

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Efectos neurotóxicos del amitraz sobre la transmisión
gabaérgica y monoaminérgica en el sistema nervioso central
de rata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Matilde Ruiz Fernández

Directores

Javier del Pino Sans
María José Anadón Baselga
Paula Moyano-Cires Ivanoff

Madrid

© Matilde Ruiz Fernández, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**EFFECTOS NEUROTÓXICOS DEL AMITRAZ SOBRE LA
TRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y MONOAMINÉRGICA EN EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Matilde Ruiz Fernández

DIRECTOR

Javier Del Pino Sans, María José Anadón Baselga, Paula Viviana Moyano-Cires Ivanoff

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa De Doctorado En Investigación En Ciencias

Médico-Quirúrgicas

Departamento De Medicina Legal, Psiquiatría y Patología



**EFFECTOS NEUROTÓXICOS DEL AMITRAZ SOBRE LA
TRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y MONOAMINÉRGICA EN
EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA.**

MATILDE RUIZ FERNÁNDEZ

Madrid, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa De Doctorado En Investigación En Ciencias Médico-Quirúrgicas

Departamento De Medicina Legal, Psiquiatría y Patología



**EFFECTOS NEUROTÓXICOS DEL AMITRAZ SOBRE LA
TRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y MONOAMINÉRGICA EN EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA.**

MATILDE RUIZ FERNÁNDEZ

Javier del Pino Sans, María José Anadón Baselga, Paula Moyano-Cires Ivanoff

Madrid, 2020

Dña. MARIA JOSE ANADON BASELGA, Profesora Titular del Departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Patología de la Facultad de Medicina, **D. JAVIER DEL PINO SANS** Profesor Contratado Doctor del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina y **Dña. PAULA MOYANO-CIRES IVANOFF** Investigador del Grupo de Investigación ECOBIOTOX de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN: Que Dña. MATILDE RUIZ FERNÁNDEZ ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado: “EFECTOS NEUROTÓXICOS DEL AMITRAZ SOBRE LA TRANSMISIÓN GABAÉRGICA Y MONOAMINÉRGICA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA”, el cual consideramos que reúne las condiciones y la calidad científica deseadas para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste se expide el presente certificado en Madrid, a de de dos mil veinte.

La Directora

El Director

La Directora

Fdo: M^a José Anadón Baselga Fdo: Javier del Pino Sans Fdo: Paula Moyano-Cires Ivanoff

Deseo expresar mi agradecimiento:

- A la Prof. Dra. María José Anadón Baselga, por la dirección de esta Memoria y por todas las enseñanzas y el apoyo recibido a lo largo de este periodo 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. Javier del Pino Sans, por la dirección de esta Memoria y por todas las enseñanzas y el apoyo recibido a lo largo de este periodo de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.

- A la Inv. Dra. Paula Moyano-Ciress Ivanoff, por la dirección de esta Memoria y por todas las enseñanzas y el apoyo recibido a lo largo de este periodo de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.

- A mis padres, un ejemplo en la vida, que nos dieron tanto a mis hermanos como a mí lo mejor de sí mismos y quienes siempre me animaron a perseverar e inculcaron en mí el amor al estudio y, también, por todos los sabios consejos que, en su momento, no supe apreciar.

- A mi madre porque, con su amor incondicional de madre, siempre se sacrificó por nosotros e intentó evitarnos todas las penas.

- A mi padre, autodidacta, que siempre creyó en mí e insistió en que hiciera el doctorado.

- A mi tía, mis hermanos y mi cuñado por su apoyo y ayuda durante toda esta etapa académica y por estar siempre a mi lado cada vez que los necesito.

- A mis sobrinos, de quienes tanto aprendo y que siempre logran sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles, aún sin saberlo.

- A mi amiga Loli por sus sinceros y desprendidos consejos.

- A mi amiga Dolores, ejemplo de superación y optimismo en los momentos más duros.

- A Cristina, por seguir siendo incondicional a través de los años.

- A Javier, Carlos, Cristina, María y Paula por hacer de este, un mundo mejor.

- A mi amiga Estefanía por su apoyo durante esta etapa de mi vida académica.

LISTADO DE ACRÓNIMOS EMPLEADOS EN ESTA TESIS

- ac- Aceite de cacahuete
- AC- Adenilato ciclasa
- Ach- Acetilcolina
- AchE- Acetilcolinesterasa
- ACTB- Gen de la beta actina
- AD- Aldehído deshidrogenasa
- ADN- Ácido desoxirribonucleico
- Am- Aceite de maíz
- ARN- Ácido ribonucleico
- ARO- Aromatasa
- β AR- Receptor adrenérgico beta
- BuChE- Butirilcolinesterasa
- CAS- Chemical Abstracts Service
- ChAT- Colina acetiltransferasa (acetiltransferasa de colina)
- CHT- Transportador de colina de alta afinidad
- 5HT- Serotonina (5-hidroxitriptamina)
- CI50- Concentración Inhibitoria 50
- CL50- Concentración Letal 50
- COMT- Catecol-O-metiltransferasa
- COP- Contaminantes orgánicos persistentes
- CPF- Clorpirifos
- CREB- Elemento de respuesta a AMPc
- DA- Dopamina
- BDH- Dopamina- β -hidroxilasa

- DE50- Dosis Eficaz 50
- DG- Día Gestacional
- DHT- Dihidrotestosterona
- DL50- Dosis Letal 50
- DMT- Dosis Máxima Tolerada
- DPGME- Dipropilenglicol metil éter
- DPN- Día Postnatal
- DRG- Ganglios de la raíz dorsal
- EA- Enfermedad de Alzheimer
- E2- 17 β -estradiol
- EFSA- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
- EPA- Environmental Protection Agency
- ERO- Especies reactivas de oxígeno
- FCF- Factor de crecimiento de fibroblastos
- FFDCa- Federal Food, Drug, and Cosmetic Act
- FIFRA- Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act
- FQPA- Food Quality Protection Act
- GABA- Ácido γ -amino butírico
- GABAT- 4-aminobutirato aminotransferasa
- GAD- Glutamato descarboxilasa
- GAD 65- Glutamato descarboxilasa 65
- GFAP- Proteína gliofibrilar ácida
- HC-3- Hemicolinio-3
- H₂O₂- Peróxido de Hidrógeno
- HVA- Ácido homovanílico

- IP- Inositol fosfato
- IV- Intravenoso
- JMPR- Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment
- Ki- Constante de inhibición
- LDH- Lactato deshidrogenasa
- LMR- Límite máximo de residuos
- LOAEL- Nivel más bajo con efectos adversos observables
- MAO- Monoamino oxidasa
- MAP-2- Proteína asociada a los microtúbulos
- MDA- Malondialdehído
- MTT- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- NA- Noradrenalina
- NAC- N-acetil cisteína
- NC- No Cuantificable
- ND- No Detectado
- NE- Norepinefrina (noradrenalina)
- NF68- Proteína neurofibrilar 68
- NF200- Proteína neurofibrilar 200
- NOAEL- Nivel Sin Efecto Adverso Observable
- NTE- Esterasa de Neuropatía
- OF- Órganofosforados
- ONU- Organización de las Naciones Unidas
- OPIDP- Polineuropatía retardada inducida por pesticidas organofosforados
- PBM- Proteína mielina básica

- Pc- Peso corporal
- P53- Proteína tumoral 53
- PCR- Reacción en cadena de la polimerasa
- PMSF- Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
- PON1- Paroxonaxa
- PPP- Productos de Protección de Plantas
- PRIA- Pesticide Registration Improvement Act
- QPCR- Reacción en Cadena de la Polimerasa semicuantitativa
- RM- Receptores muscarínicos
- RN- Receptores nicotínicos
- SD- Desviación Estándar
- SNC- Sistema Nervioso Central
- SNC-SNP- Sistema Nervioso Central-Sistema Nervioso Periférico
- Spp- Especies
- SSADH- Succinato-semialdehído deshidrogenasa (Semialdehído succínico deshidrogenasa)
- T- Testosterona
- TCP-3,5,6-tricloro-2-piridinol
- TH- Tirosina hidroxilasa
- TMX- Tamoxifeno
- TRH- Triptófano hidroxilasa
- UE- Unión Europea
- USEPA- United States Environmental Protection Agency
- VAcHT- Transportador de la acetilcolina vesicular

