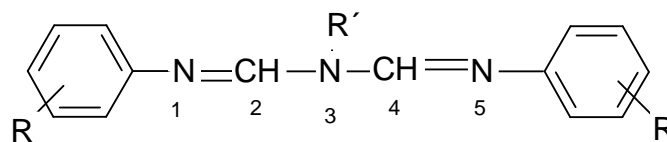


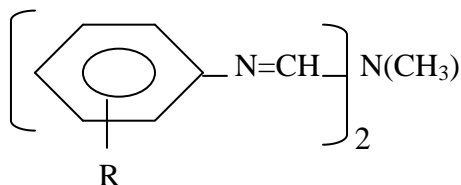
Figura 3. Estructura química de los 1,3,5-triazapenta-1,4-dienos.

1.2. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Una de las más significativas características de las formamidinas, es el alto grado de especificidad para la actividad acaricida e ixodicida. Todas las moléculas son un disustituido-fenil derivado con una combinación de sustituyentes limitada a cloro y metilo (Figura 1). 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 bastante inactivos, o solo presentan 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, ciclopropil, butilo o bencilo, da lugar a una disminución de la actividad o incluso a la eliminación completa de esta. 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 presenta 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 5. Los compuestos monosustituidos fueron inactivos. Aunque el amitraz, 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, incluso aunque estos ácaros sean altamente sensibles al mismo modelo de sustitución en el

clodimeformo. La sustitución por halógenos en la posición *orto* (XI-XIII) origina actividad contra garrapatas pero no contra ácaros (HOLLINGWORTH, 1976).

Tabla 5. Efecto sobre *Boophilus microplus* y sobre *Tetranychus urticae* de diferentes fenilsustituyentes triazapentadienos simétricos de la familia del amitraz.



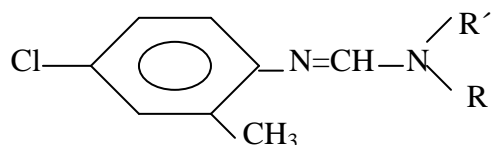
| Compuesto | R | LC ₅₀ , mg/L | |
|-----------|-----------------------------|------------------------------------|---|
| | | <i>Boophilus microplus</i> (larva) | <i>Tetranychus urticae</i> (huevos/ larvas) |
| III | 2,4-diCH ₃ | 3 | 2 |
| IV | 2,3-diCH ₃ | 40 | >1000 |
| V | 2,3,4-triCH ₃ | 30 | >1000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

moléculas. La Tabla 6, muestra la variación en la sensibilidad de la especie de acaro *Tetranychus urticae* y de garrapata *Boophilus microplus* a varios N'-4-cloro-*o*-tolil formamidas 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 dipropil (XV) compuesto tiene 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-demetil análogo) es extraordinariamente alta, aproximadamente 700 veces mas alta para XVII. Aunque el N-demetil 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-demetil derivado (XVII) (KNOWLES y ROULSTON, 1973).

En el amitraz, las mayores actividades contra garrapatas del ganado y ácaros son encontradas con el N-metil compuesto y largas cadenas alquílicas también reducen o elimina la actividad (HOLLINGWORTH, 1976). Sin embargo, considerando la relación estructura-actividad de muchos de estos análogos, la activación por conversión de una forma N,N-dialquí a un forma N-monoalquí puede tener una influencia significativa sobre la actividad, especialmente frente a garrapatas (HOLLINGWORTH, 1976).

Tabla 6. Variación de la actividad frente a la garrapata *Boophilus microplus* y al acaro *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 ₅₀ ^a (µg/garrapata) |
|-----------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------|--|
| | | | % solución. | % mortalidad | |
| II | CH ₃ | CH ₃ | 0,01 | 100 | 0,65 |
| XIV | C ₂ H ₅ | C ₂ H ₅ | 0,05 | 80 | --- |
| XV | n-C ₃ H ₇ | n-C ₃ H ₇ | 0,05 | 85 | 0,90 |
| XVI | CH ₃ | CH ₂ SCH ₃ | --- | --- | 0,012 |
| XVII | H | CH ₃ | 0,01 | 100 | 0,0009 |
| XVIII | H | C ₂ H ₅ | --- | --- | 0,03 |
| XIX | H | n-C ₃ H ₇ | 0,05 | 99 | --- |
| XX | H | i-C ₃ H ₇ | --- | --- | 0,40 |
| XXI | H | n-C ₄ H ₉ | --- | --- | 0,07 |
| XXII | H | i-C ₄ H ₉ | 0,05 | 85 | 0,12 |
| XXIII | H | s-C ₄ H ₉ | 0,05 | 80 | --- |

^aDosis la cual causa que el 50% de garrapatas se desprendan del hospedador.

1.3. MECANISMO DE ACCIÓN

La actividad biológica del amitraz puede ser atribuida por las siguientes acciones:

Agonista parcial del receptor α₂

Inicialmente se estableció una hipótesis sobre el papel del receptor α₂, en la toxicidad neuroendocrina de este insecticida 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. Esta hipótesis fue, subsecuentemente reforzada por estudios experimentales, los cuales revelaron que el amitraz provoca similares efectos observados con el agonista selectivo de los receptores α₂ clonidina, como por ejemplo: disminución de la actividad motora, alteración de la función visual, hipotensión, entre otros

(COSTA y MURPHY, 1987; COSTA *et al.*, 1988; ALTOBELLI *et al.*, 2001). Además la administración simultánea de yohimbina, antagonista del receptor α_2 , revierte los efectos del amitraz sobre la función cardíaca, motilidad intestinal, apertura pupilar y presión sanguínea entre otros (HSU y KAKUK, 1984; HSU y LU, 1984; HSU y HOPPER, 1986; HSU *et al.*, 1986).

El receptor α_2 como adrenoceptor es una glucoproteína de membrana de unos 64kD, cuyas cadenas polipeptídicas, presentan el dominio N-terminal en el exterior de la célula y el C-terminal en el citoplasma, y en la membrana celular se disponen siete hélices transmembrana. En estos dominios transmembrana, se encuentran los aminoácidos específicos para la unión agonistas-exógenos y en las porciones intracitoplasmáticas, se encuentran los lugares de interacción con las proteínas G, que dan lugar a los procesos de señalización (MEANA y GARCÍA-SEVILLA, 1997).

Dentro de los receptores α_2 , hay varios subtipos: α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , α_{2D} . Existen agonistas selectivos de estos subtipos de receptor α_2 , como es la clonidina y el guanabenz y antagonistas también selectivos como la yohimbina (MEANA y GARCÍA-SEVILLA, 1997).

La respuesta molecular a la activación del receptor α_2 , se caracteriza por su asociación a una proteína G inhibidora, que inhibe la adenilciclase y reduce la concentración de AMP cíclico y por tanto, su acción es la contraria a la provocada por la activación de los β -adrenoceptores, al menos en las células que posean ambos receptores. También se ha comprobado que la activación a nivel presináptico, provoca la apertura de diferentes tipos de canales de potasio y la consiguiente hiperpolarización celular. En ocasiones este proceso es dependiente de calcio, pero en otras se debe a un acoplamiento directo a la proteína G activada por el receptor (MEANA y GARCÍA-SEVILLA, 1997).

Para demostrar la acción del receptor α_2 se han hecho estudios comparado la acción del amitraz y otros agonistas como clonidina y xilazina en ratas o con la administración conjunta de amitraz y agonistas o antagonistas. Uno de los experimentos realizados fue sobre receptores α_2 presinápticos de sinaptosomas hipotalámicos de rata (ALTOBELLI *et al.*, 2001). En estos experimentos, se administró amitraz a muestras con sinaptosomas perfundidos con KCl, que produce despolarización de los terminales nerviosos y liberación de noradrenalina (NA); y al administrar amitraz, se vio que se reducía la despolarización y por tanto la liberación de NA de manera dosis-dependiente, y si se administraba yohimbina se vió que el efecto inhibitor del amitraz sobre la liberación de NA era totalmente abolido, y además también se observó que el amitraz reducía el efecto inhibitorio de los agonistas α_2 clonidina y xilazina sobre la liberación de NA cuando se administraban conjuntamente. Existe evidencia de que el amitraz es un agonista parcial de receptor α_2 .

Se demostró que el amitraz inhibe la unión de clonidina a un ligando específico para el α_2 -adrenoceptor en el cerebro de rata *in vitro*, tras la administración *in vivo* de dosis de 7,5 mg/kg durante y 12,5 mg/kg de amitraz (COSTA *et al.*, 1988).

Inhibición de la enzima monoamino oxidasa (MAO)

El amitraz como otras formamidinas es un inhibidor de la MAO (AZIZ y KNOWLES, 1973; BENEZET y KONWLES, 1976). En experimentos *in vivo* e *in vitro* se demostró que el amitraz era un inhibidor dosis-dependiente de ambas isoenzimas MAO-A y MAO-B, mostrando una ligera selectividad por la MAO-B (MOSER y MACPHAIL, 1989). Esta actividad puede explicar los efectos producidos por el amitraz sobre la función motora y comportamiento (MOSER y MACPHAIL, 1989; FLÓRIO *et al.*, 1993).

Las monoamino oxidasas son flavoproteínas integradas en la membrana externa mitocondrial de neuronas, glia y otras células que deaminan oxidativamente neurotransmisores y aminas 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 aminas 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. La distribución en los tejidos muestra diferencias (SAURA *et al.*, 1992). 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 transmisores (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-dinucleotido (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, 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 barredores 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 aminas traza 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 noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT) e histamina se pueden ver en las Figura 4, 5, 6, y 7 respectivamente (MEANA y GARCÍA-SEVILLA, 1997).

Los inhibidores de la MAO-A y MAO-B tienen potencial terapéutico para el tratamiento de la depresión, Parkinson y Alzheimer. El uso de inhibidores reversibles de la MAO-A para el tratamiento de la depresión (HAEFELY *et al.*, 1992) se ha impulsado con el descubrimiento de los nuevos inhibidores de la MAO-A, moclobemida y brofaromina. Por otra parte, el potencial uso de los inhibidores de la MAO-B para el tratamiento del Parkinson ha ganado confianza a partir de un estudio clínico multicéntrico que muestra que la selergilina es capaz de retrasar la necesidad de terapia con L-dopa (TETRUD y LANGSTON, 1989).

Figura 4. Metabolismo de la noradrenalina.

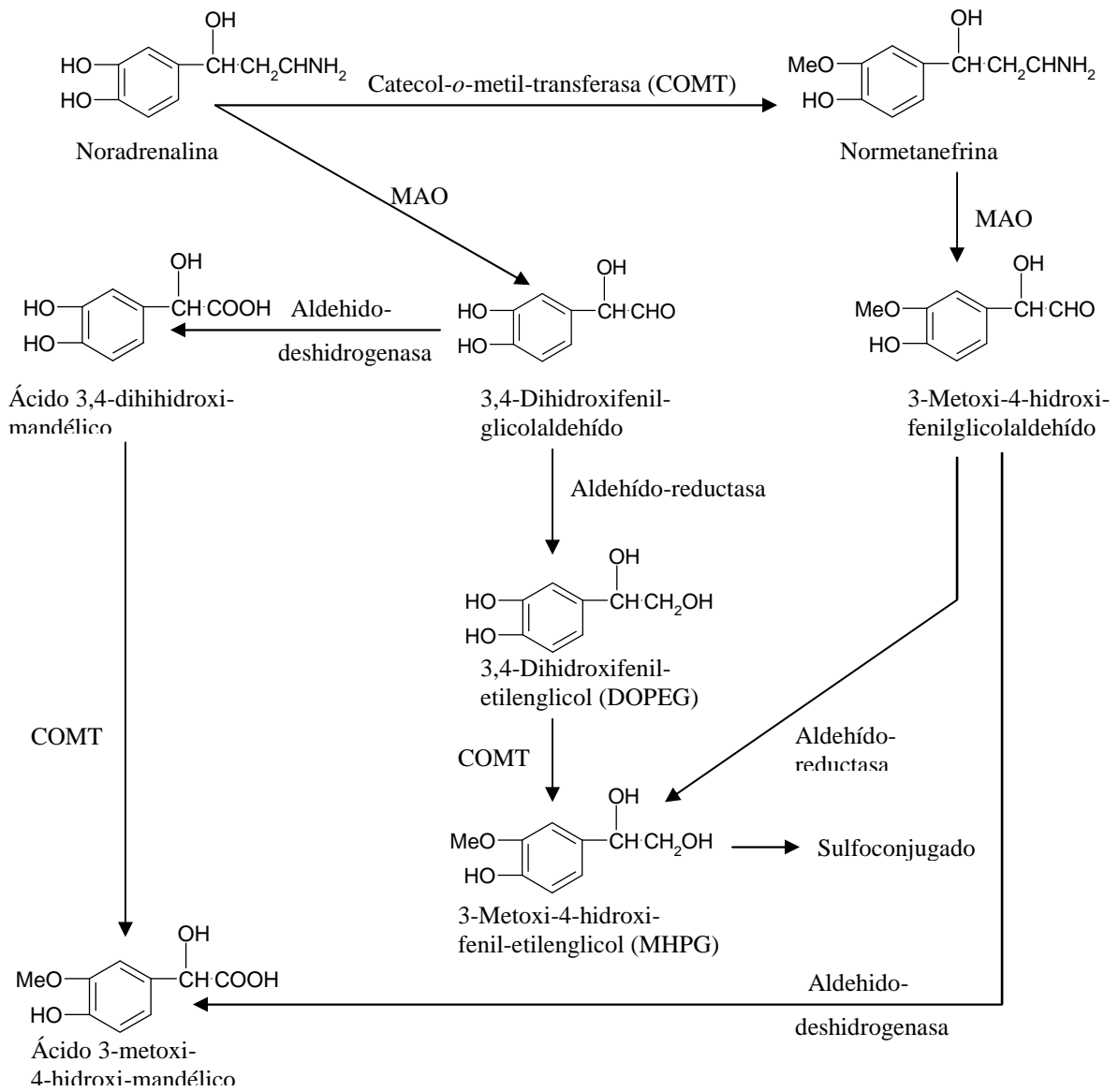


Figura 5. Metabolismo de la dopamina.

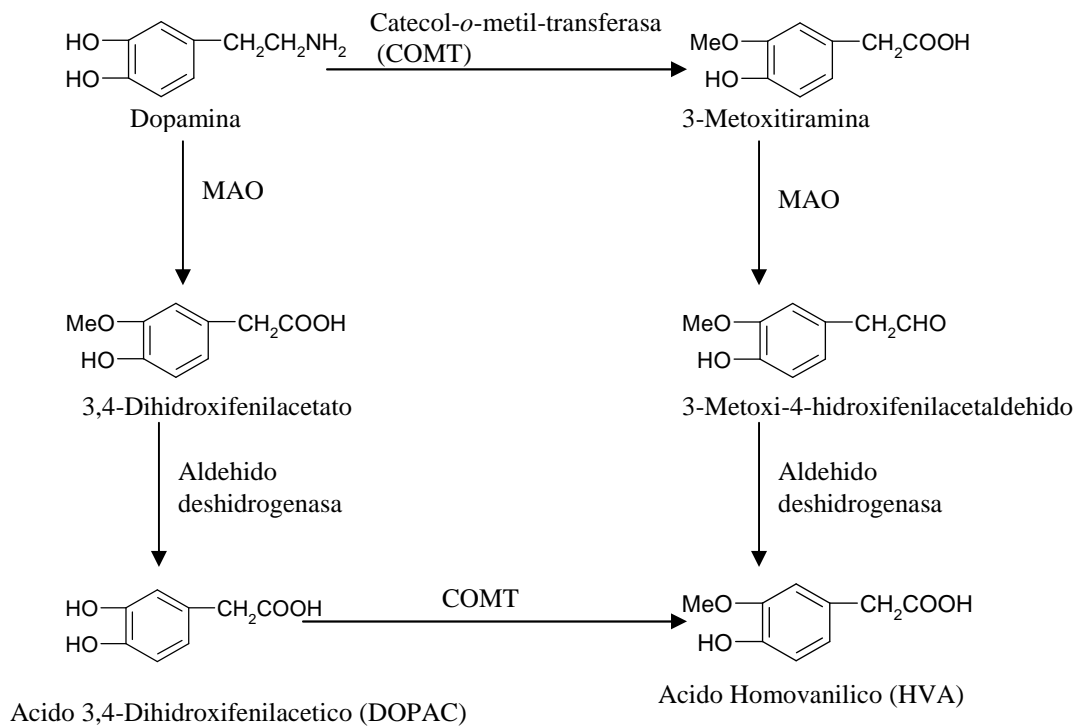


Figura 6. Metabolismo de la serotonina.

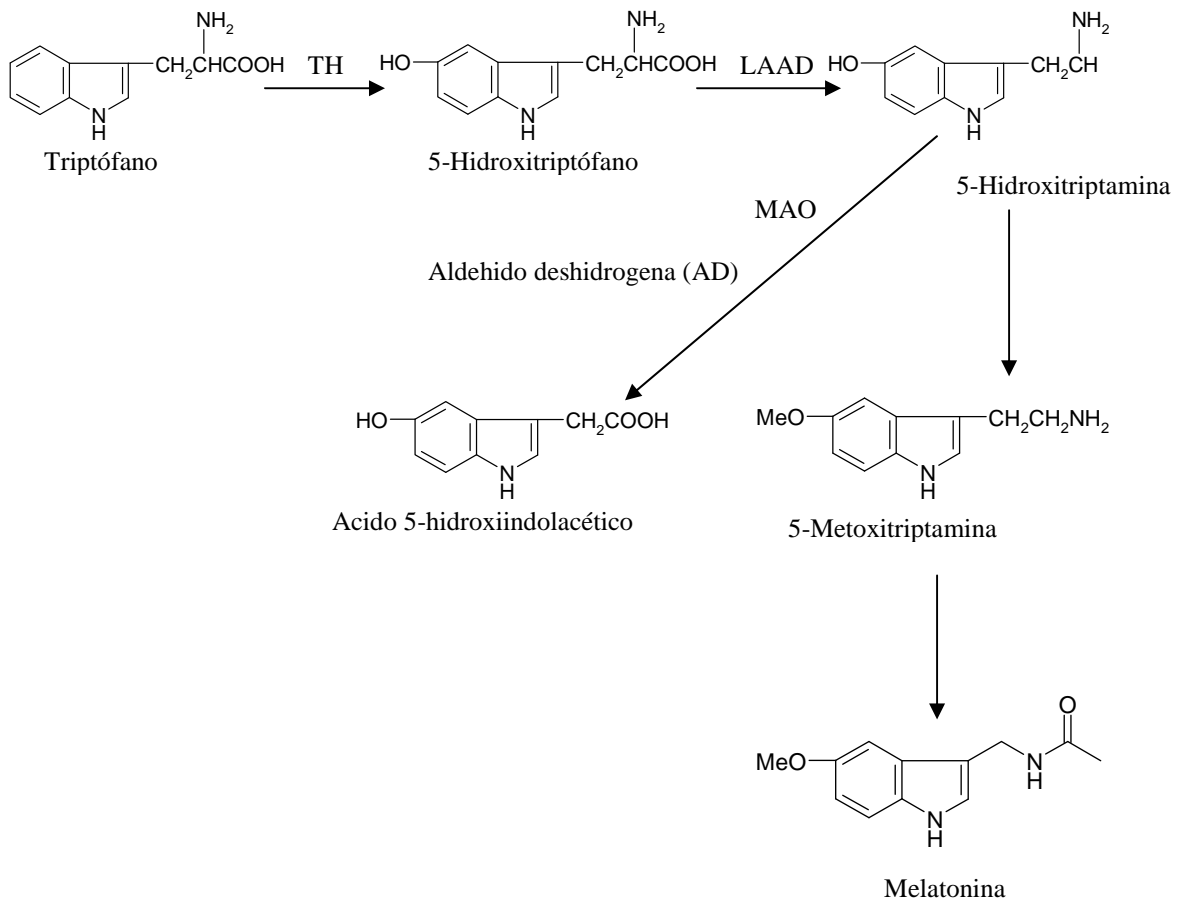
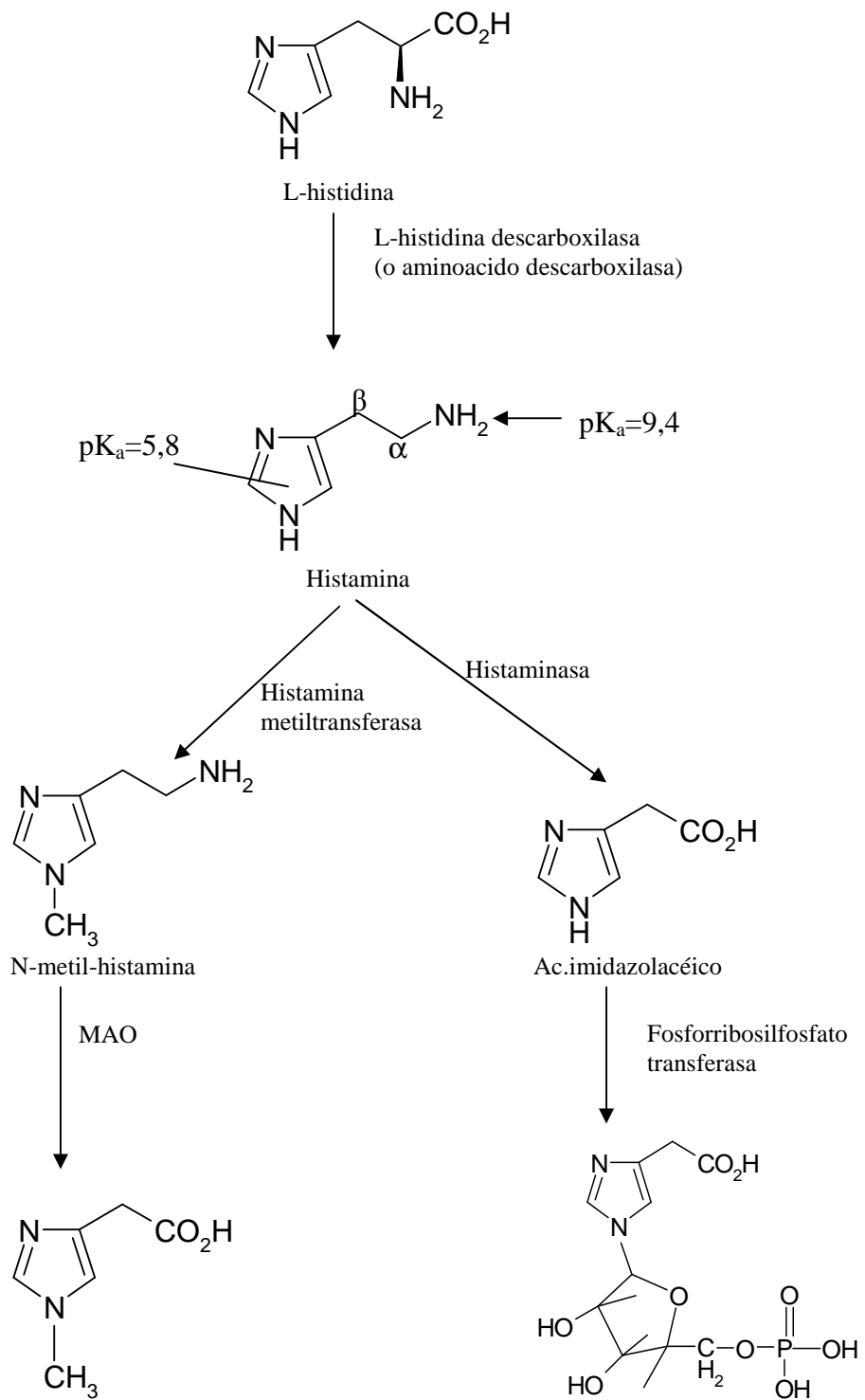


Figura 7. Metabolismo de la histamina.



Acción antagonista del receptor de histamina H₁

El amitraz, origina toxicidad en el caballo caracterizada por somnolencia y éstasis del intestino grueso (ROBERTS y SEAWRIGHT, 1979). En algunos casos, el éstasis intestinal conduce a cólico agudo, y muerte. Sobre la base de esta sintomatología se ha investigado los efectos del amitraz sobre el ileon de cobayo (PASS y SEAWRIGHT, 1982). Los resultados indicaron que el amitraz inhibe la contracción del intestino estimulada por agonistas histamínicos H₁, pero no por agonistas colinérgicos tales como acetilcolina y metacolina. La acción antihistamínica del amitraz puede ser relevante en casos de toxicidad gastrointestinal. Somnolencia y constipación son también efectos secundarios de muchos antihistamínicos (DOUGLAS, 1980), así los signos de la toxicidad del amitraz podrían ser debidos a una acción antihistamínica del insecticida. Existe evidencia de que las contracciones estimuladas por histamina del ileon de cobayo son debidas a la estimulación de receptores de histamina H₁ (ASH y SCHILD, 1966). PASS y SEAWRIGHT (1982) concluyen en su estudio que el amitraz inhibe la acción de los agonistas de histamina H₁ en ileon de cobayo y que esta acción pudiera ser relevante en el mecanismo por el que el amitraz causa éstasis intestinal en los caballos.

Inhibición de la prostaglandina sintetasa

LUND *et al.* (1978) proponen que la toxicidad de pesticidas formamidínicos en mamíferos implica colapso cardiovascular, acompañado por depresión respiratoria lo que origina una acción tipo-anestésica local. Estudios efectuados en ileon de cobayo aislado revelaron, para estos pesticidas, acciones tipo-aspirina, originando depresión de la respuesta inducida eléctricamente, que fue revertida por prostaglandina E₁, pero no por naloxona (HOLSAPPLE *et al.*, 1979; EHRENPREIS *et al.*, 1976). Estas observaciones aumentan la posibilidad de que las formamidinas pudieran tener una acción inesperada tipo-aspirina, quizás

por la capacidad de interferir con la síntesis de prostaglandinas. 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 se comporta como un agente antiinflamatorio. El amitraz originó inhibición de la síntesis de prostaglandina E₂. 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.

1.4. FISIOPATOLOGÍA Y CUADRO CLÍNICO

Fisiopatología de la intoxicación

Los efectos del amitraz se pueden explicar en función de su mecanismo de acción:

- En el SNC, por su acción presináptica, disminuye la liberación de NA, lo cual puede derivar en múltiples acciones depresoras actuando sobre la vigilia, actividad mental y psiquismo, produciendo letárgia, somnolencia, sedación y analgesia, la cual, potencia el efecto depresor de analgésicos centrales como morfina, o de anestésicos intrarraquídeos (FLOREZ y PAZOS, 1997; BONSALL y TURNBULL, 1983).
- En el sistema cardiovascular, por su acción central agonista receptor del α_2 presináptico disminuye la liberación de NA y DA y reduce el tono simpático; esto hace que el amitraz produzca hipotensión y bradicardia, en tratamientos de larga duración; aunque el amitraz a dosis elevadas puede producir vasoconstricción por estimulación adrenérgica en el

propio músculo liso vascular y por lo tanto, también puede originar hipertensión y taquicardia. Por la acción vasoconstrictora periférica produce la palidez de mucosas. La bradicardia inicialmente es debida a la activación de varios baroreceptores y posteriormente a la activación de α_2 adrenoceptores en el SNC (FLOREZ y PAZOS, 1997; KENNEL *et al.*, 1996; JONES, 1990).

- El amitraz produce midriasis que puede ser debida a la activación de receptores α_2 presinápticos del iris (HSU y KAKUK 1984; ANDRADE y SAKATE, 2003).
- El amitraz produce hipotermia por su acción central sobre el receptor α_2 a nivel del centro termorregulador del hipotálamo, y también por inhibición de la síntesis de prostaglandina E_2 (YIM *et al.*, 1978).
- El éstasis gástrico e intestinal producido por amitraz parece ser producido por su acción sobre el receptor α_2 a nivel del estomago y el ileon, inhibiendo su contracción (HSU *et al.*, 1997). También puede ser debido a la acción del amitraz como antagonista del receptor de histamina H_1 , produciendo éstasis intestinal, pero este efecto se debe principalmente por su acción sobre el receptor α_2 , porque se ha visto que este efecto es revertido por yohimbina que es un antagonista de receptor α_2 , pero solo es revertido parcialmente por 2-piridiletilamina, que es un agonista de receptor H_1 (PASS y MOGG, 1991).
- La hiperglicemia observada por amitraz puede ser debida a que el amitraz a nivel del páncreas, actúa sobre receptores $\alpha_{2A/2D}$ de células β -pancreáticas, disminuyendo la secreción de insulina y aumentando la secreción de glucagón (ABU-BASH *et al.*, 1999). Para determinar el efecto sobre la concentración de glucosa y insulina en plasma en

perros, se hizo un experimento en el que se aplicó 3,78 L (conteniendo 2,1 g) de amitraz a 5 perros, y 4 h después se administró intravenosamente glucosa (0,6 g/kg p.c.) viéndose que el habitual incremento de la concentración plasmática de insulina que sigue a la administración de glucosa fue suprimido, por tanto se suprime por amitraz al menos parcialmente la liberación de insulina (HSU *et al.*, 1986).

- A nivel sanguíneo, el amitraz produce agregación plaquetaria por su acción agonista sobre receptores α_2 de plaquetas, y por la inhibición de la síntesis de prostaglandina E_2 (la prostaglandina E_2 disminuye la agregación plaquetaria) (MEANA y GARCÍA-SEVILLA 1997; YIM *et al.*, 1978).
- El amitraz parece comportarse como un disruptor endocrino, alterando la función reproductora (el amitraz en ratas disminuye el número de crías en la camada). Actúa sobre el receptor α_2 a nivel de la sinapsis adrenérgica en hipotálamo, que controla la secreción de numerosas hormonas hipofisarias, y suprime la secreción de la hormona luteínica (LH) y de la hormona foliculoestimulante (FSH), las cuales son indispensables para la maduración de los oocitos y del folículo, así como de la secreción de progestágenos y estrógenos en hembras, y en machos en la producción de espermatozoides y la secreción de testosterona. La secreción de estas dos hormonas, está mediada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), cuya secreción es inhibida por la acción agonista sobre el receptor α_2 del amitraz y por tanto, se produce la supresión de las dos hormonas anteriormente citadas. Además, sobre la secreción de las hormonas LH y FSH, va a actuar la insulina aumentando la sensibilidad a la hormona GnRH y como el amitraz disminuye la secreción de insulina, también disminuye la sensibilidad a esta hormona, lo cual, se suma al efecto supresor de la secreción de las dos

hormonas FSH y LH (ALTOBELLI *et al.*, 2001; AL-THANI *et al.*, 2003; YOUNG *et al.*, 2005).

- La poliuria observada por amitraz se produce probablemente por un aumento de glucosa en sangre. También podría ser por inhibición de la hormona antidiurética (ANDRADE y SAKATE, 2003).
- El amitraz induce el vómito posiblemente por estimulación de centro del vómito cerca del núcleo vagal del área postrema vía receptor α_2 -adrenérgico de manera similar a como ocurre con la xilacina (potente emético por estimulación del receptor α_2 -adrenérgico en el centro del vómito) (ANDRADE y SAKATE, 2003).
- El amitraz presenta efectos anestésicos locales, por acción sobre el receptor α_2 y por inhibición de la síntesis de prostaglandina E₂ (QUEIROZ-NETO *et al.*, 1994; YIM *et al.*, 1978).
- Los efectos del amitraz sobre la función motora no esta claro si se deben a la acción sobre el receptor α_2 , o por el contrario se deben a la acción de inhibición de la MAO. Según MOSER y MCPHAIL, (1989), los efectos sobre la función motora comienzan a dosis de amitraz inferiores a 100 mg/kg, y la inhibición de la MAO se produciría a dosis superiores a 100 mg/kg en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, FLÓRIO *et al.* (1993) señalan que los efectos del amitraz sobre la función motora se deben principalmente a la inhibición de la MAO, que incrementa los niveles de catecolaminas; además su efecto sobre la función motora no puede ser revertido por yohimbina en casos de dosis de 100 mg/kg. Dado que se han observado efectos motores por amitraz a dosis inferiores a 100

mg/kg sería necesario determinar si los niveles de catecolaminas también aumentan a dosis inferiores a 100 mg/kg.

- El amitraz produce una disminución de la ingesta de alimentos, efecto que puede ser debido por una parte a los estímulos vagales que se producen por la distensión de las paredes del tracto digestivo durante el éstasis gástrico e intestinal, y a un aumento en los niveles de catecolaminas por inhibición de la MAO (FLOREZ y PAZOS, 1997).
- El amitraz produce efectos en el comportamiento tales como agresividad, hipereactividad que podrían ser debidos a un aumento de los niveles de las catecolaminas como serotonina o dopamina, por inhibición de la MAO (MEANA y GARCÍA-SEVILLA, 1997).

Cuadro clínico de la intoxicación

Los signos generales de la intoxicación con amitraz son (HUGNET *et al.*, 1996; YILMAZ y YILDAS, 2003; KALYONCU *et al.*, 2002; BONSALL y TURNBULL, 1983; YIM *et al.*, 1978; SHIN y HSU, 1994; KENNEL *et al.*, 1996; JONES, 1990; PASS y SEAWRIGHT, 1982; PASS y MOGG, 1991; FLÓRIO *et al.*, 1993; AL-THANI *et al.*, 2003; JORENS *et al.*, 1997):

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 a bajas dosis y a altas dosis midriasis.

6. Depresión respiratoria.
7. Bradicardia.
8. Hipotensión o hipertensión a dosis altas.
9. Alteraciones hematológicas (agregación plaquetaria, metahemoglobinemia y hemoconcentración).
10. Hipotermia.
11. Hiperglicemia y disminución de los niveles de insulina.
12. Palidez de las membranas mucosas
13. Poliuria.
14. Vómitos.
15. Descenso de la motilidad intestinal y distensión abdominal.
16. Efecto antinociceptivo.
17. Alteración de la fertilidad y efectos sobre el desarrollo.

1.5. ESPECTRO DE ACCIÓN Y USOS

Las formamidinas exhiben alta actividad acaricida. Los ácaros, en particular las garrapatas, en el campo de la veterinaria, y los ácaros en general en el campo de la horticultura, son la causa de las mayores 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).

Las garrapatas son el ectoparásito más importante del ganado, y se estima que el 80% de la población mundial de ganado bovino está expuesta al riesgo de ser infectada. En las zonas del mundo de mayor producción de ganado, tales como Sudamérica y Sudáfrica y Australia, la garrapata *Boophilus microplus* es la que se presenta en mayor parte. Las garrapatas son voraces chupadores de sangre y en muchos casos pueden debilitar a sus hospedadores. Además, ellas

pueden transmitir enfermedades protozoarias del ganado. Una garrapata adulta liberada sobre el pasto, puede producir mas de 2000 huevos (los cuales pueden madurar a adultos en tres semanas) asegurando la expansión de la infestación. El único método efectivo de control es el tratamiento del ganado afectado con el plaguicida aplicándolo en forma de champú para el baño, o bien por aplicación cutánea en forma de polvo (HARRISON *et al.*, 1973).

Los ácaros fitófagos están entre las más importantes pestes 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 lamina (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, diazinon)
 - carbamatos (carbaril)

- b) Para el control de ácaros fitófagos:
 - arilos con puente sulfuro (clorobenzida, tatradijon, tetrazul)
 - compuestos organoclorados
 - compuestos organofosforados
 - carbamatos
 - amidinas (clorodimeformo, formentanato)
 - derivados del dinitropentol (binapacril, dinobuton, DNOC)
 - otros (cihexatin, propargite, quinometionato)

Como se puede ver un amplio rango de compuestos de diferentes estructuras químicas han sido usadas 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 ha llevado a la introducción del uso del amitraz (HARRISON *et al.*, 1973).

El amitraz es un insecticida/acaricida usado para controlar la *Psylla pyri*, garrapatas del ganado y del perro, piojos, y ácaros de la sarna (HOLLINWORTH, 1976; DUCLOS *et al.*, 1994; ESTRADA-PENA y ASCHER, 1999; ESTRADA-PENA y REME, 2005). En la práctica agrícola, el grupo diana del amitraz serían los ácaros fitófagos, y en la práctica ganadera las garrapatas. Además, el amitraz presenta también actividad en un grupo de insectos de importancia económica, tal como los Lepidópteros y algunos Hemípteros (WEIGHTON *et al.*, 1973).

La toxicidad del amitraz para la mayoría de los otros insectos es bastante baja, y en general, insectos beneficiosos como los predadores, parásitos, y polinizadores no son severamente afectados bajo condiciones normales de uso (LINGREN *et al.*, 1972; JOHANSEN, 1972; WEIGHTON *et al.*, 1973). Así las arañas predadoras parecen ser relativamente insensibles, aunque los ácaros predadores son claramente sensibles (WESTIGARD *et al.*, 1972; CROFT y McGROARTY, 1973).

El amitraz también presenta toxicidad a los vertebrados. El valor de la CL₅₀ (96h) para peces está en un rango de 1 a 10 (µg/ml), para aves (codornices y patos) presentan una DL₅₀ de 100 µg/g en la dieta, y los mamíferos son más resistentes (HOLLINGWORTH, 1976).

Se ha estudiado la actividad del amitraz frente a un amplio rango de especies de ácaros e insectos (HARRISON *et al.*, 1973). El amitraz es activo sobre ácaros como la araña roja (*Tetranychus urticae*), afidos, y contra la cochinilla roja australiana (*Aonidiella aurantii*); también es activo frente a la araña roja europea (*Panonychus ulmi*). El amitraz posee actividad por contacto, pero no tiene actividad sistémica, aunque si alguna actividad translaminar (HOLLINGWORTH, 1976).

El amitraz ha sido evaluado para el control del acaro araña roja y especies relacionadas en mas de treinta países, cubriendo también un amplio rango de resistencias a acaricidas, cultivos y condiciones climáticas. Los resultados indican que con la aplicación de amitraz 0,02-0,04% sobre *Panonychus* spp el control ha sido mejor o comparable al de otros acaricidas disponibles. A diferencia del *Tetranychus* spp, el *Panonychus* spp esta confinado principalmente a cultivos de fruta (HARRISON *et al.*, 1973).

Amitraz también ha tenido una excelente eficacia para el control de *Tetranychus* spp en peras, ciruelas, pepinos, tomates, judías, pimientos, vides y ornamentales (HARRISON *et al.*, 1973). También el amitraz es activo frente al ácaro amarillo de las vides (*Eotetranychus carpini*), a los ácaros de la herrumbre (*Eriophidae*) de las manzanas y cítricos, a los ácaros de la zarzamora (*Eriophyes essigi*) y a los ácaros de las fresas (*Steneotarsonemus latus*) (HARRISON *et al.*, 1973).

El amitraz es formulado en forma de polvos humectantes y concentrados emulsionables para su uso en frutas, concentrados solubles y soluciones para uso en algodónes y aerosoles y collares impregnados para su uso en animales. También se ha registrado una formulación de concentrado emulsionable para el tratamiento dérmico del ganado vacuno y porcino. El amitraz es aplicado como un aerosol concentrado sobre peras, por fumigación sobre algodónes, y como un aerosol húmedo o de baja presión manual sobre cerdos, ganado vacuno, y ganado

lechero vacuno (USEPA, 1996). Los collares impregnados se usan para el control de garrapatas en perros (HUGNET *et al.*, 2001; MEDLEAU y WILLESEMSE, 1995a,b; KWOCHKA *et al.*, 1985; PARADIS, 1999; SHIPSTONE, 2000). También existen productos con amitraz para uso domestico.

1.6. TOXICOCINÉTICA Y METABOLISMO

El amitraz se metaboliza ampliamente en mamíferos y en plantas (LEWIS, 1971; CAMPBELL y NEEDHAM, 1984a,b; CHALLIS, 1990; HORNISH y NAPIER, 1983; PHILLIPS *et al.*, 1987). Se han realizado estudios sobre el metabolismo del amitraz en varias especies, incluyendo humanos, babuinos, perros, ratas, y ratones. En todas las especies, el amitraz fue rápidamente metabolizado, tras la administración oral, formandose al menos seis metabolitos, entre los cuales están el N´-(2,4-dimetilfenil)-N-metil formamidina (BTS-27271), 2,4-dimetilfenil formamida (BTS-27919) y el 2,4-dimetilanilina (BTS-24868) (Figura 8). El principal metabolito del amitraz es la N´-(2,4-dimetilfenil)-N-metilformamidina (BTS27271) que es mas activo y toxico que el propio amitraz (KNOWLES y BENEZET, 1981; PASS y MOGG, 1995). El metabolito 2,4-dimetilanilina (BTS-24868), tiene actividad metahemoglobinizante en perros y presumiblemente en el hombre (JONES, 1990). La excreción de los metabolitos tiene lugar principalmente en orina durante 48 h (62%-82% en todas las especies) y en menor extensión en heces (9-39%), sin observarse el compuesto padre en orina. La proporción de varios metabolitos recuperados de la orina, fue similar en todas las especies. Los mayores niveles de residuos de amitraz en tejidos, en animales, fueron encontrados desde los 3 a 4 días en el hígado, bilis, riñón, glándulas adrenales, y áreas pigmentadas de los ojos (CAMPBELL y NEEDHAM, 1984a,b). Las principales vías metabólicas del amitraz en animales se resumen en la Figura 8 (KNOWLES y BENEZET, 1981; JMPR, 1998).

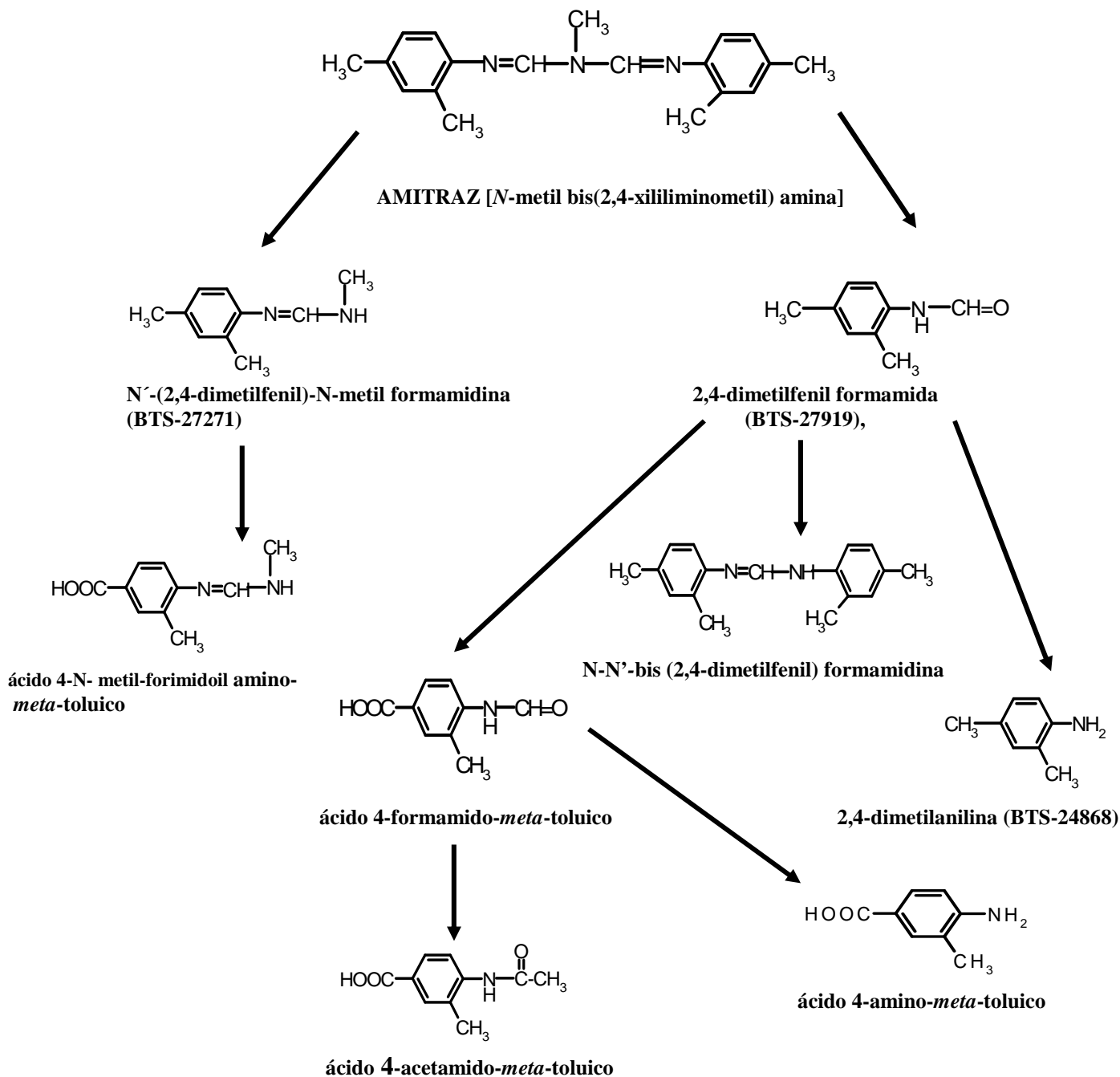


Figura 8. Metabolismo del amitraz en animales y en plantas

Con respecto a la toxicocinética del amitraz, únicamente se han realizado 2 estudios en el perro, pony y oveja (HUGNET *et al.*, 1996; PASS y MOGG, 1995). En los perros se ha observado que el amitraz se absorbe rápidamente por vía oral presentándose el comienzo de los signos tóxicos aproximadamente una hora después de la ingesta, y con concentraciones plasmáticas de alrededor de 5 mg/mL.

El rango de concentraciones plasmáticas tóxicas es aproximadamente entre 5 y 25 mg/ml. Presenta una semivida plasmática de eliminación prolongada, de aproximadamente 24 horas, la cual no es modificada por la administración de los antagonistas atipamezol y yohimbina (HUGNET *et al.*, 1996). En el estudio cinético realizado por HUGNET *et al.*, (1996) en seis perros a los que se les administró una dosis de 100 mg/kg p.c. por vía oral, se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos del amitraz en el perro, que se reflejan en la Tabla 7.

Tabla 7. Farmacocinética del amitraz tras dosis única oral de 100 mg/kg p.c. en perros.

| Variable | Valor Medio | Desviación Estándar |
|---|-------------|---|
| AUC _{0-48h} (mg/h/L) | 265,3 | 12,3 |
| AUMC _{0-48h} (mg/h/L) | 4373,2 | 145,6 |
| T _{e1/2} (h) | 23,4 | 2,3 |
| K _{eliminación} (h ⁻¹) | 0,029 | 0,003 |
| T _{max} (h) | 5 | 0,7 |
| C _{max} (mg/mL) | 20,7 | 2,3 |
| AUC _{0-48h} (mg /h/ L) = área bajo la curva desde 0 a 48 horas después de la administración AUMC _{0-48h} (mg/h/L) = área bajo la curva media desde 0 a 48 horas después de la administración T _{max} (h) = tiempo en alcanzar la concentración plasmática máxima | | K _{eliminación} (1/h) = constante de eliminación C _{max} (mg/mL) = concentración plasmática máxima T _{e1/2} (h) = semivida plasmática de eliminación |

Por otra parte, PASS y MOGG (1995) administraron amitraz y su metabolito activo BTS-27271 vía intravenosa a ponis y ovejas en dosis equimoleculares de 1 mg/kg p.c. y 0,68 mg/kg p.c., respectivamente. El amitraz no fue detectado en el plasma de la oveja después de 5 minutos de la administración, pero persistió en el plasma de pony hasta al menos 90 minutos. Dada la rápida eliminación plasmática del amitraz en ovejas, solo se determinó los parámetros farmacocinéticos del metabolito BTS-27271. Para los ponis, debido a la mayor persistencia del amitraz en plasma, se determinaron sus parámetros farmacocinéticos, y también se determinaron los de su metabolito BTS-27271. Los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos en este estudio, se reflejan en la Tabla 8.

Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos del amitraz y BTS-27271 en ponis y ovejas tras administración intravenosa a dosis de 1 y 0,68 mg/kg, respectivamente.

| Parámetros | Ponis | | Ovejas |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Amitraz | BTS-27271 | BTS-27271 |
| A (ng/mL) | 6646 ± 841 | 486 ± 52 | 638 ± 75 |
| B (ng/mL) | 190 ± 94 | 210 ± 50 | 102 ± 21 |
| α (min ⁻¹) | 0,39 ± 0,10 | 0,147 ± 0,01 | 0,160 ± 0,014 |
| β (min ⁻¹) | 0,022 ± 0,008 | 0,013 ± 0,01 | 0,015 ± 0,003 |
| t _{1/2α} (min) | 1,98 (0,89-3,31) | 5,89 (2,02-11,9) | 4,39 (3,20-4,96) |
| t _{1/2β} (min) | 39,4 (13,0-85,3) | 55,1 (41,5-72,8) | 50,8 (28,9-92,9) |
| AUC (ng/min/mL) | 26519 (18820-43761) | 26519 (15452-25291) | 11138 (7497-14681) |
| V _{d(area)} (L/kg) | 2,14 (0,78-2,92) | 2,14 (1,61-4,54) | 4,80 (2,80-6,98) |
| Cl _b (mL/min/kg) | 37,7 (22,9-53,1) | 37,7 (26,9-44,0) | 61,1 (46,3-90,7) |
| C _p ^o (ng/mL) | 6650 (4728-9792) | 6650 (452-970) | 726 (614-1036) |
| V _c (mL/kg) | 150 (102-212) | 1013 (701-1505) | 937 (656-1107) |
| MRT (min) | 18,4 (9,6-37,3) | 62,9 (52-89,9) | 48,9 (29,2-94,9) |
| K ₁₂ (min ⁻¹) | 0,086 (0,039-0,253) | 0,043 (0,011-0,173) | 0,071 (0,050-0,097) |
| K ₂₁ (min ⁻¹) | 0,024 (0,011-0,085) | 0,040 (0,018-0,149) | 0,033 (0,022-0,072) |
| K _{el} (min ⁻¹) | 0,251 (0,154-0,520) | 0,037 (0,029-0,050) | 0,065 (0,050-0,084) |

Valor medio ± ESM (n=5); En paréntesis se refiere al rango.

1.7. TOXICIDAD EN MAMÍFEROS

Toxicidad aguda

Se ha estudiado la DL₅₀ del amitraz por vía inhalatoria, dérmica y oral. En la Tabla 9 se indican los valores de DL₅₀ para el amitraz (PATTON y SUTTON, 1971; SHAW, 1971, 1973a; SUTTON y WILLIAMS, 1972; PATTON, 1973; BERCZY *et al.*, 1972, 1973) obtenidos de informes remitidos a la EPA (USEPA, 1996) y a la Organización Mundial de la Salud (OMS) (JMPR, 1998).

Tabla 9. Toxicidad aguda del amitraz.

| ESPECIE | VÍA | DL ₅₀ (mg/kg) o CL ₅₀ (mg/m ³ aire) |
|---------|------------------|--|
| Ratón | Oral | >1600 |
| Ratas | Oral | 600 |
| Rata | Dérmica | >1600 |
| Rata | Inhalatoria (6h) | 65 mg/m ³ |
| Rata | Intraperitoneal | 800 |
| Cobaya | Oral | 400-800 |
| Perro | Oral | 100 |
| Conejo | Oral | 100 |
| Conejo | Dérmica | 200 |
| Babuino | Oral | 100-250 |

El amitraz no produce sensibilización potencial en cobayos que reciben vía oral 500 mg de amitraz, grado técnico, pureza 99%, (CLOUZEAU, 1992) y no se ha encontrado irritación local después de una única aplicación de amitraz (0,5 g de amitraz, grado técnico, en ojos o piel en conejos) (LIGGETT y SMITH, 1987). Sin embargo hubo evidencias de hipersensibilidad retardada por contacto después de la aplicación de amitraz a dosis de 15-30 % v/v, amitraz grado técnico, tanto tópica como intra-dérmicamente (KYNOCH y PARCELL, 1988).

Los valores de DL₅₀ o CL₅₀ de los metabolitos de amitraz obtenidos en estudios confidenciales remitidos a la OMS (JMPR, 1998) se indican en la Tabla 10.

Tabla 10. Toxicidad aguda de los metabolitos del amitraz

| ESPECIE | VIA | DL ₅₀ o CL ₅₀ (mg/ kg de peso o mg/m ³ aire) | REFERENCIA |
|---|------|---|--------------------------|
| N^o-(2,4-dimetilfenil)-N-metil formamida (BTS-27271) | | | |
| Ratón | Oral | 150 | SUTTON (1970a) |
| Rata | Oral | 200 | SUTTON (1970b) |
| Perro | Oral | >20 | MORGAN & WILLIAMS (1974) |
| ácido 4-Amino-<i>meta</i>-toluico | | | |
| Ratón | Oral | >1600 | SHAW & WILLIAMS (1973a) |
| Rata | Oral | >1600 | SHAW & WILLIAMS (1973b) |
| 2,4-Dimetilfenil formamida (BTS-27919) | | | |
| Rata | Oral | 1600 | SHAW (1973b) |

Toxicidad subcrónica y crónica

En la Tabla 11 se resume la toxicidad subcrónica y crónica del amitraz, datos recogidos de informes enviados a la EPA (USEPA, 1996) y la OMS (JMPR, 1998); se indica, cuando procede, los valores de nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) y los valores del nivel mínimo de efecto adverso observable (LOAEL).

Tabla 11. Toxicidad subcrónica y crónica del amitraz.

| Ensayos | | Resultados | Referencia |
|--|---|---|-----------------------------|
| Duración: 13 semanas Ratonés: B6C3F ₁ Grupos de 20 ratones macho y 20 ratones hembra Amitraz grado técnico (pureza, 98,3%) | Dieta conteniendo 0; 100; 200; 400; 600; y 800 ppm (equivalente a 0; 13; 26; 53; 96; ó 110 mg/kg p.c./día en machos y a 0; 17; 35; 68; 110; ó 150 mg/kg p.c./día en hembras) | NOAEL: 100 ppm (17 mg/kg p.c./día), basándose en: (↓) ganancia de peso corporal en hembras LOAEL: 400 ppm (53 mg/kg p.c./día), basándose en: comportamiento agresivo y lesiones cutáneas en machos | COLLEY <i>et al.</i> (1981) |
| Duración: 13 semanas Ratas: Wistar Grupos de 21 ratas macho y 21 ratas hembra Amitraz grado técnico (pureza, no especificada) | Administración oral por intubación gástrica de una suspensión de amitraz en una solución de celulosa al 0,4% a dosis de 0; 3; 12 mg/kg p.c. /día. Se abandonaron las dosis de 50 y 200 mg/kg p.c./día al cabo de 7 días a causa de una fuerte reducción de peso y alteraciones del comportamiento en la primera, y por debilitación e irritabilidad en la segunda | NOAEL: 3 mg/kg p.c./día LOAEL: 12 mg/kg p.c./día basándose en: (↓) ganancia de peso corporal (8%) (↓) peso absoluto (8%) y relativo (6%) del hígado | SUTTON y WILLIAMS (1971) |

(↓) disminución; (↑) aumento.

Tabla 11 (-continuación-). Toxicidad subcrónica y crónica del amitraz.

| Ensayos | | Resultados | Referencia |
|--|---|--|-----------------------------|
| Duración: 13 semanas Perros: Beagle Grupos de 2 perros macho y 2 perros hembra Amitraz grado técnico (pureza, sin especificar) | Administración oral: cápsulas de gelatina, dosis de 0; 0,25; 1; y 4 mg/kg p.c./día | NOAEL: 0,25 mg/kg p.c./día LOAEL: 1 mg/kg p.c./día, basándose en: (↑) del tamaño de los hepatocitos e hiperplasia de la zona glomerulosa de las glándulas adrenales depresión del SNC (↓) temperatura corporal. (↓) frecuencia cardíaca. (↑) glucosa y neutrofilia | PATON y WILLIAMNS (1971) |
| Duración: 2 años Perros: Beagle Grupos de 4 perros macho y 4 perros hembra Amitraz grado técnico (pureza, sin especificar) | Administración oral: cápsulas de gelatina, dosis de 0; 0,1; 0,25; y 1 mg/kg p.c./día | NOAEL: 0,25 mg/kg p.c./día LOAEL: 1 mg/kg p.c./día, basándose en: (↑) glucosa en sangre depresión del SNC (↓) temperatura corporal | MORGAN <i>et al.</i> (1973) |
| Duración: 3 semanas Conejos: Nueva Zelanda Grupos de 4-8 conejos machos y 4-8 conejos hembras Amitraz grado técnico (pureza, sin especificar) | Aplicación sobre la piel de amitraz disuelto en acetona a dosis de 0; 50; y 200 mg/kg p.c./día, cada dosis fue aplicada 6h al día durante los 21 días | NOAEL: < 50 mg/kg p.c./día LOAEL: 50 mg/kg p.c./día en machos basándose en: signos de toxicidad dérmica sedación (↓) ganancia de peso corporal. | SUTTON (1973a) |

En la Tabla 12 se resume la toxicidad subcrónica y crónica de los metabolitos del amitraz obtenidos de informes enviados a la EPA (USEPA, 1996) y la OMS (JMPR, 1998).

Tabla 12. Toxicidad subcrónica y crónica de los metabolitos del amitraz.

| Ensayos | | Resultados | Referencia |
|--|--|--|--|
| <p>Duración: 13 semanas</p> <p>Ratas: Wistar</p> <p>Grupos de 10 ratas macho y 10 ratas hembra destetadas</p> <p>N´(2,4-dimeteilfenil)-N-metil formamidina (BTS-27271) grado técnico (pureza, sin especificar)</p> | <p>Dosis orales por intubación gástrica de 0; 0,25; 1; 3; y 12 mg/kg p.c./día</p> | <p>NOAEL: 1 mg/kg p.c./día</p> <p>LOAEL: 3 mg/kg p.c./día, basándose en: (↑) del peso de los órganos: glándulas adrenales, ovarios, útero e hígado en hembras, y bazo y testículos en machos (↓) ganancia de peso corporal</p> | <p>SHAW y WILLIAMS (1975)</p> |
| <p>Duración: 21 días</p> <p>Ratas : Wistar</p> <p>Grupos de 5 ratas macho y 5 ratas hembra</p> <p>ácido 4-amino-meta-toluico grado técnico (pureza, sin especificar)</p> | <p>Dosis orales por intubación gástrica de 0; 40; 100; y 250 mg/kg p.c./día</p> | <p>NOAEL: 100 mg/kg p.c./día</p> <p>LOAEL: 250 mg/kg p.c./día, basándose en: (↑) peso del bazo en hembras (↓) ganancia de peso y de la concentración de urea en sangre en machos</p> | <p>SHAW (1975)</p> |
| <p>Duración: 13 semanas</p> <p>Perros: Beagle</p> <p>Grupos de 4 perros macho y 4 perros hembra</p> <p>N´(2,4-dimeteilfenil)-N-metil formamidina (BTS-27271) grado técnico (pureza, sin especificar)</p> | <p>Administración oral: N´(2,4-dimeteilfenil)-N-metil formamidina (BTS-27271) en solución de lactosa al 1% con dosis de 0; 0,1; 0,25; y 1 mg/kg p.c./día</p> | <p>NOAEL: 0,1 mg/kg p.c./día</p> <p>LOAEL: 0,25 mg/kg p.c./día, basándose en: depresión del SNC (↓) temperatura corporal</p> | <p>CHESTERMAN <i>et al.</i> (1973)</p> |
| <p>Duración: 13 semanas</p> <p>Perros: Beagle</p> <p>Grupos de 4 perros macho y 4 perros hembra</p> <p>ácido 4-amino-meta-toluico grado técnico (pureza, sin especificar)</p> | <p>Administración oral: cápsulas de gelatina, dosis de 0; 16; 40; y 100 mg/kg p.c./día</p> | <p>A la dosis de 100 mg/kg se encontró un aumento de la excreción urinaria de metabolitos reducidos. No se observaron efectos sobre el comportamiento, frecuencia cardiaca, electrocardiograma, temperatura corporal, peso corporal, consumo de alimentos, bioquímica sanguínea y hematocrito, peso de los órganos, o apariencia de alteracion histopatológica</p> | <p>MORGAN <i>et al.</i> (1974)</p> |

Toxicidad a largo plazo y carcinogenicidad

En la Tabla 13 se resume la toxicidad a largo plazo incluida la carcinogénesis del amitraz de datos recogidos de estudios remitidos a la EPA (USEPA, 1996) y a la OMS (JMPR, 1998).

Tabla 13. Toxicidad a largo plazo incluida la carcinogénesis del amitraz.

| Ensayos | | Resultados | Referencia |
|--|--|---|---|
| <p>Duración: 80 semanas</p> <p>Ratones: CFLP</p> <p>Grupos de 50 ratones macho y 50 ratones hembra</p> <p>Amitraz grado técnico (pureza, no especificada)</p> | <p>Dieta conteniendo 0; 25; 100; y 400 ppm (equivalente a 0; 3,75; 15; y 60 mg/kg p.c./día)</p> | <p>El amitraz produjo un aumento de la incidencia de tumores linforeticulares en hembras a la dosis de 60 mg/kg p.c./día; NOAEL para carcinogenicidad: 15 mg/kg p.c./día</p> <p>NOAEL sistémico: 3,75 mg/kg p.c./día</p> | <p>BURNETT <i>et al.</i> (1976); KAKUK (1979)</p> |
| <p>Duración: 2 años</p> <p>Ratas: B6C3F₁</p> <p>Grupos de 75 ratas macho y 75 ratas hembra, ambos de 33 días de edad</p> <p>Amitraz grado técnico (pureza, 97,9%)</p> | <p>Dieta conteniendo 0; 25; 100; y 400 ppm (equivalentes a 0; 2,3; 9,6; y 45 mg/kg p.c./día en machos y a 0; 2,6; 11; y 50 mg/kg p.c./día en hembras)</p> | <p>El amitraz aumentó la incidencia de tumores hepatocelulares en hembras a la dosis de 50 mg/kg p.c./día; NOAEL para carcinogenicidad: 11 mg/kg p.c./día.</p> <p>NOAEL sistémico: 2,3 mg/kg p.c./ día basándose en:</p> <p>Hiperqueratosis en el estómago</p> <p>Hematopoyesis en el bazo</p> <p>Alteraciones del hígado (nódulos, focos telangiectásicos y basofílicos)</p> | <p>COLLEY <i>et al.</i> (1983)</p> |
| <p>Duración: 2 años</p> <p>Ratas: Wistar</p> <p>Grupos de 12 ratones macho y 12 ratones hembra</p> <p>Amitraz grado técnico (pureza, 97,8%)</p> | <p>Dieta conteniendo 0; 15; 50; y 200 ppm (equivalente a 0; 0,77; 2,5; y 10 mg/kg p.c./día en machos y a 0; 0,97; 3,1; y 13 mg/kg p.c./día en hembras)</p> | <p>No se observó en el estudio efectos de carcinogenicidad.</p> <p>NOAEL sistémico: 0,97 mg/kg p.c./día en hembras y 0,77 mg/kg p.c./día en machos</p> <p>LOAEL sistémico: 3,1 mg/kg p.c./día en hembras y 2,5 mg/kg p.c./día en machos, basándose en signos o comportamiento agresivo</p> <p>(↓) ganancia de peso</p> | <p>SUTTON y OFFER (1973)</p> |

El amitraz fue clasificado por la EPA en 1990 como un carcinógeno del grupo C “posible carcinógeno en el hombre”, basándose en el descubrimiento combinado de adenomas hepatocelulares y carcinomas en hembra de ratón B6C3F₁ (EPA, 1996). Se calculó que el máximo de potencial carcinógeno para el amitraz (Q₁, cuantificado por medio del modelo de riesgo de cáncer) estaba en $5 \times 10^{-2}(\text{mg/kg/día})^{-1}$ (USEPA, 1996). Posteriormente, el Comité de Revisión de la Evaluación de Riesgo de Cáncer (CARC) de la EPA (USEPA, 1996) recomendó que se clasificara al amitraz como “Posible Evidencia de Carcinogenicidad”, por las razones descritas a continuación:

- No hay respuesta tumoral en rata (estudio aceptable con dosis adecuadas).
- La única respuesta tumoral en el ratón se encontró con la mayor dosis evaluada (400ppm).
- La respuesta tumoral encontrada en el ratón fue en el hígado y pulmón, los cuales son tumores espontáneos comunes en el ratón.
- El amitraz no es mutagénico, aunque forma un metabolito el 2,4-dimetilanilina (BTS-24868) con efecto mutagénico *in vitro*
- El amitraz es estructuralmente similar al clodimeformo, otro pesticida formamídico, del cual se ha descrito que es carcinogénico en ratones (origina hemangio endoteliomas en ratas macho y hembra).

La clasificación adoptada actualmente es la sugerida por el CARC, quedando clasificado por tanto como una “Posible Evidencia de Carcinogenicidad” (USEPA, 2006).

Genotoxicidad

La Tabla 14 resume la genotoxicidad del amitraz, datos recogidos de estudios (EVEREST y WILCOX, 1976; MCGREGOR y PRINTICE, 1983; BROOKER *et al.*, 1988; MCGREGOR y RIACH, 1983a,b; PETZOLD *et al.*, 1977; EVEREST, 1976; WILCOX, 1976;

PALMER y JAMES, 1977a,b) remitidos a la EPA (USEPA, 1996) y a la OMS (JMPR, 1998).

Los resultados de la Tabla 14 indican que el amitraz no es mutagénico tanto *in vivo* como *in vitro*.

Tabla 14. Ensayos de genotoxicidad con amitraz.

| Puntos finales | | Tipo de ensayo | Concentración o dosis | Pureza del amitraz (%) | Resultados |
|-----------------|--------------------------------|--|---|------------------------|------------|
| <i>In vitro</i> | Mutación reversa | <i>S. typhimurium</i> TA 1535, TA 1537, TA 1558 | 31-500 µg/ placa | 99,4 | Negativo |
| | Mutación reversa | <i>S. typhimurium</i> TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538 | 0, 33, 100, 333, 1000, 3300, 10000 µg/ placa | 98,4 | Negativo |
| | Aberración cromosómica | Linfocitos humanos | 0, 5, 10, 20 µg/mL -S9 0, 3, 5, 30 µg/mL +S9 | 99,5 | Negativo |
| | Mutación celular | Células de ratón L5178Y <i>tk</i> ^{+/-} | 0,06-33 µg/mL+S9 0,006-20 µg/mL -S9 | 98,4 | Negativo |
| | Síntesis no programada del ADN | Fibroblastos embrionarios humanos | 20, 60, 100, 140, 180, 220, 260, 300 µg/mL ±S9 | 100 | Negativo |
| | Lesión de ADN | Fibroblastos pulmonares de células de hámster chino V79 | 0,01-0,3 mmol/L ±S9 | No descrito | Negativo |
| <i>In vivo</i> | Mutación reversa | <i>S. typhimurium</i> G46, TA 1532, TA 1964 | 0, 100, 200, 400 mg/kg p.c., única dosis | No descrito | Negativo |
| | Mutación letal dominante | Ratón hembra CFLP | 0, 12, 50 mg/animal via intubación intragástrica durante 5 días | No descrito | Negativo |
| | Mutación letal dominante | Ratón macho CFLP | 0, 12, 50 mg/animal via intubación intragástrica durante 5 días | No descrito | Negativo |

S9, 9000xg de fracción microsomal de hígado de roedor

La Tabla 15 resume los estudios de genotoxicidad de los metabolitos del amitraz, datos obtenidos de informes enviados a la EPA (USEPA, 1996) y a la OMS (JMPR, 1998). El resultado de los ensayos de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* fueron negativos, salvo en el ensayo para inducción de mutación en células de linfoma de ratón, donde hubo una respuesta positiva para el metabolito 2,4-dimetilanilina.

Tabla 15. Ensayos de genotoxicidad con metabolitos del amitraz.

| Puntos de evaluación | Tipo de ensayo | Concentración o dosis | Resultados | referencias |
|--|--|---|---|--------------------------------------|
| N-metil-N'-(2,4-dimetilfenil)formamida (BTS-27271) | | | | |
| Mutación reversa | <i>S. typhimurium</i> TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1337, TA 1538 | ≤ 5000 µg/ placa | Negativo | RICHOLD <i>et al.</i> (1983a) |
| Lesión de ADN | Fibroblastos pulmonares de células de hámster chino V79 | 0,03-3,0 mmol/L ±S9 | Negativo | PETZOLD <i>et al.</i> (1977) |
| 2,4-Dimetilfenil formamida (BTS-27919) | | | | |
| Mutación reversa | <i>S. typhimurium</i> TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1337, TA 1538 | ≤ 5000 µg/ placa | Negativo | RICHOLD <i>et al.</i> (1983b) |
| Lesión de ADN | Fibroblastos pulmonares de células de hámster chino V79 | 0,01-1,0 mmol/L ±S9 | Negativo | PETZOLD <i>et al.</i> (1977) |
| 2,4-Dimetilanilina (BTS-24868) | | | | |
| Inducción mutación celular | Células de linfoma de ratón L5178Y <i>tk</i> ^{±/-} | 1, 3,3, 10, 33, 100, 200, 300, 333, 400, 500, 600 µg/mL | Positivo + S9 Negativo - S9 | McGREGOR y RIACH (1984) |
| Transformación celular | Fibroblastos C3H/10 T1/2 clon 8 de embrión de ratón | 5, 10, 20 µg/mL +S9 100, 200, 400 µg/mL -S9 | Negativo | McGREGOR <i>et al.</i> (1984) |
| Lesión de ADN | Fibroblastos pulmonares de células de hámster chino V79 | 0,03-2,0 mmol/L ±S9 | Negativo | PETZOLD <i>et al.</i> (1977) |
| Ácido 4-amino- <i>meta</i> -toluico | | | | |
| Lesión de ADN | Fibroblastos pulmonares de células de hámster chino V79 | 0,03-3,0 mmol/L ±S9 | Negativo | PETZOLD <i>et al.</i> (1977) |
| 2,4-Dimetilanilina (BTS-24868) | | | | |
| <i>In vivo</i> | Formación de micronúcleos | Hueso medular de ratón | 56, 113, 225 mg/kg p.c., dos veces, separadas 24h | Negativo HOUNSELL y WALKER (1983) |

Toxicidad para la reproducción y 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 9 (NEUBERT *et al.*, 1973, 1980; BASS *et al.*, 1977), y la Figura 10 representa la secuencia de acotencimientos que conducen a una anomalía funcional o estructural (NEUBERT *et al.*, 1978).

Figura 9. Resultados variables de un efecto embriotóxico en mamíferos.

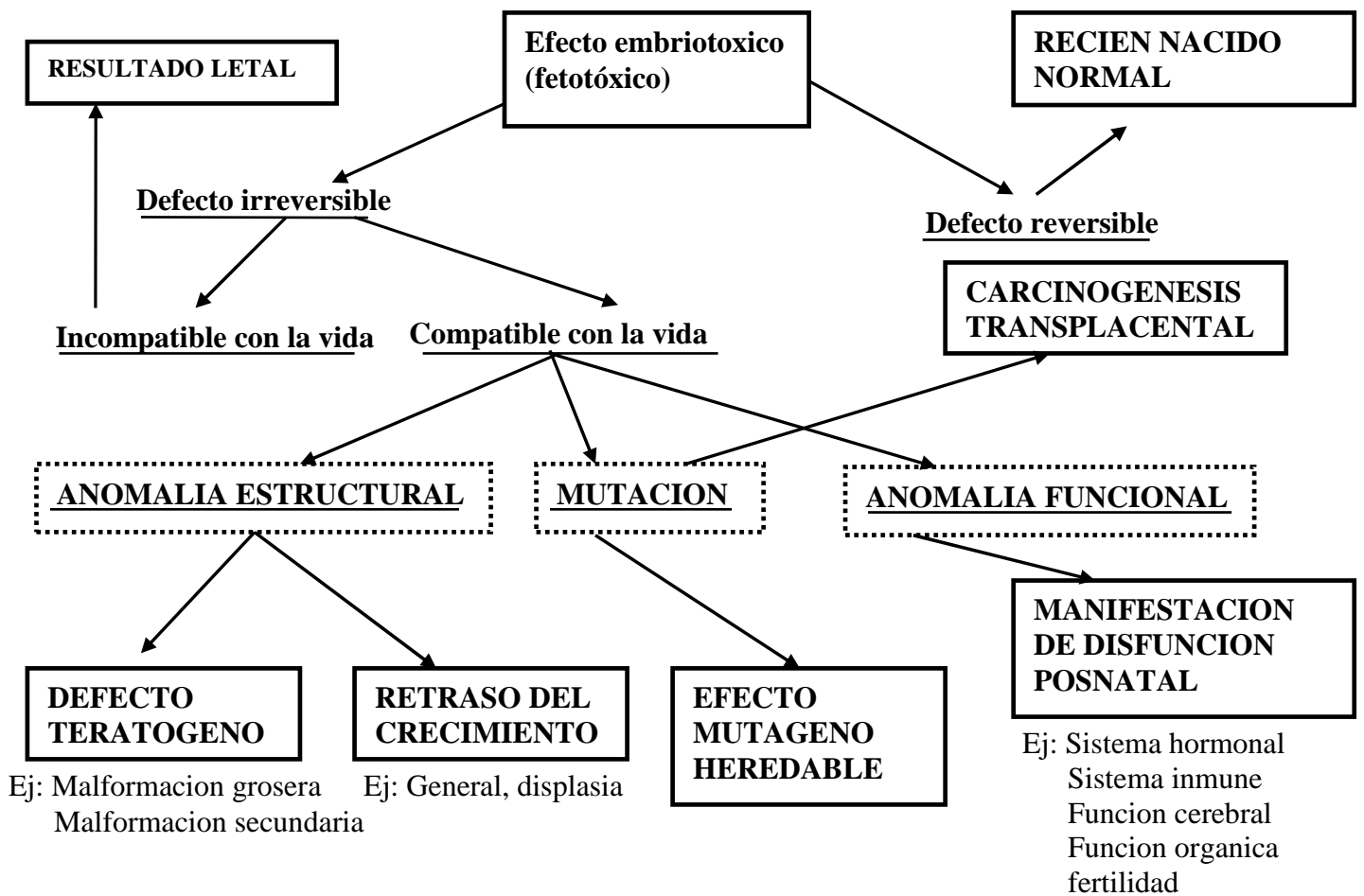
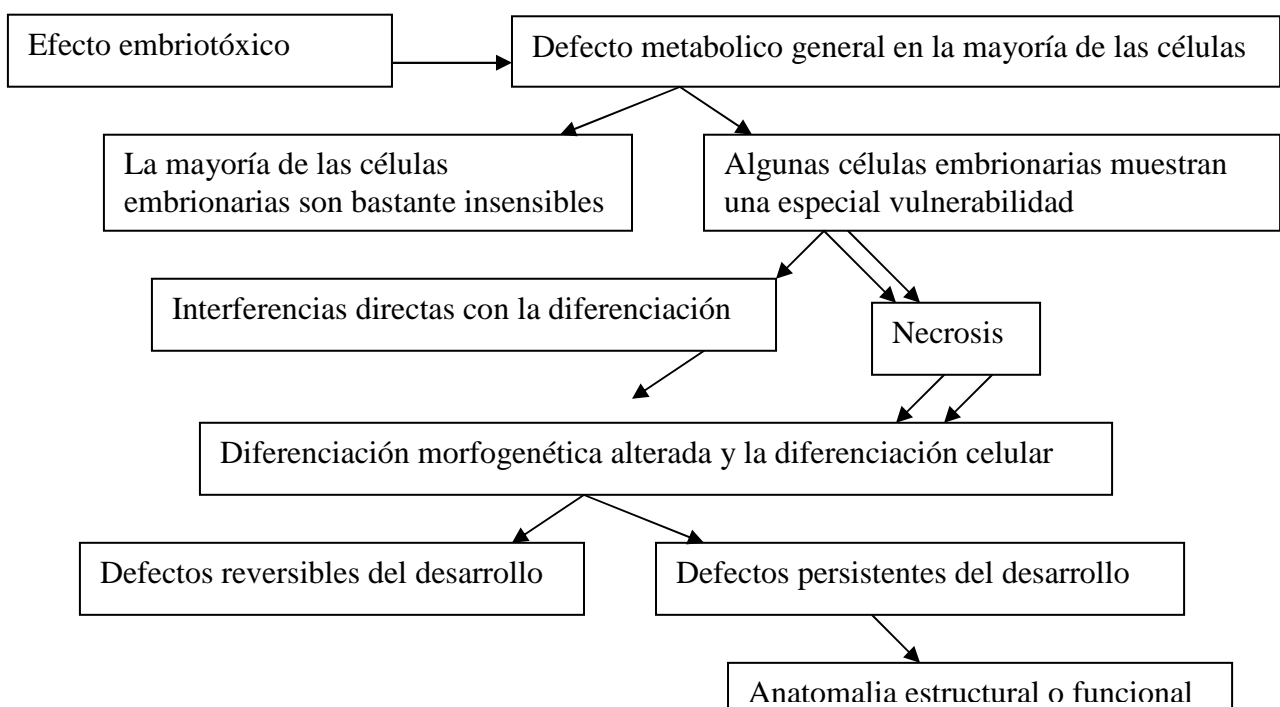


Figura 10. Representación esquemática de la secuencia de acontecimientos que conducen a una anomalía funcional o estructural.



En un estudio de toxicidad para la reproducción de tres generaciones, grupos de 10 ratas Wistar macho y 20 ratas Wistar hembra (generación F₀) se trataron con 0; 15; 50; ó 200 ppm de amitraz grado técnico (pureza 99,8%) por vía oral (equivalente a 0; 1,3; 4,4; ó 16 mg/kg/día p.c. en machos y a 0; 1,5; 5,1; ó 20 mg/kg/ día p.c. en hembras) (SUTTON, 1973b). Después de que la generación F₁ hubo sido destetada, 12 machos y 24 hembras fueron apartados para ser criados con la dieta que contenía amitraz. El procedimiento fue seguido hasta que la generación F₃ fue destetada. El amitraz a la dosis de 200 ppm disminuyó el crecimiento, el consumo de alimento, la fertilidad y viabilidad de las crías de la generación F₀, por lo que esta dosis fue eliminada cuando hubo sido destetada la generación F₁, a causa de la bajísima supervivencia. No se encontró ningún efecto sobre el número de crías o el tamaño medio de estas a la dosis de 50 ppm, sin embargo, se observó un descenso del número de recién nacidos vivos a los 21 días en todas las generaciones. El NOAEL fue de 50 ppm (4,4/mg/kg/día para machos y 5,1 mg/kg/día para hembras) y el LOAEL fue 200 ppm (16 mg/kg/día para machos y 20 mg/kg/día para hembras) basándose en el efecto de disminución de ganancia de peso corporal y de consumo de alimento en ratas de la generación F₀. El NOAEL de toxicidad de la reproducción fue 15 ppm (1,3 mg/kg/día para machos y 1,5 mg/kg/día para hembras). El LOAEL de toxicidad de la reproducción fue 50 ppm (4,4/mg/kg/día para machos y 5,1 mg/kg/día para hembras) basándose en el efecto de reducción de tamaño y supervivencia de la camada en las tres generaciones (F₁, F₂, y F₃), y en la reducción del peso corporal en los recién nacidos en la generaciones F₁ y F₂.

La Tabla 16 resume la toxicidad para el desarrollo del amitraz a partir de datos recogidos de estudios remitidos a la EPA (USEPA, 1996) y a la OMS (JMPR, 1998).

Tabla 16. Toxicidad para el desarrollo del amitraz

| | | | |
|---|--|--|------------------|
| Ratas: Wistar Grupos de 11-13 ratas preñadas Amitraz grado técnico (pureza, 99,8%) | Dosis orales de 0; 1; 3; y 12 mg/kg p.c. /día, desde el día 8 al 20 de gestación. El estudio finaliza el día 21 | NOAEL (toxicidad maternal y desarrollo fetal): 3 mg/kg p.c./día LOAEL (toxicidad maternal y desarrollo fetal): 12 mg/kg p.c./día, basándose en: (↓) ganancia de peso corporal (↓) calcificación del esternón | SUTTON (1973c) |
| Ratas: Sprague-Dawley Grupos de 24 ratas preñadas Amitraz grado técnico (pureza, 99,7%) | Dosis orales de 0; 7,5; 15; y 30 mg/kg p.c. /día, desde el día 6 al 15 de gestación. El estudio finaliza el día 20 | NOAEL (toxicidad maternal y desarrollo fetal): 7,5 mg/kg p.c./día LOAEL (toxicidad maternal y desarrollo fetal): 15 mg/kg p.c./día, basándose en: (↓) ganancia de peso corporal para la toxicidad maternal (↑) incidencia de dilatación de útero y capitación renal pélvica para la toxicidad del desarrollo fetal | McINTYRE (1987a) |
| Conejos: Nueva Zelanda Grupos de 8-10 conejas preñadas Amitraz grado técnico (pureza, no especificada) | Dosis orales de 0; 1; 5; y 25 mg/kg p.c. /día, desde el día 6 al 18 de gestación. El estudio finaliza el día 30 | NOAEL (toxicidad maternal y desarrollo fetal): 5 mg/kg p.c./día LOAEL (toxicidad maternal y desarrollo fetal): 25 mg/kg p.c./día, basándose en: (↓) ganancia de peso e incremento de abortos en los días de gestación 17-20 para la toxicidad maternal (↓) ganancia de peso corporal, y pérdida de la camada y reducción del número de fetos para el desarrollo fetal | SUTTON (1973d) |
| Conejos: Nueva Zelanda Grupos de 16 conejas preñadas Amitraz grado técnico (pureza, 99,7%) | Dosis orales de 0; 3; 6; y 12 mg/kg p.c. /día, desde el día 7 al 19 de gestación. El estudio finaliza el día 28 | NOAEL (desarrollo fetal): 6 mg/kg p.c./día LOAEL (desarrollo fetal): 12 mg/kg p.c./día, basándose en: pérdida de la camada | McINTYRE (1987b) |

Recientemente, PALERMO-NETO *et al.*, (1994) en un estudio experimental observaron que la exposición prenatal al amitraz causaba cambios transitorios en el desarrollo y comportamiento de las crías expuestas de rata. En este estudio, las ratas gestantes fueron tratadas oralmente con amitraz (20 mg/kg) en los días 1, 4, 7, 10, 13, 16, y 19 de gestación. Después del nacimiento las crías fueron agrupadas en los siguientes grupos: crías control amamantadas por ratas control hembra (CC); crías control amamantadas por hembras tratadas (CE); crías tratadas amamantadas por hembras tratadas (EE); crías tratadas amamantadas por

hembras control (EC). Los resultados muestran que comparando a las crías del grupo CC con las crías de los grupos prenatalmente expuestos al amitraz (EC y EE) se observó una disminución de la edad de apertura vaginal; también el grupo EE mostró un más temprano desarrollo del pelo y un retraso en la erupción del incisivo comparado con el grupo CC. Las ratas del grupo EE, presentaron mayor actividad locomotora, frecuencia de posición sobre las patas traseras y menor tiempo de inmovilidad comparado con las crías del grupo CC cuando se estudio a los 30 días, pero no a los 60 o 90 días. También se observaron cambios en el desarrollo, en ratas control amamantadas por ratas tratadas durante la gestación, lo cual no se esperaba por que el amitraz según protocolo experimental usado, debería haber sido eliminado de las hembras antes del parto (la última administración del amitraz fue el día 19 de gestación y se ha descrito que el amitraz tiene un tiempo de eliminación de 3 días) lo que sugiere que no se elimina en ese tiempo y debe haber una transmisión del amitraz o sus metabolitos a la leche materna.

Posteriormente, PALERMO-NETO *et al.*, (1997) evaluaron los efectos de la exposición postnatal durante la lactancia al amitraz, en ratas cuyas madres recibieron el amitraz (10 mg/kg) oralmente durante la lactancia en los días 1, 4, 7, 10, 13, 16 y 19. Los resultados mostraron que el tiempo medio efectivo (ET_{50}) para el desarrollo de pelo, apertura de los ojos, descenso testicular y el comienzo de respuesta ante un estímulo, fueron incrementados en ratas expuestas postnatalmente al amitraz (3, 15, 22 y 15 días respectivamente) en comparación con los obtenidos de las crías control (2, 14, 20 y 13 días respectivamente). A las crías procedentes de madres tratadas con amitraz durante la lactancia les llevo mas tiempo desarrollar el reflejo de enderezamiento durante los días postnatales 3 , 4 y 5. La exposición postnatal al amitraz incrementó la actividad motora espontánea de crías machos y hembras. También se observaron algunas diferencias cuantitativas en el comportamiento motor espontáneo, así como, en el levantamiento de la cabeza, hombro y maduración de la pelvis, en las crías tratadas con amitraz.

Actualmente KIM *et al.*, (2007) han evaluado la toxicidad en el desarrollo del amitraz en ratas Sprague-Dawley. El amitraz fue administrado en ratas gestantes durante los días 1 a 19 de gestación a las dosis de 0, 3, 10 y 30 mg/kg p.c./día. A todas las ratas gestantes se les practicó la cesárea el día 20 de gestación y sus fetos fueron examinados para determinar la presencia de algún tipo de anomalía externa, visceral y esquelética. A la dosis de 30 mg/kg p.c./día, hubo toxicidad maternal, manifestada como un incremento en la incidencia de signos clínicos anormales y una menor ganancia de peso e ingesta de alimento. La toxicidad en el desarrollo se manifestó como un incremento en el porcentaje de muerte fetal, un descenso en el tamaño de las crías, y una reducción de los pesos corporales fetales. Además, hubo un aumento de la incidencia de anomalías externas, viscerales y esqueléticas. A la dosis de 10 mg/kg p.c./día, la toxicidad maternal observada incluyó un descenso en la ganancia de peso y de la ingesta de alimentos. Además, hubo una mínima toxicidad en el desarrollo, y se manifestó como un descenso de los pesos corporales fetales, un aumento de aberraciones viscerales y esqueléticas, y un retraso en la osificación fetal. A la dosis de 3 mg/kg p.c./día, no se observaron signos de toxicidad maternal ni de toxicidad en el desarrollo. Estos resultados mostraron que el amitraz administrado durante toda la gestación en ratas es embriotóxico y teratogénico; a la dosis tóxica para las madres fue 30 mg/kg p.c./día. El amitraz es embriotóxico a la dosis para las madres de 10 mg/kg p.c./día. El NOAEL del amitraz para ratas gestantes y para el desarrollo embrionario se ha estimado en 3 mg/kg p.c./día (KIM *et al.*, 2007).

Efectos sobre el ciclo estral y la concentración de hormonas

Se ha evaluado los efectos del amitraz sobre el ciclo estral y la concentración de hormonas en grupos de 70 ratones B6C3F₁ hembras, a las que se les suministró amitraz (pureza, 98-100%) en la dieta a dosis de 0, 25, 100, y 400 ppm, equivalente a 0; 3,8; 15; y 60 mg/kg./día p.c., durante 28 semanas (HOUNSELL y RUSH, 1984). Se realizó un frotis vaginal diariamente

de cada animal durante 30 días después de la semana 13 de tratamiento, y el estado del ciclo estral fue determinado cada día por el examen microscópico de la población de células de cada capa. Se tomaron muestras sanguíneas en necropsia después de una noche de ayuno, y fueron evaluadas determinándose sulfato de deshidroepiandrosterona, estradiol, progesterona, testosterona, lutropina, folitropina, prolactina, tiroxina, triyodotironina y recaptación de hormona tiroidea, como indicadores del estado hormonal y parámetros clínicos de rutina. El peso del hígado fue también tomado en la necropsia. En los resultados se observó que la concentración sanguínea de progesterona fue menor y la concentración de sulfato de deshidroepiandrosterona fue mayor en los animales tratados con dosis de 400 ppm y en un menor grado a la dosis de 100 ppm en comparación con los controles. El peso relativo del hígado se incrementó tanto en la dosis de 400 ppm (4%) como de 100 ppm (5%). No se observaron efectos relacionados con el tratamiento a la dosis de 25 ppm, por tanto se estableció como NOAEL de 25 ppm equivalente a 3,8 mg/kg./día p.c. y un LOAEL de 100 ppm equivalente a 15 mg/kg./día p.c. basándose en signos de más baja concentración de progesterona, mayor concentración de sulfato de deshidroepiandrosterona, y un incremento del peso relativo del hígado (HOUNSELL y RUSH, 1984).

También se ha evaluado los efectos del amitraz sobre el ciclo estral y la concentración de hormonas en grupos de 20 ratas Wistar hembra de 22 semanas de edad, a las que se les administró una dieta que contenía amitraz en unas dosis de 0 y 200 ppm equivalente a 0 y 12 mg/kg./día p.c., durante 18 semanas (MERRYMAN y SUTTON, 1972). Se realizó un frotis vaginal durante 32 días. Después de la fijación en metanol, el frotis fue teñido con azul de metileno acuoso al 1% y se examinó la queratinización celular. El estro se caracterizó solamente por la presencia de células queratinizadas, y la longitud del ciclo fue tomada como el intervalo del primer día del estro en ciclos sucesivos. En los resultados se observó que la duración del ciclo fue alterada significativamente por el tratamiento, así como la prolongación del estro y

diestro. Las ratas tratadas tuvieron por tanto ciclos más largos que los controles, resultando periodos mas prolongados de estro y diestro (MERRYMAN y SUTTON, 1972).

1.7.1. Neurotoxicidad

Se ha descrito, un perfil de efectos sobre el comportamiento, efectos neuroquímicos, y fisiológicos en roedores y perros inducidos por amitraz, que claramente implican el SNC como órgano diana para este plaguicida (MOSER, 1991). La Tabla 17 resume diversos efectos fisiológicos y sobre el comportamiento descritos para el amitraz.

El amitraz es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (FAO, 1980), se han descrito signos y síntomas de neurotoxicidad tras la exposición al amitraz. Exposición a altas dosis de amitraz produjo una depresión del SNC con sedación, pérdida de reflejos, incoordinación motora, y coma (FOLZ *et al.*, 1984; 1986; HSU y SCHAFFER, 1988). A bajas dosis de amitraz se ha descrito una acción estimuladora del SNC que se manifiesta como hiperreactividad a estímulos externos, y agresividad (PFISTER y YIM, 1977). Se ha encontrado que la exposición perinatal al amitraz vía materna induce cambios en el desarrollo y alteración en la función motora de las crías de rata (PALERMO-NETO *et al.*, 1994, 1997).

Tabla 17. Efectos neurotóxicos del amitraz.

| Efectos | Especies | LOAEL y rango de dosis ensayado | Referencia |
|---|-----------------|--|----------------------------|
| Descenso de la actividad motora | Rata | 50 mg/kg, vía oral (25-200) | CROFTON <i>et al.</i> 1989 |
| | Rata | 3 mg/kg, i.p. (1-200) | MOSER y MACPHAIL, 1989 |
| | Perro | 1 mg/kg, i.v. (1) | HSU y HOPPER, 1986 |
| Alteración del modelo y porcentaje de respuesta operante | Rata | 6,25 mg/kg, i.p. (6,25-75) | MOSER <i>et al.</i> 1987 |
| | Rata | 25 mg/kg, i.p. (5-75) | MOSER y MACPHAIL, 1986 |
| Alteración del potencial visual evocado | Rata | 50 mg/kg, i.p. (50-100) | BOYES y MOSER, 1987 |
| Hiperactividad, agresividad | Rata | No especificada | BONSALL y TURNBULL, 1983 |
| | Rata | 25 mg/kg, i.p. (6,25-75) | MOSER <i>et al.</i> 1987 |
| | Rata | 600 mg/kg, vía oral (600) | TURNBULL, 1983 |
| | Rata | 50 mg/kg, i.p. | GILBERT, 1988 |
| Depresión de la respuesta ante un estímulo acústico turbador | Rata | 25 mg/kg, vía oral (25-200) | CROFTON <i>et al.</i> 1989 |
| Facilitación del comienzo de convulsiones | Rata | 50 mg/kg, i.p. | GILBERT, 1988 |
| Cambios en la función hipocampal | Rata | 100 mg/kg, i.p. (100) | GILBERT y DYER, 1988 |
| Hipotermia | Rata | 100 mg/kg, i.p. (50-100) | BOYES y MOSER, 1987 |
| Midriasis, bradicardia | Rata | 0,3 mg/kg, i.v. (0,03-1) | HSU y KAKUK, 1984 |
| Retraso del tránsito intestinal | Ratón | 1 mg/kg, s.c. (0,3-3) | HSU y LU, 1984 |

Hay poca información disponible sobre los efectos *in vivo* del amitraz en el SNC en mamíferos. BOYES y MOSER (1987), MOSER *et al.*, (1987) y MOSER y MACPHAIL (1989) han descrito los efectos sobre el comportamiento, fisiológicos y neuroquímicos en ratas expuestas al amitraz. A bajas dosis de amitraz (1-25 mg/kg) se observa una disminución de la actividad motora y un cambio en los porcentajes y modelos de respuesta (MOSER *et al.*, 1987). Dosis intermedias de amitraz (50-100 mg/kg) afectan a los potenciales evocados y disminuyen el peso corporal y la temperatura de las ratas tratadas (BOYES y MOSER, 1987). Además, dosis de 100 mg/kg p.c. produce una ligera inhibición de la MAO y signos característicos de intoxicación (ej. pérdida de peso corporal e hipereactividad). Altas dosis de amitraz (>100 mg/kg) producen inhibición de la MAO mas pronunciada, pérdida de peso extrema, agresividad y letalidad.