ÍNDICE

SUMARY.....	I
RESUMEN.....	II
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	32
2. INTRODUCCIÓN.....	36
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	40
3.1. Amitraz.....	42
3.2. Espectro de acción y usos.....	45
3.3. Mecanismo de acción	47
▪ Agonista de receptores alfa-adrenérgicos.	
▪ Inhibición del receptor de histamina H ₁ .	
▪ Inhibición de la prostaglandina sintetasa.	
▪ Inhibición de la monoaminoxidasa (MAO).	
▪ Inhibición de la adenilato ciclasa.	
▪ Activación del canal de iones calcio (Ca ²⁺) dependiente de voltaje.	
▪ Generación de especies reactivas de oxígeno.	
▪ Muerte celular.	
▪ Disrupción endocrina.	
3.4. Metabolismo.....	67
3.5. Toxicidad general	69
▪ Toxicidad aguda.	
▪ Toxicidad subcrónica y crónica.	
3.6. Inmunotoxicidad.....	73
3.7. Genotoxicidad	76
3.8. Carcinogénesis	80
3.9. Neurotoxicidad	82
3.10. Toxicidad reproductiva y del desarrollo.....	89
3.10.1. Toxicidad reproductiva.....	89
3.10.2. Toxicidad del desarrollo.....	94
▪ Toxicidad del desarrollo neurológico.	
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	105
4.1. Productos químicos.....	106
4.2. Cultivo primario de neuronas del hipocampo	106
4.3. Animales.....	108
4.4. Diseño experimental.....	110
▪ Análisis de la viabilidad celular.	

- Determinación de la concentración de glutamato y GABA.
- Análisis de la expresión génica.
- Análisis del contenido de estradiol y testosterona.
- Análisis de actividad de la aromatasas.
- Determinación de los niveles de neurotransmisores monoamínicos.
- Análisis de la actividad de la TH y la TRH.
- Análisis de la actividad y del contenido de la catecol-O-metiltransferasa.
- Análisis de actividad de la dopamina-β-hidroxilasa.
- Análisis estadístico.

5. RESULTADOS.....	120
5.1. Efectos tóxicos del tratamiento con amitraz.....	121
5.2. La cuantificación de estradiol y testosterona	121
5.3. Análisis de actividad de aromatasas	123
5.4. Determinación de los niveles de monoaminas	123
5.5. Análisis de actividad TH y TRH.....	129
5.6. Análisis sobre la actividad y el contenido de la catecol-O-metiltransferasa	131
5.7. Análisis de actividad de dopamina-β-hidroxilasa.....	132
5.8. Análisis de la expresión génica.....	134
5.9. Medida del contenido y de la actividad de la monoaminoxidasa.	135
5.10. Efecto del amitraz sobre la viabilidad celular	141
5.11. Determinación del contenido de glutamato y GABA	142
6. DISCUSIÓN.....	144
7. CONCLUSIONES.....	154
8. BIBLIOGRAFÍA.....	157
9. ANEXO I.....	176

SUMMARY

SUMMARY

AMITRAZ NEUROTOXIC EFFECTS ON GABAERGIC AND MONOAMINERGIC TRANSMISSION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF RATS.

INTRODUCTION

Amitraz [N-methylbis (2,4-xilyliminomethyl) amine] (Figure 1) is a formamidine pesticide that is used throughout the world as an insecticide and acaricide in both animals and crops to control pests. Amitraz is a cause of concern for health authorities due to the high number of cases of human poisoning that have been attributed to this pesticide and which continue to be described to date.

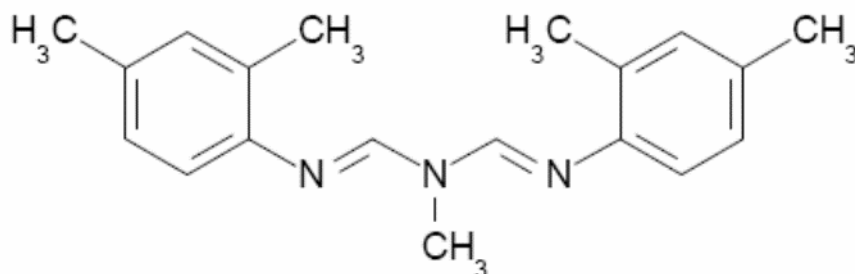


Figure 1. Amitraz Chemical structure (C₁₉H₂₃N₃).

Amitraz is a powerful neurotoxic agent that induces signs such as seizures, loss of righting reflex, motor incoordination, appetite alteration, hyperreactivity to external stimuli and aggression, among other effects. These effects can be mediated by the alteration of different neurotransmitter systems, among other mechanisms. Seizures could be induced through dysfunctions of the neurotransmitters glutamate and GABA, main regulators of

excitatory and inhibitory transmission, respectively. In addition, it has been described that amitraz is capable of inducing seizures in the hippocampus of male rats, which could be mediated through the α_2 adrenergic agonist properties of this compound. Another mechanism that could be involved is the inhibition of the histamine H₁ receptor, which has been linked to the induction of seizures.

On the other hand, it has been described that amitraz (20, 50 and 80 mg / kg of body weight) increases the levels of serotonin (5-HT), noradrenaline (NA) and dopamine (DA) and decreases its metabolites and the rate of change in the central nervous system (CNS) of male rats, the most affected regions being the striatum, the prefrontal cortex and the hippocampus. However, the mechanisms through which these alterations occur are not fully understood. In this sense, amitraz is an inhibitor of monoamine oxidase (MAO), which is the main enzyme that metabolizes monoamine neurotransmitters. Therefore, this mechanism could mediate the effects observed in monoaminergic neurotransmitters. In this sense, it has been described that amitraz at a dose of 100 mg/kg increases the levels of NA and DA in the hypothalamus and striatum, respectively, and decreases the levels of homovanillic acid (HVA) in the striatum, a through the inhibition of MAO. The alteration in the levels of NA, DA and 5-HT and their metabolites observed in male rats could also be attributed to a possible effect of amitraz on sex hormones that regulate the activity and expression of enzymes such as aldehyde dehydrogenase (AD), catechol-O-methyltransferase (COMT), dopamine- β -hydroxylase (BDH), MAO, tyrosine hydroxylase (TH) and tryptophan hydroxylase (TRH) necessary for the synthesis and metabolism of these neurotransmitters.

It has been shown that amitraz alters the hepatic metabolism of 17 β -estradiol (E2) and testosterone (T) in rats, and increases serum T in male rats at 25 and 50 mg / kg (Chou et al., 2008). The serum T when arriving at the CNS can be metabolized by aromatase (ARO) or reductase and transformed into E2 or dihydrotestosterone (DHT), respectively, in a specific manner according to the region. Therefore, the effect of amitraz on the monoaminergic neurotransmitters in male rats could be mediated through alterations in T as well as E2 or DHT.

Based on the above, we hypothesized that amitraz alters glutamatergic and GABAergic transmission in the hippocampus through the inhibition of α_2 and H₁ receptors, which could lead to the induction of seizures observed after exposure to amitraz. In addition, we hypothesized that amitraz induces an alteration of the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems that can be mediated mainly through a combination of inhibition of MAO, and/or alteration of the expression and activity of the enzymes that metabolize and synthesize these neurotransmitters through the disruption of sex hormones in male rats and which can explain the motor alterations observed after exposure to amitraz

MATERIAL AND METHODS

To test our hypothesis, we first treated with different concentrations of amitraz (0.01 μ M to 100 μ M) with or without the α_2 receptor antagonist idazoxan (1 μ M), and the H₁ agonist n-methylhistaprodiphen (30 μ M) cell cultures fetal primaries from the rat hippocampus region of 17-18 days as an in vitro model of the neuronal cells of this region, as the region mainly affected in the convulsive alterations, to show the effect of amitraz on

glutamatergic transmission and GABAergic and determine if its possible alteration occurs through the inhibition of α_2 and H₁ receptors. In particular to determine the effects of amitraz on glutamatergic/GABAergic transmission, the levels of glutamate and GABA were determined. In addition, the expression of glutaminase, 4-aminobutyrate aminotransferase (GABAT), glutamate decarboxylase 65 (GAD 65) and succinate-semialdehyde dehydrogenase (SSADH) were determined, because the neurotransmitter glutamate is synthesized mainly from glutamine by the enzyme glutaminase and the neurotransmitter GABA is synthesized by the enzyme glutamate decarboxylase (GAD), specifically by the GAD 65 isoform, which controls the availability of GABA as a transmitter. We also determined GABAT and SSADH, because the metabolism of GABA is mediated by the synchronic activity of GABAT, which converts GABA into succinic semialdehyde and SSADH, which oxidizes succinic semialdehyde to succinic acid. The induction of neuronal hyperscibility as conducive to the appearance of seizures leads to neuronal death, so we measure the effects of amitraz on neuronal viability and the involvement in this effect of the α_2 adrenergic and histamine H₁ receptors. The IC₅₀ of amitraz for the α_2 receptor is 0.1 μ M and for the H₁ receptor it is 10 μ M, so we chose the range of amitraz concentrations between 0.01 μ M and 100 μ M to test our hypothesis. The concentration selected for idazoxan is based on the pKB for the α_2 receptor (from 6 to 8) in rats. To select the concentration of n-methylhistaprodifen, we conducted a concentration-response study to determine the minimum concentration that produced the maximum reversion of the effects of amitraz.

To reach the second objective, the prefrontal cortex and the hippocampus of male rats were evaluated in the striatum, if the treatment with amitraz (20, 50 and 80 mg / kg of body weight during 5 days) inhibited MAO and/or altered the expression and activity of the other enzymes that metabolize or synthesize monoaminergic neurotransmitters by altering sex

hormones in these regions. In particular, we measured the plasma and brain levels of T and E2 and the expression of brain aromatase to determine the effects of sexual lasts. In addition, we measured the concentration of the neurotransmitters 5-HT, DA and NA and their metabolites and the involvement of the T and E2 hormones on the levels of these neurotransmitters. Finally, we measured the expression and / or the activity of MAO enzymes, COMT, BDH, TH and TRH and the involvement of hormones E2 and T in the effects of amitraz on said enzymes. Figure 2 shows the protocol and experimental design used in this investigation.

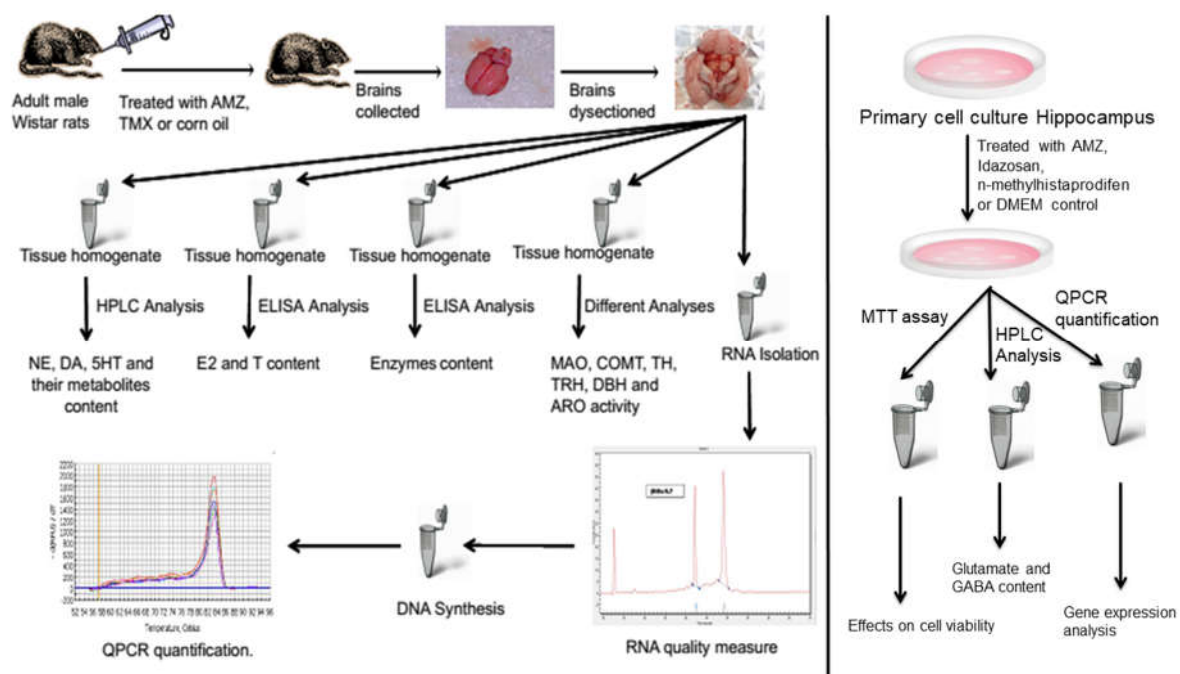


Figure 2. Summarizes the protocol and experimental design followed in this investigation

RESULTS AND DISCUSSION

The present study shows that the levels of glutamate and GABA were altered after 24 hours of exposure to amitraz from the concentration of 0.1 μ M in hippocampal neuronal primary cultures. This effect was partially mediated through the activation of the α_2 receptor and also through the inhibition of the H₁ receptor from the concentration of 10 μ M. This

effect could be due to the fact that the IC₅₀ of amitraz on the H₁ receptor is 10 μM. In addition, the reduction of GABA levels could be due to the decrease in cell viability, but as cell death was only observed at the highest concentration tested and partially reversed by simple or simultaneous co-treatment with idazoxan and n-methylhistaprodifen, this suggests that cell death was the result of neuronal hyperactivity. The alteration of the levels of glutamate and GABA induced by amitraz was mediated through the disruption of the synthesis of these neurotransmitters, by means of the alteration of the expression of GAD65 and glutaminase, although other mechanisms can not be discarded, as an alteration in the reuptake or metabolism of these neurotransmitters.

Excitatory and inhibitory neurotransmission in the CNS is mediated mainly by glutamate and GABA, respectively, and an imbalance between excitation and inhibition produced by a decrease in GABAergic transmission and/or an increase in glutamatergic transmission has been associated with the generation of seizures, so that the seizures induced by amitraz could be mediated through the alteration of said neurotransmitters although more studies are needed to confirm this effect. In addition, it has been described that agonists of α₂ adrenergic receptors and H₁ receptor blockers can alter the levels of glutamate and GABA, supporting the results observed after exposure to amitraz on these neurotransmitter systems.

On the other hand, in the present work, we demonstrate that amitraz increases, in a dose-dependent manner, the serum levels of T, as previously described in male rats, which supports our results, as well as the cerebral levels of E2 by increasing the expression and activity of the ARO enzyme in the brain regions studied.

Amitraz also altered, in a dose- and region-dependent manner, the activity and expression of TH, TRH and BDH, as well as the expression and content of MAO and COMT, which could explain, in part, the effects observed on the monoaminergic neurotransmitters in the brain regions studied. The alteration in all the enzymes and neurotransmitters studied was partially reversed in all cases by co-treatment with tamoxifen, an estrogen receptor antagonist. This suggests that amitraz alters several neurotransmitter systems, at least in part, by altering the regulation of E2 on the enzymes that synthesize and metabolize these neurotransmitters. These results are supported by previous studies that have shown that E2 regulates the activity and expression of the enzymes that synthesize and metabolize DA, NA and 5-HT among other neurotransmitters. However, we can not rule out the possibility that amitraz acts by altering the monoaminergic neurotransmitter transporters, which have also been shown to be regulated by E2.

The reversal induced by the co-treatment of amitraz with TMX on the effects produced by amitraz on these enzymes was not complete, suggesting that, in addition to the deregulation of E2, other mechanisms could be involved in these effects. It has been suggested that the α_2 -adrenergic receptor agonist action of amitraz is one of the main mechanisms of its neurotoxic effects, possibly contributing to the effects observed. It has also been described that the synthesis and reuptake of NA, DA and 5-HT in the CNS are physiologically regulated by insulin and that experimentally induced hyperglycemia, such as that induced by amitraz, produces a significant increase in catecholamine levels in different areas of the brain. Finally, it has been demonstrated that hypoinsulinemia and hyperglycemia alter the activities of COMT, BDH and TH, which could explain the observed monoaminergic dysregulation. Amitraz also alters other hormones such as prostaglandin E2 that has been shown to regulate the expression of 5-HT. In addition, the histamine H₁ receptor that

modulates the expression of TH and the synthesis of catecholamines in the brain so that their inhibition by amitraz could also contribute to the effects observed on monoaminergic neurotransmitters.