En estudios realizados en caballos se ha observado un descenso dosis-dependiente en la actividad locomotora después de la exposición a una dosis de 0,15 mg /kg p.c. de amitraz. Los efectos duraron aproximadamente hasta 3 h después de la exposición. La yohimbina revertió inmediatamente los efectos sedantes del amitraz lo que indica una actividad agonista α_2 -adrenérgica en este efecto para el amitraz (HARKINS *et al.*, 1997). También se ha observado que el amitraz y su metabolito el BTS-27271 producen éstasis intestinal que es revertido por yohimbina lo que indica que se debe a su acción agonista α_2 -adrenérgica (HSU *et al.*, 1997). Medidas adicionales realizadas sobre parámetros fisiológicos tales como el reflejo de retirada de la pezuña y el reflejo de contracción de la piel, indican que el amitraz presenta un marcado y potente efecto de sedación en caballos, mientras los efectos antinociceptivos solo tienen lugar a altas dosis de amitraz (QUEIROZ-NETO *et al.*, 1997).

Se ha descrito que el amitraz 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 α_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 amitraz aumenta la susceptibilidad a las convulsiones en la rata lo cual podría ser mediado por una acción combinada de su actividad agonista α_2 -adrenérgica y de sus efectos anestésicos locales (GILBERT, 1988).

Entre los efectos más persistentes de neurotoxicidad del amitraz en ratas están la hipereactividad o hiperexcitabilidad (BONSALL y TURNBULL, 1983; TURNBULL, 1983; MOSER *et al.*, 1987; GILBERT, 1988). En el estudio de MOSER (1991) se estableció una correlación semicuantitativa dosis-respuesta y de tiempo de transcurso de hipereactividad, cambios fisiológicos, y debilitación general producida por el amitraz.

En estudios de toxicidad crónica oral en roedores se observaron signos de neurotoxicidad tales como comportamiento agresivo o excitable en ratas o ratones (SUTTON y OFER, 1973), así como en estudios de toxicidad subcrónica y crónica en especies diferentes a los roedores (depresión del SNC e hipotermia en perros) (MORGAN *et al.*, 1973; PATTON y WILLIAMS, 1971).

También se ha observado en exposición ocupacional en el hombre signos agudos como hipotermia, desorientación, y somnolencia inducidos por amitraz que reflejan una actividad sobre el SNC (CAMPBELL y NEEDHAM, 1984b).

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 dentro 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 susceptible 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). También se ha visto que la exposición durante la gestación y la lactancia al butil ester 2,4-diclorofenoxiacético produce una alteración cerebral permanente caracterizada por un aumento en los niveles de serotonina y de su metabolito (DE DUFFARD *et al.*, 1990).

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). Aunque los genes determinan principalmente el desarrollo de la estructura del SNC, el desarrollo detallado de los circuitos neuronales depende de la acción de los neurotransmisores y neuromoduladores (HERLENIUS y LAGERCRANTZ, 2001). 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).

Una alteración en los niveles de alguno de los neurotransmisores puede modificar el desarrollo de los diferentes sistemas de neurotransmisores (LAUDER, 1985). Se conoce que el neurotransmisor GABA regula el desarrollo de los sistemas monoamínicos de tal manera que

una alteración durante el desarrollo del sistema gabaérgico podría alterar el normal desarrollo de los sistemas monoaminicos (LAUDER *et al.*, 1998). 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 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 de los tejidos, causa desordenes en la neurogénesis (LAUDER y KREBS, 1976; KHOZHAI y OTELLIN, 2006) y anormalidades en el desarrollo del cerebro y sus sistemas de neurotransmisores (LAUDER y KREBS, 1976; KHOZHAI y OTELLIN, 2006). Las consecuencias de estas anormalidades 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, 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 del desarrollo inducida por amitraz, no se conocen estudios publicados en la literatura, lo que supone una investigación de gran interés actual para desarrollar. Los estudios sobre toxicidad en el desarrollo por exposición prenatal y postnatal al amitraz realizados por PALERMO-NETO *et al.*, (1994, 1997) pusieron de manifiesto alteraciones en el comportamiento lo que sugiere la potencial presencia de efectos neuroquímicos y neurofuncionales por la exposición al amitraz.

1.7.2. Toxicidad para el hombre

Se han descrito 137 casos de intoxicación por amitraz y de estos 119 son niños (YILMAZ y YILDAS, 2003, AGING *et al.*, 2004; YARAMIS, *et al.*, 2000). La incidencia es especialmente alta en áreas rurales de Turquía, en familias que se dedican al cuidado de ganado. La causa parece ser debida a una intoxicación accidental, las madres daban a sus niños soluciones de amitraz por confusión con un bote de expectorante (YILMAZ y YILDAS, 2003). También se han dado casos de intoxicación por el uso del amitraz en el tratamiento de la pediculosis humana, principalmente por no respetar el modo de empleo, como es el caso donde no se ha preparado la dilución correspondiente recomendada; también se han descrito intoxicaciones por intento de suicidio (KALYONCU *et al.*, 2002).

El amitraz produce en el hombre depresión del SNC (KALYONCU *et al.*, 2002; ÇAKSEN *et al.*, 2003; KENNEL *et al.*, 1996; ULUKAYA *et al.*, 2001; YILMAZ y YILDAS 2003). Entre los efectos descritos se incluyen depresión respiratoria, hipotensión, y bradicardia. Todos estos casos descritos se deben principalmente a una intoxicación accidental por amitraz por ingestión de sobredosis, con éxito en el tratamiento de urgencia basado principalmente en el tratamiento sintomático y de soporte (GROPPI, 1977; ROS y VAN AKEN, 1994; PRONCZUK *et al.*, 1995).

En un estudio en humanos, seis voluntarios sanos varones, de edades comprendidas entre los 18 y 45 años y pesos comprendidos entre los 60 y 70 kg, recibieron dosis orales de 0; 0,063; y 0,13 mg/kg p.c. de amitraz, separadas dos o tres semanas, (cada dosis fue dada con 150 mL de agua, 30 min después del desayuno) y se les monitorizó el pulso cardiaco, la frecuencia respiratoria, la presión sanguínea, y la temperatura corporal y también se les examinó el electrocardiograma. Se observó que no fueron afectados por el tratamiento los parámetros hematológicos, urinarios, y químicos sanguíneos, respuesta pupilar y el rendimiento psicomotor. El NOAEL observado fue 0,13 mg/kg p.c., la dosis mas alta evaluada (CASS, 1992). En un estudio previo llevado a cabo en dos voluntarios que recibieron una única dosis de 0,25 mg/kg p.c. del amitraz, dosis superior a la ensayada por CASS (1992), se observó principalmente efectos de somnolencia, desorientación, disminución del pulso y de la presión sanguínea (CAMPBELL y NEEDHAM, 1984b).

En un estudio anterior también en humanos, cuatro varones y dos mujeres voluntarias sanas, de edades comprendidas entre 21 y 42 años de edad, recibieron dos dosis de 2 mg (aproximadamente 0,03 mg/kg p.c.) del metabolito del amitraz N´-(2,4-dimetilfenil)-N-metilformamidina (BTS-27271) en capsulas con 100 mL de agua, con una semana de descanso. Se monitorizó la presión sanguínea, el pulso cardiaco, y la temperatura a intervalos de cada

media hora durante 7 horas, y se evaluó el estado de alerta. Se examinó también el electrocardiograma, y se recogió la orina después de la dosificación. Se analizaron las muestras de orina para estimar la cantidad que había sido excretada del metabolito ácido 4-amino-*meta*-toluico. En este estudio el NOAEL para el metabolito BTS-27271 fue 0,03 mg/kg p.c. que es la única dosis evaluada (HALL *et al.*, 1975).

La EPA (1996) determinó una dosis de referencia (RfD) para el amitraz de 0,0025 mg/kg p.c./día, basándose en un NOAEL de 0,25 mg/kg p.c./día de un estudio de toxicidad crónica en perros (MORGAN *et al.*, 1973). Se uso un factor de seguridad de 100 (un factor de 10 para la extrapolación de resultados obtenidos en animales de experimentación al hombre y un factor de 10 para la variación de la sensibilidad en la población humana). Los efectos críticos observados y que fueron objeto del LOAEL fueron, incremento de la concentración de glucosa sanguínea, hipotermia, y depresión del SNC.

Recientemente, se ha re-evaluado los niveles de tolerancia ó límite máximo permitido de residuos (LMR) del amitraz en productos alimenticios (USEPA, 2006), que vienen recogidos en la Tabla 18. La Tabla 19 recoge los LMRs establecidos por el Codex Alimentarius para el amitraz (USEPA, 1996).

Tabla 18. Niveles de tolerancia para el amitraz

| Producto | LMR (mg/kg) | LMR re-evaluado (mg/kg) |
|--|------------------------|------------------------------------|
| Cera de abeja | 6,0 | - |
| Grasa de ganado vacuno | 0,1 | 0,04 |
| Subproductos cárnicos de ganado vacuno | 0,3 | 0,02 |
| Carne de ganado vacuno | 0,05 | 0,02 |
| Semillas de algodón | 1,0 | 1,0 |
| Huevos | 0,01 | - |
| Grasa de cerdo | 0,1 | 0,1 |
| Riñón de cerdo | 0,2 | 0,1 |
| Hígado de cerdo | 0,2 | 0,1 |
| Subproductos cárnicos del cerdo | 0,3 | 0,3 |
| Carne de cerdo | 0,05 | 0,05 |
| Miel y panales de abeja | 1,0 | - |
| Leche | 0,03 | 0,03 |
| Grasa de leche | 0,3 | 0,02 |
| Peras | 2,0 | - |
| Grasa de ave de corral | 0,01 | - |
| Subproductos cárnicos de ave de corral | 0,05 | - |
| Carne de ave de corral | 0,01 | - |

Tabla 19. Niveles Máximos de Residuos (LMRs) para el amitraz.

| Productos | LMR (mg/kg) |
|---|--------------------|
| Carne de ganado vacuno | 0,05 |
| Cerezas | 0,5 |
| Semillas de algodón | 0,5 |
| Aceite de semilla de algodón | 0,05 |
| Pepinos | 0,5 |
| Vísceras y despojos comestibles de ganado vacuno, cerdos y ovejas | 0,2 |
| Leche | 0,01 |
| Naranjas | 0,05 |
| Melocotón | 0,5 |
| Carne de cerdo | 0,05 |
| Granadas | 0,5 |
| Carne de oveja | 0,1 |
| Tomate | 0,5 |

Se cuestiona si la mayor exposición a amitraz se puede dar por el consumo de peras. La evaluación del riesgo alimentario crónico para el amitraz (USEPA, 1996), señaló que con un intervalo previo de cosecha (PHI) de 14 días para peras, la Concentración de Residuos Previstos (ARC) en la población de EE.UU por su consumo es el 1,1% de la RfD, que es una cantidad que se cree que no causa efectos adversos si es consumida diariamente durante un tiempo de vida de 70 años. La ARC para niños menores de un año de edad, que es el subgrupo de mayor exposición, es el 4,5% de la RfD. Dado que los valores obtenidos son bajos, parece que el riesgo alimentario crónico es mínimo por exposición a amitraz. Se estima que el riesgo de cáncer por exposición a amitraz en la población de U.S. es de 1,4 personas por cada millón de habitantes, lo que se considera como grado de riesgo aceptable (USEPA, 1996).

Debido a la preocupación existente por los posibles efectos neurotóxicos por exposición a amitraz, se calculo el riesgo de neurotoxicidad aguda, así como los niveles de exposición para todos los subgrupos de población de los EE.UU. El riesgo de neurotoxicidad aguda puede ser expresado por medio del Margen de Exposición ($MOE = NOAEL/Exposición$). El MOE es mayor de 10 para todos los grupos de población, lo cual es también considerado como aceptable (USEPA, 1996).

En cuanto a la exposición laboral, el hombre en su medio laboral podría estar expuesto al amitraz durante las operaciones de mezclado, carga, y aplicación del pesticida, especialmente cuando se usan formulaciones líquidas (concentrado emulsionable) y polvos humectables. Además, existe el riesgo de exposición potencial para trabajadores que entran en lugares o superficies donde ha habido una aplicación completa del producto, especialmente en campos de perales y algodonereros (USEPA, 1996). El uso en perales, se asocia con la exposición total más alta, seguido por el uso en algodones, y finalmente, por el uso en ganado vacuno. La exposición de los manipuladores de los perales, es la mas alta cuando realizan la operación de mezcla/carga. El uso en perales se asocia con el riesgo más alto de efectos carcinógenos, seguido por el uso en algodones y finalmente por el uso en ganado vacuno. El rango del límite superior de riesgo de efectos carcinógenos para estos manipuladores va desde $2,7 \times 10^{-8}$ a $1,2 \times 10^{-5}$; sin embargo, estos niveles de riesgo son menores de 1×10^{-4} , el cual es encontrado como aceptable (USEPA, 1996). Además, habría que añadir que ciertos manipuladores también afrontan riesgos de neurotoxicidad por exposición a corto plazo al amitraz. Sin embargo, el MOE es menor de 10, valor generalmente considerado aceptable (USEPA, 1996).

Considerando, hasta el momento, los datos de toxicidad disponibles, se puede sugerir que el amitraz presenta una relativa baja toxicidad; aunque se clasifica actualmente como “Posible Evidencia de Carcinogenicidad” (USEPA, 2006). La exposición potencial del hombre a amitraz

en la dieta parece que podría darse en un nivel muy bajo (solamente un pequeño porcentaje de la RfD), por lo que no supone con los datos de toxicidad disponibles una causa de preocupación para la salud pública.

No obstante, las agencias reguladoras, en la actualidad, vienen preocupándose del potencial de toxicidad que presenta el amitraz, principalmente de toxicidad reproductiva, en el desarrollo, y de neurotoxicidad. También se plantea que la aplicación de amitraz por los manipuladores sobre perales, campos de algodón, y ganado vacuno a largo plazo pudiera suponer una exposición que presentara un riesgo de carcinogénesis. Por todo ello, nuevos datos de toxicidad del amitraz son importantes y necesarios para ser incorporados en el análisis del riesgo de este pesticida.

1.8. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

La neurotoxicología se ocupa del estudio de los efectos adversos en la estructura y/o función del sistema nervioso por la exposición a un xenobiótico durante el desarrollo y/o la madurez. Los efectos estructurales darán lugar a cambios neuroanatómicos mientras que los efectos funcionales darán lugar a cambios neuroquímicos, neurofisiológicos o cambios en el comportamiento. Se estima que entre un 3 y un 28% de todos los productos químicos comercializados pueden ser neurotóxicos (DORMAN *et al.*, 2002). 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 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 amitraz es un plaguicida de descubrimiento y comercialización relativamente reciente, de ahí que no resulte extraño que existan pocos trabajos en la literatura científica que estudien su neurotoxicidad principalmente en mamíferos (BONSALL y TURNBULL, 1983; TURNBULL, 1983; MOSER y MACPHAIL, 1986; MOSER *et al.*, 1987; BOYES y MOSER, 1987; CROFTON *et al.* 1989; GILBERT, 1988). La mayoría de los trabajos publicados sobre el amitraz se centran en investigar su mecanismo de acción a nivel del receptor α_2 -adrenérgico (HSU y KAKUK, 1984; HSU y LU, 1984; HSU y HOPPER, 1986; HSU *et al.*, 1986; COSTA y MURPHY, 1987; COSTA *et al.*, 1988, 1989; FLÓRIO *et al.*, 1993; ALTOBELLI *et al.* 2001) y en menor medida a nivel de su acción antagonista del receptor H₁ (PASS y SEAWRIGHT, 1982), de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (YIM *et al.*, 1978) y de la inhibición de la MAO (AZIZ y KNOWLES, 1973; BENEZET y KNOWLES, 1976; MOSER y MACPHAIL, 1986).

Existe cierta discrepancia entre los estudios realizados por MOSER y MACPHAIL (1986) y los estudios realizados por FLÓRIO *et al.*, (1993) sobre el mecanismo que explicaría los efectos tóxicos observados del amitraz a nivel motor. Según MOSER y MACPHAIL (1986) estos efectos podrían deberse a la acción del amitraz sobre el receptor α_2 -adrenérgico; por el contrario, según FLÓRIO *et al.*, (1993) estos efectos se podrían deber a la acción de inhibición de la MAO por el amitraz. Por tanto, queda por confirmar si se produce una alteración en los niveles de catecolaminas a dosis inferiores a 100 mg/kg p.c./día de amitraz, lo que respaldaría la hipótesis de FLÓRIO *et al.*, (1993), ya que los efectos motores se observan a dosis inferiores a 100 mg/kg p.c./día de amitraz y según MOSER y MACPHAIL (1986) no se produce una inhibición de la MAO por debajo de esta dosis.

La utilización de animales de experimentación (ratas) de edad 30 y 60 días es importante en el objetivo de evaluar si los niveles de catecolaminas son modificados por amitraz de forma dosis dependiente a la edad de 30 días cuando la rata no es totalmente madura y no presenta los niveles adultos de catecolaminas, y a la edad de 60 días cuando la rata ya es madura y ha alcanzado los niveles adultos de catecolaminas.

Por otra parte, no existen estudios sobre la neurotoxicidad en el desarrollo inducida por el amitraz. Pero a partir de los estudios sobre toxicidad en el desarrollo por exposición prenatal y postnatal al amitraz realizados por PALERMO-NETO *et al.*, (1994; 1997) se han puesto de manifiesto alteraciones en el comportamiento lo que sugiere la presencia de efectos neurotóxicos por la exposición al amitraz. Actualmente se asume que los neurotransmisores monoaminérgicos juegan un papel durante el desarrollo, definido como “morfogenético” (BUZNIKOV *et al.*, 1996; LEVITT *et al.*, 1997; NICOTRA y SHATTEN, 1990; NICOTRA SENATORI, 1989). Cualquier modificación en los niveles de catecolaminas durante el desarrollo podría tener un efecto profundo en el desarrollo del cerebro tanto en el ámbito estructural como funcional (LAKSHMANA y RAJU, 1994). En esta área, nuestro objetivo incluye determinar si la exposición al amitraz durante la preñez de ratas madre y durante el desarrollo de los recién nacidos (periodo de lactancia) produce una alteración en los niveles de monoaminas en el SNC. Es importante determinar los efectos potenciales que se generan y si son permanentes a la edad de 60 días, cuando los animales ya presentan madurez de todos los sistemas y presentan los niveles adultos de catecolaminas, usándose como biomarcador la modificación de los niveles de catecolaminas y/o su tasa de recambio en las diferentes regiones de encéfalo.

Por todo ello, el presente trabajo de investigación tiene dos objetivos: (1) el estudio de las posibles alteraciones en los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico en regiones del SNC de ratas de edad 30 y 60 días expuestas a dosis múltiples de amitraz, y (2) el estudio de las posibles alteraciones permanentes heredadas en ratas a la edad de 60 días, procedentes de madres a las que se les administró amitraz durante el periodo de la preñez y la lactancia.

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).

MATERIAL Y MÉTODOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. PROTOCOLO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron un total de 54 ratas Wistar, 24 machos de 30 días de edad, 24 machos de 60 días de edad, y 6 hembras preñadas de 60 días de edad. Toda la fase experimental se realizó en el Animalario de la Universidad Complutense de Madrid (número de registro 28079-15 ABC-M de la Dirección General de Agricultura y Alimentación, Consejería de Economía y Empleo de la Comunidad Autónoma de Madrid). 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. Todos los experimentos fueron autorizados por el comité de experimentación animal de la Universidad Complutense de Madrid.

Primer Experimento:

Se utilizaron 24 ratas Wistar macho de 30 días de edad y de 100 gramos de peso corporal, divididas en 4 grupos:

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

Grupo II (6 ratas): los animales recibieron 20 mg amitraz/kg p.c. durante 5 días. El tratamiento se administró por vía oral mediante intubación intragástrica utilizando una jeringa acoplada a una cánula metálica. Se preparó una solución de amitraz en aceite de maíz a una concentración de 8 mg/mL, administrando el volumen correspondiente a cada rata para la dosis

diaria de 20 mg/kg p.c., es decir, 0,5 mL por cada 200 g de peso corporal.

Grupo III (6 ratas): los animales recibieron 50 mg amitraz/kg p.c. durante 5 días. El tratamiento se administró por vía oral mediante intubación intragástrica utilizando una jeringa acoplada a una cánula metálica. Se preparó una solución de amitraz en aceite de maíz a una concentración de 50 mg/mL, administrando el volumen correspondiente a cada rata para la dosis diaria de 50 mg/kg p.c., es decir, 0,5 mL por cada 200 g de peso corporal.

Grupo IV (6 ratas): los animales recibieron 80 mg amitraz/kg p.c. durante 5 días. El tratamiento se administró por vía oral mediante intubación intragástrica utilizando una jeringa acoplada a una cánula metálica. Se preparó una solución de amitraz en aceite de maíz a una concentración de 32 mg/mL, administrando el volumen correspondiente a cada rata para la dosis diaria de 80 mg/kg p.c., 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 (amitraz) diario, 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.

Las dosis elegidas de 20, 50 y 80 mg/kg representan 1/30, 1/12 y 1/7,5 de la DL₅₀. Las dosis elegidas no originan mortalidad en los animales, y solamente la dosis superior originaba una leve disminución de la actividad motora reversible.

Tres horas después del último tratamiento los animales se sacrificaron por dislocación cervical, seguidas de exanguinación y decapitación. Inmediatamente tras el sacrificio 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 y IVERSEN (1966) con ciertas modificaciones introducidas por nuestro laboratorio. En primer lugar se separó por un corte transverso el rombencéfalo, obteniendo mediante disección la médula espinal, con cuidado de no cortar el bulbo raquídeo y el cerebelo, que se separan a continuación (Figuras 11 y 12). 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.

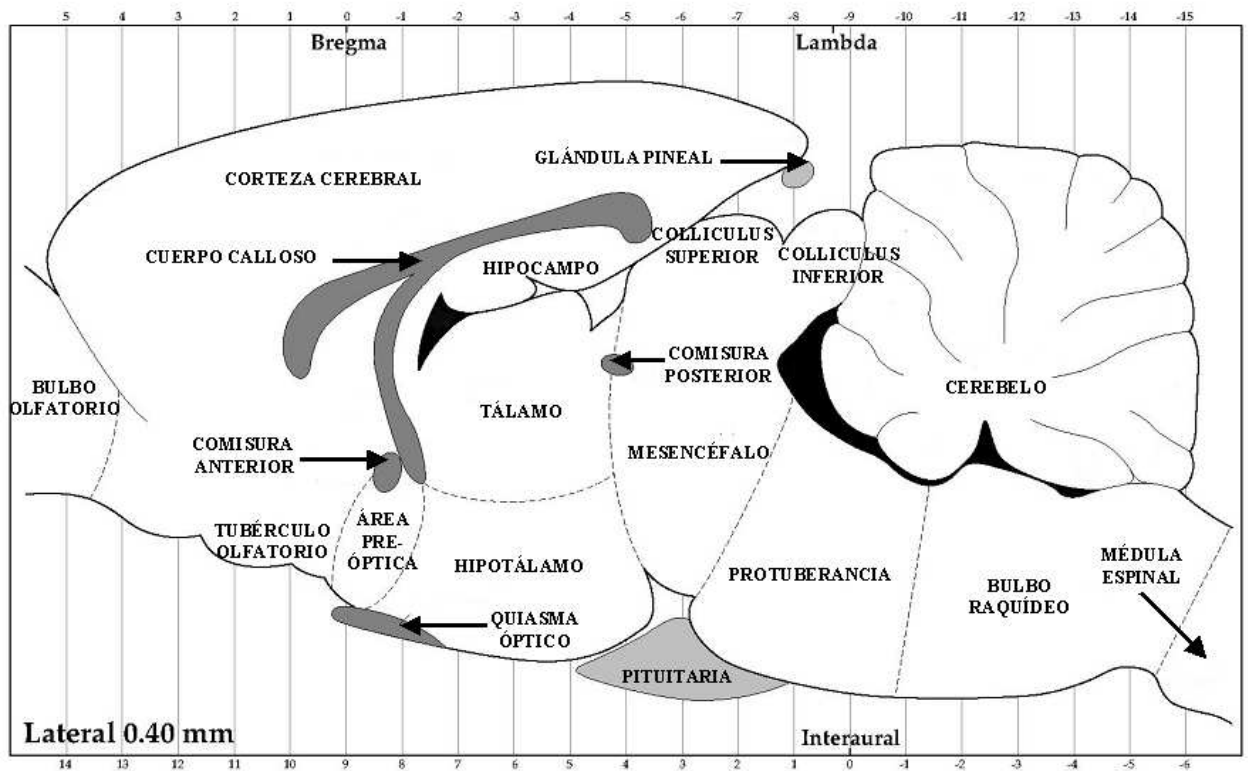


Figura 11. Representación de las distintas partes del encéfalo de la rata Wistar en un corte en el plano sagital (0,40 mm con respecto a la medial). Modificada de PAROXINOS y WATSON (1998).

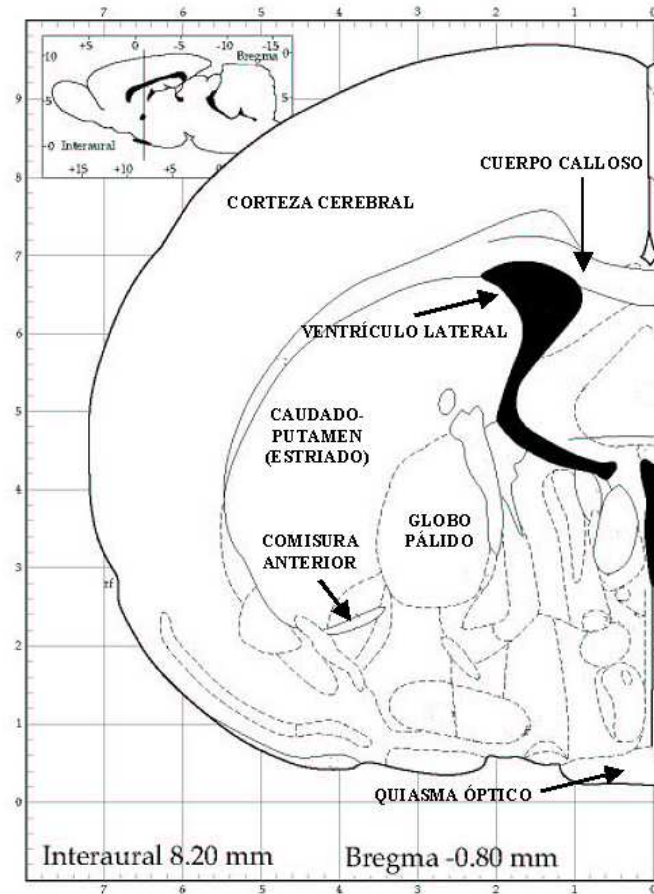


Figura 12. Representación de un corte en el plano coronal del encéfalo de la ratona Wistar (Bregma $-0,80$ mm) en el que se aprecia el estriado (no visible en la Figura anterior).
 Modificada de PAROXINOS y WATSON (1998).

Cada muestra de tejido se pesó en una balanza electrónica (Sartorius ER 182), guardándose separadamente en tubos Eppendorf debidamente identificados. Las muestras se homogeneizaron 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 (HClO₄) 0,4M y metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅) 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). Es importante cumplir estrictamente las condiciones de homogeneización ya que la ausencia de antioxidantes como el ácido ascórbico, de ácido perclórico en bajas concentraciones, así como la luz y temperaturas elevadas pueden descomponer catecolaminas y, sobre todo, indolaminas (VERBIESE-GENARD *et al.*, 1983; CAO y HOSHINO, 1998). Posteriormente, se centrifugaron a 12.000 r.p.m. en una centrifuga 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 se almacenó a –80°C hasta el análisis del contenido en neurotransmisores monoaminérgicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Segundo Experimento:

Se utilizaron 24 ratas Wistar macho de 60 días de edad y de 200 gramos de peso corporal, divididas en 4 grupo:

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

Grupo II (6 ratas): los animales recibieron 20 mg amitraz/kg p.c. durante 5 días. El tratamiento se administró por vía oral mediante intubación intragástrica utilizando una jeringa acoplada a una cánula metálica. Se preparó una solución de amitraz en aceite de maíz a una concentración de 8 mg/mL, administrando el volumen correspondiente a cada rata para la dosis de 20 mg/kg p.c., es decir, 0,5 mL por cada 200 g de peso corporal.

Grupo III (6 ratas): los animales recibieron 50 mg amitraz/kg p.c. durante 5 días. El tratamiento se administró por vía oral mediante intubación intragástrica utilizando una jeringa acoplada a una cánula metálica. Se preparó una solución de amitraz en aceite de maíz a una concentración de 20 mg/mL, administrando el volumen correspondiente a cada rata para la dosis de 50 mg/kg p.c., es decir, 0,5 mL por cada 200 g de peso corporal.

Grupo IV (6 ratas): los animales recibieron 80 mg amitraz/kg p.c. durante 5 días. El tratamiento se administró por vía oral mediante intubación intragástrica utilizando una jeringa acoplada a una cánula metálica. Se preparó una solución de amitraz en aceite de maíz a una concentración de 32 mg/mL, administrando el volumen correspondiente a cada rata para la dosis de 80 mg/kg p.c., 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 amitraz, 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.

Las dosis elegidas de 20, 50 y 80 mg/kg representan 1/30, 1/12 y 1/7,5 de la DL₅₀. Las dosis elegidas no originan mortalidad en los animales, y solamente la dosis superior originaba una leve disminución de la actividad motora reversible.

Tres horas después del último tratamiento los animales se sacrificaron por dislocación cervical, seguidas de exanguinación y decapitación. Inmediatamente tras el sacrificio 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 y IVERSEN (1966) con ciertas modificaciones introducidas por nuestro laboratorio. En primer lugar se separó por un corte transverso el rombencéfalo, obteniendo mediante disección la médula espinal, con cuidado de no cortar el bulbo raquídeo y el cerebelo, que se separan a continuación (Figuras 13 y 14). 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.

Cada muestra de tejido se pesó en una balanza electrónica (Sartorius ER 182), guardándose separadamente en tubos Eppendorf debidamente identificados. Las muestras se homogeneizaron 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 (HClO₄) 0,4M y metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅) 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). Es importante cumplir estrictamente las condiciones de homogeneización ya que la ausencia de antioxidantes como el ácido ascórbico, de ácido perclórico en bajas concentraciones, así como la luz y temperaturas elevadas pueden

descomponer catecolaminas y, sobre todo, indolaminas (VERBIESE-GENARD *et al.*, 1983; CAO y HOSHINO, 1998). Posteriormente, se centrifugaron a 12.000 r.p.m. en una centrifuga 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 en neurotransmisores monoaminérgicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Tercer Experimento:

Se utilizaron 6 ratas Wistar hembra preñadas de 60 días de edad de 200 gramos de peso corporal, divididas en 2 grupos:

Grupo I (grupo control, 3 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 (3 ratas): los animales recibieron 20 mg amitraz/kg p.c. 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 amitraz en aceite de maíz a una concentración de 8 mg/mL, administrando el volumen correspondiente a cada rata para la dosis de 20 mg/kg p.c., 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 amitraz, 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, así como se les observó diariamente por si pudiera aparecer algún signo de toxicidad.

Se ha usado la dosis de 20 mg/kg, por que 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 madres tratadas (Grupo II) tuvieron una camada de 10 ± 1 crías. En el día 1 de nacimiento se seleccionaron al azar 12 ratas (6 hembras y 6 machos) de cada grupo, realizándose los siguientes subgrupos:

Grupo I¹ (6 machos) (animales nacidos de ratas madre control)

Grupo I² (6 hembras) (animales nacidos de ratas madre control)

Grupo II¹ (6 machos) (animales nacidos de ratas madre tratadas con amitraz)

Grupo II² (6 hembras) (animales nacidos de ratas madre tratadas con amitraz)

Todas las crías de todos los subgrupos citados se mantuvieron individualmente en jaulas hasta la edad de 60 días alimentándose con pienso normal y agua *ad libitum*. Transcurrido este periodo de 60 días se sacrificaron los animales por dislocación cervical, seguidas de exanguinación y decapitación. Inmediatamente tras el sacrificio 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 y IVERSEN (1966) con ciertas modificaciones introducidas por nuestro laboratorio. En primer lugar se separó por un corte transverso el rombencéfalo, obteniendo mediante disección la médula espinal, con cuidado de no cortar el bulbo raquídeo y el cerebelo, que se separan a

continuación (Figuras 13 y 14). 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.

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 (HClO₄) 0,4M y metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅) 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). Es importante cumplir estrictamente las condiciones de homogenización ya que la ausencia de antioxidantes como el ácido ascórbico, de ácido perclórico en bajas concentraciones, así como la luz y temperaturas elevadas pueden descomponer catecolaminas y, sobre todo, indolaminas (VERBIESE-GENARD *et al.*, 1983; CAO y HOSHINO, 1998). Posteriormente, se centrifugaron a 12.000 r.p.m. en una centrifuga 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 en neurotransmisores monoaminérgicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

2.2. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE SEROTONINA (5-HT), DOPAMINA (DA), NORADRENALINA (NA) Y SUS METABOLITOS

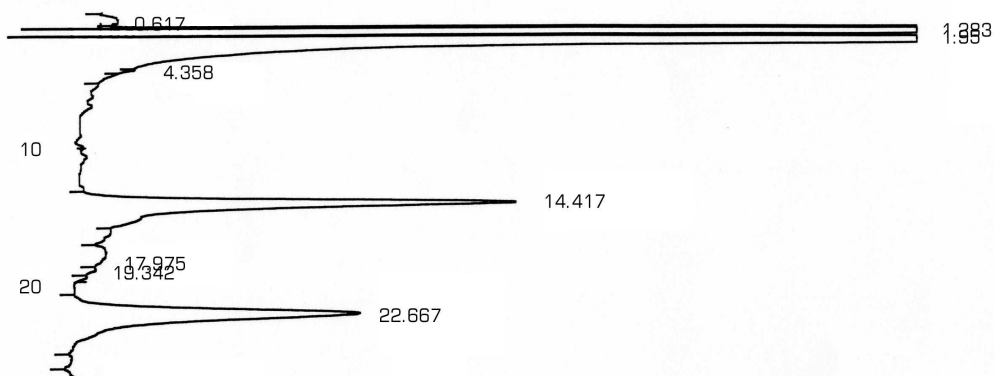
Existen distintos métodos analíticos para la separación y cuantificación de DA, 5-HT, NA y sus metabolitos en tejidos del SNC y en otros tejidos y fluidos biológicos. Entre éstos los mas importantes son la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (KAROUM *et al.*, 1975; WARSH *et al.*, 1980; WAGNER *et al.*, 1982), y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por fluorescencia (KRSTULOVIC y POWELL, 1979; FORSTER y MACDONALD, 1999) y con detección electroquímica (MÜLLER y UNSICKER, 1981; WAGNER *et al.*, 1982; BRYAN y O'DONNELL, 1989).

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 (KISSINGER *et al.*, 1973; MEFFORD y BARCHAS, 1980; MICHAUD *et al.*, 1981; HOLZER y SKOFITSCH, 1984; BRODIE y OPACKA, 1985; BOYD *et al.*, 1987; COLADO *et al.*, 1988, 1993a, 1997, 1999; MURAI *et al.*, 1988; SUÑOL *et al.*, 1988a,b; PEI *et al.*, 1989; ROBINSON *et al.*, 1989; BENWELL y BALFOUR, 1992; ANDREWS *et al.*, 1993; BALLARÍN *et al.*, 1994; VIVEROS *et al.*, 1995; FORSTER y MACDONALD, 1999; ESTEBAN *et al.*, 2001; LAWRENCE *et al.*, 2002). En nuestro caso el método HPLC utilizado es el descrito por COLADO *et al.* (1993b), con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio (FERNÁNDEZ *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-hidroxifenilglicol (MHPG) en muestras biológicas, el método mas utilizado es el de la HPLC con columnas de fase reversa y con detección por fluorescencia (ARTIGAS *et al.*, 1986).

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

Se tomaron 20 µL de los sobrenadantes de los homogeneizados de cada una de las regiones del SNC almacenadas a -80°C, que se inyectaron en un sistema cromatográfico con una columna en fase reversa Teknokroma Nucleosil 120 C₁₈ 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 (Na₂HPO₄·2H₂O) 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 (HClO₄) 0,4M conteniendo 0,1% (p/v) de metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅).

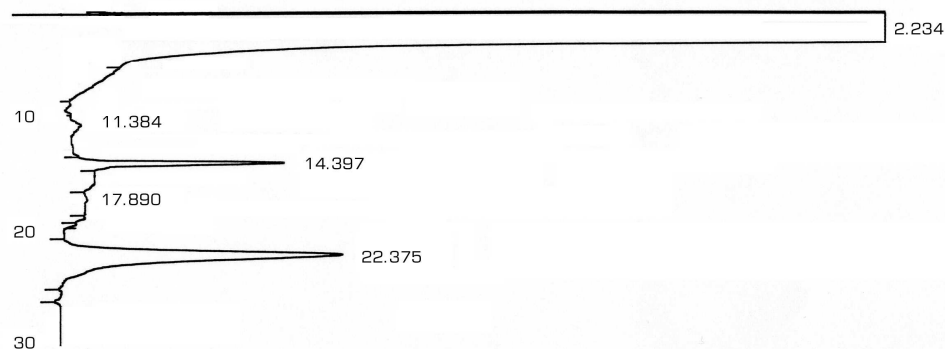
Para las muestras estudiadas de tejido de SNC, las curvas fueron lineales para concentraciones en el rango de 5 ng/mL hasta 500 ng/mL para 5-HT y 5-HIAA, los coeficientes de variación intra-día y los coeficientes de variación inter-día fueron inferiores al 4%, y la recuperación analítica media fue del 100% para 5-HT y 5-HIAA. 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 13 y 14).



CHROMATOPAC C-R6A FILE 2
 SAMPLE NO 0 METHOD 464
 REPORT NO 967 SAMPLE WT 100

| PKNO | TIME | AREA | MK | IDNO | CONC | NAME |
|------|--------|--------|----|------|--------|-------|
| 5 | 14.417 | 384971 | | 1 | 1.5422 | 5HIAA |
| 8 | 22.667 | 375748 | | 2 | 1.7389 | 5HT |

Figura 13. Cromatograma de una mezcla de estándar que contiene 5-HT y 5-HIAA.



CHROMATOPAC C-R6A FILE 2
 SAMPLE NO 0 METHOD 464
 REPORT NO 988 SAMPLE WT 100

| PKNO | TIME | AREA | MK | IDNO | CONC | NAME |
|------|--------|--------|----|------|--------|-------|
| 3 | 14.397 | 195231 | | 1 | 0.7821 | 5HIAA |
| 5 | 22.375 | 385321 | | 2 | 1.7832 | 5HT |

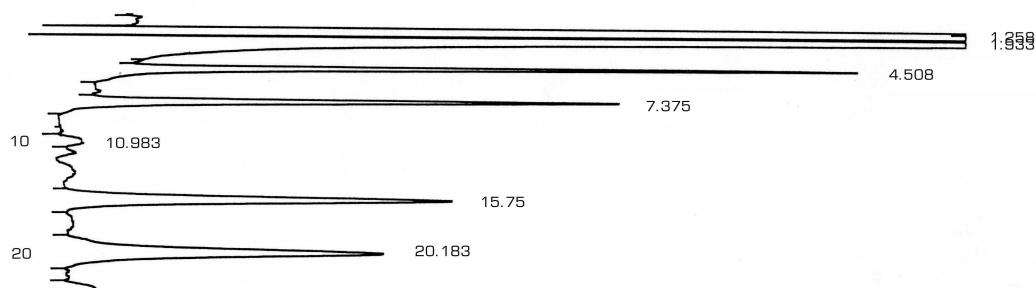
Figura 14. Cromatograma de una muestra de corteza frontal (79,9 mg), extraída en un volumen final de 500 μ L; volumen de inyección 20 μ L.

2.2.2. 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 estudiados y almacenadas a -80°C , las cuales se inyectaron en un sistema cromatográfico con una columna en fase reversa Teknokroma Nucleosil 120 C_{18} 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 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,1 M, ácido cítrico monohidratado 0,1 M ($\text{pH}=3,5$) 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_4) 0,4M conteniendo 0,1% (p/v) de metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$).

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%. En las muestras tisulares de SNC la recuperación analítica media fue del 100% para NA, DA, DOPAC y HVA. 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 15 y

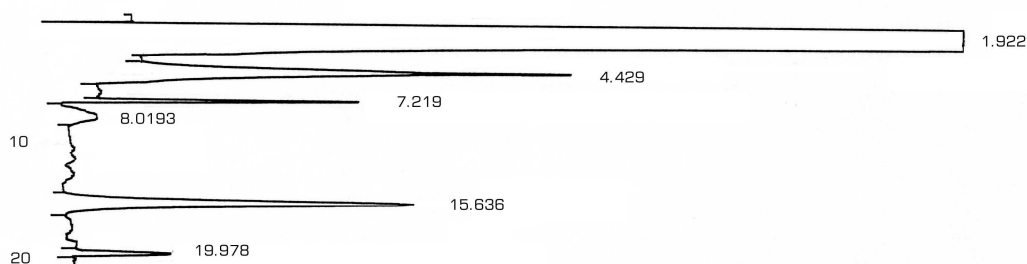
16).



CHROMATOPAC C-R6A FILE 1
 SAMPLE NO 0 METHOD 464
 REPORT NO 754 SAMPLE WT 100

| PKNO | TIME | AREA | MK | IDNO | CONC | NAME |
|------|--------|--------|----|------|--------|-------|
| 3 | 4.508 | 263948 | | 1 | 0.7297 | NA |
| 4 | 7.375 | 240334 | | 2 | 0.7889 | DOPAC |
| 6 | 15.75 | 287771 | | 3 | 1.1296 | DA |
| 7 | 20.183 | 316140 | | 4 | 1.5385 | HVA |

Figura 15. Cromatograma de una mezcla de estándar que contiene NA, DA, DOPAC y HVA.



CHROMATOPAC C-R6A FILE 1
 SAMPLE NO 0 METHOD 464
 REPORT NO 778 SAMPLE WT 100

| PKNO | TIME | AREA | MK | IDNO | CONC | NAME |
|------|--------|--------|----|------|--------|-------|
| 2 | 4.429 | 372537 | | 1 | 1.0299 | NA |
| 3 | 7.219 | 64219 | | 2 | 0.2108 | DOPAC |
| 5 | 15.636 | 263620 | | 3 | 1.0348 | DA |
| 6 | 19.978 | 39001 | | 4 | 0.1898 | HVA |

Figura 16. Cromatograma de una muestra de médula espinal (104,2 mg), extraída en un volumen final de 500 μ L; volumen de inyección 20 μ L.

2.2.3. Determinación analítica del metabolito de la NA el 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG)

Se tomaron 20 μ L 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 una columna en fase reversa Teknokroma Tracer Extrasil ODS de 25 μm (partícula de relleno), 25 cm de largo y 0,4 cm de diámetro interno. El sistema cromatográfico (HPLC) utilizado fue un Shimadzu modelo LC-10AS equipado con un detector fluorimétrico Shimadzu RF-551 y un integrador con procesador de datos Shimadzu Chromatopac C-R6A. Como fase móvil se utilizó una mezcla de monofosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,06 M, ácido cítrico monohidratado 0,03 M y agua csp 1000 mL. A continuación se retiró 75 mL de la solución y se añadió 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 (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, estudiadas 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 y los coeficientes de variación 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 17 y 18).

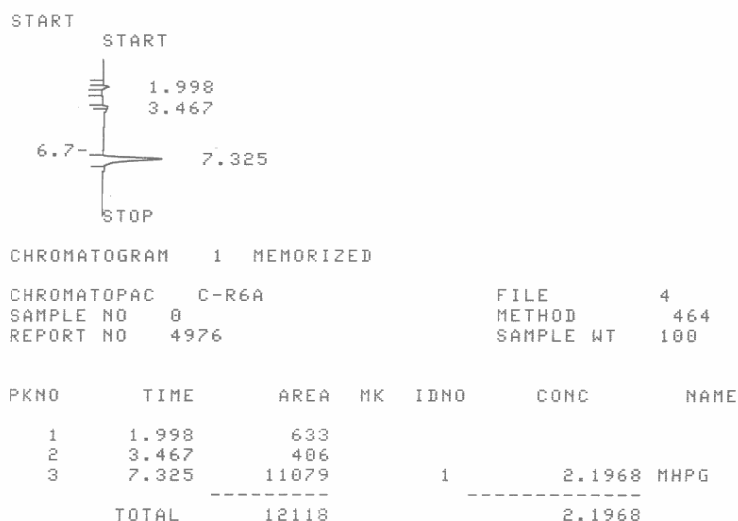


Figura 17. Cromatograma de un estándar de MHPG.

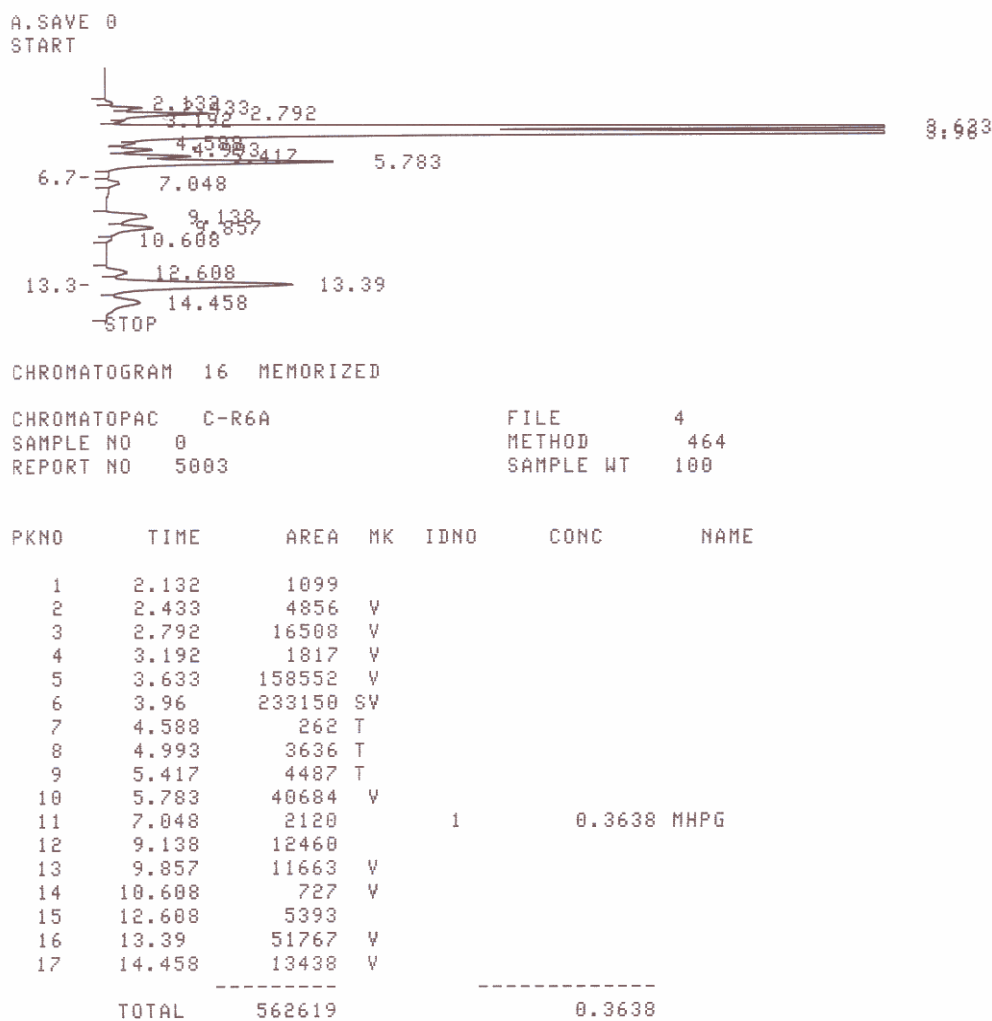


Figura 18. Cromatograma de una muestra de cuerpo estriado (60 mg), extraída en un volumen final de 300 µL; volumen de inyección 20 µL.

2.3. ANÁLISIS DE DATOS

Todos los datos obtenidos se expresan como el valor medio \pm ESM (error estándar de la media) con el número de animales indicado entre paréntesis, es decir, para cada región cerebral 6 muestras a partir de 6 animales. 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.

2.4. REACTIVOS Y EQUIPOS

2.4.1. Reactivos

- Amitraz: grado técnico (pureza del 95,0-101,5 %); donado por los Laboratorios Virbac SA. Envasado en frasco ámbar. Se mantuvo refrigerado a temperatura no superior a 4°C.
- Aceite de maíz (Mazola)

Reactivos para la preparación de las fases móviles en la determinación de monoaminas:

- di-Sodio hidrogenofosfato dihidrato para análisis (monofosfato disódico de hidrógeno, monofosfato disódico, fosfato sódico dibásico) ($\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), min. 99,5 %, Merck 106580, M.M. 177,99 g/mol. Conservado a temperatura ambiente.
- Ácido cítrico monohidrato ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$), 99,5 – 100,5 %, Merck 100242, M.M 210,14 g/mol. Conservado a temperatura ambiente.

- Ácido etiléndiaminotetraacético (sal disódica, dihidrato) (EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$), Merck 159294, M.M. 372,24 g/mol. Conservado a temperatura ambiente.
- Ácido 1-octanosulfónico (sal sódica) ($C_8H_{17}O_3SNa$), aprox. 98 %, Sigma 0 8380, M.M. 216,3 g/mol. Conservado a temperatura ambiente.
- Metanol de grado HPLC, Scharlau ME 0306, M.M. 32,04. Conservado a temperatura ambiente.

Neurotransmisores y metabolitos:

- Ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA) ($C_{10}H_9NO_3$), 98-100%, Sigma H 8876, M.M. 191,2 g/mol. Conservado a $< 0^\circ C$.
- (\pm)-Arterenol (hidrocloruro) ($[\pm]$ -norepinefrina, noradrenalina, NA) ($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$), Sigma A 7256, M.M. 205,6 g/mol. Conservado a $< 0^\circ C$.
- 5-Hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT) (complejo creatinina sulfato) ($C_{14}H_{19}N_5O_2 \cdot H_2SO_4$), Sigma H 7752, M.M. 387,4 g/mol. Conservado $< 2-8^\circ C$.
- Ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético (ácido homovanílico; HVA) ($C_9H_{10}O_4$), Sigma H 1252, M.M. 182,2 g/mol. Conservado a temperatura ambiente.
- Ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) ($C_8H_8O_4$), Sigma D 9128, M.M. 168,1 g/mol. Conservado a temperatura ambiente.

- 3-Hidroxitiramina (dopamina, DA) (hidrocloruro) ($C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl$), Sigma H 8502, M.M. 189,6 g/mol. Conservado a temperatura ambiente.
- 3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) ($C_9H_{12}O_4 \cdot 1/2C_4H_{10}N_2$), Sigma H 1377, M.M. 227.3 g/mol. Conservar < 0 y 5°C.

Reactivos para la preparación de las soluciones estándar de referencia de los neurotransmisores y metabolitos estudiados:

- Ácido perclórico 70-72% para análisis, Merck 100519, M.M. 100,46 g/mol, d 1,68 g/cm³ (20°C). Conservado a temperatura ambiente.
- Sodio disulfito para análisis (sodio metabisulfito) ($Na_2O_5S_2$), Merck 106528, M.M. 190,10 g/mol, d 1,48 g/cm³ (20°C). Conservado a temperatura ambiente.

2.4.2. Equipos

- Agitador Heidolph Reax top.
- Balanza BP 310S (Sartorius).
- Balanza de precisión ER 182 (Sartorius).
- Baño de ultrasonidos Transsonic 460 (Elma).
- Sonicador Labsonic U-Braun (B. Braun Melsungen AG).
- Congelador modelo ULT1386-5-V12 (Revco) (-80°C).
- pHmetro pH510 XS[®] Instruments.
- Centrífuga refrigerada modelo RC5C (Sorwall Instruments. Du Pont) con rotor para tubos Eppendorf.

- Baño modelo Ultrasonic-320 (Selecta)
- Sistema cromatógrafo HPLC Shimadzu modelo LC-9A:
 - Detector electroquímico Shimadzu L-ECD-6A
 - Procesador de datos Shimadzu Chromatopac C-R6A
 - Columna de fase reversa Teknokroma (TR-416306) Nucleosil 120 C₁₈ (5 μs, 125 cm x 0,4 cm).
- Sistema cromatógrafo HPLC Shimadzu modelo LC-10AS:
 - Detector fluorimétrico Shimadzu RF-551
 - Procesador de datos Shimadzu Chromatopac C-R6A
 - Columna de fase reversa Teknokroma (TR-416059) Tracer Extrasil ODS (25 μs, 25 cm x 0,4 cm).

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. EFECTO DEL AMITRAZ EN RATAS DE 30 DÍAS DE EDAD

Ratas macho de 30 días de edad tratadas por vía oral con amitraz disuelto en aceite de maíz a la dosis mas alta (80 mg/kg p.c./día, 5 días) mostraron una incoordinación motora ligera, efectos que se presentaron aproximadamente entre 1 y 2 h tras el tratamiento. Estos signos fueron reversibles y aproximadamente, a las 6 horas después del tratamiento las ratas se comportaban de manera normal.

En las ratas tratadas con 20 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días no se observó, al final de los 5 días de tratamiento, ningún efecto en la ganancia o el incremento de peso corporal con respecto de las ratas control. Sin embargo, en las ratas tratadas con 50 y 80 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se observó, al final de los 5 días de tratamiento, una disminución significativa del 44% ($P<0,01$) y del 64% ($P<0,001$), respectivamente, en el incremento del peso corporal. El tratamiento de los animales con amitraz a las 3 dosis ensayadas no afectó al peso de los tejidos (regiones cerebrales), ni a la relación peso tejido/peso corporal (%) con respecto a los animales control.

3.1.1. Efecto del amitraz sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el SNC

El tratamiento con amitraz por vía oral afectó de forma dosis-dependiente el contenido de 5-HT y de su metabolito 5-HIAA en las regiones del SNC estudiadas (Tablas 20, 21 y 22). El contenido de 5-HT (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 20. El contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 21. La Tabla 22 recoge los resultados expresados en las Tablas 20 y 21, incluyendo además la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT).

Los resultados expresados en las Tablas 20, 21 y 22 demuestran que:

- En los animales tratados con la dosis de 20 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo en todas las regiones del SNC, excepto en el bulbo raquídeo y en el hipocampo, un aumento estadísticamente significativo del contenido de 5-HT, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 11% al 32%. En cuanto al contenido de 5-HIAA, se produjo en todas las regiones del SNC, excepto en la corteza frontal, mesencéfalo e hipocampo, una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue del rango del 11% al 60%. La tasa de recambio sufrió un descenso estadísticamente significativo en todas las regiones del SNC, excepto en el hipotálamo e hipocampo. Este descenso fue del rango del 19% al 64%.
- En los animales tratados con la dosis de 50 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo, en todas las regiones del SNC, un aumento estadísticamente significativo del contenido de 5-HT, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 7% al 80%. En cuanto al contenido de 5-HIAA, se produjo en todas las regiones del SNC,

una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue del rango del 22% al 80%. La tasa de recambio disminuyó de forma estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 33% al 79%.

- En los animales tratados con la dosis de 80 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo en todas las regiones del SNC, un aumento estadísticamente significativo del contenido de 5-HT, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 17% al 113%. En cuanto al contenido de 5-HIAA, se produjo en todas las regiones del SNC, una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue del rango del 37% al 82%. La tasa de recambio disminuyó de forma estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC, excepto en la corteza frontal. Esta disminución fue del rango del 60% al 90%.

En conclusión, el amitraz de forma dosis-dependiente origina un aumento del contenido de 5-HT y un descenso del contenido del metabolito 5-HIAA, ambos estadísticamente significativos, en las regiones cerebrales estudiadas. A la dosis mas alta ensayada (80 mg amitraz/kg p.c./día, 5 días), el efecto sobre el aumento del contenido de 5-HT en orden decreciente fue: mesencéfalo> hipocampo> cuerpo estriado> corteza frontal> medula> hipotálamo> cerebelo> bulbo, y el efecto sobre el descenso del contenido en 5-HIAA en orden decreciente fue: cuerpo estriado> bulbo> hipocampo> corteza frontal> hipotálamo> cerebelo> medula> mesencéfalo.

Tabla 20. Efecto del amitraz sobre el contenido de 5-HT (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 30 días de edad.

| | 5-HT (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I Control | 2182,65 ± 48,06 | 957,41 ± 67,04 | 204,79 ± 1,92 | 2814,90 ± 31,21 | 1220,97 ± 24,45 | 444,62 ± 18,09 | 441,94 ± 10,98 | 464,93 ± 54,43 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día 5 días | 2421,32 ± 56,62** (10,93%) | 1251,09 ± 41,40** (32,33%) | 231,07 ± 3,65*** (12,84%) | 2915,12 ± 47,24 | 1403,98 ± 32,15** (14,99%) | 501,77 ± 17,99* (12,85%) | 524,59 ± 12,75*** (18,70%) | 534,49 ± 42,27 |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día 5 días | 2536,96 ± 17,67*** (13,23%) | 1721,35 ± 37,77*** (79,79%) | 255,52 ± 7,57*** (24,77%) | 3023,68 ± 63,49* (7,42%) | 1607,46 ± 39,83*** (31,65%) | 102,74 ± 4,96** (53%) | 724,99 ± 10,30*** (62,28%) | 636,90 ± 31,06* (36,99%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día 5 días | 2888,28 ± 33,50*** (32,33%) | 2040,99 ± 36,54*** (113,18%) | 264,43 ± 3,69*** (29,12%) | 3284,01 ± 58,01*** (16,67%) | 1945,39 ± 12,40*** (59,33%) | 756,86 ± 53,16** (70,23%) | 807,61 ± 7,88*** (79,28%) | 839,98 ± 46,04*** (80,67%) |

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (aumento) 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.

Tabla 21. Efecto del amitraz sobre el contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 30 días de edad.

| | 5-HIAA (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I Control | 1374,41 ± 71,07 | 1002,74 ± 81,21 | 203,94 ± 0,66 | 1879,31 ± 18,28 | 685,89 ± 23,53 | 341,61 ± 22,84 | 630,51 ± 23,00 | 730,62 ± 21,52 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día 5 días | 1135,45 ± 49,25* (-17,39%) | 965,70 ± 48,30 | 81,99 ± 0,90*** (-59,80%) | 1085,13 ± 31,21*** (-42,26%) | 612,88 ± 19,33* (-10,64%) | 290,82 ± 23,19 | 546,81 ± 11,21** (-13,27%) | 709,44 ± 24,61 |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día 5 días | 1069,32 ± 34,87** (-22,20%) | 685,72 ± 22,82** (-31,62%) | 74,10 ± 4,10*** (-63,67%) | 870,30 ± 66,74*** (-57,06%) | 411,77 ± 11,63*** (-39,97%) | 102,74 ± 4,96*** (-69,93%) | 134,73 ± 2,31*** (-79,56%) | 227,16 ± 15,04*** (-68,91%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día 5 días | 730,06 ± 48,75*** (-46,88%) | 627,20 ± 22,71** (-37,45%) | 68,89 ± 2,81*** (-66,22%) | 361,63 ± 24,44*** (-80,76%) | 239,68 ± 8,71*** (-65,05%) | 91,31 ± 6,35*** (-73,27%) | 110,41 ± 1,52*** (-82,41%) | 194,96 ± 12,97*** (-73,32%) |

Valor medio ± ESM (n=6).

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

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 22. Efecto del amitraz sobre el contenido de 5-HT (ng/g de tejido) y 5-HIAA (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 30 días de edad.

| | Hipotálamo | Mesencéfalo | Cerebelo | Bulbo raquídeo |
|--|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Grupo I Control | | | | |
| 5-HT | 2182,65 ± 48,06 | 957,41 ± 67,04 | 204,79 ± 1,92 | 2814,90 ± 31,21 |
| 5-HIAA | 1374,41 ± 71,07 | 1002,74 ± 81,21 | 203,94 ± 0,66 | 1879,31 ± 18,28 |
| 5-HIAA/5-HT | 0,63 ± 0,04 | 1,05 ± 0,05 | 1 ± 0,01 | 0,67 ± 0,01 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| 5-HT | 2421,32 ± 56,62** (10,93%) | 1251,09 ± 41,40** (30,67%) | 231,07 ± 3,65*** (12,84%) | 2915,12 ± 47,24 |
| 5-HIAA | 1135,45 ± 49,25* (-17,39%) | 965,70 ± 48,30 | 81,99 ± 0,9*** (-59,80%) | 1085,13 ± 31,21*** (-42,26%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,47 ± 0,2 ** (-26,00%) | 0,78 ± 0,04** (-25,99%) | 0,36 ± 0,00*** (-64,36%) | 0,37 ± 0,01*** (-44,19%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| 5-HT | 2536,96 ± 17,67*** (16,23%) | 1721,35 ± 37,77*** (79,79%) | 255,52 ± 7,57*** (24,77%) | 3023,68 ± 63,49* (7,42%) |
| 5-HIAA | 1069,32 ± 34,87** (-22,20%) | 685,72 ± 22,82** (-31,62%) | 74,10 ± 4,10*** (-63,67%) | 870,30 ± 66,74*** (-57,06%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,42 ± 0,01** (-33,46%) | 0,4 ± 0,02*** (-61,82%) | 0,29 ± 0,02*** (-70,78%) | 0,29 ± 0,03*** (-59,96%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| 5-HT | 2888,28 ± 33,50*** (32,33%) | 2040,99 ± 36,54*** (113,18%) | 264,43 ± 3,69*** (29,12%) | 3284,01 ± 58,01*** (16,67%) |
| 5-HIAA | 730,06 ± 48,75*** (-46,88%) | 627,20 ± 22,71** (-37,45%) | 68,89 ± 2,81*** (-66,22%) | 361,63 ± 24,44*** (-80,76%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,25 ± 0,02*** (-60,08%) | 0,31 ± 0,01*** (-70,66%) | 0,26 ± 0,01*** (-73,78%) | 0,11 ± 0,01*** (-83,44%) |

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 *** $P < 0,001$.

Tabla 22 (-continuación-).

| | Médula espinal | Corteza Frontal | Cuerpo estriado | Hipocampo |
|--|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Grupo I Control | | | | |
| 5-HT | 1220,97 ± 24,45 | 444,62 ± 18,09 | 441,94 ± 10,98 | 464,93 ± 54,43 |
| 5-HIAA | 685,89 ± 23,53 | 341,61 ± 22,84 | 630,51 ± 23,00 | 730,62 ± 21,52 |
| 5-HIAA/5-HT | 0,56 ± 0,01 | 0,77 ± 0,04 | 1,43 ± 0,06 | 1,70 ± 0,23 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| 5-HT | 1403,98 ± 32,15** (14,99%) | 501,77 ± 17,99* (12,85%) | 524,59 ± 12,75*** (18,70%) | 534,49 ± 42,27 |
| 5-HIAA | 612,88 ± 19,33* (-10,64%) | 290,82 ± 23,19 | 546,81 ± 11,21** (-13,27%) | 709,44 ± 24,61 |
| 5-HIAA/5-HT | 0,44 ± 0,02*** (-26,33%) | 0,59 ± 0,06* (-23,60%) | 1,05 ± 0,03*** (-26,94%) | 1,38 ± 0,15 |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| 5-HT | 1607,46 ± 39,83*** (31,65%) | 684,64 ± 58,48** (53,98%) | 724,99 ± 10,30*** (64,05%) | 636,90 ± 31,06* (36,99%) |
| 5-HIAA | 411,77 ± 11,63*** (-39,97%) | 102,74 ± 4,96*** (-69,93%) | 134,73 ± 2,31*** (-78,63%) | 227,16 ± 15,04*** (-68,91%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,26 ± 0,01*** (-54,30%) | 0,16 ± 0,02*** (-79,48%) | 0,19 ± 0,00*** (-87,00%) | 0,36 ± 0,03*** (-78,76%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| 5-HT | 1945,39 ± 12,40*** (59,33%) | 756,86 ± 91,31*** (70,23%) | 807,61 ± 7,88*** (82,74%) | 839,98 ± 46,04*** (80,67%) |
| 5-HIAA | 239,68 ± 8,71*** (-65,05%) | 91,31 ± 6,35*** (-73,27%) | 110,41 ± 1,52*** (-82,49%) | 194,96 ± 12,97*** (-73,32%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,12 ± 0,00*** (-78,06%) | 0,12 ± 0,01*** (-83,74%) | 0,14 ± 0,00*** (-90,44%) | 0,24 ± 0,02*** (-86,02%) |

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 *** $P < 0,001$.

3.1.2. Efecto del amitraz sobre el contenido de DA, DOPAC y HVA en el SNC

El tratamiento con amitraz por vía oral afectó de forma dosis-dependiente el contenido de DA, y de sus metabolitos DOPAC y HVA en las regiones del SNC estudiadas (Tablas 23, 24, 25 y 26). El contenido de DA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 23. El contenido de DOPAC (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 24. El contenido de HVA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 25. La Tabla 26 recoge los resultados expresados en las Tablas 23, 24 y 25, incluyendo además la tasa de recambio (DOPAC+HVA/DA).

Los resultados expresados en las Tabla 23, 24, 25 y 26 demuestran que:

- En los animales tratados con la dosis de 20 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo en todas las regiones del SNC un aumento estadísticamente significativo del contenido de DA, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 10% al 93%. En cuanto al contenido de DOPAC, se produjo una pérdida estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC, excepto en el bulbo raquídeo, mesencéfalo y cuerpo estriado, respecto a los animales control. Esta pérdida fue del rango del 12% al 27%. El contenido de HVA también se redujo de forma estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC, respecto a los animales control. Esta disminución fue del rango del 6% al 66%. Se observó una disminución estadísticamente significativa en la tasa de recambio de DA en todas las regiones del SNC, excepto en el mesencéfalo. Esta disminución fue del rango del 12% al 67%.

- En los animales tratados con la dosis de 50 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo un aumento estadísticamente significativo del contenido de DA en todas las regiones del SNC, respecto a los animales control. El incremento fue del rango del 14% al 512%. En cuanto al contenido de DOPAC, se observó una disminución estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC, respecto a los animales control, excepto en el mesencéfalo. Esta disminución fue del rango del 21% al 76%. El contenido de HVA también se redujo de forma estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC, respecto a los animales control. Esta disminución fue del rango del 37% al 92%. Se observó una disminución estadísticamente significativa en la tasa de recambio de DA en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 37% al 92%.
- En los animales tratados con la dosis de 80 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo un aumento estadísticamente significativo del contenido de DA en todas las regiones del SNC, respecto a los animales control. Este incremento fue del rango del 31% al 708%. En cuanto al contenido de DOPAC, se observó una disminución estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC, respecto a los animales control. Esta disminución fue del rango del 37% al 85%. El contenido de HVA también se redujo de forma estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC, respecto a los animales control. Esta disminución fue del rango de 86% al 126%. Se observó una disminución significativa en la tasa de recambio de DA en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 55% al 96%.

En conclusión, el amitraz de forma dosis-dependiente origina un aumento del contenido de DA y un descenso del contenido de sus metabolitos DOPAC y HVA, ambos estadísticamente significativos, en las regiones cerebrales estudiadas. A la dosis mas alta ensayada (80 mg amitraz/kg p.c./día, 5 días), el efecto sobre el aumento del contenido de DA en orden decreciente fue: corteza frontal> hipocampo> mesencéfalo> hipotálamo> medula> bulbo> cerebelo> cuerpo estriado; el efecto sobre el descenso del contenido en DOPAC en orden decreciente fue: cerebelo> bulbo> mesencéfalo> hipocampo> corteza frontal> hipotalamo> cuerpo estriado> medula, y el efecto sobre el descenso del contenido en HVA en orden decreciente fue: hipotálamo> mesencéfalo> hipocampo> medula> cerebelo> corteza frontal> bulbo> cuerpo estriado.

Tabla 23. Efecto del amitraz sobre el contenido de DA (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 30 días de edad.

| | DA (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---------------------|---------------------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I | 337,64 ± | 140,59 ± | 74,45 ± | 321,79 ± | 67,79 ± | 34,77 ± | 6366,68 ± | 115,91 ± |
| Control | 3,98 | 3,88 | 3,13 | 7,05 | 2,52 | 0,58 | 112,03 | 1,22 |
| Grupo II | 426,06 ± | 162,09 ± | 98,82 ± | 443,24 ± | 108,54 ± | 67,20 ± | 6996,09 ± | 221,77 ± |
| Tratado | 2,67*** | 4,31** | 2,52*** | 7,52*** | 3,16*** | 0,98*** | 119,44** | 4,32*** |
| vía oral | (26,19%) | (15,29%) | (32,73%) | (37,74%) | (60,11%) | (93,26%) | (9,89%) | (91,33%) |
| 20 mg/kg/día | | | | | | | | |
| 5 días | | | | | | | | |
| Grupo III | 522,42 ± | 328,08 ± | 114,51 ± | 573,64 ± | 146,57 ± | 212,78 ± | 7250,90 ± | 482,83 ± |
| Tratado | 12,19*** | 7,56*** | 5,65*** | 10,50*** | 3,96*** | 4,19*** | 76,86*** | 4,92*** |
| vía oral | (54,73%) | (133,36%) | (53,80%) | (78,27%) | (116,20%) | (511,96%) | (13,89%) | (316,55%) |
| 50 mg/kg/día | | | | | | | | |
| 5 días | | | | | | | | |
| Grupo IV | 952,08 ± | 435,33 ± | 122,97 ± | 676,84 ± | 168,99 ± | 281,11 ± | 8308,86 ± | 637,27 ± |
| Tratado | 8,48*** | 8,90*** | 2,60*** | 14,15*** | 5,04*** | 3,99*** | 64,15*** | 10,26*** |
| vía oral | (181,98%) | (209,64%) | (65,18%) | (110,34%) | (149,27%) | (708,47%) | (30,51%) | (449,79%) |
| 80 mg/kg/día | | | | | | | | |
| 5 días | | | | | | | | |

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (aumento) 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.

Tabla 24. Efecto del amitraz sobre el contenido de DOPAC (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 30 días de edad.

| | DOPAC (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I Control | 61,87 ± 2,24 | 43,80 ± 14,46 | 24,68 ± 0,93 | 45,34 ± 0,74 | 26,69 ± 0,51 | 37,97 ± 1,01 | 758,15 ± 19,76 | 27,11 ± 0,79 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día 5 días | 50,46 ± 3,01* (-18,45%) | 27,80 ± 2,10 | 17,91 ± 0,68*** (-27,44%) | 44,23 ± 0,69 | 23,53 ± 0,30*** (-11,82%) | 27,75 ± 0,85*** (-26,91%) | 738,49 ± 14,79 | 23,26± 0,55** (-14,19%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día 5 días | 46,11 ± 2,04*** (-25,47%) | 11,55 ± 0,25* (-73,63%) | 9,02 ± 0,43*** (-63,44%) | 10,98 ± 0,29*** (-75,77%) | 21,13± 0,18*** (-20,84%) | 21,43 ± 0,35*** (-43,55%) | 481,31± 22,27*** (-36,52%) | 16,90 ± 0,27*** (-37,66%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día 5 días | 23,76 ± 1,60*** (-61,60%) | 10,07 ± 0,49* (-77,02%) | 3,70 ± 0,33*** (-85,00%) | 8,46 ± 0,15*** (-81,35%) | 16,70 ± 0,16*** (-37,44%) | 11,15 ± 0,32*** (-70,63%) | 393,35 ± 14,80*** (-48,12%) | 7,32 ± 0,21*** (-72,99%) |

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 *** $P < 0,001$.

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

Tabla 25. Efecto del amitraz sobre el contenido de HVA (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 30 días de edad.

| | HVA (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---------------------|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I | 62,68 ± | 31,76 ± | 17,85 ± | 35,66 ± | 32,03 ± | 39,72 ± | 359,75 ± | 20,97 ± |
| Control | 1,54 | 1,20 | 1,49 | 1,19 | 0,53*** | 0,64 | 7,45 | 0,56 |
| Grupo II | 41,72 ± | 27,34 ± | 13,63 ± | 24,45 ± | 24,80 ± | 26,98 ± | 339,04 ± | 7,11 ± |
| Tratado | 1,02*** | 0,74* | 0,52* | 0,36*** | 0,41*** | 0,44*** | 3,67* | 0,23*** |
| vía oral | (-33,45%) | (-13,93%) | (-23,61%) | (-31,45%) | (-22,57%) | (-32,09%) | (-5,76%) | (-66,11%) |
| 20 mg/kg/día | | | | | | | | |
| 5 días | | | | | | | | |
| Grupo III | 23,12 ± | 7,09 ± | 7,72 ± | 17,18 ± | 15,55 ± | 16,86 ± | 315,77 ± | 5,02 ± |
| Tratado | 1,29*** | 0,29*** | 0,34*** | 0,56*** | 0,62*** | 0,27*** | 2,77*** | 0,16*** |
| vía oral | (-63,12%) | (-77,68%) | (-56,77%) | (-51,82%) | (-51,47%) | (-57,54%) | (-12,23%) | (-76,09%) |
| 50 mg/kg/día | | | | | | | | |
| 5 días | | | | | | | | |
| Grupo IV | 8,58 ± | 5,34 ± | 5,05 ± | 12,86 ± | 6,91 ± | 11,48 ± | 266,23 ± | 4,12 ± |
| Tratado | 0,49*** | 0,08*** | 0,49*** | 0,31*** | 0,33*** | 0,65*** | 10,03*** | 0,16*** |
| vía oral | (-86,30%) | (-83,17%) | (-71,72%) | (-63,93%) | (-78,44%) | (-71,10%) | (-26,00%) | (-80,34%) |
| 80 mg/kg/día | | | | | | | | |
| 5 días | | | | | | | | |

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 *** $P < 0,001$.

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

Tabla 26. Efecto del amitraz sobre el contenido de DA (ng/g de tejido), DOPAC (ng/g de tejido) y HVA (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 30 días de edad.

| | Hipotálamo | Mesencéfalo | Cerebelo | Bulbo raquídeo |
|--|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Grupo I Control | | | | |
| DA | 337,64 ± 3,98 | 140,59 ± 3,88 | 74,45 ± 3,13 | 321,79 ± 7,05 |
| DOPAC | 61,87 ± 2,24 | 43,80 ± 14,46 | 24,68 ± 0,93 | 45,34 ± 0,74 |
| HVA | 62,68 ± 1,54 | 31,76 ± 1,20 | 17,85 ± 0,49,27 | 35,66 ± 1,19 |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,37 ± 0,01 | 0,54 ± 0,11 | 0,58 ± 0,03 | 0,25 ± 0,00 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| DA | 426,06 ± 2,67*** (26,19%) | 162,09 ± 4,31** (15,29%) | 98,82 ± 2,52*** (32,73%) | 443,24 ± 7,52*** (37,74%) |
| DOPAC | 50,46 ± 3,01* (-18,45%) | 27,80 ± 2,10 | 17,91 ± 0,68*** (-27,44%) | 44,23 ± 0,69 |
| HVA | 41,72 ± 1,02*** (-33,45%) | 27,34 ± 0,74* (-13,93%) | 13,63 ± 0,52* (-23,61%) | 24,45 ± 0,36*** (-31,45%) |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,22 ± 0,01*** (-41,35%) | 0,34 ± 0,02 | 0,32 ± 0,01*** (-44,45%) | 0,16 ± 0,00*** (-38,43%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| DA | 522,42 ± 12,19*** (54,73%) | 328,08 ± 7,56*** (133,36%) | 114,51 ± 2,31*** (53,80%) | 573,64 ± 10,50*** (78,27%) |
| DOPAC | 46,11 ± 2,04*** (-25,47%) | 11,55 ± 0,25* (-73,63%) | 9,02 ± 0,17*** (-63,44%) | 10,98 ± 0,29*** (-75,77%) |
| HVA | 23,12 ± 1,29*** (-63,12%) | 7,09 ± 0,29*** (-77,68%) | 7,72 ± 0,34*** (-56,77%) | 17,18 ± 0,56*** (-51,82%) |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,13 ± 0,00*** (-65,07,00%) | 0,06 ± 0,00** (-89,51%) | 0,15 ± 0,00*** (-74,55%) | 0,05 ± 0,00*** (-80,48%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| DA | 952,08 ± 8,48*** (181,98%) | 435,33 ± 8,90*** (209,64%) | 122,97 ± 2,60*** (65,18%) | 676,84 ± 14,15*** (110,34%) |
| DOPAC | 23,76 ± 1,60*** (-61,60%) | 10,07 ± 0,49* (-77,02%) | 3,70 ± 0,33*** (-85,00%) | 8,46 ± 0,15*** (-81,35%) |
| HVA | 8,58 ± 0,49*** (-86,30%) | 5,34 ± 0,08*** (-83,17%) | 5,05 ± 0,49*** (-71,72%) | 12,86 ± 0,31*** (-63,93%) |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,03 ± 0,00*** (-90,80%) | 0,04 ± 0,00** (-93,46%) | 0,07 ± 0,01*** (-87,55%) | 0,03 ± 0,00*** (-87,49%) |

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 *** $P < 0,001$.

Tabla 26 (-continuación-).

| Región del SNC | Médula espinal | Corteza Frontal | Cuerpo estriado | Hipocampo |
|--|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Grupo I Control | | | | |
| DA | 67,79 ± 2,52 | 34,77 ± 0,58 | 6366,68 ± 112,03 | 115,91 ± 1,22 |
| DOPAC | 26,69 ± 0,51 | 37,97 ± 1,01 | 758,15 ± 19,76 | 27,11 ± 0,79 |
| HVA | 32,03 ± 0,53 | 39,72 ± 0,64 | 359,75 ± 7,45 | 20,97 ± 0,56 |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,87 ± 0,02 | 2,24 ± 0,03 | 0,18 ± 0,00 | 0,42 ± 0,01 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| DA | 108,54 ± 3,16*** (60,11%) | 67,20 ± 0,98*** (93,26%) | 6996,09 ± 119,44** (9,89%) | 221,77 ± 4,32*** (91,33%) |
| DOPAC | 23,53 ± 0,30*** (-11,82%) | 27,75 ± 0,85*** (-26,91%) | 738,49 ± 14,79 | 23,26 ± 0,55** (-14,19%) |
| HVA | 24,80 ± 0,41*** (-22,57%) | 26,98 ± 0,44*** (-32,09%) | 339,04 ± 3,67* (-5,76%) | 7,11 ± 0,23*** (-66,11%) |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,45 ± 0,01*** (-48,63%) | 0,81 ± 0,01*** (-63,58%) | 0,15 ± 0,00** (-12,14%) | 0,14 ± 0,00*** (-66,94%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| DA | 146,57 ± 3,96*** (116,20%) | 212,78 ± 4,19*** (511,96%) | 7250,90 ± 76,86*** (13,89%) | 482,83 ± 4,92*** (316,55%) |
| DOPAC | 21,13 ± 0,18*** (-20,84%) | 21,43 ± 0,35*** (-43,55%) | 481,31 ± 22,27*** (-36,52%) | 16,90 ± 0,27*** (-37,66%) |
| HVA | 15,55 ± 0,62*** (-51,47%) | 16,86 ± 0,27*** (-57,54%) | 315,77 ± 2,77*** (-12,23%) | 5,02 ± 0,16*** (-76,09%) |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,25 ± 0,01*** (-71,16%) | 0,18 ± 0,00*** (-91,93%) | 0,11 ± 0,00*** (-37,34%) | 0,05 ± 0,00*** (-89,06%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| DA | 168,99 ± 5,04*** (149,27%) | 281,11 ± 3,99*** (708,47%) | 8308,86 ± 64,15*** (30,51%) | 637,27 ± 10,26*** (449,79%) |
| DOPAC | 16,70 ± 0,16*** (-37,44%) | 11,15 ± 0,32*** (-70,63%) | 393,35 ± 14,80*** (-48,12%) | 7,32 ± 0,21*** (-72,99%) |
| HVA | 6,91 ± 0,33*** (-78,44%) | 11,48 ± 0,65*** (-71,10%) | 266,23 ± 10,03*** (-26,00%) | 4,12 ± 0,16*** (-80,34%) |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,14 ± 0,01*** (-83,87%) | 0,08 ± 0,00*** (-96,40%) | 0,08 ± 0,00*** (-54,81%) | 0,02 ± 0,00*** (-95,67%) |

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 *** $P < 0,001$.

3.1.3. Efecto del amitraz sobre el contenido de NA y MHPG en el SNC

El tratamiento con amitraz por vía oral afectó de forma dosis-dependiente el contenido de NA y de su metabolito MHPG en las regiones del SNC estudiadas (Tablas 27, 28 y 29). El contenido de NA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 27. El contenido de MHPG (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos se presenta en la Tabla 28. La Tabla 29 recoge los resultados expresados en las Tablas 27 y 28, incluyendo además la tasa de recambio (MHPG/NA).

Los resultados expresados en las Tabla 27, 28 y 29 demuestran que:

- En los animales tratados con la dosis de 20 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo en todas las regiones del SNC un aumento estadísticamente significativo del contenido de NA, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 10% al 98%. En cuanto al contenido de MHPG, se produjo en todas las regiones del SNC una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue del rango del 18% al 48%. La tasa de recambio sufrió una disminución estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 28% al 66%.
- En los animales tratados con la dosis de 50 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo en todas las regiones del SNC un aumento estadísticamente significativo del contenido de NA, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 18% al 235%. En cuanto al contenido de MHPG, se produjo en todas las regiones del SNC una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue rango del 30% al 75%. La tasa de recambio sufrió una disminución estadísticamente

significativa en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 50% al 80%.

- En los animales tratados con la dosis de 80 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo en todas las regiones del SNC un aumento estadísticamente significativo del contenido de NA, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 36% al 264%. En cuanto al contenido de MHPG, se produjo en todas las regiones del SNC una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue del rango del 57% al 88%. La tasa de recambio sufrió una disminución estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 76% al 96%.

En conclusión, el amitraz de forma dosis-dependiente origina un aumento del contenido de NA y un descenso del contenido de su metabolito MHPG, ambos estadísticamente significativos, en las regiones cerebrales estudiadas. A la dosis mas alta ensayada (80 mg amitraz/kg p.c./día, 5 días), el efecto sobre el aumento del contenido de NA en orden decreciente fue: cerebelo> cuerpo estriado> hipotálamo> bulbo> medula> hipocampo> corteza frontal> mesencéfalo, y el efecto sobre el descenso del contenido de MHPG en orden decreciente fue: mesencéfalo> hipotálamo> cerebelo> medula> bulbo> cuerpo estriado> corteza frontal > hipocampo.

Tabla 27. Efecto del amitraz sobre el contenido de NA (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 30 días de edad.

| | NA (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I Control | 638,16 ± 11,21 | 276,19 ± 6,07 | 95,28 ± 2,83 | 343,27 ± 4,49 | 228,12 ± 3,02 | 187,79 ± 4,48 | 116,67 ± 1,65 | 182,45 ± 2,85 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día 5 días | 1260,82 ± 11,20*** (97,57%) | 302,77 ± 7,16* (9,62%) | 104,77 ± 1,16* (9,95%) | 395,85 ± 6,99*** (15,32%) | 301,68 ± 6,55*** (32,25%) | 213,70 ± 2,15*** (13,80%) | 153,67 ± 1,79*** (31,71%) | 229,61 ± 3,12*** (25,85%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día 5 días | 1736,61 ± 18,58*** (172,13%) | 324,84 ± 18,32* (17,62%) | 325,80 ± 14,50*** (241,93%) | 693,76 ± 13,78*** (102,10%) | 427,04 ± 5,02*** (87,19%) | 264,51 ± 3,43*** (40,86%) | 189,00 ± 3,52*** (62,00%) | 309,71 ± 3,78*** (69,75%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día 5 días | 1792,65 ± 14,34*** (180,91%) | 375,70 ± 28,92** (40,76%) | 353,36 ± 8,84*** (270,85%) | 858,60 ± 19,33*** (150,12%) | 562,04 ± 9,09*** (146,37%) | 304,17 ± 4,12*** (61,97%) | 352,27 ± 11,62*** (201,94%) | 355,55 ± 6,73*** (94,87%) |

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (aumento) 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.

Tabla 28. Efecto del amitraz sobre el contenido de MHPG (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 30 días de edad.

| | MHPG (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I Control | 1738,71 ± 14,69 | 432,47 ± 8,58 | 649,74 ± 15,82 | 744,40 ± 9,53 | 1208,39 ± 18,70 | 2493,68 ± 12,77 | 2042,74 ± 20,06 | 1247,40 ± 10,56 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día 5 días | 1168,80 ± 42,73*** (-32,78%) | 323,96 ± 18,74*** (-25,09%) | 335,04 ± 10,77*** (-48,43%) | 547,39 ± 4,94*** (-26,47%) | 755,84 ± 19,09*** (-37,45%) | 2034,91 ± 26,62*** (-18,40%) | 1373,49 ± 41,66*** (-32,76%) | 870,47 ± 14,64*** (-30,22%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día 5 días | 588,74 ± 52,14*** (-66,14%) | 109,14 ± 7,07*** (-74,76%) | 216,57 ± 7,20*** (-66,67%) | 319,07 ± 6,33*** (-57,14%) | 652,32 ± 15,38*** (-46,02%) | 1741,04 ± 12,19*** (-30,18%) | 1014,50 ± 44,47*** (-50,34%) | 63713,29,21 ± 14,53*** (-48,92%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día 5 días | 208,33 ± 15,13*** (-88,02%) | 49,94 ± 2,26*** (-88,45%) | 88,24 ± 2,66*** (-86,42%) | 105,16 ± 4,01*** (-85,87%) | 166,41 ± 6,19*** (-86,23%) | 975,44 ± 6,86*** (-60,88%) | 778,59 ± 32,33*** (-61,88%) | 542,22 ± 11,21*** (-56,53%) |

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 *** $P < 0,001$.

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

Tabla 29. Efecto del amitraz sobre el contenido de NA (ng/g de tejido) y MHPG (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 30 días de edad.

| | Hipotálamo | Mesencéfalo | Cerebelo | Bulbo raquídeo |
|--|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Grupo I Control | | | | |
| NA | 638,16 ± 11,21 | 276,19 ± 6,70 | 95,28 ± 2,83 | 343,27 ± 4,49 |
| MHPG | 1738,71 ± 14,69 | 432,47 ± 8,58 | 649,74 ± 15,82 | 744,40 ± 9,53 |
| MHPG/NA | 2,73 ± 0,06 | 1,57 ± 0,05 | 6,84 ± 0,19 | 2,17 ± 0,04 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| NA | 1260,82 ± 11,20*** (97,57%) | 302,77 ± 7,16* (9,62%) | 104,77 ± 1,16* (9,95%) | 395,85 ± 6,99*** (15,32%) |
| MHPG | 1168,80 ± 42,73*** (-32,78%) | 323,96 ± 18,74*** (-25,09%) | 335,04 ± 10,77*** (-48,43%) | 547,39 ± 4,94*** (-26,47%) |
| MHPG /NA | 0,93 ± 0,03*** (-66,04%) | 1,07 ± 0,06*** (-31,76%) | 3,20 ± 0,10*** (-53,22%) | 1,39 ± 0,03*** (-36,19%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| NA | 1736,61 ± 18,58*** (172,13%) | 324,84 ± 18,32* (17,62%) | 325,80 ± 14,50*** (235,26%) | 693,76 ± 13,78*** (102,10%) |
| MHPG | 588,74 ± 52,14*** (-66,14%) | 109,14 ± 7,07*** (-74,76%) | 216,57 ± 7,20*** (-66,67%) | 319,07 ± 6,33*** (-57,14%) |
| MHPG /NA | 0,34 ± 0,03*** (-87,55%) | 0,34 ± 0,01*** (-78,59%) | 0,67 ± 0,07*** (-90,04%) | 0,46 ± 0,01*** (-78,77%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| NA | 1792,65 ± 14,34*** (180,91%) | 375,70 ± 28,92** (36,03%) | 353,36 ± 8,84*** (263,62%) | 858,60 ± 19,33*** (150,12%) |
| MHPG | 208,33 ± 15,13*** (-88,02%) | 49,94 ± 2,26*** (-88,45%) | 88,24 ± 2,66*** (-86,42%) | 105,16 ± 4,01*** (-85,87%) |
| MHPG /NA | 0,12 ± 0,01*** (-95,74%) | 0,14 ± 0,01*** (-91,35%) | 0,25 ± 0,01*** (-96,28%) | 0,12 ± 0,00*** (-94,35%) |

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 *** $P < 0,001$.

Tabla 29 (-continuación-).

| Región del SNC | Médula espinal | Corteza Frontal | Cuerpo estriado | Hipocampo |
|--|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Grupo I Control | | | | |
| NA | 228,12 ± 3,02 | 187,79 ± 4,48 | 116,67 ± 1,65 | 182,45 ± 2,85 |
| MHPG | 1208,39 ± 18,70 | 2493,68 ± 12,77 | 2042,74 ± 20,06 | 1247,40 ± 10,56 |
| MHPG/NA | 5,30 ± 0,11 | 13,32 ± 0,36 | 17,52 ± 0,24 | 6,85 ± 0,14 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| NA | 301,68 ± 6,55*** (32,25%) | 213,70 ± 2,15*** (13,80%) | 153,67 ± 1,79*** (31,71%) | 229,61 ± 3,12*** (25,85%) |
| MHPG | 755,84 ± 19,09*** (-37,45%) | 2034,91 ± 26,62*** (-18,40%) | 1373,49 ± 41,66*** (-32,76%) | 870,47 ± 14,64*** (-30,22%) |
| MHPG /NA | 2,51 ± 0,03*** (-52,75%) | 9,53 ± 0,17*** (-28,48%) | 8,94 ± 0,29*** (-48,96%) | 3,80 ± 0,10*** (-44,55%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| NA | 427,04 ± 5,02*** (87,19%) | 264,51 ± 3,43*** (40,86%) | 189,00 ± 3,52*** (62,00%) | 309,71 ± 3,78*** (69,75%) |
| MHPG | 652,32 ± 15,38*** (-46,02%) | 1741,04 ± 12,19*** (-30,18%) | 1014,50 ± 44,47*** (-50,34%) | 637,21 ± 13,29*** (-48,92%) |
| MHPG /NA | 1,53 ± 0,04*** (-71,17%) | 6,59 ± 0,10*** (-50,54%) | 5,37 ± 0,22*** (-69,36%) | 2,06 ± 0,06*** (-69,90%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| NA | 562,04 ± 9,09*** (146,37%) | 304,17 ± 4,12*** (61,97%) | 807,61 ± 7,88*** (82,74%) | 839,98 ± 46,04** (80,67%) |
| MHPG | 166,41 ± 6,19*** (-86,23%) | 975,44 ± 6,86*** (-60,88%) | 110,41 ± 1,52*** (-82,49%) | 194,96 ± 12,97*** (-73,32%) |
| MHPG /NA | 0,30 ± 0,01*** (-94,41%) | 3,21 ± 0,06*** (-75,89%) | 0,14 ± 0,00*** (-90,44%) | 0,24 ± 0,02** (-86,02%) |

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 *** $P < 0,001$.

3.2. EFECTO DEL AMITRAZ EN RATAS DE 60 DÍAS DE EDAD

Ratas macho de 60 días de edad tratadas por vía oral con amitraz disuelto en aceite de maíz a la dosis mas alta (80 mg/kg/días, 5 días) mostraron una incoordinación motora ligera, efecto que se presento aproximadamente entre 1 y 2 h tras el tratamiento. Estos signos fueron reversibles y aproximadamente, a las 6 horas después del tratamiento las ratas se comportaban de manera normal.

En las ratas tratadas con 20 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días no se observó, al final de los 5 días de tratamiento, ningún efecto en la ganancia o el incremento de peso corporal con respecto a las ratas control (Tabla 31). Sin embargo, en las ratas tratadas con 50 y 80 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se observó, al final de los 5 días de tratamiento, una disminución significativa del 57% ($P<0,05$) y del 71% ($P<0,001$), respectivamente, en el incremento de peso corporal. El tratamiento de los animales con amitraz a las 3 dosis ensayadas no afectó al peso de los tejidos (regiones cerebrales), ni a la relación peso tejido/peso corporal (%) con respecto a los animales control.