CONCLUSIONS

The present work demonstrates that amitraz deregulates the glutamatergic and GABAergic neurotransmitter systems mediated, in part, by the activation of the α_2 receptor and the inhibition of the H_1 receptor as a function of concentration, as well as the NA, 5-HT neurotransmitter systems and DA mediated, in part, through the alteration in brain levels of estradiol. The alterations induced by amitraz in these neurotransmitter systems may differ between male and female rats due to differences in sex hormones. However, as the neurotoxic effects described in adult animals after exposure to amitraz were not differentiated by sex, these effects may be similar in both sexes, but probably with different intensity. Future studies should characterize the rest of the mechanisms involved in the alteration of these neurotransmitter systems induced by amitraz, the neurotoxic effects mediated by these alterations and the possible sexual differences in these neurotoxic effects. These results are of great interest because they allow a better understanding of the mechanisms underlying the neurotoxic effects and may offer a new vision in the design of therapeutic strategies against the neurotoxic effects induced by amitraz. In addition, new molecules of the formamidine family are being developed with a therapeutic use, so it is very important to determine the mechanisms through which this compound could induce these effects.

RESUMEN

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El amitraz [N-metilbis (2,4-xililiminometil) amina] (Figura 1) es un plaguicida formamidínico que se utiliza en todo el mundo como insecticida y acaricida, tanto en animales como en cultivos, para controlar plagas. El amitraz supone un motivo de preocupación para las autoridades sanitarias debido al elevado número de casos de intoxicación humana que se han atribuido a este plaguicida y que siguen siendo descritas actualmente.

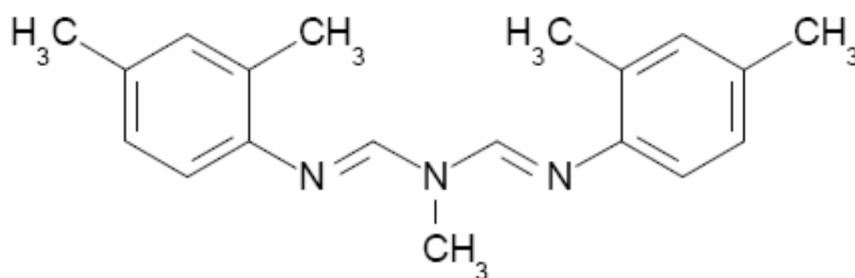


Figura 1. Estructura química del amitraz (C₁₉H₂₃N₃).

El amitraz es un potente neurotóxico que induce signos como convulsiones, pérdida del reflejo de enderezamiento, incoordinación motora, alteración del apetito, hiperreactividad a estímulos externos y agresividad, entre otros efectos. Estos efectos pueden estar mediados por la alteración de distintos sistemas de neurotransmisores, entre otros mecanismos. Las convulsiones podrían ser inducidas a través de disfunciones de los neurotransmisores glutamato y GABA, principales reguladores de la transmisión excitatoria e inhibitoria, respectivamente. Además, se ha descrito que el amitraz es capaz de inducir convulsiones en el

hipocampo de ratas macho, lo cual podría estar mediado a través de las propiedades agonistas α_2 adrenérgicas de este compuesto. Otro mecanismo que podría estar implicado es la inhibición del receptor de histamina H_1 , que se ha relacionado con la inducción de convulsiones.

Por otra parte, se ha descrito que el amitraz (20, 50 y 80 mg/kg de peso corporal) aumenta los niveles de serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y dopamina (DA) y disminuye sus metabolitos y la tasa de recambio en el sistema nervioso central (SNC) de ratas macho, siendo las regiones más afectadas el cuerpo estriado, la corteza prefrontal y el hipocampo. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales estas alteraciones ocurren no se conocen completamente. En este sentido, el amitraz es un inhibidor de la monoaminoxidasa (MAO), que es la enzima principal que metaboliza los neurotransmisores de monoamina. Por lo tanto, este mecanismo podría mediar los efectos observados en los neurotransmisores monoaminérgicos. En este sentido, se ha descrito que el amitraz a la dosis de 100 mg/kg aumenta los niveles de NA y DA en el hipotálamo y el estriado, respectivamente, y disminuye los niveles de ácido homovanílico (HVA) en el cuerpo estriado, a través de la inhibición de la MAO. La alteración en los niveles de NA, DA y 5-HT y sus metabolitos observada en ratas macho también podría atribuirse a un posible efecto del amitraz sobre las hormonas sexuales que regulan la actividad y expresión de enzimas como la aldehído deshidrogenasa (AD), la catecol-O-metiltransferasa (COMT), la dopamina- β -hidroxilasa (BDH), la MAO, la tirosina hidroxilasa (TH) y la triptófano hidroxilasa (TRH) necesarias para la síntesis y el metabolismo de estos neurotransmisores.

Se ha demostrado que el amitraz altera el metabolismo hepático del 17β -estradiol (E2) y la testosterona (T) en ratas, y aumenta la T sérica en ratas macho a 25 y 50 mg/ kg (Chou et

al. 2008). La T sérica al llegar al SNC puede ser metabolizada por la aromatasa (ARO) o por la reductasa y transformarse en E2 o dihidrotestosterona (DHT), respectivamente, de una manera específica según la región. Por lo tanto, el efecto del amitraz sobre los neurotransmisores monoaminérgicos en ratas macho podría estar mediado tanto a través de alteraciones en la T como del E2 o la DHT.

En función de todo lo expuesto, nosotros hipotetizamos que el amitraz altera la transmisión glutamatérgica y GABAérgica en el hipocampo a través de la inhibición de los receptores α_2 y H_1 , lo cual podría conducir a la inducción de las convulsiones observadas tras la exposición al amitraz. Además, hipotetizamos que el amitraz induce una alteración de los sistemas serotoninérgicos, noradrenérgicos y dopaminérgicos que puede estar mediada principalmente a través de una combinación de inhibición de la MAO y/o alteración de la expresión y la actividad de las enzimas que metabolizan y sintetizan estos neurotransmisores a través de la disrupción de las hormonas sexuales en las ratas macho, la cual puede explicar las alteraciones motoras observadas tras la exposición al amitraz.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para alcanzar estos objetivos, en primer lugar tratamos con diferentes concentraciones de amitraz (0,01 μM a 100 μM) con o sin el antagonista del receptor α_2 idazoxan (1 μM), y el agonista H_1 n-metilhistaprodifeno (30 μM) cultivos celulares primarios fetales procedentes de la región del hipocampo de ratas de 17-18 días como un modelo *in vitro* de las células neuronales de esta región, por ser la región principalmente afectada en las alteraciones convulsivas, para mostrar el efecto del amitraz sobre la transmisión glutamatérgica y GABAérgica y determinar si su posible alteración se produce a través de la inhibición de los

receptores α_2 y H_1 . En particular, para determinar los efectos del amitraz sobre la transmisión glutamatérgica/GABAérgica, se determinaron los niveles de glutamato y GABA. Además, se determinaron la expresión de la glutaminasa, la 4-aminobutirato aminotransferasa (GABAT), la glutamato descarboxilasa 65 (GAD 65) y la succinato-semialdehído deshidrogenasa (SSADH) porque el neurotransmisor glutamato se sintetiza principalmente a partir de la glutamina por la enzima glutaminasa y el neurotransmisor GABA es sintetizado por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), específicamente por la isoforma GAD 65, que controla la disponibilidad de GABA como transmisor. También determinamos la GABAT y la SSADH, debido a que el metabolismo del GABA está mediado por la actividad sincrónica de la GABAT, que convierte GABA en semialdehído succínico y de la SSADH, que oxida semialdehído succínico a ácido succínico. La inducción de hiperexcitabilidad neuronal como la conducente a la aparición de convulsiones lleva a muerte neuronal por lo que medimos los efectos del amitraz sobre la viabilidad neuronal y la implicación en este efecto de los receptores α_2 adrenérgico y H_1 de histamina. La CI_{50} del amitraz para el receptor α_2 es de 0,1 μM y para el receptor H_1 es de 10 μM , por lo que elegimos el intervalo de concentraciones de amitraz entre 0,01 μM y 100 μM para probar nuestra hipótesis. La concentración seleccionada para idazoxan se basa en el pK_B para el receptor α_2 (de 6 a 8) en ratas. Para seleccionar la concentración de n-metilhistaprodifeno, realizamos un estudio de concentración-respuesta para determinar la concentración mínima que producía la máxima reversión de los efectos del amitraz.