3.2.1. Efecto del amitraz sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el SNC

El tratamiento con amitraz por vía oral afectó de forma dosis-dependiente el contenido de 5-HT y de su metabolito 5-HIAA en las regiones del SNC estudiadas respecto a los animales control (Tablas 30, 31 y 32). El contenido de 5-HT (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 30. El contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 31. La Tabla 32 recoge los resultados expresados en las Tablas 30 y 31, incluyendo además la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT).

Los resultados expresados en las Tablas 30, 31 y 32 demuestran que:

- En los animales tratados con la dosis de 20 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo en todas las regiones del SNC, excepto en el hipocampo, un aumento estadísticamente significativo del contenido de 5-HT, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 23% al 128%. En cuanto al contenido de 5-HIAA, se produjo en todas las regiones del SNC, excepto en el mesencéfalo y en la corteza frontal, una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue del rango del 4% al 66%. La tasa de recambio sufrió un descenso estadísticamente significativo en todas las regiones del SNC, excepto en el mesencéfalo. Esta disminución fue del rango del 41% al 88%.
- En los animales tratados con la dosis de 50 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo en todas las regiones del SNC, excepto en el hipocampo, un aumento estadísticamente significativo del contenido de 5-HT, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 45% al 244%. En cuanto al contenido de 5-HIAA, se

produjo en todas las regiones del SNC, una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue del rango del 8% al 68%. La tasa de recambio disminuyó de forma estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 54% al 91%.

- En los animales tratados con la dosis de 80 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo en todas las regiones del SNC un aumento estadísticamente significativo del contenido de 5-HT, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 89% al 688%. En cuanto al contenido de 5-HIAA, se produjo en todas las regiones del SNC una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue del rango del 21% al 84%. La tasa de recambio disminuyó de forma estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC, excepto en el hipotálamo. Esta disminución fue del rango 63% al 97%.

En conclusión, el amitraz de forma dosis-dependiente origina un aumento del contenido de 5-HT y un descenso del contenido de su metabolito 5-HIAA, ambos estadísticamente significativos, en las regiones cerebrales estudiadas. A la dosis mas alta ensayada (80 mg amitraz/kg p.c./día, 5 días), el efecto sobre el aumento del contenido de 5-HT en orden decreciente fue: medula> cerebelo> hipocampo> mesencéfalo> hipotálamo> bulbo> corteza frontal> cuerpo estriado, y el efecto sobre el descenso del contenido en 5-HIAA en orden decreciente fue: corteza frontal> medula> bulbo> hipotálamo> cerebelo> hipocampo> cuerpo estriado> mesencéfalo.

Tabla 30. Efecto del amitraz sobre el contenido de 5-HT (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 60 días de edad.

| | 5-HT (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I Control | 2265,33 ± 57,19 | 1017,93 ± 29,96 | 74,69 ± 1,48 | 1112,71 ± 3,87 | 248,18 ± 7,85 | 771,73 ± 71,81 | 235,04 ± 7,54 | 525,88 ± 9,28 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día 5 días | 3154,34 ± 76,31*** (39,24%) | 1256,01 ± 47,02** (23,39%) | 96,74 ± 1,07*** (29,52%) | 1608,90 ± 20,37*** (44,59%) | 565,52 ± 18,86*** (127,87%) | 1129,72 ± 61,08*** (46,39%) | 371,83 ± 3,91*** (58,20%) | 852,94 ± 35,46*** (62,19%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día 5 días | 3469,37 ± 132,44*** (53,15%) | 1621,50 ± 15,71*** (59,29%) | 108,24 ± 3,02*** (44,91%) | 1761,54 ± 9,92*** (58,31%) | 854,38 ± 13,33*** (244,26%) | 1425,70 ± 7,95*** (84,74%) | 390,41 ± 2,06*** (74,61%) | 1052,13 ± 12,29*** (100,07%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día 5 días | 4802,27 ± 48,49*** (111,99%) | 2340,79 ± 18,20*** (129,96%) | 237,60 ± 8,97*** (218,12%) | 2341,90 ± 67,82*** (110,47%) | 1955,65 ± 14,53*** (687,99%) | 1581,12 ± 22,87*** (104,88%) | 410,98 ± 10,16*** (88,89%) | 1236,03 ± 27,70*** (135,04%) |

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (aumento) 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.

Tabla 31. Efecto del amitraz sobre el contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 60 días de edad.

| | 5-HIAA (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I Control | 1083,91 ± 49,73 | 912,51 ± 12,82 | 106,41 ± 3,45 | 1070,01 ± 5,01 | 357,20 ± 14,51 | 530,29 ± 92,11 | 355,85 ± 11,89 | 507,58 ± 10,75 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día 5 días | 858,03 ± 22,75** (-20,84%) | 892,92 ± 61,29 (-2,15) | 80,78 ± 2,03*** (-24,08%) | 825,30 ± 9,98*** (-22,87%) | 122,47 ± 2,74*** (-65,71%) | 441,74 ± 16,45 (-16,70%) | 306,35 ± 6,30** (-13,91%) | 487,43 ± 13,37 |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día 5 días | 633,27 ± 39,63*** (-46,75%) | 814,36 ± 19,09** (-10,76%) | 48,46 ± 0,86*** (-54,46%) | 435,42 ± 9,65*** (-59,31%) | 113,91 ± 3,25*** (-68,11%) | 289,85 ± 1,91*** (-45,34%) | 236,16 ± 5,13*** (-33,64%) | 267,26 ± 11,87* (-7,94%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día 5 días | 378,99 ± 14,84*** (-64,04%) | 720,57 ± 7,68*** (-21,03%) | 41,02 ± 2,05*** (-61,45%) | 365,98 ± 8,77*** (-65,80%) | 90,99 ± 2,05*** (-74,53%) | 84,65 ± 5,78*** (-84,04%) | 167,37 ± 1,98*** (-52,97%) | 222,87 ± 4,60*** (-56,09%) |

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 *** $P < 0,001$.

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

Tabla 32. Efecto del amitraz sobre el contenido de 5-HT (ng/g de tejido) y 5-HIAA (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 60 días de edad.

| | Hipotálamo | Mesencéfalo | Cerebelo | Bulbo raquídeo |
|--|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Grupo I Control | | | | |
| 5-HT | 2265,33 ± 57,19 | 1017,93 ± 29,96 | 74,69 ± 1,48 | 1112,71 ± 3,87 |
| 5-HIAA | 1083,91 ± 49,73 | 912,51 ± 12,82 | 106,41 ± 3,45 | 1070,01 ± 5,01 |
| 5-HIAA/5-HT | 0,48 ± 0,03 | 0,90 ± 0,03 | 1,42 ± 0,03 | 0,96 ± 0,00 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| 5-HT | 3154,34 ± 76,31*** (39,24%) | 1256,01 ± 47,02** (23,39%) | 96,74 ± 1,07*** (29,52%) | 1608,90 ± 20,37*** (44,59%) |
| 5-HIAA | 858,03 ± 22,75** (-20,84%) | 892,92 ± 61,29 | 80,78 ± 2,03*** (-24,08%) | 825,30 ± 9,98*** (-22,87%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,27 ± 0,01*** (-43,24%) | 0,72 ± 0,06 | 0,84 ± 0,02*** (-41,37%) | 0,51 ± 0,01 |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| 5-HT | 3469,37 ± 132,44 *** (53,15%) | 1621,50 ± 15,71*** (59,29%) | 108,24 ± 3,02*** (44,91%) | 1761,54 ± 9,92*** (58,31%) |
| 5-HIAA | 633,27 ± 39,63*** (-46,75%) | 814,36 ± 19,09** (-10,76%) | 48,46 ± 0,86*** (-54,46%) | 435,42 ± 9,65*** (-59,31%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,17 ± 0,01*** (-65,21%) | 0,25 ± 0,00*** (-72,49%) | 0,45 ± 0,02*** (-68,43%) | 0,25 ± 0,00*** (-74,30%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| 5-HT | 4802,27 ± 48,49*** (111,99%) | 2340,79 ± 18,20*** (129,96%) | 237,60 ± 8,97*** (218,12%) | 2341,90 ± 67,82*** (110,47%) |
| 5-HIAA | 378,99 ± 14,84*** (-65,04%) | 720,57 ± 7,68*** (-21,03%) | 41,02 ± 2,05*** (-61,45%) | 365,98 ± 8,77*** (-65,80%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,08 ± 0,00*** (-83,61%) | 0,31 ± 0,00*** (-65,82%) | 0,17 ± 0,01*** (-87,75%) | 0,16 ± 0,00*** (-83,73%) |

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 *** $P < 0,001$.

Tabla 32 (-continuación-).

| | Médula espinal | Corteza Frontal | Cuerpo estriado | Hipocampo |
|--|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Grupo I Control | | | | |
| 5-HT | 248,18 ± 7,85 | 771,73 ± 71,81 | 235,04 ± 7,54 | 525,88 ± 9,28 |
| 5-HIAA | 357,18 ± 14,51 | 530,29 ± 92,11 | 355,85 ± 11,89 | 507,58 ± 10,75 |
| 5-HIAA/5-HT | 1,44 ± 0,03 | 0,69 ± 0,09 | 1,52 ± 0,07 | 0,97 ± 0,02 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| 5-HT | 565,53 ± 18,86*** (127,87%) | 1129,72 ± 61,08*** (46,39%) | 371,83 ± 3,91*** (58,20%) | 852,94 ± 35,46*** (62,19%) |
| 5-HIAA | 122,47 ± 2,74*** (-65,71%) | 441,74 ± 16,45 | 306,35 ± 6,30** (-13,91%) | 487,43 ± 13,38 |
| 5-HIAA/5-HT | 0,22 ± 0,00*** (-84,91%) | 0,40 ± 0,03*** (-42,07%) | 0,83 ± 0,02*** (-45,74%) | 0,57 ± 0,02*** (-40,55%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| 5-HT | 854,38 ± 13,33*** (244,26%) | 1425,70 ± 7,95*** (84,74%) | 390,41 ± 2,06*** (66,10%) | 1052,13 ± 12,29*** (100,07%) |
| 5-HIAA | 113,91 ± 3,25*** (-68,11%) | 289,85 ± 1,91*** (-45,34%) | 236,16 ± 5,13*** (-33,64%) | 467,26 ± 11,87* (-7,94%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,13 ± 0,00*** (-90,73%) | 0,20 ± 0,00*** (-70,38%) | 0,60 ± 0,01*** (-60,22%) | 0,44 ± 0,01*** (-54,05%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| 5-HT | 1955,65 ± 14,53*** (687,99%) | 1581,12 ± 22,87*** (104,88%) | 410,98 ± 10,16*** (74,85%) | 1236,03 ± 27,70*** (135,04%) |
| 5-HIAA | 90,99 ± 2,05*** (-74,53%) | 84,65 ± 5,78*** (-84,04%) | 167,37 ± 1,97*** (-52,97%) | 441,87 ± 4,60*** (-12,95%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,05 ± 0,00*** (-96,76%) | 0,05 ± 0,00*** (-92,21%) | 0,41 ± 0,01*** (-73,15%) | 0,36 ± 0,01*** (-62,91%) |

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 *** $P < 0,001$.

3.2.2. Efecto del amitraz sobre el contenido de DA, DOPAC y HVA en el SNC

El tratamiento con amitraz por vía oral afectó de forma dosis-dependiente el contenido de DA, y de sus metabolitos DOPAC y HVA en las regiones del SNC estudiadas (Tablas 33, 34, 35 y 36). El contenido de DA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 33. El contenido de DOPAC (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 34. El contenido de HVA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 35. La Tabla 36 recoge los resultados expresados en las Tablas 33, 34 y 35, incluyendo la tasa de recambio (DOPAC+HVA/DA).

Los resultados expresados en las Tabla 33, 34, 35 y 36 demuestran que:

- En los animales tratados con la dosis de 20 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo un aumento estadísticamente significativo del contenido de DA en todas las regiones del SNC, excepto en el hipotálamo, respecto a los animales control. El aumento fue del rango del 6% 118%. En cuanto al contenido de DOPAC se produjo una pérdida estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC, excepto en la corteza frontal. Esta disminución fue del rango del 9% al 83%. El contenido de HVA se redujo de forma estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 15% al 60%. Se observó una disminución estadísticamente significativa en la tasa de recambio de DA en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 22% al 77%.
- En los animales tratados con la dosis de 50 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo un aumento estadísticamente significativo del contenido de DA en todas las regiones del SNC, respecto a los animales control. El incremento fue del rango del 18%

al 585%. En cuanto al contenido de DOPAC, se observó una disminución estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 26% al 90%. El contenido de HVA se redujo de forma estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC, siendo esta disminución del rango del 8% al 80%. Se observó una disminución estadísticamente significativa en la tasa de recambio de DA en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 46% al 97%.

- En los animales tratados con la dosis de 80 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo un aumento estadísticamente significativo del contenido de DA en todas las regiones del SNC, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 29% al 930%. En cuanto al contenido de DOPAC, se observó una disminución estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 45% al 97%. El contenido de HVA se redujo de forma estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 12% al 100%. Se observó una disminución estadísticamente significativa en la tasa de recambio de DA en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 72% al 99%.

En conclusión, el amitraz de forma dosis-dependiente origina un aumento del contenido de DA y un descenso del contenido de sus metabolitos DOPAC y HVA, ambos estadísticamente significativos, en las regiones cerebrales estudiadas. A la dosis mas alta ensayada (80 mg amitraz/kg p.c./día, 5 días), el efecto sobre el aumento del contenido de DA en orden decreciente fue: cerebelo> medula> corteza frontal> hipocampo> hipotálamo> bulbo> mesencéfalo> cuerpo estriado; el efecto sobre el descenso del contenido en DOPAC en orden decreciente fue: mesencéfalo> medula> cerebelo> hipotálamo> cuerpo estriado> hipocampo> bulbo> corteza frontal, y el efecto sobre el descenso del contenido en HVA en orden decreciente fue: mesencéfalo> cerebelo> bulbo> corteza frontal> medula> hipotálamo> cuerpo estriado> hipocampo.

Tabla 33. Efecto del amitraz sobre el contenido de DA (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 60 días de edad.

| | DA (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I Control | 307,41 ± 8,24 | 148,42 ± 28,47 | 9,44 ± 0,43 | 299,29 ± 4,67 | 62,48 ± 0,94 | 52,31 ± 1,21 | 3929,66 ± 30,81 | 170,32 ± 4,32 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día 5 días | 344,89 ± 14,87 | 207,37 ± 4,62*** (39,72%) | 20,55 ± 1,03*** (117,78%) | 393,92 ± 9,57*** (31,62%) | 77,13 ± 0,76*** (23,45%) | 68,58 ± 2,81*** (31,09%) | 4165,44± 26,84*** (6,00%) | 197,85 ± 5,66** (16,17%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día 5 días | 495,17 ± 23,50*** (61,08%) | 268,22 ± 15,59*** (80,72 %) | 64,60 ± 1,96*** (584,72%) | 625,17 ± 11,24*** (108,88%) | 354,72 ± 8,74*** (467,73%) | 194,11 ± 2,61*** (271,04%) | 4637,48± 100,86*** (18,01%) | 274,01 ± 5,93*** (60,88%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día 5 días | 675,64 ± 25,23*** (119,78%) | 285,25± 11,84*** (92,19%) | 97,20 ± 2,70*** (930,22%) | 625,17 ± 11,24*** (108,88%) | 354,72 ± 8,74*** (467,73%) | 250,39 ± 3,54*** (378,63%) | 5064,90 ± 134,49*** (28,89%) | 415,90 ± 6,96*** (144,19%) |

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (aumento) 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.

Tabla 34. Efecto del amitraz sobre el contenido de DOPAC (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 60 días de edad.

| | DOPAC (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I Control | 49,49 ± 3,02 | 21,51 ± 1,56 | 25,78 ± 1,73 | 29,01 ± 2,09 | 47,12 ± 0,89 | 27,41 ± 1,66 | 594,07 ± 4,13 | 10,87 ± 0,31 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día 5 días | 36,07± 2,51** (-27,11%) | 15,98 ± 0,87*** (-25,70%) | 17,21 ± 1,18** (-33,27%) | 13,37 ± 0,48*** (-53,90%) | 8,07 ± 0,39*** (-82,88%) | 24,54 ± 2,43 | 542,33 ± 9,88*** (-8,71%) | 7,20 ± 0,24*** (-33,74%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día 5 días | 24,13 ± 1,55*** (-51,24%) | 10,80 ± 1,97*** (-49,76%) | 5,79 ± 0,20*** (-77,56%) | 10,21 ± 0,52*** (-64,82%) | 4,52 ± 0,19*** (-90,40%) | 20,27 ± 0,68** (-26,04%) | 384,49 ± 7,48*** (-35,28%) | 5,49 ± 0,31*** (-49,50%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día 5 días | 8,91 ± 0,97*** (-82,00%) | 0,65 ± 0,18*** (-96,98%) | 2,77 ± 0,33*** (-89,27%) | 8,15 ± 0,48*** (-71,90%) | 3,35 ± 0,07*** (-92,89%) | 14,96 ± 1,00*** (-45,40%) | 130,44 ± 5,28*** (-78,04%) | 2,72 ± 0,16*** (-74,97%) |

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 *** $P < 0,001$.

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

Tabla 35. Efecto del amitraz sobre el contenido de HVA (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 60 días de edad.

| | HVA (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I Control | 86,91 ± 3,97 | 32,40 ± 2,35 | 28,49 ± 1,53 | 41,85 ± 1,38 | 17,52 ± 0,48 | 54,98 ± 1,13 | 395,59 ± 20,31 | 16,12 ± 0,44 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día 5 días | 47,33 ± 1,96*** (-45,54%) | 27,39 ± 1,80* (-15,48%) | 22,67 ± 1,86* (-20,45%) | 16,94 ± 0,41*** (-59,51%) | 10,67 ± 0,27*** (-39,12%) | 34,97 ± 0,59*** (-36,38%) | 279,94 ± 19,21** (-29,23%) | 15,64 ± 0,41 |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día 5 días | 41,71 ± 2,55*** (-52,00%) | 21,68 ± 0,96*** (-33,10%) | 5,69 ± 0,44*** (-80,03%) | 11,40 ± 0,26*** (-72,77%) | 7,49 ± 0,25*** (-57,25%) | 32,19 ± 0,71*** (-41,44%) | 247,01 ± 6,41*** (-37,56%) | 14,83 ± 0,24* (-8,02%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día 5 días | 33,89 ± 3,72*** (-61,01%) | 0,034 ± 0,00*** (-99,89%) | 3,42 ± 0,32*** (-88,01%) | 5,48 ± 0,29*** (-86,90%) | 3,83 ± 0,22*** (-78,17%) | 7,26 ± 0,41*** (-86,79%) | 221,72 ± 9,13*** (-43,95%) | 14,19 ± 0,12** (-11,97%) |

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 *** $P < 0,001$.

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

Tabla 36. Efecto del amitraz sobre el contenido de DA (ng/g de tejido), DOPAC (ng/g de tejido) y HVA (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 60 días de edad.

| | Hipotálamo | Mesencéfalo | Cerebelo | Bulbo raquídeo |
|--|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Grupo I Control | | | | |
| DA | 307,41 ± 8,24 | 148,42 ± 28,47 | 9,44 ± 0,43 | 299,29 ± 4,67 |
| DOPAC | 49,49 ± 3,02 | 21,51 ± 1,56 | 25,78 ± 1,73 | 29,01 ± 2,09 |
| HVA | 86,91 ± 3,97 | 32,40 ± 2,35 | 28,49 ± 1,53 | 41,85 ± 1,38 |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,45 ± 0,03 | 0,37 ± 0,07 | 5,86 ± 0,52 | 0,24 ± 0,01 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| DA | 344,89 ± 14,87 | 207,37 ± 4,62*** (39,72%) | 20,55 ± 1,03*** (117,78%) | 382,63 ± 6,13*** (27,84%) |
| DOPAC | 36,07 ± 2,51** (-27,11%) | 15,98 ± 0,87*** (-25,70%) | 17,21 ± 1,18** (-33,27%) | 13,37 ± 0,48*** (-53,90%) |
| HVA | 47,33 ± 1,96*** (-45,54%) | 27,39 ± 1,80* (-15,48%) | 22,67 ± 1,86* (-20,45%) | 16,94 ± 0,41*** (-59,51%) |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,24 ± 0,01*** (-45,45%) | 0,21 ± 0,02*** (-43,59%) | 1,94 ± 0,08*** (-66,81%) | 0,08 ± 0,00*** (-66,56%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| DA | 495,17 ± 23,50*** (61,08%) | 268,22 ± 15,59*** (80,72%) | 64,60 ± 1,96*** (584,72%) | 625,17 ± 11,24*** (108,88%) |
| DOPAC | 24,13 ± 1,55*** (-51,24%) | 10,80 ± 0,81*** (-49,76%) | 5,79 ± 0,20*** (-77,56%) | 10,21 ± 0,52*** (-64,82%) |
| HVA | 41,71 ± 2,55*** (-52,00%) | 21,68 ± 0,96*** (-33,10%) | 5,69 ± 0,44*** (-80,03%) | 11,40 ± 0,26*** (-72,77%) |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,13 ± 0,01*** (-69,89%) | 0,12 ± 0,01*** (-67,11%) | 0,18 ± 0,01*** (-96,96%) | 0,03 ± 0,00*** (-85,41%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| DA | 675,64 ± 25,23*** (119,78%) | 285,25 ± 11,84*** (92,19%) | 97,20 ± 2,70*** (930,22%) | 889,00 ± 19,37*** (197,03%) |
| DOPAC | 8,91 ± 0,97*** (-82,00%) | 0,65 ± 0,18*** (-96,98%) | 2,77 ± 0,33*** (-89,27%) | 8,15 ± 0,48*** (-71,90%) |
| HVA | 33,89 ± 3,72*** (-61,01%) | 0,034 ± 0,00*** (-99,89%) | 3,42 ± 0,32*** (-88,01%) | 5,48 ± 0,29*** (-86,90%) |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,06 ± 0,01*** (-85,51%) | 0,00 ± 0,00*** (-99,35%) | 0,06 ± 0,00*** (-98,91%) | 0,02 ± 0,00*** (-93,52%) |

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 *** $P < 0,001$.

Tabla 36 (-continuación-).

| Región del SNC | Médula espinal | Corteza Frontal | Cuerpo estriado | Hipocampo |
|--|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Grupo I Control | | | | |
| DA | 62,48± 0,94 | 52,31± 1,21 | 3929,66 ± 30,81 | 170,32 ± 4,32 |
| DOPAC | 47,12± 0,89 | 27,41± 1,66 | 594,07 ± 4,13 | 10,87 ± 0,31 |
| HVA | 17,52± 0,48 | 54,98± 1,13 | 395,59 ± 20,31 | 16,12 ± 0,44 |
| (DOPAC+HVA)/DA | 1,04± 0,03 | 1,58± 0,07 | 0,25 ± 0,01 | 0,16 ± 0,00 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| DA | 77,13± 0,76*** (23,45%) | 68,58± 2,81*** (31,09%) | 4165,44 ± 26,84*** (6,00%) | 197,85 ± 5,66** (16,17%) |
| DOPAC | 8,07± 0,39*** (-82,88%) | 24,54± 2,43 | 542,33± 9,88*** (-8,71%) | 7,20 ± 0,24*** (-33,74%) |
| HVA | 10,67± 0,27*** (-39,12%) | 34,97± 0,59*** (-36,38%) | 279,94 ± 19,21** (-29,23%) | 15,64 ± 0,41 |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,24± 0,00*** (-76,57%) | 0,88 ± 0,05*** (-44,67%) | 0,20 ± 0,01*** (-21,62%) | 0,12 ± 0,00*** (-27,19%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| DA | 354,72± 8,74*** (467,73%) | 194,11± 2,61*** (271,04%) | 4637,48 ± 100,86*** (18,01%) | 274,01 ± 5,93*** (60,88%) |
| DOPAC | 4,52± 0,19*** (-90,40%) | 20,27± 0,68** (-26,04%) | 384,49± 7,48*** (-35,28%) | 5,49 ± 0,31*** (-49,50%) |
| HVA | 7,49± 0,25*** (-57,25%) | 32,19± 0,71*** (-41,44%) | 247,01 ± 6,41*** (-37,56%) | 14,83 ± 0,24* (-8,02%) |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,03± 0,00*** (-96,72%) | 0,27± 0,00*** (-82,90%) | 0,14 ± 0,00*** (-45,82%) | 0,07 ± 0,00*** (-53,12%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| DA | 419,32± 6,84*** (571,12%) | 250,39± 3,54*** (378,63%) | 5064,90 ± 134,49*** (28,89%) | 415,90 ± 6,96*** (144,19%) |
| DOPAC | 3,35± 0,07*** (-92,89%) | 14,96 ± 1,00*** (-45,40%) | 130,44 ± 5,28*** (-78,04%) | 2,72 ± 0,16*** (-74,97%) |
| HVA | 3,83± 0,22*** (-78,17%) | 7,26± 0,41*** (-86,79%) | 221,72 ± 9,13*** (-43,95%) | 14,19 ± 0,12*** (-11,97%) |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,02 ± 0,00*** (-98,34%) | 0,09± 0,00*** (-94,39%) | 0,07 ± 0,00*** (-72,34%) | 0,04 ± 0,00*** (-74,33%) |

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 *** $P < 0,001$.

3.2.3. Efecto del amitraz sobre el contenido de NA y MHPG en el SNC

El tratamiento con amitraz por vía oral afectó de forma dosis-dependiente el contenido de NA y de su metabolito MHPG en las regiones del SNC estudiadas (Tablas 37, 38 y 39). El contenido de NA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 37. El contenido de MHPG (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 38. La Tabla 39 recoge los resultados expresados en las Tablas 37 y 38, incluyendo además la tasa de recambio (MHPG/NA).

Los resultados expresados en las Tablas 37, 38 y 39 demuestran que:

- En los animales tratados con la dosis de 20 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días se produjo en todas las regiones del SNC, excepto en el cuerpo estriado, un aumento estadísticamente significativo del contenido de NA, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 7% al 145%. En cuanto al contenido de MHPG, se produjo en todas las regiones del SNC, una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue del rango del 37% al 67%. La tasa de recambio sufrió una disminución estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 22% al 77%.
- En los animales tratados con la dosis de 50 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días (grupo III) se produjo en todas las regiones del SNC un aumento estadísticamente significativo del contenido de NA, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 29% al 172%. En cuanto al contenido de MHPG, se produjo en todas las regiones del SNC una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue del rango del 54% al 75%. La tasa de recambio disminuyó de forma

estadísticamente significativa en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 46% al 97%.

- En los animales tratados con la dosis de 80 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días (grupo IV) se produjo en todas las regiones del SNC un aumento estadísticamente significativo del contenido de NA, respecto a los animales control. Este aumento fue del rango del 49% al 458%. En cuanto al contenido de MHPG, se produjo en todas las regiones del SNC una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue del rango del 64% al 90%. La tasa de recambio disminuyó estadísticamente de forma significativa en todas las regiones del SNC. Esta disminución fue del rango del 78% al 98%.

En conclusión, el amitraz de forma dosis-dependiente origina un aumento del contenido de NA y un descenso del contenido de su metabolito MHPG, ambos estadísticamente significativos, en las regiones cerebrales estudiadas. A la dosis más alta ensayada (80 mg amitraz/kg p.c./día, 5 días), el efecto sobre el aumento del contenido de NA en orden decreciente fue: cerebelo > cuerpo estriado > hipotálamo > bulbo > hipocampo > mesencéfalo > medula > corteza frontal, y el efecto sobre el descenso del contenido de MHPG en orden decreciente fue: cerebelo > mesencéfalo > bulbo > hipotálamo > cuerpo estriado > hipocampo > corteza frontal > medula.

Tabla 37. Efecto del amitraz sobre el contenido de NA (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 60 días de edad.

| | NA (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I Control | 676,33 ± 31,98 | 235,01 ± 4,77 | 118,53 ± 7,46 | 294,73 ± 4,40 | 403,02 ± 3,63 | 245,38 ± 7,34 | 64,19 ± 6,79 | 153,59 ± 5,30 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día 5 días | 889,16 ± 32,87*** (31,47%) | 283,72 ± 8,84*** (20,73%) | 290,09± 5,92*** (144,73%) | 339,16± 5,02*** (15,08%) | 430,18 ± 8,13* (6,74%) | 293,31 ± 3,66*** (19,53%) | 76,67 ± 5,91 | 201,52 ± 10,29** (31,20%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día 5 días | 1840,88 ± 51,60*** (172,19%) | 363,18 ± 18,63*** (54,54%) | 307,63 ± 7,15*** (159,53%) | 581,11 ± 9,45*** (97,17%) | 585,49 ± 18,65*** (45,28%) | 316,89 ± 4,81*** (29,14%) | 132,09 ± 6,72*** (105,79%) | 238,15 ± 7,95*** (55,05%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día 5 días | 1931,01 ± 19,36*** (185,51%) | 460,93 ± 11,31*** (96,13%) | 661,63 ± 12,56*** (458,19%) | 657,81 ± 7,63*** (123,19%) | 651,88 ± 13,57*** (61,75%) | 366,61 ± 11,75*** (49,40%) | 254,54 ± 5,40*** (296,55%) | 317,44 ± 14,24*** (106,67%) |

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (aumento) 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.

Tabla 38. Efecto del amitraz sobre el contenido de MHPG (ng/g de tejido) en regiones del SNC de ratas de 60 días de edad.

| | MHPG (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|---|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I Control | 224,30 ± 2,89 | 107,13 ± 0,82 | 71,92 ± 1,07 | 68,38 ± 1,31 | 99,75 ± 1,04 | 190,25 ± 4,58 | 176,60 ± 6,92 | 61,76 ± 2,13 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día 5 días | 105,58 ± 2,33*** (-52,93%) | 67,59 ± 0,89*** (-36,91%) | 23,50 ± 0,91*** (-67,32%) | 36,90 ± 1,52*** (-46,04%) | 50,81± 1,15*** (-49,07%) | 129,89 ± 3,03*** (-31,72%) | 90,97 ± 3,44*** (-48,49%) | 35,44 ± 1,93*** (-42,62%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día 5 días | 57,34 ± 0,60*** (-74,43%) | 32,04 ± 0,97*** (-70,09%) | 17,63 ± 0,53*** (-75,49%) | 25,29 ± 0,86*** (-63,02%) | 43,02± 0,77*** (-56,87%) | 56,73 ± 1,77*** (-70,18%) | 80,43 ± 2,42*** (-54,45%) | 27,59 ± 0,91*** (-55,33%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 80 mg/kg/día 5 días | 30,81 ± 1,27*** (-86,27%) | 11,90 ± 0,39*** (-88,90%) | 6,93 ± 0,28*** (-90,37%) | 9,31 ± 0,54*** (-86,39%) | 35,73 ± 1,18*** (-64,18%) | 40,57 ± 0,41*** (-78,67%) | 29,67 ± 1,45*** (-83,20%) | 10,48 ± 0,55*** (-83,04%) |

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 *** $P < 0,001$.

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

Tabla 39. Efecto del amitraz sobre el contenido de NA (ng/g de tejido) y MHPG (ng/g de tejido) de regiones del SNC en ratas de 60 días de edad.

| | Hipotálamo | Mesencéfalo | Cerebelo | Bulbo raquídeo |
|--|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Grupo I Control | | | | |
| NA | 676,33 ± 31,98 | 235,01 ± 4,77 | 118,53 ± 7,46 | 294,73 ± 4,40 |
| MHPG | 224,30 ± 2,89 | 107,13 ± 0,82 | 71,92 ± 1,07 | 68,38 ± 1,31 |
| MHPG/NA | 2,89 ± 0,01 | 0,46 ± 0,02 | 0,62 ± 0,04 | 0,23 ± 0,00 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| NA | 889,16 ± 32,87*** (31,47%) | 283,72 ± 8,84*** (20,73%) | 290,09 ± 5,92*** (144,73%) | 339,16 ± 5,02*** (15,08%) |
| MHPG | 105,58 ± 2,33*** (-52,93%) | 67,59 ± 0,89*** (-36,91%) | 23,50 ± 0,91*** (-67,32%) | 36,90 ± 1,52*** (-46,04%) |
| MHPG /NA | 0,12 ± 0,00*** (-64,34%) | 0,24 ± 0,01*** (-47,57%) | 0,08 ± 0,00*** (-86,81%) | 0,11 ± 0,00*** (-53,08%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| NA | 1840,88 ± 51,60*** (172,19%) | 363,18 ± 18,63*** (54,54%) | 307,63 ± 7,15*** (159,53%) | 581,11 ± 9,45*** (97,17%) |
| MHPG | 57,34 ± 0,60*** (-74,43%) | 32,04 ± 0,97*** (-70,09%) | 17,63 ± 0,53*** (-75,49%) | 25,29 ± 0,86*** (-63,02%) |
| MHPG /NA | 0,03 ± 0,00*** (-90,66%) | 0,09 ± 0,01*** (-80,43%) | 0,06 ± 0,00*** (-90,71%) | 0,04 ± 0,00*** (-81,26%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| NA | 1931,01 ± 19,36*** (185,51%) | 460,93 ± 11,31*** (96,13%) | 661,63 ± 12,56*** (458,19%) | 657,81 ± 7,63*** (123,19%) |
| MHPG | 30,81 ± 1,27*** (-86,27%) | 11,90 ± 0,39*** (-88,90%) | 6,93 ± 0,28*** (-90,37%) | 9,31 ± 0,54*** (-86,39%) |
| MHPG /NA | 0,02 ± 0,00*** (-95,23%) | 0,03 ± 0,00*** (-94,33%) | 0,01 ± 0,00*** (-98,30%) | 0,01 ± 0,00*** (-93,91%) |

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 *** $P < 0,001$.

Tabla 39 (-continuación-).

| Región del SNC | Médula espinal | Corteza Frontal | Cuerpo estriado | Hipocampo |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Grupo I Control | | | | |
| NA | 403,02 ± 3,63 | 245,38 ± 7,34 | 64,19 ± 6,79 | 153,59 ± 5,30 |
| MHPG | 99,75 ± 1,04 | 190,25 ± 4,58 | 176,60 ± 6,92 | 61,76 ± 2,13 |
| MHPG/NA | 0,25 ± 0,00 | 0,78 ± 0,03 | 2,93 ± 0,36 | 0,41 ± 0,02 |
| Grupo II Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| NA | 430,18 ± 8,13* (6,74%) | 293,31 ± 3,66**** (19,53%) | 76,67 ± 5,91 | 201,52 ± 10,29**** (31,20%) |
| MHPG | 50,81 ± 1,15**** (-49,07%) | 129,89 ± 3,03**** (-31,72%) | 90,97 ± 3,44**** (-48,49%) | 35,44 ± 1,93**** (-42,62%) |
| MHPG /NA | 0,12 ± 0,00**** (-52,18%) | 0,44 ± 0,01**** (-43,17%) | 1,24 ± 0,15** (-57,63%) | 0,18 ± 0,01**** (-56,27%) |
| Grupo III Tratado vía oral 50 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| NA | 585,49 ± 18,65**** (45,28%) | 316,89 ± 4,81**** (29,14%) | 132,09 ± 6,72**** (105,79%) | 238,15 ± 7,95**** (55,05%) |
| MHPG | 43,02 ± 0,77**** (-56,87%) | 56,73 ± 1,77**** (-70,18%) | 80,43 ± 2,42**** (-54,45%) | 27,59 ± 0,91**** (-55,33%) |
| MHPG /NA | 0,07 ± 0,00**** (-70,20%) | 0,18 ± 0,01**** (-76,99%) | 0,62 ± 0,04**** (-78,86%) | 0,12 ± 0,01**** (-71,24%) |
| Grupo IV Tratado vía oral 20 mg/kg/día, 5 días | | | | |
| NA | 651,88 ± 13,57**** (61,75%) | 366,61 ± 11,75**** (49,40%) | 254,54 ± 5,40**** (296,55%) | 317,44 ± 14,24**** (106,67%) |
| MHPG | 35,73 ± 1,18**** (-64,18%) | 40,57 ± 0,41**** (-78,67%) | 29,67 ± 1,45**** (-83,20%) | 10,48 ± 0,55**** (-83,04%) |
| MHPG /NA | 0,05 ± 0,00**** (-77,83%) | 0,11 ± 0,00**** (-85,72%) | 0,12 ± 0,01**** (-96,02%) | 0,03 ± 0,00**** (-91,85%) |

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 *** $P < 0,001$.

3.3. EFECTO DEL AMITRAZ EN RATAS DE 60 DIAS NACIDAS DE MADRES TRATADAS CON AMITRAZ 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 amitraz (20 mg amitraz/kg p.c./día, durante los días 6 a día 21 de gestación, y durante los días 1 a 10 de la lactancia) disuelto en aceite de maíz. El tratamiento con amitraz 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 machos y hembras nacidas de las ratas madres (tratadas con 20 mg amitraz/kg p.c./día, durante los días 6 a día 21 de gestación, y durante los días 1 a 10 de la lactancia) transcurridos 60 días (es decir ratas machos y hembras a los 60 días de edad), no mostraron ningún efecto en la ganancia o el incremento del peso corporal con respecto a las ratas control machos y hembras nacidas de ratas madre no tratadas con amitraz (también de 60 días de edad). 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.

3.3.1. Efecto del amitraz sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el SNC

El tratamiento con amitraz 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 al contenido de 5-HT y de su metabolito 5-HIAA en las regiones del SNC estudiadas de las ratas descendientes a la edad de 60 días (Tablas 40, 41 y 42). El contenido de 5-HT (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 40. El contenido de 5-HIAA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 41. La Tabla 42 recoge los resultados expresados en las Tablas 40 y 41, incluyendo además la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT).

Los resultados expresados en las Tablas 40, 41 y 42 demuestran que:

- En las ratas machos 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 con la dosis de 20 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días (grupo II¹) se produjo una pérdida estadísticamente significativa del contenido de 5-HT en las regiones cuerpo estriado y corteza frontal, respecto a los animales control. Esta disminución fue de un 11% ($P < 0,01$) en la corteza frontal y de un 17% ($P < 0,001$) en el cuerpo estriado. En cuanto al contenido de 5-HIAA, hubo también una pérdida estadísticamente significativa en las regiones corteza frontal y cuerpo estriado y un aumento estadísticamente significativo en las regiones bulbo e hipocampo, respecto a los animales control. La pérdida fue de un 10% ($P < 0,001$) en el cuerpo estriado y de un 22% ($P < 0,001$) en la corteza frontal. El incremento fue de un 16% ($P < 0,001$) en el bulbo y de un 39% ($P < 0,001$) en el hipocampo. La tasa de recambio sufrió una disminución estadísticamente significativa de un 6% ($P < 0,001$) en la corteza frontal y un aumento de un 34% ($P < 0,01$) en el hipocampo.

- En las ratas hembras de 60 días de edad nacidas de ratas madres tratadas durante los días de gestación 6 a 21 y durante los días de lactancia 1 a 10 con la dosis de 20 mg amitraz/kg p.c./día durante 5 días (grupo II²) también se produjo una pérdida estadísticamente significativa del contenido de 5-HT en las regiones cuerpo estriado y corteza frontal, respecto a los animales control. Esta disminución fue de un 13% ($P<0,05$) en el cuerpo estriado y de un 30% ($P<0,001$) en la corteza frontal. En cuanto al contenido de 5-HIAA, también hubo una pérdida estadísticamente significativa en las regiones corteza frontal y cuerpo estriado y un aumento estadísticamente significativo en las regiones bulbo e hipocampo, respecto a los animales control. La pérdida fue de un 11% ($P<0,05$) en el cuerpo estriado y de un 8% ($P<0,01$) en la corteza frontal. El incremento fue de un 61% ($P<0,001$) en el bulbo raquídeo y de un 53% en el hipocampo. La tasa de recambio sufrió un aumento estadísticamente significativo de un 30% ($P<0,01$) en el bulbo raquídeo.

En conclusión, el amitraz origina una disminución estadísticamente significativa del contenido de 5-HT y de su metabolito 5-HIAA en las regiones corteza frontal y cuerpo estriado, y un aumento estadísticamente significativo del metabolito 5-HIAA en las regiones hipocampo y bulbo raquídeo. El efecto sobre el descenso del contenido en 5-HT en orden decreciente fue: corteza frontal > cuerpo estriado tanto en ratas macho como en ratas hembras. El efecto sobre el descenso del contenido en 5-HIAA en orden decreciente fue: corteza frontal > cuerpo estriado en ratas macho y cuerpo estriado > corteza frontal en las ratas hembras. El efecto sobre el aumento del contenido de 5-HIAA en las ratas macho en orden decreciente fue: hipocampo > bulbo, y en la ratas hembra fue: bulbo > hipocampo.

Tabla 40. Contenido de 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 amitraz durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia.

| | 5-HT (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|--|-----------------------|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I¹ Control Ratas ♂ | 2051,66± 23,56 | 2580,09± 10,07 | 157,23± 3,79 | 1402,34± 18,87 | 855,71± 6,54 | 1154,40± 15,44 | 836,09± 14,94 | 584,62± 4,56 |
| Grupo I² Control Ratas ♀ | 2061,11 ± 17,62 | 2578,17 ± 47,80 | 137,00 ± 3,70 | 1404,42 ± 33,83 | 848,77 ± 12,25 | 1196,74 ± 28,77 | 858,59 ± 14,01 | 548,70 ± 11,09 |
| Grupo II¹ Ratas ♂ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 2118,14± 23,11 | 2611,41 ± 111,51 | 229,44 ± 38,03 | 1569,69 ± 81,28 | 1029,75± 113,19 | 957,04± 14,15*** (-17,10%) | 742,80 ± 23,97** (-11,16%) | 689,36 ± 77,59 |
| Grupo II² Ratas ♀ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 2221,98 ± 81,72 | 2675,86 ± 24,09 | 161,31 ± 10,54 | 1596,38 ± 90,14 | 1027,08 ± 102,18 | 838,05 ± 9,00*** (-29,97%) | 747,41 ± 35,41* (-12,95%) | 644,09 ± 55,15 |

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 *** $P < 0,001$.

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

Tabla 41 Contenido de 5-HIAA (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 amitraz durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia.

| | 5-HIAA (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|--|-------------------------|---------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I¹ Control Ratas ♂ | 1176,54 ± 9,83 | 1626,75 ± 17,03 | 116,98 ± 3,63 | 804,92 ± 17,20 | 403,83 ± 11,37 | 613,21 ± 11,64 | 735,24 ± 5,64 | 495,58 ± 22,14 |
| Grupo I² Control Ratas ♀ | 1155,31 ± 17,65 | 1647,13 ± 10,24 | 110,03 ± 1,82 | 618,63 ± 15,94 | 456,42 ± 8,99 | 484,01 ± 38,00 | 728,93 ± 24,63 | 464,99 ± 9,51 |
| Grupo II¹ Ratas ♂ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 1534,65 ± 160,97 | 1744,99 ± 119,63 | 117,87 ± 33,65 | 934,51 ± 5,34*** (16,10%) | 501,25 ± 52,72 | 479,33 ± 11,92*** (-21,83%) | 660,95 ± 11,03*** (-10,10%) | 690,17 ± 20,86*** (39,26%) |
| Grupo II² Ratas ♀ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 1548,53 ± 194,23 | 2025,63 ± 208,38 | 146,89 ± 17,85 | 995,47 ± 16,69*** (60,91%) | 561,57 ± 49,02 | 445,28 ± 16,90** (-8,00%) | 650,84 ± 15,35* (-10,71%) | 712,63 ± 9,80*** (53,26%) |

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 *** $P < 0,001$.

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

Tabla 42. Contenido de 5-HT (ng/g de tejido) y 5-HIAA (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 amitraz durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia.

| | Hipotálamo | Mesencéfalo | Cerebelo | Bulbo raquídeo |
|-------------------------------------|------------------|------------------|----------------|-------------------------------|
| Grupo I¹ Control | | | | |
| 5-HT | 2051,66 ± 23,56 | 2580,09 ± 10,07 | 157,23 ± 3,79 | 1402,34 ± 18,87 |
| 5-HIAA | 1176,54 ± 9,83 | 1626,75 ± 17,03 | 116,98 ± 3,63 | 804,92 ± 17,20 |
| 5-HIAA/5-HT | 0,57 ± 0,01 | 0,63 ± 0,01 | 0,75 ± 0,03 | 0,57 ± 0,02 |
| Grupo I² Control | | | | |
| 5-HT | 2061,11 ± 17,62 | 2578,17 ± 47,80 | 137,00 ± 3,70 | 1569,69 ± 33,83 |
| 5-HIAA | 1155,31 ± 17,65 | 1647,13 ± 10,24 | 110,03 ± 1,82 | 618,63 ± 15,94 |
| 5-HIAA/5-HT | 0,56 ± 0,01 | 0,77 ± 0,01 | 1,00 ± 0,04 | 0,54 ± 0,02 |
| Grupo II¹ Tratado | | | | |
| 5-HT | 2118,14 ± 23,11 | 2611,41 ± 111,51 | 229,44 ± 38,03 | 1569,69 ± 81,28 |
| 5-HIAA | 1534,65 ± 160,97 | 1744,99 ± 119,63 | 176,87 ± 33,65 | 934,51 ± 5,34*** (16,10%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,73 ± 0,08 | 0,67 ± 0,03 | 1,14 ± 0,36 | 0,60 ± 0,03 |
| Grupo II² Tratado | | | | |
| 5-HT | 2221,98 ± 81,72 | 2675,86 ± 24,09 | 161,31 ± 10,54 | 1596,38 ± 90,14 |
| 5-HIAA | 1548,53 ± 194,23 | 2025,63 ± 208,38 | 146,89 ± 17,35 | 995,47 ± 16,69*** (60,91%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,70 ± 0,09 | 0,76 ± 0,08 | 0,90 ± 0,07 | 0,63 ± 0,04** (29,87%) |

Valor medio ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (aumento) 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 42 (-continuación-).

| | Médula espinal | Corteza Frontal | Cuerpo estriado | Hipocampo |
|-------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Grupo I¹ Control | | | | |
| 5-HT | 855,71 ± 6,54 | 1154,40 ± 15,44 | 836,09 ± 14,94 | 584,62 ± 4,56 |
| 5-HIAA | 403,83 ± 11,37 | 613,21 ± 11,64 | 735,24 ± 5,64 | 495,58 ± 22,14 |
| 5-HIAA/5-HT | 0,47 ± 0,01 | 0,53 ± 0,01 | 0,88 ± 0,01 | 0,85 ± 0,04 |
| Grupo I² Control | | | | |
| 5-HT | 848,77 ± 12,25 | 1196,74 ± 28,77 | 858,59 ± 14,01 | 548,70 ± 11,09 |
| 5-HIAA | 456,42 ± 8,99 | 484,01 ± 38,00 | 728,93 ± 24,63 | 464,99 ± 9,51 |
| 5-HIAA/5-HT | 0,54 ± 0,02 | 0,40 ± 0,03 | 0,85 ± 0,04 | 0,85 ± 0,02 |
| Grupo II¹ Tratado | | | | |
| 5-HT | 1029,75 ± 113,19 | 957,04 ± 14,15*** (-17,10%) | 742,80 ± 23,97** (-11,16%) | 689,36 ± 77,59 |
| 5-HIAA | 501,25 ± 52,72 | 479,33 ± 11,92*** (-21,83%) | 660,95 ± 11,03*** (-10,10%) | 690,17 ± 20,86*** (39,26%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,50 ± 0,09 | 0,50 ± 0,01*** (-5,82%) | 0,89 ± 0,03 | 1,14 ± 0,08** (34,22%) |
| Grupo II² Tratado | | | | |
| 5-HT | 1027,08 ± 102,18 | 838,05 ± 9,00*** (-29,97%) | 747,41 ± 35,41* (-12,95%) | 644,09 ± 52,15 |
| 5-HIAA | 561,57 ± 49,02 | 445,28 ± 16,90** (-8,00%) | 650,84 ± 15,35* (-10,71%) | 712,63 ± 9,80*** (53,26%) |
| 5-HIAA/5-HT | 0,50 ± 0,05 | 0,53 ± 0,02 | 0,88 ± 0,05 | 1,06 ± 0,11 |

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 *** $P < 0,001$.

3.3.2. Efecto del amitraz sobre el contenido de DA, DOPAC y HVA en el SNC

El tratamiento con amitraz 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 al contenido de DA, y de sus metabolitos DOPAC y HVA en las regiones del SNC estudiadas de las ratas descendientes a la edad de 60 días (Tablas 43, 44, 45 y 46). El contenido de DA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupo tratados se presenta en la Tabla 43. El contenido de DOPAC (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupo tratados se presenta en la Tabla 44. El contenido de HVA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupo tratados se presenta en la Tabla 45. La Tabla 46 recoge los resultados expresados en las Tablas 43, 44 y 45, incluyendo además la tasa de recambio (DOPAC+HVA/DA).

Los resultados expresados en las Tabla 43, 44, 45 y 46 demuestran que:

- En las ratas machos de 60 días de edad nacidas de ratas madres tratadas con la dosis de 20 mg amitraz/kg p.c./día durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia (grupo II¹ y ²) se produjo en las regiones cuerpo estriado, corteza frontal e hipocampo una disminución estadísticamente significativa del contenido de DA, respecto a los animales control. Esta disminución fue de un 12% ($P<0,01$) en el cuerpo estriado, de un 17% ($P<0,001$) en la corteza frontal y de un 32% ($P<0,001$) en el hipocampo. En cuanto al contenido de DOPAC, se produjo un aumento estadísticamente significativo de un 30% ($P<0,001$) en el cuerpo estriado e hipocampo y una pérdida estadísticamente significativa de un 25% ($P<0,001$) en la corteza frontal, respecto a los animales control. En cuanto al contenido de HVA se produjo un aumento estadísticamente significativo de un 16% ($P<0,001$) en el cuerpo estriado y de un 23% ($P<0,01$) en el hipocampo y una pérdida estadísticamente significativa del 21%

($P < 0,001$) en la corteza frontal, respecto a los animales control. En este grupo únicamente se observó una disminución estadísticamente significativa en la tasa de recambio de DA en la corteza frontal de un 8% ($P < 0,01$) y un aumento estadísticamente significativo de un 41% ($P < 0,001$) en el cuerpo estriado y de un 69% ($P < 0,001$) en el hipocampo.

- En las ratas hembras de 60 días de edad nacidas de ratas madre tratadas con la dosis de 20 mg amitraz/kg p.c./día durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de la lactancia (grupo II¹ y ²) se produjo en las regiones cuerpo estriado, corteza frontal e hipocampo una disminución estadísticamente significativa del contenido de DA, respecto a los animales control. Esta disminución fue de un 12% ($P < 0,001$) en el cuerpo estriado, de un 29% ($P < 0,001$) en la corteza frontal y de un 8% ($P < 0,05$) en el hipocampo. En cuanto al contenido de DOPAC, se produjo un aumento estadísticamente significativo de un 18% ($P < 0,01$) en el cuerpo estriado y de un 43% ($P < 0,001$) en el hipocampo y una pérdida estadísticamente significativa de un 33% ($P < 0,001$) en la corteza frontal, respecto a los animales control. En cuanto al contenido de HVA se produjo un aumento estadísticamente significativo de un 44% ($P < 0,001$) en el cuerpo estriado y de un 54% ($P < 0,001$) en el hipocampo y una pérdida estadísticamente significativa de un 36% ($P < 0,001$) en la corteza frontal, respecto a los animales control. En este grupo únicamente se observó un aumento estadísticamente significativo en la tasa de recambio de DA en el cuerpo estriado de un 41% ($P < 0,001$) y en el hipocampo de un 58% ($P < 0,001$).

En conclusión, el amitraz origina una disminución estadísticamente significativa del contenido de DA en las regiones hipocampo, cuerpo estriado y corteza frontal tanto en ratas macho como en hembras y un aumento estadísticamente significativo del contenido del metabolito DOPAC en las regiones hipocampo, mesencéfalo y cuerpo estriado tanto en ratas machos como en ratas hembras, así como del contenido del metabolito HVA en las regiones hipocampo y cuerpo estriado tanto en ratas machos como en hembras. Por otra parte, el amitraz origina un descenso estadísticamente significativo del contenido de los metabolitos DOPAC y HVA en la corteza frontal tanto en ratas machos como en ratas hembras. El efecto sobre la disminución del contenido de DA en orden decreciente fue: hipocampo > corteza frontal > cuerpo estriado en ratas machos y corteza frontal > cuerpo estriado > hipocampo en ratas hembras; el efecto sobre el aumento del contenido en DOPAC en orden decreciente fue: mesencéfalo > hipocampo > cuerpo estriado tanto en ratas machos como en ratas hembras. El efecto sobre el aumento del contenido en HVA en orden decreciente fue: hipocampo > cuerpo estriado tanto en ratas machos como ratas en hembras.

Tabla 43. Contenido de 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 amitraz durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia.

| | DA(ng/g de tejido) | | | | | | | |
|--|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I¹ Control Ratas ♂ | 1240,20 ± 17,50 | 1105,53 ± 17,46 | 87,48 ± 1,89 | 519,45± 18,93 | 295,78 ± 3,77 | 508,51 ± 1,92 | 7252,74 ± 121,07 | 434,62 ± 9,98 |
| Grupo I² Control Ratas ♀ | 1052,92 ± 12,15 | 1128,70 ± 70,11 | 93,15 ± 0,78 | 463,86 ± 9,40 | 309,52 ± 4,32 | 495,39 ± 14,59 | 7654,58 ± 84,04 | 504,89± 10,70 |
| Grupo II¹ Ratas ♂ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 1359,98 ± 66,82 | 1374,91 ± 130,33 | 139,33 ± 23,71 | 604,65 ± 63,28 | 331,28 ± 22,09 | 421,26 ± 6,55*** (-17,16%) | 6447,88 ± 137,17** (-12,48%) | 329,08 ± 8,12*** (-32,07%) |
| Grupo II² Ratas ♀ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 1238,77 ± 96,67 | 1473,23 ± 188,93 | 141,67 ± 22,12 | 568,67 ± 57,88 | 338,63 ± 31,22 | 350,26 ± 4,26*** (-29,30%) | 6828,54 ± 145,30*** (-12,10%) | 468,38 ± 8,59* (-7,80%) |

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 *** $P < 0,001$.

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

Tabla 44. Contenido de DOPAC (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 amitraz durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia.

| | DOPAC (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|--|------------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I¹ Control Ratas ♂ | 103,29 ± 2,02 | 61,85 ± 3,24 | 18,54± 0,22 | 10,45 ± 0,31 | 20,48 ± 0,51 | 46,52 ± 1,07 | 833,58 ± 15,79 | 8,40 ± 0,20 |
| Grupo I² Control Ratas ♀ | 95,93 ± 1,13 | 50,38 ± 4,96 | 21,26 ± 0,41 | 7,76 ± 0,17 | 22,09 ± 0,26 | 51,00 ± 1,49 | 883,62 ± 24,89 | 8,65 ± 0,31 |
| Grupo II¹ Ratas ♂ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 111,76 ± 8,61 | 83,05± 2,68*** (34,27%) | 19,64 ± 1,66 | 11,64± 1,16 | 25,09 ± 2,34 | 34,97 ± 1,04*** (-24,84%) | 1081,61 ± 11,99*** (29,75%) | 10,95 ± 0,21*** (30,36%) |
| Grupo II² Ratas ♀ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 107,38 ± 5,90 | 76,80 ± 1,98*** (52,45%) | 22,83 ± 1,92 | 12,87 ± 2,83 | 29,58 ± 3,85 | 34,33 ± 0,84*** (-32,69%) | 1044,52 ± 35,78** (18,21%) | 12,35 ± 0,43*** (42,74%) |

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 *** $P < 0,001$.

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

CE: cuerpo estriado; HC: hipocampo.

Tabla 45. Contenido de HVA (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 amitraz durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia.

| | HVA (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|--|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I¹ Control Ratas ♂ | 42,89 ± 1,58 | 34,35 ± 1,16 | 12,62 ± 0,50 | 11,45 ± 0,32 | 9,22 ± 0,22 | 28,88 ± 0,83 | 472,93 ± 8,37 | 5,75 ± 0,13 |
| Grupo I² Control Ratas ♀ | 34,06 ± 1,19 | 33,58 ± 2,57 | 10,32 ± 0,23 | 10,81 ± 0,17 | 9,44 ± 0,32 | 34,65 ± 1,02 | 347,16 ± 21,19 | 4,84 ± 0,30 |
| Grupo II¹ Ratas ♂ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 47,72 ± 3,74 | 41,87 ± 3,88 | 13,51 ± 0,12 | 14,68 ± 1,14 | 12,88 ± 1,74 | 22,75 ± 0,87*** (-21,20%) | 547,40 ± 9,24*** (15,75%) | 7,07 ± 0,34** (23,06%) |
| Grupo II² Ratas ♀ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 49,58 ± 1,48 | 44,59 ± 4,89 | 11,82 ± 0,77 | 13,48 ± 1,46 | 13,39 ± 1,82 | 22,21 ± 1,08*** (-35,92%) | 499,95 ± 12,35*** (44,01%) | 7,46 ± 0,33*** (54,08%) |

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 *** $P < 0,001$.

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

Tabla 46. Contenido de DA (ng/g de tejido), DOPAC (ng/g de tejido) y HVA (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 amitraz durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia.

| | Hipotálamo | Mesencéfalo | Cerebelo | Bulbo raquídeo |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------|----------------|
| Grupo I¹ Control | | | | |
| DA | 1240,20 ± 17,50 | 1105,53 ± 17,46 | 87,48 ± 1,89 | 519,45 ± 18,93 |
| DOPAC | 103,29 ± 2,02 | 61,85 ± 3,24 | 18,54 ± 0,22 | 10,45 ± 0,31 |
| HVA | 42,89 ± 1,58 | 34,35 ± 1,16 | 12,62 ± 0,50 | 11,45 ± 0,32 |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,12 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 0,36 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 |
| Grupo I² Control | | | | |
| DA | 1052,92 ± 12,15 | 1128,70 ± 70,11 | 93,15 ± 0,78 | 463,86 ± 9,40 |
| DOPAC | 45,93 ± 1,13 | 50,38 ± 4,96 | 21,26 ± 0,41 | 7,76 ± 0,17 |
| HVA | 34,06 ± 1,19 | 33,58 ± 2,57 | 10,32 ± 0,23 | 10,81 ± 0,17 |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,012 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 0,34 ± 0,01 | 0,04 ± 0,00 |
| Grupo II¹ Tratado | | | | |
| DA | 1359,98 ± 66,82 | 1374,91 ± 130,33 | 139,33 ± 23,71 | 604,65 ± 63,28 |
| DOPAC | 111,76 ± 8,61 | 83,05 ± 2,68*** (34,27%) | 19,64 ± 1,66 | 11,64 ± 1,16 |
| HVA | 47,72 ± 3,74 | 41,87 ± 3,88 | 13,51 ± 0,12 | 14,68 ± 1,14 |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,12 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 | 0,27 ± 0,04 | 0,05 ± 0,00 |
| Grupo II² Tratado | | | | |
| DA | 1238,77 ± 96,67 | 1473,23 ± 188,93 | 141,67 ± 22,12 | 568,67 ± 57,88 |
| DOPAC | 107,38 ± 5,90 | 76,80 ± 1,98*** (52,45%) | 22,83 ± 1,92 | 12,87 ± 2,34 |
| HVA | 42,91 ± 4,94 | 44,59 ± 4,89 | 11,82 ± 0,77 | 13,48 ± 1,46 |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,13 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 | 0,27 ± 0,04 | 0,05 ± 0,01 |

Valor media ± ESM (n=6).

Entre paréntesis se indica la diferencia (aumento) 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 46 (-continuación-).

| | Médula espinal | Corteza Frontal | Cuerpo estriado | Hipocampo |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Grupo I¹ Control | | | | |
| DA | 295,78 ± 3,77 | 508,51 ± 1,92 | 7252,74 ± 121,07 | 434,62 ± 9,98 |
| DOPAC | 20,48 ± 0,51 | 46,52 ± 1,07 | 833,58 ± 15,79 | 8,40 ± 0,20 |
| HVA | 9,22 ± 0,22 | 28,88 ± 0,83 | 472,93 ± 8,37 | 5,75 ± 0,13 |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,10 ± 0,00 | 0,15 ± 0,00 | 0,18 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 |
| Grupo I² Control | | | | |
| DA | 309,52 ± 4,32 | 495,39 ± 14,59 | 7654,58 ± 84,04 | 504,89 ± 10,70 |
| DOPAC | 22,09 ± 0,26 | 51,00 ± 1,49 | 883,62 ± 24,89 | 8,65 ± 0,31 |
| HVA | 9,44 ± 0,32 | 34,65 ± 1,02 | 347,16 ± 21,19 | 4,84 ± 0,30 |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,10 ± 0,00 | 0,17 ± 0,00 | 0,16 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 |
| Grupo II¹ Tratado | | | | |
| DA | 331,28 ± 22,09 | 421,26 ± 6,55*** (-17,16%) | 6447,88 ± 137,17** (-12,48%) | 329,08 ± 8,12*** (-32,07%) |
| DOPAC | 25,09 ± 2,34 | 34,97 ± 1,04*** (-24,84%) | 1081,61 ± 11,99*** (29,75%) | 10,95 ± 0,21*** (30,36%) |
| HVA | 12,88 ± 1,74 | 22,75 ± 0,87*** (-21,20%) | 547,40 ± 9,24*** (15,75%) | 7,07 ± 0,34** (110,08%) |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,13 ± 0,02 | 0,14 ± 0,00** (-7,65%) | 0,25 ± 0,01*** (40,55%) | 0,05 ± 0,00*** (68,56%) |
| Grupo II² Tratado | | | | |
| DA | 338,63 ± 31,22 | 350,26 ± 4,26*** (-29,30%) | 6828,54 ± 145,30*** (-12,10%) | 468,38 ± 8,59* (-7,80%) |
| DOPAC | 29,58 ± 3,85 | 34,33 ± 0,84*** (-32,69%) | 1044,52 ± 35,78** (18,21%) | 12,35 ± 0,43*** (42,74%) |
| HVA | 13,39 ± 1,82 | 22,21 ± 1,08*** (-35,92%) | 499,95 ± 12,35*** (44,01%) | 7,46 ± 0,33*** (54,08%) |
| (DOPAC+HVA)/DA | 0,12 ± 0,01 | 0,16 ± 0,00 | 0,23 ± 0,01*** (41,19%) | 0,04 ± 0,00*** (58,31%) |

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 *** $P < 0,001$.

3.3.3. Efecto del amitraz sobre el contenido de NA y MHPG en el SNC

El tratamiento con amitraz 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 al contenido de NA y de su metabolito MHPG en las regiones del SNC estudiadas de las ratas descendientes de 60 días (Tablas 47, 48 y 49). El contenido de NA (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 47. El contenido de MHPG (ng/g de tejido) en regiones del SNC en los animales del grupo control, y de los grupos tratados se presenta en la Tabla 48. La Tabla 49 recoge los resultados expresados en las Tablas 47 y 48, incluyendo además la tasa de recambio (MHPG/NA).

Los resultados expresados en las Tablas 47, 48 y 49 demuestran que:

- En las ratas machos de 60 días de edad nacidas de ratas madres tratadas con la dosis de 20 mg amitraz/kg p.c./día durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia (grupo II¹ y ²) se produjo una pérdida estadísticamente significativa del contenido de NA en las regiones corteza frontal y cuerpo estriado, respecto a los animales control. La pérdida fue de un 15% ($P < 0,001$) en la corteza frontal y de un 8% ($P < 0,01$) en el cuerpo estriado. En cuanto al contenido de MHPG, se produjo en las regiones corteza frontal y cuerpo estriado, una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue de un 35% ($P < 0,001$) en la corteza frontal y de un 16% ($P < 0,001$) en el cuerpo estriado. La tasa de recambio sufrió una disminución estadísticamente significativa de un 23% ($P < 0,001$) en la corteza frontal.
- En las ratas hembras de 60 días de edad nacidas de ratas madres tratadas con la dosis de 20 mg amitraz/kg p.c./día durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10

de lactancia (grupo II¹ y ²) se produjo una pérdida estadísticamente significativa del contenido de NA en las regiones corteza frontal y cuerpo estriado, respecto a los animales control. La pérdida fue de un 21% ($P<0,001$) en la corteza frontal y de un 7% ($P<0,01$) en el cuerpo estriado. En cuanto al contenido de MHPG, se produjo en las regiones corteza frontal y cuerpo estriado, una pérdida estadísticamente significativa, respecto a los animales control. Esta pérdida fue de un 18% ($P<0,001$) en la corteza frontal y de un 33% ($P<0,001$) en el cuerpo estriado. La tasa de recambio sufrió una disminución estadísticamente significativa de un 28% ($P<0,001$) en el cuerpo estriado y de un 34% ($P<0,01$) en el hipotálamo.

En conclusión, el amitraz origina un descenso estadísticamente significativo del contenido de NA y de su metabolito MHPG en las regiones cuerpo estriado y corteza frontal. El efecto sobre el descenso del contenido en NA y MHPG en orden decreciente fue: corteza frontal > cuerpo estriado, tanto en ratas macho como en ratas hembra.

Tabla 47. Contenido de 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 amitraz durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia.

| | NA (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|--|---------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I¹ Control Ratas ♂ | 1316,23 ± 15,67 | 569,16 ± 7,92 | 237,07 ± 2,30 | 457,18 ± 11,71 | 209,49 ± 3,63 | 255,24 ± 5,36 | 173,14 ± 2,83 | 237,83 ± 2,80 |
| Grupo I² Control Ratas ♀ | 1179,37 ± 12,79 | 475,73 ± 53,12 | 210,48 ± 3,13 | 377,18 ± 9,08 | 228,89 ± 9,85 | 250,08 ± 6,20 | 169,92 ± 2,85 | 228,71 ± 4,99 |
| Grupo II¹ Ratas ♂ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 1367,89 ± 21,41 | 658,73± 56,33 | 242,54± 2,86 | 462,42 ± 13,74 | 214,06 ± 2,32 | 216,40 ± 6,19*** (-15,22%) | 158,62 ± 2,87** (-8,39%) | 241,90 ± 4,27 |
| Grupo II² Ratas ♀ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 1671,59 ± 224,70 | 599,48 ± 66,55 | 214,50 ± 0,91 | 401,01 ± 6,81 | 236,09 ± 2,95 | 198,68 ± 5,18*** (-20,56%) | 158,06 ± 2,36** (-6,98%) | 231,08 ± 4,77 |

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 *** $P < 0,001$.

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

Tabla 48. Contenido de MHPG (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 amitraz durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia.

| | MHPG (ng/g de tejido) | | | | | | | |
|--|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| | HT | MS | CB | BL | MD | CF | CE | HC |
| Grupo I¹ Control Ratas ♂ | 46,12 ± 1,78 | 44,24 ± 0,92 | 23,78 ± 0,47 | 21,77 ± 0,68 | 23,33 ± 0,45 | 76,52 ± 3,08 | 81,07 ± 1,35 | 34,01 ± 1,18 |
| Grupo I² Control Ratas ♀ | 27,84 ± 0,39 | 46,21 ± 0,23 | 23,13 ± 1,22 | 22,54 ± 1,43 | 42,45 ± 1,06 | 55,94 ± 2,22 | 79,77 ± 1,29 | 35,21 ± 0,82 |
| Grupo II¹ Ratas ♂ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 45,32 ± 0,79 | 48,50 ± 2,17 | 25,20 ± 1,46 | 23,56 ± 1,10 | 25,01 ± 0,95 | 50,06 ± 1,69*** (-34,58%) | 68,05 ± 0,54*** (-16,06%) | 38,34 ± 1,92 |
| Grupo II² Ratas ♀ nacidas de madres tratadas 20 mg/kg /día | 23,97 ± 1,83 | 48,71 ± 2,10 | 24,57 ± 0,82 | 25,83 ± 0,62 | 44,52 ± 0,73 | 42,04 ± 0,45*** (-24,85%) | 53,43 ± 1,40*** (-33,02%) | 37,95 ± 1,32 |

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 *** $P < 0,001$.

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

Tabla 49. Contenido de NA (ng/g de tejido) y MHPG (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 amitraz durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia.

| | Hipotálamo | Mesencéfalo | Cerebelo | Bulbo raquídeo |
|-------------------------------------|----------------------------|----------------|---------------|----------------|
| Grupo I¹ Control | | | | |
| NA | 1316,23 ± 15,67 | 569,16 ± 7,92 | 237,07 ± 2,30 | 457,18 ± 11,71 |
| MHPG | 46,12 ± 1,78 | 44,24 ± 0,92 | 23,78 ± 0,47 | 21,77 ± 0,68 |
| MHPG/NA | 0,04 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,05 ± 0,030 |
| Grupo I² Control | | | | |
| NA | 1179,37 ± 12,79 | 475,73 ± 53,12 | 210,48 ± 3,13 | 377,18 ± 9,08 |
| MHPG | 27,84 ± 0,39 | 46,21 ± 0,23 | 23,13 ± 1,22 | 22,54 ± 1,43 |
| MHPG/NA | 0,02 ± 0,00 | 0,10 ± 0,03 | 0,11 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 |
| Grupo II¹ Tratado | | | | |
| NA | 1367,89 ± 21,41 | 658,73 ± 56,33 | 242,54 ± 2,86 | 462,42 ± 13,74 |
| MHPG | 45,32 ± 0,79 | 48,50 ± 2,17 | 25,20 ± 1,46 | 23,56 ± 1,10 |
| MHPG/NA | 0,02 ± 0,00 | 0,08 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 |
| Grupo II² Tratado | | | | |
| NA | 1671,59 ± 224,70 | 599,48 ± 66,55 | 214,50 ± 0,91 | 401,01 ± 6,81 |
| MHPG | 23,97 ± 1,83 | 48,71 ± 2,10 | 24,57 ± 0,82 | 25,83 ± 0,62 |
| MHPG/NA | 0,02 ± 0,00** (-34,15%) | 0,09 ± 0,01 | 0,11 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 |

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 *** $P < 0,001$.

Tabla 49 (-continuación-).

| | Médula espinal | Corteza Frontal | Cuerpo estriado | Hipocampo |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------|
| Grupo I¹ Control | | | | |
| NA | 209,49 ± 3,63 | 255,24 ± 5,36 | 173,14 ± 2,83 | 237,83 ± 2,80 |
| MHPG | 23,33 ± 0,45 | 76,52 ± 3,08 | 81,07 ± 1,35 | 34,01 ± 1,18 |
| MHPG/NA | 0,11 ± 0,00 | 0,30 ± 0,01 | 0,53 ± 0,03 | 0,14 ± 0,01 |
| Grupo I² Control | | | | |
| NA | 228,89 ± 9,85 | 250,08 ± 6,20 | 169,92 ± 2,85 | 228,71 ± 4,99 |
| MHPG | 42,45 ± 1,06 | 55,94 ± 2,22 | 79,77 ± 1,29 | 35,21 ± 0,82 |
| MHPG/NA | 0,19 ± 0,01 | 0,23 ± 0,01 | 0,47 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 |
| Grupo II¹ Tratado | | | | |
| NA | 214,06 ± 2,32 | 216,40 ± 6,19*** (-15,22%) | 158,62 ± 2,87** (-8,39%) | 241,90 ± 4,27 |
| MHPG | 25,01 ± 0,95 | 50,06 ± 1,69*** (-34,58%) | 68,05 ± 0,54*** (-16,06%) | 38,34 ± 1,92 |
| MHPG/NA | 0,12 ± 0,00 | 0,23 ± 0,01*** (-22,85%) | 0,43 ± 0,02 | 0,16 ± 0,01 |
| Grupo II² Tratado | | | | |
| NA | 236,09 ± 2,95 | 198,68 ± 5,18*** (-20,56%) | 158,06 ± 2,36** (-6,98%) | 231,08 ± 4,77 |
| MHPG | 44,52 ± 0,73 | 42,04 ± 0,45*** (-24,85%) | 53,43 ± 1,40*** (-33,02%) | 37,95 ± 1,32 |
| MHPG/NA | 0,19 ± 0,00 | 0,21 ± 0,01 | 0,34 ± 0,01*** (-28,08%) | 0,16 ± 0,01 |

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 *** $P < 0,001$.

La Tabla 50 resume todos los resultados obtenidos en el presente estudio, indicando también el orden decreciente del efecto observado en diferentes regiones estudiadas del SNC. El amitraz a la dosis mas alta ensayada (80 mg/kg p.c./día, via oral, 5 días) produjo en ratas macho, un aumento estadísticamente significativo del contenido de los neurotransmisores 5-HT, DA y NA, así como una disminución estadísticamente significativa del contenido de sus metabolitos 5-HIAA, DOPAC y HVA, y MHPG respectivamente, tanto en animales de 30 días como en animales de 60 días de edad, efecto observado en todas las regiones estudias del SNC con respecto a los animales control (Tabla 50).

La región mas afectada en el aumento del contenido de 5-HT fue el mesencéfalo en los animales de 30 días de edad, y la medula en los animales de 60 días de edad. En cuanto al metabolito, la región mas afectada en el descenso del contenido de 5-HIAA fue el cuerpo estriado en los animales de 30 días de edad y la corteza frontal en los animales de 60 días de edad.

La región mas afectada en el aumento del contenido del neurotransmisor DA fue la corteza frontal en los animales de 30 días de edad y el cerebelo en los animales de 60 días de edad, respecto a los animales control. En cuanto a los metabolitos, la región mas afectada en el descenso del contenido de DOPAC fue el cerebelo en los animales de 30 días de edad y el mesencéfalo en los animales de 60 días de edad. La región mas afectada en el descenso del contenido de HVA fue el hipotalamo en los animales de 30 días de edad y el mesencéfalo en los animales de 60 días de edad.

La región mas afectada en el aumento del contenido del neurotransmisor NA fue el cerebelo tanto en los animales de 30 días como en los animales de 60 días de edad, respecto a los animales control. La región mas afectada en el descenso del contenido de MHPG fue el mesencefalo en los animales de 30 días de edad y el cerebelo en los animales de 60 días de edad.

En cuanto al estudio de la neurotoxicidad del desarrollo inducida por amitraz, en ratas machos y hembras de 60 días de edad nacidas de madres tratadas (20 mg/kg p.c./día) durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia, se observó una disminución estadísticamente significativa del contenido de 5-HT y su metabolito 5-HIAA y del contenido de NA y su metabolito MHPG en la corteza frontal y en el cuerpo estriado, respecto a los animales control. Por otra parte, el amitraz origino un aumento del contenido de 5-HIAA en el bulbo e hipocampo. En cuanto al neurotransmisor DA, el amitraz produjo una disminución estadísticamente significativa del contenido de DA en las regiones corteza frontal, cuerpo estriado

e hipocampo, y una disminución del contenido de DOPAC y HVA en la corteza frontal, respecto a los animales control. También el amitraz produjo un efecto de aumento en el contenido de los metabolitos DOPAC en las regiones hipocampo, cuerpo estriado y mesencéfalo, y de HVA en las regiones de hipocampo y cuerpo estriado (Tabla 50).

Tabla 50. Resumen de los resultados obtenidos en los 3 experimentos realizados:

1. Efecto del amitraz en ratas tratadas de 30 días de edad.
2. Efecto del amitraz en ratas tratadas de 60 días de edad.
3. Efecto del amitraz en ratas de 60 días de edad nacidas de madres tratadas (durante los días 6 a 21 de gestación y durante los días 1 a 10 de lactancia).

| Neurotoxicidad | | Neurotoxicidad del Desarrollo | |
|---|---|--|--|
| Efecto del amitraz (80mg/kg p.c./día, via oral, 5 días) en ratas ♂ de 30 días de edad | Efecto del amitraz (80mg/kg p.c./día, via oral, 5 días) en ratas ♂ de 60 días de edad | Efecto del amitraz en ratas ♂ de 60 días nacidas de madres tratadas con amitraz (20 mg/kg p.c./día) durante el periodo de la preñez y la lactancia | Efecto del amitraz en ratas ♀ de 60 días nacidas de madres tratadas con amitraz (20 mg/kg p.c./día) durante el periodo de la preñez y la lactancia |
| Aumento de 5-HT: MS>HC>CE>CF>MD>HT>CB>BL | Aumento de 5-HT: MD>CB>HC>MS>HT>BL>CF>CE | Descenso de 5-HT: CF>CE | Descenso de 5-HT: CF>CE |
| Descenso de 5-HIAA: CE>BL>HC>CF>HT>CB>MD>MS | Descenso de 5-HIAA: CF>MD>BL>HT>CB>HC>CE>MS | Aumento de 5-HIAA: HC>BL Descenso de 5-HIAA: CF>CE | Aumento de 5-HIAA: BL>HC Descenso de 5-HIAA: CE>CF |
| Aumento de DA: CF>HC>MS>HT>MD>BL>CB>CE | Aumento de DA: CB>MD>CF>HC>HT>BL>MS>CE | Descenso de DA: HC>CF>CE | Descenso de DA: CF>CE>HC |
| Descenso de DOPAC: CB>BL>MS>HC>CF>HT>CE>MD | Descenso de DOPAC: MS>MD>CB>HT>CE>HC>BL>CF | Aumento de DOPAC: MS>HC>CE Descenso de DOPAC: CF | Aumento de DOPAC: MS>HC>CE Descenso de DOPAC: CF |
| Descenso de HVA: HT>MS>HC>MD>CB>CF>BL>CE | Descenso de HVA: MS>CB>BL>CF>MD>HT>CE>HC | Aumento de HVA: HC >CE Descenso de HVA: CF | Aumento de HVA: HC >CE Descenso de HVA: CF |
| Aumento de NA: CB>CE>HT>BL>MD>HC>CF>MS | Aumento de NA: CB>CE>HT>BL>HC>MS>MD>CF | Descenso de NA: CF>CE | Descenso de NA: CF>CE |
| Descenso de MHPG: MS>HT>CB>MD>BL>CE>CF>HC | Descenso de MHPG: CB>MS>BL>HT>CE>HC>CF>MD | Descenso de MHPG: CF>CE | Descenso de MHPG: CF>CE |

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

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

El amitraz, insecticida formamidina, es ampliamente usado para el control de ectoparásitos. La incidencia de intoxicaciones por amitraz en animales y en el hombre ha venido aumentando en los últimos años debido un incremento en su producción y uso (JORENS *et al.*, 1997; PROUDFOOT, 2003; ULUKAYA *et al.*, 2001). La intoxicación por amitraz puede ocurrir por vía oral, dérmica e inhalatoria. Aunque las intoxicaciones agudas con este pesticida no son comunes, los signos y síntomas sobre el SNC tras la exposición de amitraz incluyen sedación, pérdida de reflejos, incoordinación motora y coma (FOLZ *et al.*, 1984; HSU y SCHAFFER, 1988). El presente estudio ha investigado los efectos potenciales del pesticida amitraz sobre los niveles de catecolaminas en el SNC en ratas de 30 y 60 días de edad, así como también en ratas de 60 días de edad nacidas de ratas madres expuestas oralmente a amitraz durante el periodo de la preñez y durante la lactancia, al objeto de poder tener información sobre la neurotoxicidad del amitraz, incluida la neurotoxicidad del desarrollo.

La actividad biológica descrita en la literatura para el amitraz incluye: inhibición de la monoamino oxidasa (MAO) (AZIZ y KNWOLES, 1973; BEEMAN y MATSUMURA, 1973; BENEZET *et al.*, 1978), actividad anticolinérgica (WANG *et al.*, 1975), inhibición de la síntesis de prostaglandinas (YIM *et al.*, 1978), efectos tipo anestésico (PFISTER *et al.*, 1977; CHINN *et al.*, 1977), y actividad agonista α_2 -adrenérgica (COSTA y MURPHY, 1987; COSTA *et al.*, 1988; ALTOBELLI *et al.*, 2001).

Existe evidencia de que la fase mas importante de degradación de numerosas aminas bioactivas viene representada por una deaminación oxidativa catalizada por la MAO tipo A y tipo B, dos isoenzimas codificadas por dos genes relacionados pero separados (WEYLER *et al.*, 1990). Las dos isoenzimas son funcionalmente distintas, propiamente poseen diferente afinidad

por diversos sustratos. La MAO A preferentemente degrada serotonina y noradrenalina, mientras la MAO B posee mayor afinidad por la β -feniletilamina (FOWLER y TIPTON, 1984). La dopamina se considera un sustrato para ambas isoformas de la MAO (GARRICK y MURPHY, 1980). En el tejido nervioso, ambos tipos de MAO participan en la regulación de los niveles de neurotransmisores monoaminérgicos (BERRY *et al.*, 1994). Dado que la MAO participa en la inactivación metabólica de aminas biógenas incluyendo los neurotransmisores serotonina, dopamina y noradrenalina, es de especial importancia revelar si las acciones del amitraz incluyen las aminas biógenas.

Nuestro trabajo de investigación demuestra que el amitraz de forma dosis-dependiente incrementa los niveles de noradrenalina, dopamina y serotonina, junto con un descenso en los niveles de sus metabolitos el 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético, el ácido homovanílico, y el ácido 5-hidroxi-3-indolacético respectivamente, tanto en rata de 30 como de 60 días de edad. Las ocho regiones del SNC estudiadas fueron susceptibles a cambios en el contenido de noradrenalina, dopamina y serotonina y de sus respectivos metabolitos por el amitraz. Este efecto puede ser debido a la existencia de cantidades residuales de amitraz o de su metabolito activo en las regiones del SNC que podrían interferir con la síntesis y/o metabolismo de monoaminas. Estos resultados en principio podrían ser originados vía la acción inhibitoria descrita del amitraz sobre la actividad de la MAO.

En el cerebro humano, existe un incremento en la actividad de la isoforma B de la MAO con la edad mientras que la isoforma A permanece inalterada (ECKERT *et al.*, 1980; FOWLER *et al.*, 1980). Un incremento selectivo similar para la MAO B se ha encontrado en el cerebro de rata con la edad (MANTLE *et al.*, 1976; BENEDETTI y KEANE, 1980; ARAI *et al.*, 1985). La MAO en cerebro esta localizada en las neuronas así como en otras células, pero el coeficiente de partición exacto entre los diferentes tipos de células es desconocido. En el cerebro de rata se ha

indicado una mayor ratio MAO-B/A extraneuronal que intraneuronal en base a una variedad de ensayos experimentales (STUDENT y EDWARDS, 1977; DEMAREST y AZZARO, 1979; ORELAND *et al.*, 1980, 1983; CARLSSON *et al.*, 1981). Se ha sugerido que el efecto de la edad sobre la MAO es debido a una pérdida neuronal con el correspondiente incremento de la fracción celular no-neuronal (ORELAND, 1979; ORELAND y SHASKAN, 1983).

En el presente estudio, se podría esperar en relación a la edad de los animales ensayados, un incremento en la actividad de ambas isoformas MAO A y B. Nuestros resultados tomando en cuenta las regiones cerebrales de corteza frontal, hipocampo, e hipotálamo demuestran que en ratas de 60 días de edad el amitraz provoca un mayor aumento de niveles de serotonina en relación a las ratas de 30 días de edad, pero sin embargo el amitraz no provoca un mayor aumento en los niveles de noradrenalina y dopamina en las ratas de 60 días de edad en comparación con las ratas de 30 días de edad. En nuestro estudio en ratas de 30 días de edad el amitraz provoca un incremento significativo del contenido de serotonina en las regiones cerebrales corteza frontal (13-70%), hipocampo (37-81%), e hipotálamo (11-32%), frente a las ratas de 60 días de edad donde se origina un aumento significativo del contenido de serotonina en corteza frontal (46-105%), hipocampo (62-135%), e hipotálamo (39-112%). Por lo tanto, el incremento de los niveles de serotonina en las ratas de 60 días de edad observado en nuestro estudio podría ser consecuencia de una mayor actividad de la inhibición de la MAO, es decir mayor inactivación metabólica de estos neurotransmisores. Pero por otra parte, dado que no se observa aumento en los niveles de noradrenalina y dopamina en relación con la edad de los animales, no se puede desechar también otro mecanismo de acción para el amitraz, diferente del efecto inhibitorio de la MAO.

Diversos autores describen efectos sobre el comportamiento, fisiológicos y neuroquímicos en ratas expuestas a amitraz. A bajas dosis de amitraz (1-25 mg/kg) observan

una disminución de la actividad motora y algunos cambios de comportamiento (MOSER *et al.*, 1987); dosis intermedias (50-80 mg/kg) afectan a los potenciales evocados y disminuyen la temperatura y el peso corporal de las ratas (BOYES y MOSER, 1987); dosis \geq de 100 mg/kg p.c. producen una inhibición de ligera a moderada de la MAO, junto con hiperreactividad (MOSER y MACPHAIL, 1989), por lo que concluyen que únicamente dosis altas de amitraz originan un efecto inhibitorio de la MAO. Nuestros resultados no comparten esta sugerencia, ya que dosis de amitraz de 20, 50 y 80 mg/kg/p.c. originan un incremento de los niveles de serotonina, dopamina, y noradrenalina, efecto que puede ser ligado, entre otros, a un mecanismo de inhibición de la actividad de la MAO por amitraz.

FLÓRIO *et al.* (1993) evalúan los efectos del amitraz sobre la función motora. Entre los resultados que presentan, se encuentra una disminución de la locomoción así como un incremento del tiempo de inmovilidad en modelos de comportamiento. El efecto de la disminución de la actividad motora parece ser debido a un bloqueo de la actividad de la MAO, además de una probable acumulación citosólica de catecolaminas (MASON, 1984). En el experimento realizado por FLÓRIO *et al.* (1993) descartan que la inducción de sedación e inmovilidad por amitraz sea vía α_2 -adrenoreceptores ya que la administración de yohimbina no fue capaz de modificar los efectos del amitraz sobre la función motora en los modelos de comportamiento ensayados (GILBERT y DYER, 1988; COSTA *et al.*, 1988). Este resultado difiere de estudios previos que mostraban como agentes α_2 bloqueantes eran capaces de antagonizar la sedación e inmovilidad inducida por amitraz (ANDÉN *et al.*, 1976; CLINESCHMIDT *et al.*, 1979; GOLDBERG y ROBERTSON, 1983).

Se ha demostrado que la serotonina en el SNC interviene en los mecanismos que regulan distintos tipos de crisis convulsivas inducidas experimentalmente. Por ejemplo, se ha demostrado que los agonistas de serotonina y los inhibidores de la recaptación de serotonina

presentan propiedades anticonvulsivantes (FAVALE *et al.*, 1995; YAN *et al.*, 1995; DAILEY *et al.*, 1997; WADA *et al.*, 1997), mientras que los antagonistas serotoninérgicos, los inhibidores de la síntesis de serotonina o las lesiones en neuronas serotoninérgicas inducen y favorecen la aparición de crisis convulsivas en ratas y ratones (KILIAN y FREY, 1973; RACINE y COSCINA, 1979; BURLEY y FERRENDELLI, 1984; ABED, 1989).

GILBERT (1988) ha descrito que la administración de amitraz aumenta la susceptibilidad a las convulsiones en ratas, lo cual, es todo lo contrario de lo que se podría esperar para el aumento de los niveles de serotonina observados en el presente estudio, lo que indica que el amitraz puede también actuar por otro mecanismo. GILBERT (1988) adjudica el aumento de convulsiones por amitraz a una acción tipo agonista α_2 -adrenérgica y/o propiedades tipo anestésico local (CHINN *et al.*, 1977; PFISTER *et al.*, 1977). Los metabolitos activos del amitraz han demostrado una actividad agonista parcial en lugares α -adrenérgicos (ROBINSON y BITTLE, 1979; ROBINSON, 1979). Similarmente HSU y KAKUK (1984) también han descrito que la midriasis y la bradicardia inducida por amitraz puede ser bloqueada por antagonistas α_2 como yohimbina y fentolamina. Además PANG y ROSE (1986) han presentado evidencia de que los receptores α_2 son excitatorios en el *gyrus dentatus* de la rata. Por lo tanto, también sería propio, que el amitraz pueda ejercer sus efectos a través de una combinación de efectos anestésicos locales y de actividad α_2 -adrenérgica.

Existe evidencia neurofisiológica, anatómica y bioquímica que sugiere que los mecanismos GABAérgicos están implicados en la regulación de la actividad del sistema serotoninérgico (GALLAGER y AGHAJANIAN, 1976; BISWAS y CARLSSON, 1977a,b; BELIN *et al.*, 1979). Algunos autores han demostrado que los agonistas GABAérgicos disminuyen la tasa de recambio de serotonina (FORCHETTI y MEEK, 1981; SCATTON, *et al.*, 1984; NISHIKAWA y SCATTON, 1985), efecto antagonizado por antagonistas GABAérgicos.

La administración intracerebral (núcleo medio del rafe) de picrotoxina y bicuculina provoca un aumento de la tasa de recambio de serotonina, que es revertido por muscimol y diazepam (FORCHETTI y MEEK, 1981). Se ha descrito la existencia de receptores GABAérgicos y serotoninérgicos en las mismas neuronas del núcleo dorsal del rafe (HARANDI *et al.*, 1987), así como la regulación GABAérgica de la transmisión serotoninérgica en distintas regiones del SNC (SOUBRIÉ *et al.*, 1981). En base a lo descrito, se podría también sugerir que la alteración de los niveles de serotonina por amitraz puede afectar al sistema GABAérgico, y a través del cual se aumente esta susceptibilidad a los procesos convulsivos. De todas formas, mayores investigaciones se deben realizar en este campo para un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en el efecto del amitraz sobre los procesos convulsivos.

Los efectos observados en el presente trabajo por amitraz de aumento de los niveles de serotonina, podrían interferir con numerosas funciones fisiológicas en donde participa el sistema serotoninérgico tales como el sueño (HAGAN *et al.*, 2000; MARKOV y GOLDMAN, 2006; MONTI y JANTOS, 2006; THOMAS *et al.*, 2003), el estado de alerta (SCHOLES *et al.*, 2007; SANGER *et al.*, 2007; OBERLANDER *et al.*, 2007; HALLER *et al.*, 2005; ABRAMS *et al.*, 2005), la ingesta de alimentos (ASHRAF *et al.*, 2007; CURZON, 1995; HALFORD y BLUNDELL, 2000; SOMERVILLE *et al.*, 2007; YOKOYAMA *et al.*, 2007), el dolor (MARTIKAINEN *et al.*, 2007; DJALDETTI *et al.*, 2007; BUTKEVICH *et al.*, 2005), el comportamiento agresivo y la motivación (BARROS *et al.*, 2002; BARROS y TOMAZ, 2002; HARVEY, 1996; THOMAS y HAGAN, 2004), los ritmos circadianos (THOMAS y HAGAN, 2004; HEDLUND y SUTCLIFFE, 2004), el estrés (YAU *et al.*, 2001), el aprendizaje y la memoria (AGHAJANIAN y SANDERS-BUSH, 2002; HERREMANS *et al.*, 1995), y otros efectos psicoestimulantes de comportamiento (MULLER y HUSTON, 2006).

En nuestro estudio, el amitraz a las dosis de 20, 50 y 80 mg/kg p.c./día, durante 5 días, en ratas de 30 y 60 días de edad también provoca un incremento significativo del contenido de noradrenalina y dopamina en las regiones cerebrales, en un rango, en mesencéfalo de 10-96% y de 15-210%, respectivamente, en cuerpo estriado de 32-296% y de 6-31%, respectivamente, en corteza frontal de 14-67% y de 31-708%, respectivamente, en hipocampo de 26-107% y de 16-450%, respectivamente y en hipotálamo del 31-186% y del 26-182%, respectivamente, así como también un descenso en los niveles del metabolito de la noradrenalina el 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol y de los metabolitos de dopamina el ácido 3,4-dihidroxifenilacético y el ácido homovanílico, efecto que podría estar correlacionado con la hiperactividad observada en las ratas tratadas con las dosis mas altas de amitraz. Sería importante realizar en un futuro estudios con inhibidores de la liberación de noradrenalina y dopamina, con el fin de confirmar si la hiperactividad observada con amitraz pudiera ser atenuada (CALCAGNETTI y SCHECHTER, 1992). Además también sería de interés estudiar inhibidores del transporte de dopamina como protectores de la neurotoxicidad inducida por amitraz de acuerdo con los resultados obtenidos para la neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) (FULLER y HEMRICK-LUECKE, 1985; PILEBLAD y CARLSSON, 1985; SUNDSTRÖM y JONSSON, 1985); la neurotoxina MPTP es una herramienta que se utiliza para inducir degeneración de neuronas dopaminérgicas en animales experimentales (SCHNEIDER y ROTHBLAT, 1991). Debido a que la dopamina se considera un sustrato para ambas formas de la MAO (GARRICK y MURPHY, 1980), el aumento del contenido de dopamina inducido por amitraz observado en este estudio podría ser originado por una inhibición de las dos formas de la MAO, mecanismo también a tener en cuenta en la neurotoxicidad por amitraz. Sería un criterio lógico farmacológico ensayar el efecto de inhibidores de la MAO A y B, tales como clorgilina y deprenilo, sobre el efecto de aumento del contenido de noradrenalina y dopamina por amitraz (JOHNSTON, 1968; KNOLL y MAGYAR, 1972).