Para alcanzar el segundo objetivo, se evaluó en el estriado, la corteza prefrontal y el hipocampo de ratas macho si el tratamiento con amitraz (20, 50 y 80 mg/kg de peso corporal durante 5 días) inhibe la MAO y/o altera la expresión y actividad de las otras enzimas que metabolizan o sintetizan los neurotransmisores monoaminérgicos alterando las hormonas

sexuales en estas regiones. En particular, medimos los niveles plasmáticos y cerebrales de T y E2 y la expresión de la aromatasa cerebral para determinar los efectos de las hormonas sexuales. Además, medimos la concentración de los neurotransmisores 5-HT, DA y NA y sus metabolitos y la implicación de las hormonas T y E2 sobre los niveles de dichos neurotransmisores. Por último, medimos la expresión y/o la actividad de las enzimas MAO, COMT, BDH, TH y TRH y la implicación de las hormonas E2 y T en los efectos del amitraz sobre dichas enzimas. La Figura 2 muestra el protocolo y el diseño experimental utilizado en esta investigación.

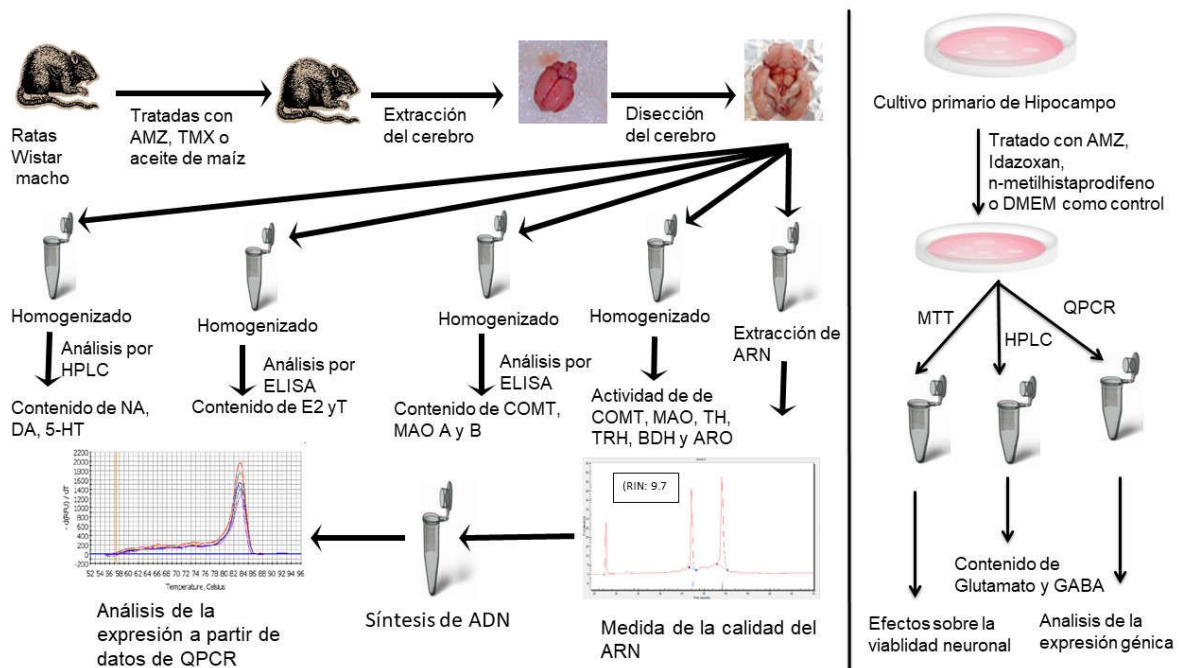


Figura 2. Representación esquemática del diseño experimental de la investigación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que los niveles de glutamato y GABA fueron alterados tras 24 horas de exposición al amitraz a partir de la concentración de 0,1 μM en cultivos primarios neuronales de hipocampo. Este efecto fue mediado parcialmente a través de la activación del receptor α_2 y también a través de la inhibición del receptor H_1 a partir de la

concentración de 10 μM . Este efecto podría deberse al hecho de que la CI_{50} del amitraz sobre el receptor H_1 es 10 μM . Además, la reducción de los niveles de GABA podría deberse a la disminución de la viabilidad celular, pero como la muerte celular sólo se observó a la concentración más alta probada y se revirtió parcialmente por el cotratamiento simple o simultáneo con idazoxán y n-metilhistaprodifeno, esto sugiere que la muerte celular fue el resultado de la hiperactividad neuronal. La alteración de los niveles de glutamato y GABA inducida por amitraz fue mediada a través de la interrupción de la síntesis de estos neurotransmisores, por medio de la alteración de la expresión de la GAD65 y de la glutaminasa, aunque otros mecanismos no pueden descartarse, como una alteración en la recaptación o el metabolismo de estos neurotransmisores.

La neurotransmisión excitadora e inhibitoria en el SNC está mediada principalmente por glutamato y GABA, respectivamente, y un desequilibrio entre excitación e inhibición producido por una disminución en la transmisión GABAérgica y/o un aumento en la transmisión glutamatérgica se ha asociado con la generación de convulsiones, por lo que las convulsiones inducidas por amitraz podrían estar mediadas a través de la alteración de dichos neurotransmisores, aunque se necesitan más estudios para confirmar este efecto. Además, se ha descrito que los agonistas de los receptores adrenérgicos α_2 y los bloqueantes del receptor H_1 pueden alterar los niveles de glutamato y GABA, apoyando estos resultados los efectos observados tras la exposición al amitraz sobre estos sistemas de neurotransmisores.

Por otra parte, en el presente trabajo, demostramos que el amitraz aumenta, de una manera dosis-dependiente, los niveles séricos de T, como fue descrito previamente en ratas macho, lo cual apoya nuestros resultados, así como los niveles cerebrales de E2 a través del aumento de la expresión y actividad de la enzima ARO en las regiones cerebrales estudiadas.

El amitraz también alteró, de una manera dependiente de la dosis y de la región, la actividad y expresión de la TH, la TRH y la BDH, así como la expresión y el contenido de la MAO y la COMT, lo cual puede explicar, en parte, los efectos observados sobre los neurotransmisores monoaminérgicos en las regiones cerebrales estudiadas. La alteración en todos los enzimas y neurotransmisores estudiados se revirtió parcialmente en todos los casos por el co-tratamiento con tamoxifeno, un antagonista del receptor de estrógenos. Esto sugiere que el amitraz altera varios sistemas de neurotransmisores, al menos en parte, al alterar la regulación del E2 sobre las enzimas que sintetizan y metabolizan estos neurotransmisores. Estos resultados son apoyados por estudios previos que han mostrado que el E2 regula la actividad y la expresión de las enzimas que sintetizan y metabolizan la DA, NA y 5-HT entre otros neurotransmisores. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que el amitraz actúe alterando los transportadores de neurotransmisores monoaminérgicos, que también se ha demostrado que están regulados por el E2.

La reversión inducida por el co-tratamiento del amitraz con el TMX sobre los efectos producidos por el amitraz sobre estas enzimas no fue completa, lo que sugiere que, además de la desregulación de E2, podrían estar involucrados otros mecanismos en estos efectos. Se ha sugerido que la acción agonista del receptor α_2 -adrenérgico del amitraz es uno de los principales mecanismos de sus efectos neurotóxicos, posiblemente contribuyendo a los efectos observados. También se ha descrito que la síntesis y la recaptación de la NA, DA y 5-HT en el SNC están fisiológicamente reguladas por la insulina y que tanto la hiperglucemia inducida experimentalmente como la inducida por amitraz producen un aumento significativo en los niveles de catecolaminas en diferentes áreas del cerebro. Por último, se ha demostrado que la hipoinsulinemia y la hiperglucemia alteran las actividades de la COMT, BDH y TH, lo

que podría explicar la desregulación monoaminérgica observada. El amitraz, además, altera otras hormonas como la prostaglandina E2 que se ha demostrado que regula la expresión de la TH. Además, el receptor de histamina H₁ modula la expresión de la TH y la síntesis de catecolaminas en el cerebro, por lo que su inhibición por el amitraz también podría contribuir a los efectos observados sobre los neurotransmisores monoaminérgicos.

CONCLUSIONES

El presente trabajo demuestra que el amitraz desregula los sistemas de neurotransmisores glutamatérgicos y GABAérgicos mediado, en parte, por la activación del receptor α_2 y la inhibición del receptor H₁ en función de la concentración, así como de los sistemas de neurotransmisores NA, 5-HT y DA mediado, en parte, a través de la alteración en los niveles cerebrales de estradiol. Las alteraciones inducidas por amitraz en estos sistemas de neurotransmisores pueden diferir entre las ratas macho y hembra debido a las diferencias en las hormonas sexuales. Sin embargo, como los efectos neurotóxicos descritos en animales adultos después de la exposición al amitraz no se diferenciaron por sexo, estos efectos pueden ser similares en ambos sexos, pero probablemente con diferente intensidad. Futuros estudios deben caracterizar el resto de los mecanismos implicados en la alteración de estos sistemas de neurotransmisores inducida por el amitraz, los efectos neurotóxicos mediados por estas alteraciones y las posibles diferencias sexuales en estos efectos neurotóxicos. Estos resultados son de gran interés porque permiten una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes a los efectos neurotóxicos y pueden ofrecer una nueva visión en el diseño de estrategias terapéuticas contra los efectos neurotóxicos inducidos por el amitraz. Además, se están desarrollando nuevas moléculas de la familia de las formamidinas con un uso terapéutico, por lo que es muy importante determinar los mecanismos a través de los cuales este compuesto podría inducir dichos efectos.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
DEL TRABAJO

1. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

El amitraz supone un motivo de preocupación para las autoridades sanitarias debido al elevado número de casos de intoxicación humana que se han atribuido a este plaguicida y que siguen siendo descritas en la actualidad y por la falta de conocimiento de los mecanismos a través de los cuales se producen algunos de los efectos neurotóxicos más graves que este presenta.

El amitraz es un potente neurotóxico que induce signos como convulsiones, pérdida del reflejo de enderezamiento, incoordinación motora, alteración del apetito, hiperreactividad a estímulos externos y agresividad, entre otros efectos, aunque los mecanismos exactos a través de los cuales se producen estos signos no se conocen. Estos efectos pueden estar mediados por la alteración de distintos sistemas de neurotransmisores, entre otros mecanismos. En particular, las convulsiones podrían estar inducidas a través de disfunciones de los neurotransmisores glutamato y GABA, principales reguladores de la transmisión excitatoria e inhibitoria, respectivamente. Además, otros mecanismos que podrían estar implicados son la inhibición del receptor de histamina H₁ o la activación del receptor α_2 adrenérgico, que se han relacionado con la inducción de convulsiones.

Por otra parte, se ha descrito que el amitraz (20, 50 y 80 mg / kg de peso corporal) aumenta los niveles de serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y dopamina (DA) y disminuye sus metabolitos y la tasa de recambio en el sistema nervioso central (SNC) de ratas macho, siendo las regiones más afectadas el cuerpo estriado, la corteza prefrontal y el hipocampo, pudiendo mediar dichos efectos las alteraciones motoras, agresividad y alteraciones del apetito, entre otros efectos tóxicos del amitraz cuyo mecanismo no se conoce. Sin embargo,

los mecanismos a través de los cuales estas alteraciones ocurren no se entienden completamente. En este sentido, el amitraz es un inhibidor de la monoaminoxidasa (MAO), que es la enzima principal que metaboliza los neurotransmisores de monoamina. Por lo tanto, este mecanismo podría mediar los efectos observados en los neurotransmisores monoaminérgicos. Además, la alteración en los niveles de NE, DA y 5-HT y de sus metabolitos observados en ratas macho también podría atribuirse a un posible efecto del amitraz sobre las hormonas sexuales que regulan la actividad y expresión de las enzimas necesarias para la síntesis y metabolismo de estos neurotransmisores. En este sentido, se ha demostrado que el amitraz altera el metabolismo hepático del 17β -estradiol (E2) y de la testosterona (T) en ratas y aumenta la T sérica en ratas macho a 25 y 50 mg/ kg.

Según estos datos, hipotetizamos que el amitraz altera la transmisión glutamatérgica y GABAérgica en el hipocampo a través de la inhibición de los receptores α_2 y H_1 , lo cual podría conducir a la inducción de las convulsiones observadas tras la exposición al amitraz. Además, hipotetizamos que el amitraz induce una alteración de los sistemas serotoninérgicos, noradrenérgicos y dopaminérgicos que puede ser mediada principalmente a través de una combinación de inhibición de la MAO y/o alteración de la expresión y la actividad de las enzimas que metabolizan y sintetizan estos neurotransmisores a través de la disrupción de las hormonas sexuales en las ratas macho que puede explicar las alteraciones motoras observadas tras la exposición al amitraz.

Para probar esta hipótesis, nuestro objetivo fue investigar la neurotoxicidad inducida por el amitraz sobre:

1. Los sistemas de neurotransmisores glutamatérgicos y GABAérgicos en la región del hipocampo y los mecanismos implicados.
2. Los sistemas de neurotransmisores serotoninérgicos, noradrenérgicos y dopaminérgicos en las regiones del cuerpo estriado, corteza prefrontal e hipocampo y los mecanismos implicados.

El interés de este trabajo se centra en aportar nuevos datos sobre la neurotoxicidad inducida por el amitraz que permiten una nueva comprensión de los mecanismos que contribuyen a los efectos nocivos del amitraz sobre distintos sistemas de neurotransmisores. Específicamente, el interés del presente trabajo se centra en aportar nuevos datos de la neurotoxicidad inducida por el amitraz sobre los sistemas glutamatérgico, GABAérgico, serotoninérgico, dopaminérgico y noradrenérgico del SNC, que puedan explicar los efectos motores y convulsiones producidos por la exposición al mismo entre otros efectos, así como los mecanismos a través de los que se producen los mismos. Además, los presentes datos son de relevancia para la evaluación del riesgo de este compuesto y pueden ofrecer una nueva visión en la elaboración de estrategias terapéuticas contra la neurotoxicidad inducida por el amitraz.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

incluyendo diferentes tipos de cáncer, alteraciones de la reproducción y alteraciones del sistema nervioso, entre otros.

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

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las formamidinas (Figura 1) fueron desarrolladas a finales de los años 1950 y principios de los 60. Las formamidinas son compuestos de un amplio espectro de actividad biológica, con efectos bactericidas y antiprotozoarios, que tienen desde propiedades fungicidas, antihelmínticas y herbicidas hasta acciones insecticidas y acaricidas. Además, también se ha visto que presentan actividades farmacológicas (Hollingworth, 1976).

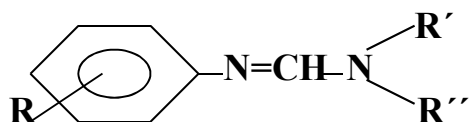


Figura 1. Estructura química general de las formamidinas

Las formamidinas son particularmente útiles para combatir plagas resistentes a los insecticidas organofosforados y carbamatos, debido a que presentan un mecanismo de acción diferente, el cual está relacionado con la interferencia 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 formamidinas principalmente comercializadas y de más amplio uso son el clordimeformo y el amitraz; los efectos sobre el sistema nervioso del clordimeformo han sido ampliamente estudiados, sin embargo, poco se conoce de la función del amitraz sobre el SNC de mamíferos (Moser et al., 1987).

3.1. AMITRAZ

El amitraz [N-metilbis (2,4-xililiminometil) amina] (Figura 2) 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-levemente tóxico por las vías oral e inhalatoria, como Clase II-moderadamente tóxico por vía dérmica y como Clase IV-no irritante dérmico y sólo un ligero irritante para los ojos y no sensibilizador dérmico (USEPA, 1996).

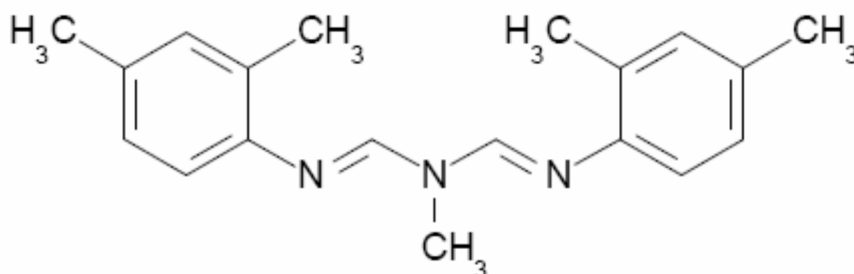


Figura 2. Estructura química del amitraz (C₁₉H₂₃N₃).