De acuerdo con ANTELMAN y CAGGIULA (1977) algunas actividades sobre el comportamiento dopamina-dependientes tales como ingesta de alimentos, olfateo y mordisqueo, son afectadas por agentes que modifican la transmisión noradrenérgica. De esta manera, el pretratamiento de ratas con fenoxibenzamina o fentolamina, que son antagonistas no selectivos de receptores α -adrenérgicos, desplaza las curvas dosis-respuesta del comportamiento de estereotipia inducida por apomorfina hacia la izquierda de una manera dosis dependiente (DE SOUZA y PALERMO-NETO, 1982). Al estar la estereotipia relacionada al sistema dopaminérgico negroestriatal, es posible que los efectos de amitraz en este sentido, pudieran ser debidos a una interrupción de las vías neuroanatómicas que conectan el *locus coeruleus* al sistema negroestriatal como fue postulado por ANTELMAN y CAGGIULA (1977) para otros tipos de comportamiento. Además, la inhibición de la MAO por amitraz podría estar induciendo la acumulación de la noradrenalina en el citosol, y por lo tanto inhibiendo su liberación. Tomando en consideración todos estos datos, es posible que los efectos del amitraz sobre la función motora sean consecuencia de sus efectos inhibitorios sobre la actividad de la MAO.

De confirmarse que el aumento de serotonina, dopamina y noradrenalina inducido por amitraz es vía inactivación de la MAO A y B conduce a importantes consecuencias. De todos es conocido que, la rápida degradación de monoaminas del cerebro, tales como serotonina, dopamina, y noradrenalina, es esencial para el funcionamiento correcto de la neurotransmisión sináptica. La reacción química catalizada por la MAO consiste en la degradación de monoaminas en sus correspondientes aldehídos, los cuales, a continuación, son oxidados a ácidos por la aldehído dehidrogenasa, o convertidos a alcoholes o glicoles por la aldehído reductasa. Los productos de estas reacciones incluyen un número de especies potencialmente neurotóxicas tales como el peróxido de hidrógeno y amonio. En particular el peróxido de hidrógeno puede originar especies de oxígeno reactivas e inducir lesión mitocondrial y apoptosis neuronal (BORTOLATO *et al.*, 2008). El desarrollo de inhibidores de MAO se inició

principalmente para el tratamiento de la depresión, con inhibidores de la MAO tipo iproniazida de efectos antidepressivos. Los efectos adversos de inhibidores de la MAO no selectivos implican crisis hipertensivas con hemorragias cerebrales, adjudicadas a un incremento en la liberación de catecolaminas simpaticomiméticas (BROWN *et al.*, 1989) que inducen a su vez un incremento en la liberación de noradrenalina en la médula lo cual activa el sistema simpático y en ausencia de un metabolismo mediado por MAO se origina repentinamente un incremento de la presión sanguínea.

También, debido a que uno de los efectos neuropatológicos en la enfermedad de Parkinson es una pérdida irreversible de dopamina contenida en las neuronas de la sustancia negra (BOWLING y BEAL, 1995; LOTHARIUS y O'MALLEY, 2000), se han desarrollado diferentes agentes terapéuticos inhibidores de MAO A y B al objeto de incrementar los niveles de dopamina y compensar el déficit de este neurotransmisor (CESURA y PLETSCHER, 1992; KNOLL, 2000).

En distintos modelos *in vivo* e *in vitro* se ha descrito una liberación de DA inducida por agentes químicos de los cuales se conocía su capacidad para alterar el normal funcionamiento del sistema dopaminérgico (KANTHASAMY *et al.*, 1991, 1994; GIOVANNI *et al.*, 1994a,b; WAGNER *et al.*, 1999). Se ha observado que el exceso de liberación de DA, y el consiguiente aumento de los niveles de DA en el espacio extraneuronal, puede acelerar temporalmente la neurotoxicidad (LOTHARIUS y O'MALLEY, 2000). La exposición a muchas sustancias tóxicas en el medio ambiente, tales como el monóxido de carbono, cianuro y manganeso, se ha asociado a distintos síndromes de rigidez-acinética (SÁNCHEZ-RAMOS, 1993), pero ninguno de estos agentes químicos originan un síndrome totalmente similar, desde la perspectiva neuropatológica y clínica, a la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, estudios epidemiológicos implican la exposición ocupacional a plaguicidas como un factor de riesgo para el desarrollo de

la enfermedad de Parkinson (LANGSTON *et al.*, 1987; TANNER y LANGSTON, 1990; BUTTERFIELD *et al.*, 1993; GOLBE, 1993; HUBBLE *et al.*, 1993; SEMCHUK *et al.*, 1993). La relación más directa entre la exposición a plaguicidas y la enfermedad de Parkinson se ha descrito en insecticidas del grupo de los policlorocicloalcanos, como el dieldrín (FLEMING *et al.*, 1994; CORRIGAN *et al.*, 1998, 2000; PRIYADARSHI *et al.*, 2000). El dieldrín está considerado como un potente neurotóxico dopaminérgico que afecta la función mitocondrial (inhibe la fosforilación oxidativa), provocando hipoquinesia transitoria, irritabilidad y tremor corporal (BERGEN, 1971; WAGNER y GREENE, 1978; SÁNCHEZ-RAMOS *et al.*, 1998; KITAZAWA *et al.*, 2001). Se ha demostrado en diversas especies animales que el dieldrín interacciona con la neurotransmisión monoaminérgica en el SNC, provocando cambios significativos en los niveles de dopamina, serotonina y noradrenalina (SHARMA *et al.*, 1976; WAGNER y GREENE, 1978; HEINZ *et al.*, 1980).

En este contexto, y tomando todos estos datos anteriormente mencionados, el presente trabajo de investigación contribuye a sugerir una nueva clase de pesticidas, inhibidores de MAO, las formamidinas, y que la toxicidad observada tras la exposición a amitraz podría ser debida a una neurotoxicidad catecolaminérgica por inactivación de la degradación de aminas biógenas. Además, también sería importante establecer si el aumento de los niveles de DA inducida por amitraz, podría contribuir a un incremento del estrés oxidativo (STOKES *et al.*, 1999; COHEN, 2000), ya que distintas investigaciones han demostrado que el exceso de liberación de DA origina muerte celular apoptótica y puede, además, potenciar otro tipo de apoptosis inducida por agentes químicos (MILLER *et al.*, 1999; STOKES *et al.*, 1999, 2000; TERASAKA *et al.*, 2000). También existe evidencia de que los compuestos inhibidores de MAO pueden originar numerosas interacciones farmacológicas. Los inhibidores de la MAO retardan la N-dealquilación, O-metilación y la hidroxilación. Los inhibidores de la MAO potencialmente pueden bloquear otras enzimas diferentes de la MAO y de alguna manera

pueden afectar el metabolismo de muchos fármacos (GOLDBERG, 1964; GAULTIERI y POWELL, 1978).

La toxicidad del amitraz ha sido estudiada en ensayos a corto y largo plazo, y la EPA lo ha clasificado en la Clase III, como ligeramente toxico (EPA, 1996). Los efectos adversos del amitraz sobre la reproducción y el desarrollo describen que la exposición posnatal al amitraz causa alteraciones transitorias en el desarrollo y en el comportamiento en los animales recién nacidos (PALERMO-NETO *et al.*, 1997). AL-THANI *et al.*, (2003) han descrito un descenso en la fertilidad, en la producción de espermatozoides y en el número de fetos viables y una mayor pérdida en la post-implantación a dosis de 5,4 mg/kg/día en ratones Swiss macho expuestos a la amitraz en el agua de bebida. KIM *et al.*, (2007) demuestran que el amitraz administrado durante todo el periodo de preñez en ratas es embriotóxico y teratógeno a la dosis de 30 mg/kg/día, y dosis de 10 mg/kg/día únicamente origina un descenso en la ganancia de peso corporal y en la ingesta de alimento en las ratas madres, resultado que se contradice al descrito por PALERMO-NETO *et al.*, (1997), quienes previamente describieron que una dosis de 20 mg/kg/día era la dosis mas alta que no originaba un descenso en la ingesta de alimento o agua y en la ganancia de peso corporal en las ratas durante la lactación. Bajo las condiciones experimentales de KIM *et al.*, (2007) el nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) del amitraz se estimó en 3 mg/kg/día para las ratas hembras preñadas y para el desarrollo embrio-fetal, con un IDA para el hombre calculando en 0,003 mg/kg/día (EPA, 1996). Debido a que tal exposición puede ocurrir en el hombre, particularmente para los aplicadores y granjeros, y ya que existe escasa información sobre la neurotoxicidad del amitraz durante el desarrollo y lactación, el objetivo del presente trabajo de estudiar la exposición a amitraz de ratas madres durante la preñez y lactación y su potencial efecto en las ratas nacidas transcurrido un periodo de tiempo o edad de 60 días, sobre los niveles de noradrenalina, serotonina y dopamina en el SNC es importante pues se aportan nuevos datos de la neurotoxicidad del desarrollo del amitraz, datos escasos en la literatura. Se

conoce que el amitraz cruza la placenta y también se excreta en la leche materna (FAO, 1980).

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). Existe interés en identificar puntos críticos neuroquímicos que contribuyan a comprender mejor el mecanismo de acción de los agentes neurotóxicos y que pueden ser manifestados a dosis inferiores y antes de que los síntomas sistémicos de toxicidad o neurotoxicidad sean aparentes. En el presente estudio se han seleccionado como ejemplos de biomarcadores de neurotoxicidad la medida del contenido de noradrenalina, serotonina y dopamina en regiones cerebrales. Los biomarcadores neuroquímicos noradrenalina, dopamina, y serotonina y sus respectivos metabolitos, pueden estar correlacionados con biomarcadores neuropatológicos y del comportamiento, y pueden ayudar a un mejor conocimiento de los mecanismo de neurotoxicidad. (ALI *et al.*, 1991).

Existen dos trabajos previos sobre efectos de la exposición prenatal y postnatal de amitraz sobre el comportamiento (PALERMO-NETO *et al.*, 1994, 1997). La exposición prenatal de amitraz (20 mg/kg/día) origina en los animales nacidos, a los 30 días después del nacimiento (es decir a los 30 días de edad), una mayor actividad locomotora y un tiempo de inmovilidad mas corto (PALERMO-NETO *et al.*, 1994). Similarmente, la exposición postnatal (periodo de lactación) de las ratas madre a amitraz (10 mg/kg/día) origina también un

incremento en la actividad motora espontánea de los animales nacidos a los 16, 17 y 18 días de edad, sin observarse ningún cambio en la locomoción ni en el tiempo de inmovilidad en los animales a los 30, 60 y 90 días de edad (PALERMO-NETO *et al.*, 1997). Los datos observados en estos dos estudios previos sobre neurotoxicidad del desarrollo del amitraz, apoyan la evidencia de que el uso de evaluaciones del comportamiento pueden ayudar a un mejor conocimiento de la neurotoxicidad del desarrollo por agentes químicos.

En el presente estudio se ha evaluado las exposición prenatal y posnatal (gestación y lactación) de ratas madres a amitraz, 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 amitraz (20 mg/kg/día) durante la preñez y la lactación de las ratas madre conduce a alteraciones del sistema serotoninérgico, dopaminérgico y noradrenérgico en los animales nacidos y transcurridos 60 días después del nacimiento, es decir a los 60 días de edad. Los efectos observados en nuestro estudio incluyen una disminución significativa de los niveles de serotonina y noradrenalina en las regiones cerebrales corteza frontal (en un rango de 17-30% y de 15-20%, respectivamente), y cuerpo estriado (en un rango de 11-13% y de 7-9%, respectivamente), así como también una disminución significativa de los niveles de dopamina en las regiones cerebrales hipocampo (en un rango de 8-32%), corteza frontal (en un rango de 17-30%) y cuerpo estriado (en un rango de 12-13%).

Con respecto a los metabolitos, la exposición amitraz originó un aumento significativo del metabolito de serotonina, el ácido 5-hidroxi-3-indolacético, en bulbo (16-61%), y en hipocampo (39-53%), y un descenso en corteza frontal y cuerpo estriado (en un rango del 8-21%). Con respecto al sistema noradrenérgico, la exposición de amitraz originó un descenso en el metabolito el 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol en corteza frontal y cuerpo estriado (en un rango

del 16-35%). También se reflejó en el sistema dopaminérgico, un aumento estadísticamente significativo en el contenido del metabolito ácido 3,4-dihidroxifenilacético en mesencéfalo (34-53%), hipocampo (30-43%), y cuerpo estriado (18-30%) y también del metabolito ácido homovanílico en hipocampo (23-54%), y en cuerpo estriado (16-44%), pero por el contrario se observó un descenso en el contenido de estos dos metabolitos de dopamina en la región cerebral corteza frontal (en un rango de 21-36%).

Teniendo en cuenta las regiones cerebrales afectadas en nuestro estudio por amitraz (corteza frontal, cuerpo estriado, e hipocampo), se podría considerar que los procesos de aprendizaje y memoria se podrían ver comprometidos (ROLLS, 1994; KIM *et al.*, 1995; PRADO-ALCALA, 1995; RIDLEY *et al.*, 1996; GALANI *et al.*, 1998; FANSELOW, 2000; BURGESS *et al.*, 2002; PRADO-ALCALA *et al.*, 2003; COMPTON, 2004; SEAMANS y YANG, 2004; DUNNET *et al.*, 2005; BERRY *et al.*, 1994; CRUSIO y SCHWEGLER, 2005; WILLIAMS y CASTNER, 2006; LAPIZ y MORILAK, 2006; BANDYOPADHYAY y HABLITZ, 2007; CIFARIELLO *et al.*, 2007; SHAPOVALOVA y KAMKINA, 2008; GONZÁLEZ-BURGOS y FERIA-VELASCO, 2008; OLVERA-CORTÉS *et al.*, 2008; WISMAN *et al.*, 2008). Por lo tanto, es importante continuar con experimentos específicos sobre el comportamiento para definir el papel del amitraz en las respuestas, implicadas a su vez en la neurotoxicidad del desarrollo.

El amitraz, originalmente, se admite que podría ejercer sus efectos adversos sobre el desarrollo del cerebro a través del mismo mecanismo por el que sucede su toxicidad sistémica, propiamente inhibición de la MAO y como consecuencia hiperestimulación catecolaminérgica (BENEZET y KNOWLES, 1976; BERRY *et al.*, 1994). Sin embargo, los resultados del presente trabajo también apuntan a que el amitraz podría alterar el desarrollo del cerebro a través de otros mecanismos diferentes a los de inhibición de la MAO, ya que en el presente

estudio, la exposición prenatal y posnatal de las ratas madre a amitraz (20 mg/kg/día) supone una dosis baja y que en el estudio previo de neurotoxicidad originaba solo una ligera inhibición de la MAO. El amitraz, por si mismo, podría afectar a la replicación celular neuronal, diferenciación, axonogénesis y sinaptogénesis, y al desarrollo funcional de los sistemas neurotransmisores, efectos que bien podrían culminar en las alteraciones del comportamiento observadas en estudios previos (PALERMO-NETO *et al.*, 1994 y 1997) y al igual que se sugiere para 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). Deficiencias en el sistema serotoninérgico están asociadas con síntomas de depresión en el hombre y las terapias, mas eficaces son aquellos fármacos que restauran la función sináptica serotoninérgica (MELTZER y MAES, 1995). En el presente estudio los efectos originados por amitraz de pérdida del contenido de neurotransmisores serotonina, noradrenalina, y dopamina estarían correlacionados con las anomalías en el comportamiento por amitraz previamente descritas (PALERMO-NETO *et al.*, 1994 y 1997). Se viene sugiriendo que aquellos tóxicos ambientales que originan cambios a largo plazo en la función serotoninérgica pueden contribuir a desordenes neuronales tales como una mayor incidencia de depresión (ALDRIDGE *et al.*, 2005).

Los resultados del presente estudio, sugieren que el amitraz es neurotóxico en el desarrollo del cerebro. Nosotros hemos encontrado claramente una disminución de los niveles de serotonina, dopamina y noradrenalina en ratas hembras y en machos a los 60 días de edad, nacidas de ratas madre tratadas con amitraz durante la preñez y lactación. Estos efectos pueden representar un gran numero de acciones implicadas en la disfunción del desarrollo sináptico y en

los sistemas de neurotransmisores que últimamente contribuyen a anomalías del comportamiento. Porque el amitraz está descrito como un inhibidor de la MAO, es propio que no se pueda omitir este mecanismo en la neurotoxicidad del desarrollo inducida por amitraz. A este respecto, se ha descrito en la rata que la MAO A alcanza niveles adultos a los pocos días del nacimiento, mientras que la MAO B es extremadamente baja en el cerebro fetal y se desarrolla totalmente desde el nacimiento hasta la edad adulta (DIEZ y MADERDRUT, 1977; CHORDIKIAN *et al.*, 1975; MELAMED *et al.*, 1990). Esto podría sugerir que durante el desarrollo pueden ocurrir alteraciones cuantitativas en las dos isoformas, así como también pueden existir alteraciones en la afinidad de una isoforma por un sustrato dado. La MAO puede efectivamente modular el desarrollo de los sistemas monoaminérgicos. Como las dos isoformas de la MAO son componentes integrales del metabolismo de monoaminas, cualquier cambio en las isoformas de la MAO tendrían un efecto profundo en el desarrollo del cerebro modificando ambos su estructura final y su función.

Se han realizado estudios en ratas sobre los efectos de la exposición gestacional a inhibidores de MAO, sobre la densidad de la innervación 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 también una reducción significativa de la innervación de serotonina en corteza frontal, sin observarse cambios en el sistema dopaminérgico (WHITAKER-AZMITIA *et al.*, 1994). Es claro que los neurotransmisores monoaminas 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 MAO, cualquier cambio en esta enzima puede afectar profundamente al desarrollo del cerebro y por ello es propio que el tratamiento con amitraz incluso a dosis bajas a

través de la gestación y lactación puede 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 post-natal donde en corteza frontal, cuerpo estriado, e hipocampo se presenta una pérdida significativa de estos neurotransmisores. No obstante no puede también omitirse la posibilidad de un efecto directo del amitraz sobre el desarrollo funcional de los sistemas monoaminérgicos.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la exposición de xenobióticos en el periodo del desarrollo (gestación y lactación) es especialmente vulnerable para los sistemas noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico. Los resultados observados en el presente estudio refuerzan la idea del uso de las medidas neuroquímicas, tal como el contenido de noradrenalina, serotonina y dopamina y sus metabolitos, en regiones cerebrales, como indicadores adecuados de neurotoxicidad, incluyendo neurotoxicidad del desarrollo, inducida por agentes químicos. Dado que en la disfunción en los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico están implicados desordenes tales como apetito, afectivos, de locomoción, de aprendizaje, neurológicos y neuropsiquiátricos (INSEL *et al.*, 1990; STEIN *et al.*, 1993; RIEDERER *et al.*, 1989) en general, nuestros resultados son consonantes con la sugerencia de que al menos algunas de las incidencias de estos desordenes que se vienen presentando cada vez mas en el hombre pueden ser originadas por la exposición de contaminantes ambientales neurotóxicos (SLIKKER y SCHWETZ, 2003; TOSCHKE *et al.*, 2002; VON KRIES *et al.*, 2002; MAY, 2000). Por ello cada vez se hace necesario mayores investigaciones de ciertos agentes neurotóxicos, tipo amitraz que confieren un riesgo adicional para la salud pública.

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

1. El presente trabajo de investigación demuestra que el tratamiento con amitraz a dosis de 20, 50 y 80 mg/kg p.c./día, vía oral, durante 5 días en ratas Wistar macho de 30 y 60 días de edad, altera, en el SNC de forma dosis-dependiente, los niveles de noradrenalina (NA) y de su metabolito el 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), serotonina (5-HT) y de su metabolito el ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA), así como los niveles de dopamina (DA) y de sus metabolitos el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA). Por el momento, en la literatura científica no se ha descrito este tipo de efectos a las dosis descritas y nuestra investigación proporciona una información relevante, aportando un nuevo conocimiento a la neurotoxicología de este pesticida.
2. El amitraz a las dosis de 50 y 80 mg/kg p.c./día, durante 5 días, produjo, en los animales de edad 30 y 60 días, una disminución significativa dosis-dependiente de la ganancia de peso.
3. En las ratas de 30 días de edad, la administración de 20, 50 y 80 mg amitraz/kg p.c./día, durante 5 días, produjo en el sistema serotoninérgico:
 - a) Un aumento significativo de los niveles de 5-HT en todas las regiones estudiadas del SNC (excepto en el bulbo raquídeo e hipocampo a la dosis de 20 mg/kg p.c.) y este aumento fue en un rango de 7-113%.
 - b) Una disminución significativa de los niveles del metabolito 5-HIAA, en todas las regiones del SNC (excepto en la corteza frontal, mesencéfalo e hipocampo a la dosis de 20 mg/kg p.c.) y esta disminución fue del rango de 11-82%.
 - c) La tasa de recambio disminuyó de forma significativa en todas las regiones del SNC (excepto en el hipotálamo e hipocampo a la dosis de 20 mg/kg p.c. y en la corteza frontal a la dosis de 80 mg/kg p.c.) y esta disminución fue del rango de 19-90%.

4. En las ratas de 30 días de edad, la administración de 20, 50 y 80 mg amitraz/kg p.c./día, durante 5 días, produjo en el sistema noradrenergico:
 - a) Un aumento significativo de los niveles de NA en todas las regiones estudiadas del SNC y este aumento fue en un rango de 10-264%.
 - b) Una disminución significativa de los niveles del metabolito MHPG en todas las regiones estudiadas del SNC y esta disminución fue del rango de 18-88%.
 - c) La tasa de recambio sufrió una disminución significativa en todas las regiones estudiadas del SNC y esta disminución fue del rango de 28-96%.

5. En las ratas de 30 días de edad, la administración de 20, 50 y 80 mg amitraz/kg p.c./día, durante 5 días, produjo en el sistema dopaminérgico:
 - a) Un aumento significativo de los niveles de DA en todas las regiones estudiadas del SNC y este aumento fue en un rango de 10-708%.
 - b) Una disminución significativa de los niveles del metabolito DOPAC en todas las regiones estudiadas del SNC (excepto en el bulbo raquídeo, mesencéfalo y cuerpo estriado a la dosis de 20 mg/kg p.c. y en el mesencéfalo a la dosis de 50 mg/kg p.c.) y esta disminución fue del rango de 12-85%.
 - c) Una disminución significativa de los niveles del metabolito HVA en todas las regiones estudiadas del SNC y esta disminución fue del rango de 6-126%.
 - d) La tasa de recambio sufrió una disminución significativa en todas las regiones del SNC estudiadas (excepto en el mesencéfalo a la dosis de 20 mg/kg p.c.) y esta disminución fue del rango de 12-96%.

6. En las ratas de 60 días de edad, la administración de 20, 50 y 80 mg amitraz/kg p.c./día, durante 5 días, produjo en el sistema serotoninérgico:
 - a) Un aumento significativo de los niveles de 5-HT en todas las regiones del SNC

estudiadas (excepto en el hipocampo a la dosis de 20 y 50 mg/kg p.c.) y este aumento fue en un rango de 23-688%.

b) Una disminución significativa de los niveles del metabolito 5-HIAA, en todas las regiones del SNC estudiadas (excepto en la corteza frontal y mesencéfalo a la dosis de 20 mg/kg p.c.) y esta disminución fue del rango de 4-84%.

c) La tasa de recambio disminuyó de forma significativa en todas las regiones del SNC estudiadas (excepto en el mesencéfalo a la dosis de 20 mg/kg p.c. y en el hipotálamo a la dosis de 80 mg/kg p.c.) y esta disminución fue del rango de 41-97%.

7. En las ratas de 60 días de edad, la administración de 20, 50 y 80 mg amitraz/kg p.c./día, durante 5 días, produjo en el sistema noradrenérgico:

a) Un aumento significativo de los niveles de NA en todas las regiones del SNC (excepto en el cuerpo estriado a la dosis de 20 mg/kg p.c.) y este aumento fue en un rango de 7-458%.

b) Una disminución significativa de los niveles del metabolito MHPG en todas las regiones estudiadas del SNC y esta disminución fue del rango de 18-88%.

c) La tasa de recambio sufrió una disminución significativa en todas las regiones estudiadas del SNC y esta disminución fue del rango de 37-90%.

8. En las ratas de 60 días de edad, la administración de 20, 50 y 80 mg amitraz/kg p.c./día, durante 5 días, produjo en el sistema dopaminérgico:

a) Un aumento significativo de los niveles de DA en todas las regiones del SNC estudiadas (excepto en la corteza frontal a la dosis de 20 mg/kg p.c.) y este aumento fue en un rango de 6-930%.

b) Una disminución significativa de los niveles del metabolito DOPAC en todas las regiones del SNC estudiadas (excepto en la corteza frontal a la dosis de 20 mg/kg p.c.) y

esta disminución fue del rango de 9-97%.

c) Una disminución significativa de los niveles del metabolito HVA en todas las regiones del SNC estudiadas y esta disminución fue del rango de 8-100%.

d) La tasa de recambio sufrió una disminución significativa en todas las regiones del SNC estudiadas y esta disminución fue del rango de 22-99%.

9. Las diferencias observadas en el efecto del amitraz sobre los niveles de NA, 5-HT, DA y sus respectivos metabolitos en las distintas regiones del SNC podrían ser atribuidas a diferencias en la disposición cinética del amitraz entre las regiones del SNC (TK/TD), hecho que debería ser confirmado en estudios posteriores sobre la toxicocinética del amitraz.

10. En ratas de 60 días de edad nacidas de madres expuestas al amitraz (20 mg/kg/día) durante la gestación y la lactancia, se detectó a nivel de sistema serotoninérgico:

a) Una disminución significativa de los niveles de 5-HT en el cuerpo estriado (17% en los machos y 13% en las hembras) y en la corteza frontal (11% en el macho y 30% en las hembras).

b) Una disminución significativa de los niveles del metabolito 5-HIAA en el cuerpo estriado (10% en los machos y 11% en las hembras) y en la corteza frontal (22% en los machos y 8% en las hembras), pero por el contrario se detectó un aumento en el contenido de 5-HIAA en el bulbo raquídeo (16% en los machos y 61% en las hembras) y en el hipocampo (39% en los machos y 53% en las hembras).

11. En ratas de 60 días de edad nacidas de madres expuestas al amitraz (20 mg/kg/día) durante la gestación y la lactancia, se produjo a nivel de sistema noradrenérgico:

a) Una disminución significativa de los niveles de NA en el cuerpo estriado (8% en los machos y 7% en las hembras) y en la corteza frontal (15% en los machos y 21% en las hembras).

hembras).

b) Una disminución significativa de los niveles del metabolito MHPG en el cuerpo estriado (16% en los machos y 33% en las hembras) y en la corteza frontal (35% en los machos y 18% en las hembras).

12. En ratas de 60 días de edad nacidas de madres expuestas al amitraz (20 mg/kg/día) durante la gestación y la lactancia, se observó a nivel del sistema dopaminérgico:

a) Una disminución significativa de los niveles de DA en el cuerpo estriado (12% en machos y hembras), en la corteza frontal (17% en los machos y 29% en las hembras) y en el hipocampo (32% en los machos y 8% en las hembras).

b) Una disminución significativa del contenido de DOPAC en la corteza frontal (25% en los machos y 33% en las hembras), por el contrario se detectó un aumento significativo de los niveles del metabolito DOPAC en el cuerpo estriado (30% en los machos y 18% en las hembras) y en el hipocampo (30% en los machos y 43% en las hembras).

c) Una disminución significativa del contenido de HVA en la corteza frontal (21% en los machos y 36% en las hembras), pero sin embargo se detectó un aumento significativo de los niveles del metabolito HVA en el cuerpo estriado (16% en los machos y 44% en las hembras) y en el hipocampo (23% en los machos y 54% en las hembras).

13. En resumen, los resultados de la presente investigación demuestran que el amitraz afecta a los sistemas noradrenérgico serotoninérgico y dopaminérgico en animales adultos, así como también origina neurotoxicidad en el desarrollo a nivel de estos sistemas de neurotransmisores, efecto que puede ser mediado vía inhibición de la MAO o vía directa sobre la síntesis o liberación de estos neurotransmisores. Posteriores trabajos son necesarios para clarificar el mecanismo implicado.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFIA

- ABED, W.T. (1989). The effect of monoamine depletors on metrazol induced convulsions and brain γ -aminobutyric acid (GABA) contents in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 41(11): 807-808.
- ABO-KHATWA, N. & HOLLINGWORTH, R.M. (1973). Chlordimeform: Uncoupling activity against rat liver mitochondria. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 3: 358.
- ABRAMS, J.K., JOHNSON, P.L., HAY-SCHMIDT, A., MIKKELSEN, J.D., SHEKHAR, A. & LOWRY, C.A. (2005). Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. *Neuroscience* 133(4): 983–997.
- ABU-BASH, E.A., YIBCHOK-ANUN, S., HOPPER, D.L. & HSU, W.H. (1999). Effects of the pesticide amitraz and its metabolite BTS 27271 on insulin and glucagon secretion from the perfused rat pancreas: involvement of α_{2D} -adrenergic receptors. *Metabolism* 48(11): 1461-1469.
- AGHAJANIAN, G.K. & SANDERS-BUSH, E. (2002). Serotonin. In: *Neuropsychopharmacology: the Fifth Generation of Progress*. Davis, K.L., Charney, D., Coyle, J.T. & Nemeroff, C.B. (Eds), Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 15–34.
- AGING, H.A., ÖCALKAVUR, Ö., UZUN, H. & BAK, M. (2004). Amitraz poisoning: clinical and laboratory finding. *Indian Pediatrics* 41(5): 482-486.
- 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 α_2 -adrenoceptor regulating [H^3] noradrenaline release from rat hypothalamic synaptosomes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 172: 179-185.
- AL-THANI, R.K., AL-THANI, A.S., ELBETIEHA, A. & DARMANI, H. (2003). Assessment of reproductive and fertility effects of amitraz pesticide in male mice. *Toxicology Letters* 138: 253-260.

- ANDÉN, N.E., GRABOWSKA, M. & STRÖMBON, U. (1976). Different alpha-adrenoceptors in the central nervous system mediating biochemical and functional effects of clonidine and receptor blocking agents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 292: 43-52.
- ANDRADE, S.F. & SAKATE, M. (2003). The comparative efficacy of yohimbine and atipamezole to treat amitraz intoxication in dogs. *Veterinary and Human Toxicology* 45(3): 124-127.
- ANDREWS, N., BARNES, N.M., STEWARD, L.J., WEST, K.E., CUNNINGHAM, J., WU, P.Y., ZANGROSSI, H. & FILE, S.E. (1993). A comparison of rat brain amino acid and monoamine content in diazepam withdrawal and after exposure to a phobic stimulus. *British Journal of Pharmacology* 109: 171-174.
- ANTELMAN, S.M. & CAGGIULA, A.R. (1977). Norepinephrine-dopamine interactions and behavior. *Science* 195: 646-653.
- ARAI, Y., STENSTRÖM, A. & ORELAND, L. (1985). The effect of age on intraneuronal and extraneuronal monoamine oxidase-A and -B activities in the rat brain. *Biogenic Amines* 2(1): 65-71.
- 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.
- ASHRAF, M.Z., REDDY, M.K., HUSSAIN, M.E., PODREZ, E.A. & FAHIM, M. (2007). Contribution of EDRF and EDHF to restoration of endothelial function following dietary restrictions in hypercholesterolemic rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 45(6): 505-514.
- AZIZ, S.A. & KNOWLES, C.O. (1973). Inhibition of monoamine oxidase by the pesticide chlordimeform and related compounds. *Nature* 242: 417-418.
- 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.
- BALLARÍN, M., CARCELLER, A. & GUITART, X. (1994). Effect of acute administration of the 5-HT_{1A} receptor ligand, lesopitron, on rat cortical 5-HT and dopamine turnover. *British Journal of Pharmacology* 113: 425-430.
- BANDYOPADHYAY, S. & HABLITZ, J.J. (2007). Dopaminergic modulation of local network activity in rat prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology* 97(6): 4120-4128.
- 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.

- BARROS, M., DE SOUZA SILVA, M.A., HUSTON, J.P. & TOMAZ, C. (2002). Anxiolytic-like effects of substance P fragment (SP1-7) in non-human primates (*Callithrix penicillata*). *Peptides* 23(5): 967-973.
- BARROS, M. & TOMAZ, C. (2002). Non-human primate models for investigating fear and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26(2): 187-201.
- 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.
- BELIN, M.F., AGUERA, M., TAPPAZ, M., MCRAE-DEGUEURCE, A., BOBILLIER, P. & PUJOL, J.F. (1979). GABA-accumulating neurons in the nucleus raphe dorsalis and periaqueductal gray in the rat: a biochemical and radioautographic study. *Brain Research* 170(2): 279-297.
- BEEAMAN, R.W. & MATSUMURA, F. (1973). Chlordimeform: a pesticide acting upon amine regulatory mechanisms. *Nature* 242(5395): 273-274.
- BEEAMAN, R.W. (1982). Recent advances in mode of action of insecticides. *Annual Review of Entomology* 27: 253-281.
- BENEDETTI, M.S. & KEANE, P.E. (1980). Differential changes in monoamine oxidase A and B activity in the aging rat brain. *Journal of Neurochemistry* 35(5):1026-32.
- 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.
- BENWELL, M.E.M. & BALFOUR, D.J.K. (1992). The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. *British Journal of Pharmacology* 105: 849-856.
- BERCZY, Z.S., BINNS, R. & NEWMAN, A.J. (1972). Acute inhalation toxicity to the rat of BTS 27419. Unpublished report No. 4971/72/406 from Huntingdon Research Centre Ltd, Huntingdon, Cambridge-shire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- BERCZY, Z.S., BINNS, R., STREET, A.E., NEWMAN, A.J. & WHITFIELD, R.A.S. (1973). Subacute inhalation toxicity to the rat of BTS 27419. Unpublished report No. 5454/72/850 from Huntingdon Research Centre Ltd, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- BERGEN, W.G. (1971). The *in vitro* effect of dieldrin on respiration of rat liver mitochondria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 136(3): 732-735.
- 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.
- BISWAS, B. & CARLSSON, A. (1977a). The effect of intracerebroventricularly administered GABA on brain monoamine metabolism. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 229(1): 41-46.
- BISWAS, B. & CARLSSON, A. (1977b). The effect of intraperitoneally administered GABA on brain monoamine metabolism. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 229(1): 47-51.
- 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.
- BONSALL, J.L. & TURNBULL, G.J. (1983). Extrapolation from safety data to management of poisoning with reference to amitraz (a formamidine pesticide) and xylene. *Human Toxicology* 2: 587-592.
- BORTOLATO, M., CHEN, K. & SHIH, J.C. (2008). Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60(13-14): 1527-1533.
- 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.
- BOWLING, A.C. & BEAL, M.F. (1995). Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sciences* 56(14): 1151-1171.
- 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.
- BOYD, K.E., FITZPATRICK, D.W., WILSON, J.R. & WILSON, L.M. (1987). Effect of T-2 toxin on brain biogenic monoamines in rats and chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research* 52: 181-185.
- BRODIE, M.E. & OPACKA, J. (1985). Dissociation between circling behaviour and striatal dopamine activity following unilateral deltamethrin administration to rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 331: 341-346.
- BROOKER, P.C., AKHURST, L.C. & GRAY, V.M. (1988). Technical amitraz, metaphase chromosome analysis of human lymphocytes cultured in vitro. Unpublished report No. SMS 127/881149 from Huntingdon Research Centre Ltd, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.

- BROWN, C.S., KENT, T.A., BRYANT, S.G., GEVEDON, R.M., CAMPBELL, J.L., FELTHOUS, A.R., BARRATT, E.S. & ROSE, R.M. (1989). Blood platelet uptake of serotonin in episodic aggression. *Psychiatry Research* 27(1): 5-12.
- BRYAN, L.J. & O'DONNELL, S.T. (1989). Analysis of the o-methylated metabolites of isoprenaline, adrenaline and noradrenaline in physiological salt solutions by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography* 487: 29-39.
- BURGESS, N., MAGUIRE, E.A. & O'KEEFE, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35(4): 625-641.
- BURNETT, R., CROWLEY, J., LESSEL, B., PATTON, D.S.G., SUTTON, M.M. & TURNBULL, G.J. (1976). BTS 27419: 80-week carcinogenicity study in mice-final report. Unpublished report No. TX 76039 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- BURLEY, E.S. & FERRENDELLI, J.A. (1984). Regulatory effects of neurotransmitters on electroshock and pentylenetetrazol seizures. *Federation Proceedings* 43(10): 2521-2524.
- BURROWS, A.K. (2000). Generalised demodicosis in the dog: the unresponsive or recurrent case. *Australian Veterinary Journal* 78 (4): 244-246.
- 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.
- BUTKEVICH, I.P., MIKHAILENKO, V.A. & LEONT'EVA, M.N. (2005). Sequelae of prenatal serotonin depletion and stress on pain sensitivity in rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 35(9): 925-930.
- BUTTERFIELD, P.G., VALANIS, B.G., SPENCER, P.S., LINDEMAN, C.A. & NUTT, J.G. (1993). Environmental antecedents of young-onset Parkinson's disease. *Neurology* 43(6): 1150-1158.
- 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.
- CALCAGNETTI, D.J. & SCHECHTER, M.D. (1992). Psychostimulant-induced activity is attenuated by two putative dopamine release inhibitors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 43(4): 1023-1031.
- CAMPBELL, J.K. & NEEDHAM, D. (1984a). The metabolism of ¹⁴C-amitraz by male and female rats. Unpublished report No. METAB/84/2 from FBC Ltd, Chesterford Park Research Station, Saffron Walden, Essex, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- CAMPBELL, J.K. & NEEDHAM, D. (1984b). Urinary excretion of amitraz-C¹⁴ by two male humans following a single oral dose of 0,25 mg/kg bodyweight. Unpublished report No. METAB/84/10 from FBC Ltd, Chesterford Park Research Station, Saffron Walden, Essex, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.

- CAO, G.M. & HOSHINO, T. (1998). Stability of catecholamines, indolamines and related metabolites in the process of sample preparation with ultrasonication and an analysis by high-performance liquid chromatography. *Analytical Sciences* 14: 835-838.
- CARLSSON, A., FOWLER, C.J., MAGNUSSON, T., ORELAND, L. & WIBERG, A. (1981). The activities of monoamine oxidase-A and -B, succinate dehydrogenase and acid phosphatase in the rat brain after hemitranssection. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 316(1): 51-55.
- CASES, O., LEBRAND, C., GIROS, B., VITALIS, T., DE MAEYER, E., CARON, M.G., PRICE, D.J., GASPAR, 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.
- CASIDA, J.E. & QUISTAD, G.B. (2004). Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chemical Research in Toxicology* 17(8): 983-998.
- CASS, L.M.R. (1992). Report of a double blind tolerance study of amitraz in six adult healthy volunteers. Unpublished report No. TOX/92/179-209 from Simbec Research Ltd, Merthyr Tydfil, Mid-Glamorgan, Wales. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- 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.
- CESURA, A.M. & PLETSCHER, A. (1992). The new generation of monoamine oxidase inhibitors. *Progress in Drug Research* 38: 171-297.
- CHALLIS I.R. (1990). Dermal absorption of amitraz in the rat. Unpublished report No. TOX/90/179-178 from Schering Agrochemicals Ltd, Chesterford Park Research Station, Saffron Walden, Essex, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- CHESTERMAN, H., SKERRETT, K., STREET, A.E. & CHERRY, C.P. (1973). Boots 27271, oral toxicity study in beagle dogs (repeated dosage for 13 weeks). Unpublished report No. BTS 38/73511 from Huntingdon Research Centre, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- CHINN, C., LUND, A.E. & YIM, G.K.W. (1977). The central actions of lidocaine and a pesticide, chlordimeform. *Neuropharmacology* 16(12): 867-872.
- CHORDIKIAN, F.J., TABAKOFF, B. & ALIVISATOS, S.G. (1975). Ontogeny of multiple forms of monoamine oxidase in mouse brain. *Brain Research* 93(2): 301-308.
- CIFARIELLO, A., POMPILI, A. & GASBARRI, A. (2007). 5-HT(7) receptors in the modulation of cognitive processes. *Behavioural Brain Research* 195(1): 171-179.
- CLINESCHMIDT, B.V., FLATAKER, L.M., FASSON, E. & HOLMES, R. (1979). An *in vivo* model for investigating alpha₁ and alpha₂ receptors in CNS: Studies with mianserin. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* 242: 59-76.

- CLOUZEAU, J. (1992). Technical amitraz: Guinea pig sensitization study (Buehler test). Unpublished report No. TOX 91/179-203 from Centre International de Toxicologie, Miserey, Evreux, France. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- COHEN, G. (2000). Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 899: 112-120.
- 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.
- COLLEY, J., DAWE, S., HEYWOOD, R., GIBSON, W.A. & PRENTICE, D.E. (1981). Amitraz toxicity to B6C3F1 mice by dietary administration for 13 weeks. Unpublished report No. BTS 158/80759 from Huntingdon Research Centre Ltd, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- COLLEY, J., DAWE, S., HEYWOOD, R., STREET, A.E., GIBSON W.A. & GOPINATH, C. (1983). Amitraz, 104 week tumorigenicity study in mice. Unpublished report No. BTS 153/8262/A from Huntingdon Research Centre plc, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agro-chemicals Ltd.
- 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.
- CORRIGAN, F.M., MURRAY, L., WYATT, C.L. & SHORE, R.F. (1998). Diorthosubstituted polychlorinated biphenyls in caudate nucleus in Parkinson disease. *Experimental Neurology* 150(2): 339-342.
- CORRIGAN, F.M., WIENBURG, C.L., SHORE, R.F., DANIEL, S.E. & MANN, D. (2000). Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 59(4): 229-234.
- 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). α_2 -adrenoceptor as a target for formamidine pesticides: in vitro and in vivo studies in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 93: 319-328
- COSTA, L.G., OLIBET, G., WU, D. & MURPHY, S.D. (1989). Acute and chronic effects of the pesticide amitraz on α_2 - adrenoceptors in the mouse brain. *Toxicology Letters* 47: 135-143.
- CROFT, B.A. & MCGROARTY, D.L. (1973). A model study of acaricide resistance, spider mite outbreaks, and biological control patterns in Michigan apple orchards. *Environmental Entomology* 2: 633.
- CROFTON, K.M., BONCEK, V.M. & REITER, L.W. (1989). Acute effects of amitraz on the acoustic startle response and motor activity. *Pesticide Science* 27: 1-11.
- 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.
- CURZON, G. (1995). Serotonergic aspects of feeding. In: *Serotonin in the central nervous system and periphery*. Takada, A. & Curzon, G. (Eds), Elsevier, pp. 42–51.
- ÇAKSEN, H., ODABAŞ, D., ARSLAN, S., AKGÜN, C., ATLAŞ, B. & SINAN, A. (2003). Report of eight children with amitraz intoxication. *Human and Experimental Toxicology* 22: 95-97.
- DAILEY, J.W., REITH, M.E.A., YAN, Q.S., LI, M.Y. & JOBE, P.C. (1997). Carbamazepine increases extracellular serotonin concentration: lack of antagonism by tetrodotoxin or zero Ca^{+2} . *European Journal of Pharmacology* 328(2-4): 153-162.
- 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.
- DE DUFFARD, A.M., DE ALDERETE, M.N. & DUFFARD, R. (1990). Changes in brain serotonin and 5-hydroxyindolacetic acid levels induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic butyl ester. *Toxicology* 64(3): 265-270.
- DEMAREST, K.T. & AZZARO, A.J. (1979). The association of type A monoamine oxidase with the nigrostriatal dopamine neuron. In: *Monoamine Oxidase: Structure, Function and Altered functions*. Singer, T.P., Von Korff, R.W. & Murphy, D.L. (Eds), Academic Press, New York, pp. 423-430.
- DE SOUZA, H. & PALERMO-NETO, J. (1982). Effects of alpha-adrenergic blocking agents on stereotyped behavior induced by apomorphine in rats. *British Journal of Medical Biology Research* 15: 143-146.
- DESTEPHANO, D.B. & BRADY, U.E. (1977). Prostaglandin and prostaglandin synthetase in the cricket, *Acheta domesticus*. *Journal of Insect Physiology* 23 (7): 905-911.

- DIEZ, J.A. & MADERDRUT, J.L. (1977). Development of multiple forms of mouse brain monoamine oxidase in vivo and in vitro. *Brain Research* 128(1): 187-192.
- DJALDETTI, R., YUST-KATZ, S., KOLIANOV, V., MELAMED, E. & DABBY, R. (2007). The effect of duloxetine on primary pain symptoms in Parkinson disease. *Clinical Neuropharmacology* 30(4):201–205.
- DORMAN, D.C., BRENNEMAN, K.A. & BOLON, B. (2002). Nervous system. In: *Handbook of Toxicologic Pathology. 2nd Edition. Volume 2*. Haschek, W.M., Rousseaux, C.G. & Wallig, M.A. (Eds), Academic Press, California, pp. 509-537.
- 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.
- ECKERT, B., GOTTFRIES, C.G., VON KNORRING, L., ORELAND, L., WIBERG, A. & WINBLAD B. (1980). Brain and platelet monoamine oxidase in mental disorders 1. Schizophrenics and cycloid psychotics. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 4(1): 57-68.
- 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.
- ESTEBAN, B., O'SHEA, E., CAMARERO, J., SÁNCHEZ, V., GREEN, A.R. & COLADO, M.I. (2001). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose. *Psychopharmacology* 154: 251-260.
- ESTRADA-PENA, A. & ASCHER, F. (1999). Comparison of an amitraz-impregnated collar with topical administration of fipronil for prevention of experimental and natural infestations by the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214(12): 1799-1803.
- ESTRADA-PENA, A. & REME, C. (2005). Efficacy of a collar impregnated with amitraz and pyriproxyfen for prevention of experimental tick infestations by *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus*, and *Ixodes scapularis* in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226(2): 221-224.