El amitraz 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.

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 detallado 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

Aunque la descomposición del amitraz en agua a pH neutro es muy baja, sin embargo, pueden producirse cambios observables en la forma física del mismo durante su almacenamiento por un periodo de tiempo prolongado. 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 a través de la adición de un agente estabilizante tal como sílice gel, o paraformaldehído. En el caso de concentrados emulsionables, la inclusión de epíclorhidrina 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).

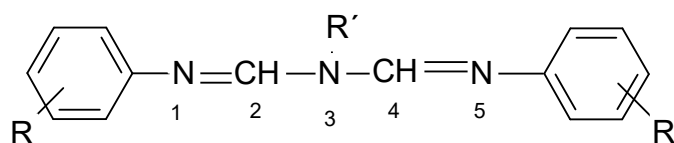


Figura 3. Estructura química de los 1,3,5-triazapenta-1,4-dienos.

3.2. ESPECTRO DE ACCIÓN Y USOS

El amitraz se emplea en la actualidad como medicamento de uso veterinario para la prevención y tratamiento de infestaciones por ectoparásitos y como acaricida e insecticida. El amitraz es activo por contacto, siendo efectivo contra un amplio espectro de ácaros e insectos (Hollingworth, 1976; Hollingworth y Lund, 1982; Muller, 1983; Farmer y Seawright, 1989; USEPA, 1996; Burrows, 2000).

El amitraz es un acaricida/insecticida empleado en el control de garrapatas del ganado y del perro, piojos, ácaros de la sarna y la *Psylla pyri*, (Hollingworth, 1976; Duclos et al., 1994; Estrada-Pena y Ascher, 1999; Estrada-Pena y Reme, 2005). El amitraz se emplea fundamentalmente para el control de los ácaros fitófagos en la práctica agrícola y en el ganado, fundamentalmente, para el control de las garrapatas. El amitraz también presenta actividad sobre algunos grupos de insectos de importancia económica tales como los Lepidópteros y algunos Hemípteros (Weighton 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 presenta una excelente eficacia para el control de *Tetranychus* spp en peras, ciruelas, pepinos, tomates, judías, pimientos, vides y ornamentales (Harrison et al., 1973). Además, 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 posee actividad por contacto, pero no tiene actividad sistémica, aunque sí alguna actividad translaminar (Hollingworth, 1976).

El amitraz presenta cierta toxicidad selectiva para las especies diana, mientras que para la mayoría de los insectos es bastante baja, y en general, insectos beneficiosos como los predadores, parásitos y polinizadores no son afectados severamente 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 para los vertebrados. El valor de la CL_{50} (96h) para peces está en un rango de 1 a 10 ($\mu\text{g/ml}$), para aves (codornices y patos) presentan una DL_{50} de 100 $\mu\text{g/g}$ en la dieta, y los mamíferos son más resistentes (Hollingworth, 1976).

El amitraz se formula 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 se aplica 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 y 1995b; Kwochka et al., 1985; Paradis, 1999; Shipstone, 2000). También existen productos con amitraz para uso doméstico.

3.3. MECANISMO DE ACCIÓN

Se han descrito diferentes mecanismos de toxicidad del amitraz como se presenta a continuación (Figura 4).

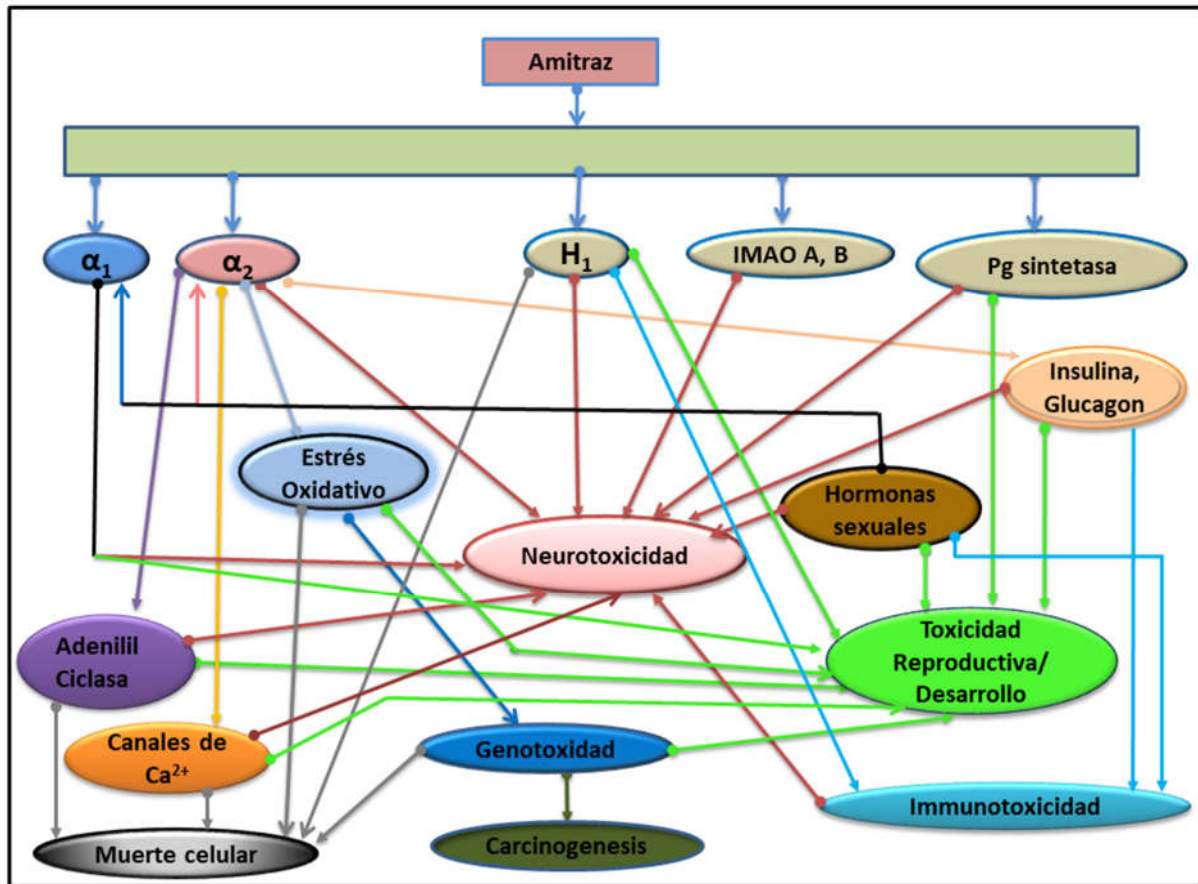


Figura 4. Mecanismos de toxicidad del amitraz.

Agonista de receptores alfa-adrenérgicos.

Se ha descrito que el principal mecanismo de toxicidad del amitraz es la activación de los receptores α_2 -adrenérgicos, ya que, esta acción desempeña un papel en la inducción de hipotensión, bradicardia, miosis y midriasis, alteración del estado mental, hipotermia, convulsiones, poliuria, hipomotilidad gastrointestinal e hiperglucemia (Yilmaz y Yildizdas, 2003). Inicialmente, se estableció una hipótesis sobre el papel del receptor α_2 en la toxicidad

neuroendocrina de este insecticida en mamíferos, en base a las similitudes observadas entre este receptor y los receptores octopaminérgicos, que son las dianas de los pesticidas formamidina en insectos (Hollingworth y Murdock, 1980). Esta hipótesis fue posteriormente reforzada por estudios experimentales que revelaron que el amitraz causa efectos similares a los producidos por la clonidina, un agonista selectivo del receptor α_2 . Además, la administración simultánea de amitraz y yohimbina, un antagonista del receptor α_2 , pero no del α_1 , revirtió los efectos del amitraz sobre la función cardíaca, la motilidad intestinal, la apertura pupilar y la presión arterial, entre otros efectos y, además, redujo la letalidad inducida por el mismo, lo cual reforzaba dicha hipótesis (Hsu y Kakuk, 1984; Hsu y Lu, 1984; Hsu y Hopper, 1986; Hsu et al., 1986; Moser y McPhail, 1985). Finalmente, esta hipótesis fue probada a través de los estudios desarrollados por Costa y colaboradores (1988, 1989a) que demostraron que el amitraz, *in vivo* e *in vitro*, es capaz de inhibir fuertemente la unión de la [3 H] clonidina al receptor α_2 en el cerebro de ratón y de rata.