- EVEREST, R.P. (1976). BTS 27 419: Mutagenicity study in the male mouse perivisceral cavity host-mediated assay. Unpublished report No. TX 76056 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- EVEREST, R.P. & WILCOX, P. (1976). BTS 27 419: Mutagenicity testing against *Salmonella typhimurium* strains TA1535, TA1537 and TA1538 in the presence and absence of liver microsomes from male and female mice. Unpublished report No. TX 76057 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS) (1980). Plant production and protection paper. In: *Pesticide Residues in Food, Toxicological Evaluation*. FAO/WHO (Eds), 26(suppl): 1-59.
- FANSELOW, M.S. (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behavioural Brain Research* 110: 73-81.
- FARMER, H. & SEAWRIGHT, A.A. (1989). The use of amitraz (N 1-2,4-(dimethylphenyl)-N-[(2,4-dimethylphenyl)imino)methyl]-N-methylmethan imidamide) in demodicosis in dogs. *Australian Veterinary Journal* 56: 537-541.
- FAVALE, E., RUBINO, V., MAINARDI, P., LUNARDI, G. & ALBANO, C. (1995). Anticonvulsant effect of fluoxetine in humans. *Neurology* 45(10): 1926-1927.
- 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.
- FLEMING, L., MANN, J.B., BEAN, J., BRIGGLE, T. & SÁNCHEZ-RAMOS, J.R. (1994). Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides. *Annals of Neurology* 36(1): 100-103.
- FLOREZ, J. & PAZOS, A. (1997). Neurotransmisión en el sistema nervioso central. En: *Farmacología Humana. 3ª Edición*. Flórez, J., Armijo, J.A. & Mediavilla, A. (Eds.), Masson, S.A., Barcelona, pp. 409-433.
- FLÓRIO, J.C., SAKATE, M. & PALEMO-NETO, J. (1993). Effects of amitraz on motor function. *Pharmacology and Toxicology* 73: 109-114.
- FOLZ, S.D., KAKUK, T.J., HENKE, C.L., RECTOR, D.L. & TESAR, F.B. (1984). Clinical evaluation of amitraz as a treatment for canine demodicosis. *Veterinary Parasitology* 16(3-4): 335-341.
- FOLZ, S.D., ASH, K.A., CONDER, G.A. & RECTOR, D.L. (1986). Amitraz: a tick and flea repellent and tick detachment drug. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 9(2): 150-156.
- FORCHETTI, C.M. & MEEK, J.L. (1981). Evidence for a tonic GABAergic control of serotonin neurons in the median raphe nucleus. *Brain Research* 206(1): 208-212.

- FORSTER, C.D. & MACDONALD, A. (1999). The assay of the catecholamine content of small volumes of human plasma. *Biomedical Chromatography: BMC* 13(3): 209-215.
- FOWLER, C.J., WIBERG, A., ORELAND, L., MARCUSSON, J. & WINBLAD, B. (1980). The effect of age on the activity and molecular properties of human brain monoamine oxidase. *Journal of Neural Transmission* 49(1-2): 1-20.
- FOWLER, C.J. & TIPTON, K.F. (1984). On the substrate specificities of the two forms of monoamine oxidase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 36(2):111-115.
- FULLER, R.W. & HEMRICK-LUECKE, S.K. (1985). Effects of amfonelic acid, alpha-methyltyrosine, Ro 4-1284 and haloperidol pretreatment on the depletion of striatal dopamine by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 48(1): 17-25.
- GALANI, R., WEISS, I., CASSEL, J.C. & KELCHE, C. (1998). Spatial memory, habituation, and reactions to spatial and nonspatial changes in rats with selective lesions of the hippocampus, the entorhinal cortex or the subiculum. *Behavioural Brain Research* 96(1-2): 1-12.
- GALLAGER, D.W. & AGHAJANIAN, G.K. (1976). Effect of antipsychotic drugs on the firing of dorsal raphe cells. II: Reversal by picrotoxin. *European Journal of Pharmacology* 39(2): 357-364.
- GARRICK, N.A. & MURPHY, D.L. (1980). Species differences in the deamination of dopamine and other substrates for monoamine oxidase in brain. *Psychopharmacology* 72(1): 27-33.
- GAULTIERI, C.T. & POWELL, S.F. (1978). Psychoactive drug interactions. *Journal of Clinical Psychiatry* 39(9): 720-729.
- 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.
- GIOVANNI, A., SIEBER, B.A., HEIKKILA, R.E. & SONSALLA, P.K. (1994a). Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: systemic administration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270(3): 1000-1007.
- GIOVANNI, A., SONSALLA, P.K. & HEIKKILA, R.E. (1994b). Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2: Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270(3): 1008-1014.
- GLOWINSKI, J. & IVERSEN, L.L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain – I. The disposition of [³H]norepinephrine, [³H] dopamine and [³H]DOPA in various regions of the brain. *Journal of Neurochemistry* 13: 655-669.
- GOLBE, L.I. (1993). Risk factors in young-onset. Parkinson's disease. *Neurology* 43(9): 1641-1643.

- GOLDBERG, L.I. (1964). Monoamine oxidase inhibitors. adverse reactions and possible mechanisms. *Journal of the American Medical Association* 190: 456-462.
- GOLDGERG, M. & ROBERTSON, D. (1983). Iohimbine: a pharmacological probe for studies of the alpha₂-adrenoceptor. *Pharmacological Reviews* 35: 143-180.
- GONZÁLEZ-BURGOS, I. & FERIA-VELASCO, A. (2008). Serotonin/dopamine interaction in memory formation. *Progress in Brain Research* 172: 603-623.
- GROPPI, L. (1977). Medical report on a patient who ingested Mitac (Edrizar) in Italy in 1977. Report No. T84 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- GUPTA, R.C. (2004). Brain Regional Heterogeneity and Toxicological Mechanisms of Organophosphates and Carbamates. *Toxicology Mechanisms and Methods* 14(3): 103-143.
- HAEFELY, W., BURKARD, W.P., CESURA, A.M., KETTLER, R., LOPEZ, H.P., MARTIN, J.R., RICHARDS, J.G., SCHERSCHLICHT, R. & DA PRADA, M. (1992). Biochemistry and pharmacology of moclobemide, a prototype R.I.M.A. *Psychopharmacology* 106: S6-S14.
- HAGAN, J.J., PRICE, G.W., JEFFREY, P., DEEKS, N.J., STEAN, T., PIPER, D., SMITH, M.I., UPTON, N., MEDHURST, A.D., MIDDLEMISS, D.N., RILEY, G.J., LOVELL, P.J., BROMIDGE, S.M. & THOMAS, D.R. (2000). Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT₇ receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology* 130(3):539-548.
- HALFORD, J.C. & BLUNDELL, J.E. (2000). Pharmacology of appetite suppression. *Progress in Drug Research* 54:25-58.
- HALL, J.E., AHLUWALIA, H. & HAMPSON, P. (1975). A study of effects of oral administration of a metabolite (BTS 27271) of amitraz to volunteers. Unpublished report No. MS 75002 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- HALLER, J., TOTH, M. & HALASZ, J. (2005). The activation of raphe serotonergic neurons in normal and hypoarousal-driven aggression: a double labeling study in rats. *Behavioural Brain Research* 161(1): 88-94.
- HARANDI, M., AGUERA, M., GAMRANI, H., DIDIER, M., MAITRE, M., CALAS, A. & BELIN, M.F. (1987). γ -Aminobutyric acid and 5-hydroxytryptamine interrelationship in the rat nucleus raphe dorsalis: combination of radioautographic and immunocytochemical techniques at light and electron microscopy levels. *Neuroscience* 21(1): 237-251.
- HARKINS, J.D., QUEIROZ-NETO, A., MUNDY, G.D., WEST, D. & TOBIN, T. (1997). Development and characterization of an equine behaviour chamber and the effects of amitraz and detomidine on spontaneous locomotor activity. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 20(5): 396-401.
- HARRISON, I.R., ANTONIN, K., McCARTHY, J.F., PALMER, B.H., WAKERLEY, S.B., WATKINSON, T.I. & WEIGHTON, D.M. (1973). 1,3,5-Triazapenta-1,4-dienes: Chemical Aspects of a New Group of Pesticides. *Pesticides Science* 4: 901-910.

- HARVEY, J.A. (1996). Serotonergic regulation of associative learning. *Behavioral Brain Research* 73(1-2): 47–50.
- HEDLUND, P.B. & SUTCLIFFE, J.G. (2004). Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT₇ receptor research. *Trends in Pharmacological Sciences* 25(9): 481–486.
- HEINZ, G.H., HILL, E.F. & CONTRERA, J.F. (1980). Dopamine and norepinephrine depletion in ring doves fed DDE, dieldrin, and Aroclor 1254. *Toxicology and Applied Pharmacology* 53(1): 75-82.
- 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.
- HERREMANS, A.H.J., HIJZEN, T.H., OLIVIER, B. & SLANGEN, J.L. (1995). Serotonergic drug effects on a delayed conditional discrimination task in the rat: involvement of the 5-HT_{1A} receptor in working memory. *Journal of Psychopharmacol* 9(3): 242–250.
- 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.
- HOLZER, P. & SKOFITSCH, G. (1984). Release of endogenous 5-hydroxytryptamine from the myenteric plexus of the guinea-pig isolated small intestine. *British Journal of Pharmacology* 81: 381-386.
- HOLLINGWORTH, R.M. (1976). Chemistry, biological activity, and uses of formamidine pesticides. *Environmental Health Perspectives* 14: 57-69.
- 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.
- HORNISH R.E. & NAPPIER, J.M. (1983). The absorption, metabolism, and excretion of Mitaban^(R) (U-36,059) in the dog from oral and dermal exposure. Unpublished report No.527-9760-83-001 from Agricultural Research and Development Laboratories, The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, USA. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- HOUNSELL, I.A.G. & WALKER, A.K. (1983). A micronucleous study in mice using BTS 24868 (2,4-dimetianilina). Unpublished report No. TOX/84/179-97 from FBC Ltd, Chesterford Park Research Station, Saffron Walden, Essex, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- HOUNSELL, I.A. & RUSH, K.C. (1984). Technical amitraz: The effect of dietary administration on the oestrus cycle and hormones in the mouse. Unpublished report No. TOX/84/179-97 from FBC Ltd, Chesterford Park Research Station, Saffron Walden, Essex, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.

- HSU, W.H. & KAKUK, T.J. (1984). Effect of amitraz and chlordimeform on heart rate and pupil diameter in rats: mediated by α_2 -adrenoceptor. *Toxicology and Applied Pharmacology* 73: 411-415.
- HSU, W.H. & LU, Z.H. (1984). Amitraz-induced delay of gastrointestinal transit in mice: mediated by α_2 -adrenergic receptors. *Drug Development Research* 4: 655-660.
- HSU, W.H. & HOPPER, D.L. (1986). Effect of yohimbine on amitraz-induced CNS depression and bradycardia in dogs. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 18(3): 423-429.
- HSU, W.H., LU, Z.X. & HEMBROUGH, F.B. (1986). Effect of amitraz on heart rate and aortic blood pressure in conscious dogs: influence of atropine, prazosin, tolazoline, and yohimbine. *Toxicology and Applied Pharmacology* 84: 418-422.
- HSU, W.H. & SCHAFFER, D.D. (1988). Effects of topical application of amitraz on plasma glucose and insulin concentrations in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 49(1): 130-131.
- HSU, W.H., SHAW, R.N., SCHAFFER, D.D., CRUMP, M.H. & GEER, M.H. (1997). Further evidence to support the α_2 -adrenergic nature of amitraz-induced decrease in intestinal motility. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 286: 145-151.
- HUBBLE, J.P., CAO, T., HASSANEIN, R.E., NEUBERGER, J.S. & KOLLER, W.C. (1993). Risk factors of Parkinson's disease. *Neurology* 43(9): 1693-1697.
- HUGNET, C., BURONFOSSE, F., PINEAU, X., CADORÉ, JL., LORGEE, G. & BERNY, PJ. (1996). Toxicity and kinetics of amitraz in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 57(10): 1506-1510.
- HUGNET, C., BRUCHON-HUGNET, C., ROYER, H. & BOURDOISEAU, G. (2001). Efficacy of 1.25% amitraz solution in the treatment of generalized demodicosis (eight cases) and sarcoptic mange (five cases) in dogs. *Veterinary Dermatology* 12(1): 89-92.
- INSEL, T.R., ZOHAR, J., BENKELF, A.T.C. & MURPHY, D.L. (1990). Serotonin in obsessions, compulsions, and the control of aggressive impulses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 600: 574-585.
- 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.
- JOHANSEN, C.A. (1972). Toxicity of field-weathered insecticide residues to four kinds of bees. *Environmental Entomology* 67: 445.
- 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). *Pesticide Residues in Food – 1998. Evaluations Part II: Toxicological WHO/PCS/99.18*. WHO Pesticide Residues in Food, No 14.

Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v098pr02.htm>.

JONES, R.D. (1990). Xylene/Amitraz: A pharmacological review and profile. *Veterinary and Human Toxicology* 32(5): 446-448.

JOSENS, P.G., ZANDIJK, E., BELMANS, L., SCHEPENS, P.J. & BOSSAERT, L.L. (1997). An unusual poisoning with the unusual pesticide Amitraz. *Human and Experimental Toxicology* 16(10): 600-601.

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.

KAKUK, T.J. (1979). Pathological findings on the matched control and amitraz 400 ppm females from the Boots 80 week mouse study by various pathologists with commentary. Unpublished report No. 315-78-9610-005 from Agricultural Research and Development Laboratories, The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, USA. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.

KALYONCU, M., DILBER, E. & ÖKTEN, A. (2002). Amitraz intoxication in children in de rural Black Sea region: analysis of forty-three patients. *Human and Experimental Toxicology* 21(5): 269-272.

KANTHASAMY, A.G., BOROWITZ, J.L. & ISOM, G.E. (1991). Cyanide-induced increases in plasma catecholamines: relationship to acute toxicity. *Neurotoxicology* 12(4): 777-784.

KANTHASAMY, A.G., BOROWITZ, J.L., PAVLAKOVIC, G. & ISOM, G.E. (1994). Dopaminergic neurotoxicity of cyanide: neurochemical, histological, and behavioral characterization. *Toxicology and Applied Pharmacology* 126(1): 156-163.

KAROUM, F., FILLIN, J.C. & WYATT, R.J. (1975). Mass-fragmentography of biogenic amine metabolites in human cerebrospinal fluid and whole rat brain. *Biomedical Mass Spectrometry* 2(2): 183-189.

KENNEL, O., PRINCE, C. & GARNIER, R. (1996). Four Cases of Amitraz Poisoning in Humans. *Veterinary and Human Toxicology* 38 (1): 28-30.

KILIAN, M. & FREY, H.H. (1973). Central monoamines and convulsive thresholds in mice and rats. *Neuropharmacology* 12(7): 681-692.

KIM, J.C., SHIN, J.Y., YANG, Y.S., SHIN, D.H., MOON, C.J., KIM, S.H., PARK, S.C., KIM, Y.B., KIM, H.C. & CHUNG, M.K. (2007). Evaluation of developmental toxicity of amitraz in Sprague-Dawley rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52(1): 137-144.

KIM, J.J., CLARK, R.E. & THOMPSON, R.F. (1995). Hippocampectomy impairs the memory of recently, but not remotely, acquired trace eyeblink conditioned responses. *Behavioral Neuroscience* 109(2):195-203.

- KISSINGER, P.T., REFSHAUGE, C., DREILING, R. & ADAMS, R.N. (1973). An electrochemical detector for liquid chromatography with picogram sensitivity. *Analytical Letters* 6: 465-477.
- KITAZAWA, M., ANANTHARAM, V. & KANTHASAMY, A.G. (2001). Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptotic cell death in dopaminergic cells. *Free Radical Biology and Medicine* 31(11): 1473-1485.
- KNOLL, J. & MAGYAR, K. (1972). Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 5: 393-408.
- KNOLL, J. (2000). (-)Deprenyl (Selegiline): past, present and future. *Neurobiology* 8(2):179-99.
- 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. & BENEZET, H.J.(1981). Excretion balance, metabolic fate and tissue residues following treatment of rats with amitraz and N´-(2,4-dimethylphenil)-N-metilformamidine. *Journal of Enviromental Science and Health* 16 (5): 547-555.
- KRSTULOVIC, A.M. & POWELL, A.M. (1979). Use of a native fluorescence measurements and stopped-flow scanning technique in the high-performance liquid chromatographic analysis of catecholamines and related compounds. *Journal of Chromatography* 171: 345-356.
- KWOCHKA, K.W., KUNKLE, G.A. & FOIL, C.O. (1985). The efficacy of amitraz for generalized demodosis in dogs: a study of two concentrations and frequencies of application. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 7: 8-18.
- KYNOCH, S.R. & PARCELL, B.I. (1988). Technical amitraz: Assessment of delayed contact hypersensitivity in the guinea-pig. Unpublished report No. TOX 88/179-145 from Huntingdon Research Centre Ltd, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- 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.
- LANGSTON, J.W., IRWIN, I. & RICUARTE, G.A. (1987). Neurotoxins, parkinsonism and Parkinson´s disease. *Pharmacology and Therapeutics* 32(1): 19-49.
- 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.
- 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.
- LEWIS, D.K. (1971). Fate of [¹⁴C]-BTS 27419 applied to rats as a single oral dose. Unpublished report No. C 71011 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- LIGGETT, M.P. & SMITH, P.A. (1987). Technical amitraz: Irritant effects on rabbit skin. Unpublished report No. TOX/87/179-137 from Huntingdon Research Centre, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- LINGREN, P.D., WOLFENBARGER, D.A., NOSKY, J.B. & DIAZ, M.(1972). Response of *Campoletis perdinctus* and *Apanteles marginiventris* to insecticides. *Journal of Economic Entomology* 65(5): 1295-1299.
- LOTHARIUS, J. & O'MALLEY, K.L. (2000). The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity. *Journal of Biological Chemistry* 275(49): 38581-38588.
- 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.
- MANTLE, T.J., GARRETT, N.J. & TIPTON, K.F. (1976). The development of monoamine oxidase in rat liver and brain. *FEBS Letters* 64(1): 227-230.
- MARKOV, D. & GOLDMAN, M. (2006). Normal sleep and circadian rhythms: neurobiologic mechanisms underlying sleep and wakefulness. *Psychiatric Clinics of North America* 29(4):841-853.
- MARTIKAINEN, I.K., HIRVONEN, J., KAJANDER, J., HAGELBERG, N., MANSIKKA, H., NÅGREN, K., HIETALA, J. & PERTOVAARA, A. (2007). Correlation of human cold pressor pain responses with 5-HT(1A) receptor binding in the brain. *Brain Research* 1172: 21-31.
- MASON, S.T. (Ed) (1984). *Catecholamines and Behavior*. Editorial Cambridge University Press. London.

- MAY, M. (2000). Disturbing behavior: neurotoxic effects in children. *Environmental Health Perspectives* 108(6): 262-267.
- McGREGOR, D.B. & PRINTICE, R.D. (1983). Technical amitraz: Ames bacterial mutagenicity test. Unpublished report No. 2590 from Inveresk Research International, Musselburgh, Scotland. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- McGREGOR, D.B. & RIACH, C.G. (1983a). Technical amitraz: Mouse lymphoma mutation assay. Unpublished report No. 2669 from Inveresk Research International, Musselburgh, Scotland. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- McGREGOR, D.B. & RIACH, C.G. (1983b). Technical amitraz: Unscheduled DNA synthesis in human embryonic cells. Unpublished report No. 2634 from Inveresk Research International, Musselburgh, Scotland. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- McGREGOR, D.B. & RIACH, C.G. (1984). Technical amitraz: Mouse lymphoma mutation assay. Unpublished report No. TOX/84/179-97 from FBC Ltd, Chesterford Park Research Station, Saffron Walden, Essex, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- McGREGOR, D.B., BROWN, A.G. & RIACH, C.G. (1984). Technical BTS24868. Induction of cell transformation in C3H10T1/2 cells. Unpublished report No. TOX/84/179-97 from FBC Ltd, Chesterford Park Research Station, Saffron Walden, Essex, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- McINTYRE, M. (1987a). Technical amitraz: Teratogenicity study in the rat. Unpublished report No. 5562-194/11 from Hazleton UK, Harrogate, North Yorkshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- McINTYRE, M. (1987b). Technical amitraz: Teratogenicity study in the rabbit. Unpublished report No. 5536-194/13 from Hazleton UK, Harrogate, North Yorkshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- 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.
- MEDLEAU, L. & WILLEMSE, T. (1995a). Efficacy of daily amitraz therapy for refractory, generalised demodicosis in dogs: Two independent studies. *Journal of the American Animal Hospital Association* 31: 246-249.
- MEDLEAU, L. & WILLEMSE, T. (1995b). Efficacy of daily amitraz on generalised demodicosis in dogs. *Journal of Small Animal Practice* 36: 3-6.
- MEFFORD, I.N. & BARCHAS, J.D. (1980). Determination of tryptophan and metabolites in rat brain and pineal tissue by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography* 181: 187-193.
- MELAMED, E., ROSENTHAL, J. & YOUDIM, M.B. (1990). Immunity of fetal mice to prenatal administration of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Journal of Neurochemistry* 55(4): 1427-1431.

- MELTZER, H.Y. & MAES, M. (1995). Effects of ipsapirone on plasma cortisol and body temperature in major depression. *Biological Psychiatry* 38(7): 450-457
- MERRYMAN, D.C. & SUTTON, M.M. (1972). Effects on the oestrus cycle of the rat. Unpublished report No. PM 72003 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- MICHAUD, R.L., BANNON, M.J. & ROTH, R.H. (1981). The use of C₈-octyl columns for the analysis of catecholamines by ion-pair reversed-phase liquid chromatography with amperometric detection. *Journal of Chromatography* 225: 335-345.
- MILLER, G.W., KIRBY, M.L., LEVEY, A.I. & BLOOMQUIST, J.R. (1999). Heptachlor alters expression and function of dopamine transporters. *Neurotoxicology* 20: 631-637.
- MONTI, J.M. & JANTOS, H. (2006). Effects of the 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 microinjected into the dorsal raphe nucleus on REM sleep in the rat. *Behavioural Brain Research* 167(2): 245-250.
- MORGAN, H.E., PATTON, D.S.G. & TURNBULL, G.J. (1973). BTS 27 419: Two-year oral toxicity study in dogs. Unpublished report No. TX 73035 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- MORGAN, H.E., SHEPHERD, G.M. & TURNBULL, G.J. (1974). BTS 28 369: 90-day oral toxicity study in dogs. Unpublished report No. TX 74037 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- MORGAN, H.E. & WILLIAMS, G.A.H. (1974). BTS-27271: Acute oral toxicity study in dogs-Histopathology. Unpublished report No. TX 73030 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- 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.
- MOSER, V.C. (1991). Investigations of amitraz neurotoxicity in rats. IV. Assessment of toxicity syndrome using a functional observational battery. *Fundamental and Applied Toxicology* 17(1): 7-16.
- MULLER, G.H. (1983). Amitraz treatment of demodicosis. *Journal American Animal Hospital Association* 16: 435-441.
- MULLER, C.P. & HUSTON, J.P. (2006). Determining the region-specific contributions of 5-HT receptors to the psychostimulant effects of cocaine. *Trends in Pharmacological Sciences* 27(2): 105-112.

- MÜLLER, T.H. & UNSICKER, K. (1981). High-performance liquid chromatography with electrochemical detection as a highly efficient tool for studying catecholaminergic systems. I. Quantification of noradrenaline, adrenaline and dopamine in cultured adrenal medullary cells. *Journal of Neuroscience Methods* 4: 39-52.
- MURAI, S., SAITO, H., MASUDA, Y. & ITOH, T. (1988). Rapid determination of norepinephrine, dopamine, serotonin, their precursor amino acids, and related metabolites in discrete brain areas of mice within ten minutes by HPLC with electrochemical detection. *Journal of Neurochemistry* 50: 473-479.
- 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.
- 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.
- 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.
- NISHIKAWA, T. & SCATTON, B. (1985). Inhibitory influence of GABA on central serotonergic transmission. Raphe nuclei as the neuroanatomical site of GABAergic inhibition of cerebral serotonergic neurons. *Brain Research* 331(1): 91-103.
- OBERLANDER, T.F., REEBYE, P., MISRI, S., PAPSDORF, M., KIM, J. & GRUNAU, R.E. (2007). Externalizing and attentional behaviors in children of depressed mothers treated with a selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant during pregnancy. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine* 161(1): 22-9.
- 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.

- ORELAND, L. (1979). The activity of human brain and thombocyte monoamino oxidase (MAO) in relation to various psychiatric disorders. I. MAO activity in some disease states. In: *Monoamine Oxidase: Structure, Function and Altered functions*. Singer, T.P., Von Korff, R.W. & Murphy, D.L. (Eds), Academic Press, New York, pp. 379-387.
- ORELAND, L., FOWLER, C.J., CARLSSON, A. & MAGNUSSON, T. (1980). Monoamine oxidase -A and -B activity in the rat brain after hemitranssection. *Life Science* 26(2): 139-146.
- ORELAND, L., ARAI, Y., STENSTRÖM, A. & FOWLER, C.J. (1983). Monoamine oxidase activity and localisation in the brain and the activity in relation to psychiatric disorders. *Modern Problems of Pharmacopsychiatry* 19:246-254.
- ORELAND, L. & SHASKAN, E.G. (1983). Monoamine oxidase activity as a biological marker. *Trends in Pharmacological Sciences* 4: 339-341
- 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.
- PALMER A.K. & JAMES, P.A. (1977a). Dominant lethal assay of amitraz in the female mouse. Unpublished report No. BTS 81/7758 from Huntingdon Research Centre, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- PALMER A.K. & JAMES, P.A. (1977b). Dominant lethal assay of amitraz in the male mouse. Unpublished report No. BTS 80/7792 from Huntingdon Research Centre, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- PANG, K. & ROSE, G.M. (1986). Differential effects of norepinephrine on hippocampal neurons. *Society for Neuroscience Abstracts* 12: 1391.
- 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. 4th Edition, Academic Press, California.
- PASS, M.A. & SEAWRIGHT, A.A. (1982). Effect of amitraz on contractions of the guinea-pig ileum in vitro. *Biochemical Physiology* 73C: 419-422.
- PASS, M.A. & MOGG, T.D. (1991). Effect of amitraz and its metabolites on intestinal motility. *Biochemical Physiology* 99C(1/2): 169-172.
- PASS, M.A. & MOGG, T.D. (1995). Pharmacokinetics and metabolism of amitraz in ponies and sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 18: 210-215.

- PATTON, D.S.G & SUTTON, M.M. (1971). Acute toxicity studies on BTS 27 419, an acaricide. Unpublished report No. P71544 from The Boots Pure Drug Company, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- PATTON, D.S.G. & WILLIAMS, G.A.H. (1971). BTS 27 419: 90-day toxicity study in dogs. Unpublished report No. P71547 from The Boots Pure Drug Company, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- PATTON, D.S.G. (1973). BTS 27419: Acute toxicity in baboons. Unpublished report No. TX 73002 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- PEI, Q., ZETTERSTRÖM, T. & FILLENZ, M. (1989). Both systemic and local administration of benzodiazepine agonists inhibit the *in vivo* release of 5-HT from ventral hippocampus. *Neuropharmacology* 28: 1061-1066.
- PENDLETON, R.G., RASHEED, A., ROYCHOWDHURY, R. & HILLMAN, R. (1998). A new role for catecholamines: ontogenesis. *Trends in Pharmacological Sciences* 19(7): 248-251.
- PETZOLD, G.L., SWENBERG, J.A. & BEDELL, M. (1977). Evaluation of amitraz (U-36,059) and its metabolites (U-40,481, U-36,893, U-54,915A and U-54,914) in the DNA damage/alkaline elution assay. Unpublished report No. 7268/77/7268/001 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- 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.
- PHILLIPS, M.W.A., SWALWELL, L.M. & NEEDHAM, D. (1987). Identification of metabolites of amitraz in the milk and meat of a cow dosed for 4 days with amitraz. Unpublished report No. Envir/87/46 from Schering Agrochemicals Ltd, Chesterford Park Research Station, Saffron Walden, Essex, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- PIERPOINT, A.C., HAPEMAN, C.J. & TORRENTS, A. (1997). Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1937-1939.
- PILEBLAD, E. & CARLSSON, A. (1985). Catecholamine-uptake inhibitors prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain. *Neuropharmacology* 24(7): 689-692.
- PRADO-ALCALA, R.A., SOLANA-FIGUEROA, R., GALINDO, L.E., MEDINA, A.C. & QUIRARTE, G.L. (2003). Blockade of striatal 5-HT₂ receptors produces retrograde amnesia in rats. *Life Science* 74: 481-488.
- 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.

- PRIYADARSHI, A., KHUDER, S.A., SCHAUB, E.A. & SHRIVASTAVA, S. (2000). A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology* 21(4): 435-440.
- PRONCZUK, J., HEUHS, L., SCAIOLA, G., BOGDAN, M. & FOGEL DE KORC, E. (1995). Clinical cholinergic presentation of acute amitraz poisoning. Report No. T368 from Departamet of Toxicology, Hospital de clinicas, Montevideo, Uruguay. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- PROUDFOOT, A.T. (2003). Poisoning with amitraz. *Toxicological Reviews* 22(2):71-74.
- 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.
- QUEIROZ-NETO, A., JUANG, S.J., SOUZA, K.R. & AKAMATSU, A. (1994). Antinocioceptive effect of amitraz in mice and rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27: 1407-1411.
- QUEIROZ-NETO, A., ZAMUR, G., GONÇALVES, S.C., CARREGARO, A.B., MATAQUEIRO, M.I., HARKINS, J.D. & TOBIN, T. (1997). Characterization of the antinocioceptive and sedative effect of amitraz in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 21(5): 400-405.
- 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.
- RACINE, R. & COSCINA, D.V. (1979). Effects of midbrain raphe lesions or p-chlorophenylalanine on the development of kindled seizures in rats. *Brain Research Bulletin* 4(1): 1-7.
- 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.
- RICHOLD, M., JONES, E. & FENNER, L.A. (1983a). Technical BTS 27271, Ames bacterial mutagenicity test. Unpublished report No. FSB 61A/83580 from Huntingdon Research Centre plc, Huntindon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.

- RICHOLD, M., JONES, E. & FENNER, L.A. (1983b). Technical BTS 27919, Ames bacterial mutagenicity test. Unpublished report No. FSB 61B/83581 from Huntingdon Research Centre plc, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- 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.
- RIEDERER, P., SOFIC, E., KONRADI, C., KORNHUBER, J., BECKMANN, H., DIETL, M., MOLL, G. & HERBENSTREIT, G. (1989). The role of dopamine in control of neurobiological functions. In: *Basic and Clinical Aspects of Neuroscience. The Role of Brain Dopamine*. Fluckiger, E., Muller, E.E. & Thorner, M.O. (Eds), Springer, Berlin, pp. 1-17.
- ROBERTS, M.C. & SEAWRIGHT, A.A. (1979). Amitraz induced large intestinal impaction in the horse. *Australian Veterinary Journal* 55: 553-554.
- ROBINSON, C.P. & BITTLE, I.(1979). Vascular effects of demethylchlordimeform, a metabolite of chlordimeform. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 11(1): 55-46.
- ROBINSON, C.P. (1979). Effects of U-40481 and formetanate on the isolated rabbit central ear artery. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 12(2): 109-116.
- ROBINSON, T.N., DE SOUZA, R.J., CROSS, A.J. & GREEN, A.R. (1989). The mechanism of tetrahydroaminoacridine-evoked release of endogenous 5-hydroxytryptamine and dopamine from the rat brain tissue prisms. *British Journal of Pharmacology* 98: 1127-1136.
- ROLLS, E.T. (1994). Neurophysiology and cognitive functions of the striatum. *Revue Neurologique* 150(8-9):648-660.
- ROS, J.J.W. & VAN AKEN, J. (1994). Poisoning with amitraz, an agricultural anti-ectoparasitic agent. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde* 138(15): 776-778.
- RUEDIGER, T. & BOLZ, J. (2007). Neurotransmitters and the development of neuronal circuits. *Advances in experimental Medicine and Biology* 621:104-15.
- SÁNCHEZ-RAMOS, J. (1993). Toxin-induced Parkinsonism. In: *Parkinsonian Syndromes*. Stern, M.B. & Koller, W.C. (Eds), Marcel Dekker, New York, pp. 155-172.
- SÁNCHEZ-RAMOS, J., FACCA, A., BASIT, A. & SONG, S. (1998). Toxicity of dieldrin for dopaminergic neurons in mesencephalic cultures. *Experimental Toxicology* 150(2): 263-271.
- SANGER, D.J., SOUBRANE, C. & SCATTON, B. (2007). New perspectives for the treatment of disorders of sleep and arousal. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 65(4): 268-274.
- SAURA, J., KETTLER, R., DA PRADA, M. & RICHARDS, J.G. (1992). Quantitative enzyme radioautography with ³H-Ro 41-1049 and ³H-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.

- SCATTON, B., SERRANO, A., RIVOT, J.P. & NISHIKAWA, T. (1984). GABAergic inhibitory influence on striatal serotonergic transmission exerted in the dorsal raphe as revealed by *in vivo* voltammetry. *Brain Research* 305(2): 343-352.
- SCHOLES, K.E., HARRISON, B.J., O'NEILL, B.V., LEUNG, S., CROFT, R.J., PIPINGAS, A., PHAN, K.L. & NATHAN, P.J. (2007) Acute serotonin and dopamine depletion improves attentional control: findings from the stroop task. *Neuropsychopharmacology* 32(7): 1600–1610.
- SCHNEIDER, J.S. & ROTHBLAT, D.S. (1991). Neurochemical evaluation of the striatum in symptomatic and recovered MPTP-treated cats. *Neuroscience* 44(2): 421-429
- SEAMANS, J.K. & YANG, C.R. (2004). The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Progress in Neurobiology* 74: 1–58.
- SEMCHUK, K.M., LOVE, E.J. & LEE, R.G. (1993). Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology* 43(6): 1173-1180.
- 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.
- SHARMA, R.P., WINN, D.S. & LOW, J.B. (1976). Toxic, neurochemical and behavioral effects of dieldrin exposure in mallard ducks. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 5(1): 43-53.
- SHAW, J.W. (1971). BTS 27419 - Acute intraperitoneal toxicity to rats. Unpublished re No. PM 71057 from The Boots Pure Drug Company, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SHAW, J.W. (1973a). BTS 27419: Comparison of the acute oral and intraperitoneal toxicities to rats. Unpublished report No. TXM 73006 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SHAW, J.W. (1973b). BTS 27419: Comparison of the acute oral toxicities to rats of BTS 27 419 and BTS 27 919. Unpublished report No. TXM 73010 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SHAW, J.W. & WILLIAMS, P.A. (1973a). BTS 27419 metabolite, BTS 28369 acute oral toxicity to mice. Unpublished report No. TXM 73 036 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SHAW, J.W. & WILLIAMS, P.A. (1973b). BTS 27419 metabolite, BTS 28369 acute oral toxicity to rats. Unpublished report No. TXM 73 037 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SHAW, J.W. (1975). BTS 27419 metabolite: 21 Day chronic oral toxicity in rats of BTS-28369. TX 75 058 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SHAW, J.W. & WILLIAMS, P.A. (1975). BTS 27419 metabolite: 90 day chronic oral toxicity in rats of BTS-27271. Unpublished report No. TX 75 059 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.

- SHIPSTONE, M. (2000). Generalised demodicosis in dogs, clinical perspective. *Australian Veterinary Journal* 78(4): 240-242.
- SHIN, D. & HSU, W.H. (1994). Influence of formamidine pesticide amitraz and its metabolites on porcine myometrial contractility: involvement of alpha-2- adrenoceptors and Ca²⁺ Channels. *Toxicology and Applied Pharmacology* 128: 45-49.
- SLIKKER, W. & SCHWETZ, B.A. (2003). Childhood Obesity: The Possible Role of Maternal Smoking and Impact on Public Health. *Journal of Children's Health* 1(1): 29-40.
- 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.
- SOMERVILLE, E.M., HORWOOD, J.M., LEE, M.D., KENNETT, G.A. & CLIFTON, P.G. (2007). 5-HT_{2C} receptor activation inhibits appetitive and consummatory components of feeding and increases brain c-fos immunoreactivity in mice. *European Journal of Neuroscience* 25(10): 3115-3124.
- SOUBRIÉ, P., MONTASTRUC, J.L., BOURGOIN, S., REISINE, T., ARTAUD, F. & GLOWINKSKI, J. (1981). *In vivo* evidence for GABAergic control of serotonin release in the cat substantia nigra. *European Journal of Pharmacology* 69(4): 483-488.
- 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.
- STEIN, D.J., HOLLANDER, E. & LIEBOWITZ, M.R. (1993). Neurobiology of impulsivity and the impulse control disorders. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 5(1): 9-17.
- STOKES, A.H., HASTINGS, T.G. & VRANA, K.E. (1999). Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *Journal of Neuroscience Research* 55(6): 659-665.
- STOKES, A.H., LEWIS, D.Y., LASH, L.H., JEROME, W.G., GRANT, K.W., ASCHNER, M. & VRANA, K.E. (2000). Dopamine toxicity in neuroblastoma cells: rolls of glutathione depletion by L-BSO and apoptosis. *Brain Research* 858(1): 1-8.
- STONE, B.F., ATKINSON, P.W. & KNOWLES, C.O. (1974) Formamidine structure and deattachment of the cattle tick *Bhoophilus microplus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 4: 407.

- STUDENT, A.K. & EDWARDS, D.J. (1977). Subcellular localization of types A and B monoamine oxidase in rat brain. *Biochemical Pharmacology* 26(24): 2337-2342.
- SUNDSTRÖM, E. & JONSSON, G. (1985). Pharmacological interference with the neurotoxic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in the mouse. *European Journal of Pharmacology* 110(3): 293-299.
- SUÑOL, C., TUSELL, J.M., GELPÍ, E. & RODRÍGUEZ-FARRÉ, E. (1988a). Regional concentrations of GABA, serotonin and noradrenaline in brain at onset of seizures induced by lindane (γ -hexachlorocyclohexane). *Neuropharmacology* 27: 677-681.
- SUÑOL, C., TUSELL, J.M., GELPÍ, E. & RODRÍGUEZ-FARRÉ, E. (1988b). Convulsant effect of lindane and regional brain concentration of GABA and dopamine. *Toxicology* 49: 247-252.
- SUTTON, M.M. (1970a). RD27,271. Acute oral toxicity to mice. Unpublished report No. PM 70 043 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SUTTON, M.M. (1970b). RD27,271. Acute oral toxicity to rats. Unpublished report No. PM 70 042 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SUTTON, M.M. (1973a). BTS 27 419: Three week dermal toxicity to rabbits. Unpublished report No. TX 73 026 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SUTTON, M.M. (1973b). BTS 27 419: Multigeneration feeding test in rats. Unpublished report No. TX 73 036 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SUTTON, M.M. (1973c). BTS 27 419: Teratogenicity in the rat. Unpublished report No. TX 73028 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SUTTON, M.M. (1973d). BTS 27 419: Teratogenicity in the rabbit. Unpublished report No. TX 73029 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SUTTON, M.M. & OFFER, J. (1973). BTS 27 419: Carcinogenicity and long-term toxicity study in rats. Unpublished report No. TX 73043 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SUTTON, M.M. & WILLIAMS, G.A.H. (1971). BTS 27 419: 90-day toxicity study in rats. Unpublished report No. P71548 from The Boots Pure Drug Company, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SUTTON, M.M. & WILLIAMS, P.A. (1972). BTS 27 419: Acute dermal toxicity to rabbits. Unpublished report No. YM 72 011 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- SUZUKI, K. & MARTIN, P.M. (1994). Neurotoxicants and Developing Brain In: *Developmental Neurotoxicology*. Harry, G.J. (Ed), Boca Raton, CRC Press, pp. 9-32.

- TANNER, C.M. & LANGSTON, J.W. (1990). Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review. *Neurology* 40(Suppl.3): 17-31.
- TERASAKA, H., TAMURA, A., TAKAYAMA, F., KASHIMATA, M., OHTOMO, K., MACHINO, M., FUJISAWA, S., TOGUCHI, M., KANDA, Y., KUNII, S., KUSAMA, K., ISHINO, A., WATANABE, S., SATOH, K., TAKANO, H., TAKAHAMA, M. & SAKAGAMI, H. (2000). Induction of apoptosis by dopamine in human oral tumor cell lines. *Anticancer Research* 20(1A): 243-250.
- TETRUD, J. W. & LANGSTON, J.W. (1989). The effect of deprenyl (selegiline) on the natural history of Parkinson's disease. *Science* 245: 519-522.
- THOMAS, D.R., MELOTTO, S., MASSAGRANDE, M., GRIBBLE, A.D., JEFFREY, P., STEVENS, A.J., DEEKS, N.J., EDDERSHAW, P.J., FENWICK, S.H., RILEY, G., STEAN, T., SCOTT, C.M., HILL, M.J., MIDDLEMISS, D.N., HAGAN, J.J., PRICE, G.W. & FORBES, I.T. (2003). SB-656104-A, a novel selective 5-HT7 receptor antagonist, modulates REM sleep in rats. *British Journal of Pharmacology* 139(4):705-714.
- THOMAS, D.R. & HAGAN, J.J. (2004). 5-HT7 receptors. *Current Drug Targets. CNS and Neurological Disorders* 3(1): 81-90.
- 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.
- TOSCHKE, A.M., KOLETZKO, B., SLIKKER, W., HERMANN, M. & VON KRIES R. (2002). Childhood obesity is associated with maternal smoking in pregnancy. *European Journal of Pediatrics* 161(8): 445-448.
- TURNBULL, G.J. (1983). Animal studies on the treatment of poisoning by amitraz (a formamidine pesticide) and xylene. *Human Toxicology* 2(4): 579-586.
- ULUKAYA, S., DEMIRAG, K. & MORAL, A.R. (2001). Acute amitraz intoxication in human. *European Journal of Intensive Care Medicine* 27(5): 930-933.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1996). *Amitraz Reregistration Eligibility Decision (RED), Case 0234. (EPA-738-F-96-031)*, US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticide and Toxic Substances, Washington, DC .
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (2006). Report of the Food Quality Protection Act (FQPA) Tolerance Reassessment Progress and Risk Management Decision (TRED) for Amitraz. US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.

- VERBIESE-GENARD, N., HANOCQ, M., ALVOET, C. & MOLLE, L. (1983). Degradation study of catecholamines, indole amines and some of their metabolites in different extraction media by chromatography and electrochemical detection. *Analytical Biochemistry* 134(1): 170-175.
- VERNEY, C., LEBRAND, C. & GASPAR, 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.
- VIVEROS, M.P., DE CABO, C., COLADO, M.I. & MARTÍN, M.I. (1995). Naltrexone administration during the preweaning period affects striatal and hypothalamic serotonergic systems, but not midbrain serotonergic or striatal dopaminergic systems in the adult rat. *Neuroscience Letters* 201: 195-198.
- VON KRIES, R., TOSCHKE, A.M., KOLETZKO, B. & SLIKKER, W. (2002). Maternal smoking during pregnancy and childhood obesity. *American Journal of Epidemiology* 156(10): 954-961.
- WADA, Y., SHIRAIISHI, J., NAKAMURA, M. & KOSHINO, Y. (1997). Role of serotonin receptor subtypes in the development of amygdaloid kindling in rats. *Brain Research* 747(2): 338-342.
- WAGNER, S.R. & GREENE, F.E. (1978). Dieldrin-induced alterations in biogenic amine content of rat brain. *Toxicology and Applied Pharmacology* 43(1): 45-55.
- WAGNER, J., VITALI, P., PALFREYMAN, M.G., ZRAIKA, M. & HUOT, S. (1982). Simultaneous determination of 3,4-dihydroxyphenylalanine, 5-hydroxytryptophan, dopamine, 4-hydroxy-3-methoxyphenylalanine, norepinephrine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, serotonin, and 5-hydroxyindolacetic acid in rat cerebrospinal fluid and brain by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Neurochemistry* 38(5): 1241-1254.
- WAGNER, J.R., TRUONG, D.D. & KANTHASAMY, A.G. (1999). Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) induced dopaminergic toxicity in PC12 cells. *Toxicological Sciences* 42: 192.
- WANG, C.M. NARAHASHI, T. & FUKAMI, J. (1975). Mechanism of neuromuscular block by chlordimeform. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 5(2): 119-125.
- WARSH, J.J., CHIU, A., LI, P.P. & GODSE, D.D. (1980). Comparison of liquid chromatography-electrochemical and gas chromatography-mass spectrometry methods for brain dopamine and serotonin. *Journal of Chromatography* 183(4): 483-486.
- WEIGHTON, D.M., KERRY, J.C., McCARTHY, J.T. & PRICE, G.N. (1973). Amitraz- a novel acaricide with selective insecticidal properties. *Proceedings 7th British Insecticide and Fungicide Conference., British Crop Protection Council* 2: 703.
- WESTIGARD, P.H., MEDINGER, L.E. & KELLOGG, O.E. (1972). Field evaluation of pesticides for their suitability in an integrated program for spider mites on pear. *Journal of Economic Entomology* 65 (1): 191-192.

- WEYLER, W., HSU, Y.P. & BREAKFIELD, X.O. (1990). Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacology and Therapeutics* 47(3): 391-417.
- WILCOX, P. (1976). BTS 27 419: Mutagenicity study in the intraperitoneal host-mediated assay. Unpublished report No. TX 76028 from The Boots Company Ltd, Nottingham, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.
- WILLIAMS, G.V. & CASTNER, S.A. (2006). Under the curve: critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory. *Neuroscience* 139: 263–276.
- 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.
- 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.
- YAN, Q.S., JOBE, P.C. & DAILEY, J.W. (1995). Further evidence of anticonvulsant role for 5-hydroxytryptamine in genetically epilepsy-prone rats. *British Journal of Pharmacology* 115(7): 1314-1318.
- 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.
- YARAMIS, A., SOKER, M. & BILICI, M. (2000). Amitraz poisoning in children. *Human and Experimental Toxicology*. 19(8): 431-433.
- YAU, J.L.W., NOBLE, J. & SECKL, J.R. (2001). Acute restraint stress increases 5-HT7 receptor mRNA expression in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 309(3): 141–144.
- YILMAZ, H.L. & YILDAS, D.R. (2003). Amitraz poisoning, an emerging problem: epidemiology, clinical features, management, and preventive strategies. *Archives of Disease in Childhood* 88(2): 130-134.
- 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.
- YOKOYAMA, F., ONOZAWA, K., KAKUI, N. & IMANISHI, T. (2007). The selective serotonin reuptake inhibitor fluvoxamine suppresses post-feeding hyperactivity induced by food restriction in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 87(1): 98–103.
- YOUNG, F. M., MENADUE, M.F. & LAVRANOS, T.C. (2005). Effects of the insecticide amitraz, an alpha2- adrenergic receptor agonist, on human luteinized granulosa cells. *Human Reproduction* 20(11): 3018-3025.