Además, Costa y colaboradores (1988) demostraron que la concentración inhibidora del amitraz 50 (CI₅₀) sobre el receptor α_2 en prosencéfalo de ratón *in vitro* es de 130 nM, y que la inhibición del receptor α_2 se produce a la dosis de 7.5 mg/kg en cerebro de ratón *in vivo* (Costa et al., 1989). Costa y colaboradores (1989b) también describieron que la CI₅₀ del amitraz es de 95-110 nM en cerebro de rata *in vitro*, y la inhibición del receptor α_2 se produce a la dosis de 25 mg/kg en cerebro de rata *in vivo*. Estos resultados *in vivo* muestran que las ratas son menos sensibles a la inhibición del amitraz del receptor α_2 que los ratones, lo que no concuerda con la mayor sensibilidad a la toxicidad observada por exposición al amitraz en ratas como lo muestra la DL₅₀ oral (Tabla 7). Sin embargo, los resultados *in vitro* están de acuerdo con las diferencias de sensibilidad presentadas en la toxicidad por exposición al amitraz. Esto podría deberse al hecho de que *in vivo*, el amitraz se metaboliza a BTS-27271,

que es más activo que el propio amitraz, presentando valores de DL_{50} más altos en ratas que en ratones. Posteriormente, Abu-Basha y colaboradores (1999) describieron que las acciones del amitraz y su metabolito el BTS-27271 (0.01, 0.1, 1 y 10 μM) sobre la secreción de insulina y glucagón están mediadas por los receptores α_{2D} -adrenérgicos como se demostró tras el tratamiento con idazoxán, un antagonista del receptor α_{2A}/α_{2D} -adrenérgico, de tejido páncreático de rata *in vitro*. Altobelli y colaboradores (2001) demostraron que el amitraz (0.1-10 mM) actúa como un agonista parcial de los receptores presinápticos α_{2D} -adrenérgicos en los sinaptosomas del hipotálamo de rata. Estos resultados sugieren que el subtipo de receptores α_{2D} -adrenérgicos puede ser el subtipo de receptor adrenérgico sobre el que actúa el amitraz, pero se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis.

Por otra parte, Costa y colaboradores (1988) describieron que el amitraz también presenta una acción agonista débil sobre el receptor adrenérgico α_1 en el prosencéfalo de ratón *in vitro* con una CI_{50} de 10 nM. Además, Cullen y Reynoldson (1990) demostraron que los antagonistas selectivos del receptor adrenérgico α_1 y α_2 prazosina (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y yohimbina (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$), respectivamente, bloquean la bradicardia producida por inyecciones intracisterna magna de amitraz (5-25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en perros, lo que sugiere que el receptor α_1 también puede participar en los efectos tóxicos inducidos por el amitraz. Estos resultados están en contradicción con los estudios comentados anteriormente donde el antagonista del receptor α_1 prazosina a altas dosis no revirtió los efectos tóxicos inducidos por el amitraz. Tomando todos estos datos en cuenta, algunos de los efectos mediados por el amitraz podrían deberse a una acción sólo sobre el receptor α_2 , pero en otros efectos tóxicos podrían participar ambos receptores, estando la acción del receptor adrenérgico α_1 posiblemente enmascarada por acciones agonistas del receptor α_2 , debido a la baja acción agonista del receptor α_1 . Además,

otros mecanismos, aparte de la acción del agonista sobre el receptor α_2 , podrían contribuir a algunos de los signos descritos anteriormente.

Inhibición del receptor de histamina H₁

El amitraz causa toxicidad en caballos caracterizada por somnolencia y estasis del intestino (Roberts y Seawright, 1979), que también son efectos secundarios de muchos antihistamínicos (Douglas, 1980), lo que sugiere que estos signos pueden deberse a una acción antihistaminica del amitraz. En base a estos signos, se investigaron los efectos del amitraz sobre el íleon de cobaya *in vitro* (Pass y Seawright, 1982). Los resultados indicaron que el amitraz (3.4 μM) inhibe la contracción del intestino, la cual fue previamente estimulada por los agonistas del receptor de histamina H₁, la 2-metilhistamina (0.32 μM) y la 2-piridiletilamina (1,64 μM) en un 52% y 47%, respectivamente, pero no fueron estimuladas por los agonistas colinérgicos como la acetilcolina y la metacolina. Pass y Seawright (1982) concluyeron que el amitraz es un antagonista del receptor H₁ en íleon de cobaya y que esta acción podría ser relevante en casos de toxicidad gastrointestinal. Posteriormente, Costa y colaboradores (1988) describieron que el amitraz es capaz de inhibir la unión de [3H] mepiramina (3.5 nM) al receptor H₁ en cerebro de rata *in vitro* con una CI₅₀ de 10⁻⁵M, concluyendo que es un inhibidor débil del receptor H₁. Finalmente, Pass y Mogg (1991) describieron que el amitraz (10⁻⁵M) y BTS-27271 (10⁻⁵M) tenían una actividad antagonista H₁ significativa en el íleon de cobaya, aumentando la concentración efectiva 50 (CE₅₀) del agonista H₁ 2-piridiletilamina en 2.5 \pm 0.35 y 8.3 \pm 1.75 veces, respectivamente, respecto del control. Sin embargo, el estasis fecal inducido por amitraz (1 y 2 mg/kg, iv) y por el BTS-27271 (0,68 y 1,35 mg/kg, iv) en ovinos fue revertido parcialmente mediante la administración intravenosa de 2-piridiletilamina (10 mg/kg), pero fue completamente revertida por la administración intravenosa de yohimbina (0.5 mg/kg), lo que confirma que

amitraz es un inhibidor débil del receptor H₁ e indica que esta acción *in vivo* es secundaria a la actividad agonista del receptor adrenérgico α₂.

Las discrepancias entre Costa y colaboradores (1988) y Pass y Mogg (1991) sobre la actividad antagonista sobre el receptor H₁ *in vitro* podrían estar relacionadas con las diferencias en las especies y los tejidos evaluados o con las diferencias en el vehículo utilizado. En este sentido, las discrepancias entre especies podrían deberse a la mayor toxicidad presentada por el amitraz sobre cobayas que sobre ratas, como muestran las diferencias en la DL₅₀ por vía oral (Tabla 7), que podría reflejar una mayor potencia antagonista del amitraz sobre el receptor H₁ en cobayas. Además, se ha sugerido que los receptores H₁ en rata pueden no ser estructuralmente idénticos a los de cobaya y pueden presentar afinidad diferente por la histamina y los antagonistas de los mismos, como se observó con el antagonista selectivo del receptor H₁ mepiramina (Hill y Young, 1980), las cuales podrían explicar las diferencias observadas entre especies. Además, se ha descrito que los receptores H₁ presentan polimorfismo (García-Martín et al., 2008; Vehof et al., 2011; Swan et al., 2006) y las variantes expresadas en el intestino y el cerebro podrían ser diferentes, teniendo así una sensibilidad diferente al amitraz y sus metabolitos. Se requieren más estudios para confirmar las diferencias en la potencia antagonista entre especies y tejidos *in vivo*, determinar la relación dosis-respuesta y estudiar los posibles efectos tóxicos mediados por este mecanismo. En este sentido, la inhibición del receptor H₁, además de la reducción de la motilidad intestinal, podría contribuir a otros efectos tóxicos como la muerte celular (Jangi et al., 2006), alteraciones del comportamiento (Serafim et al., 2013; Nath y Gupta, 2001) y reproductivas (Kathpalia y Parshad, 1990; Liu et al., 2004; Cara et al., 1995; Mayerhofer et al., 1989), convulsiones (Yokoyama et al., 1993; Swiader et al., 2004) y acciones antiinflamatorias (Okamoto et al., 2009), entre otros efectos.

Inhibición de la prostaglandina sintetasa

Se ha propuesto que las formamidinas son inhibidores de la prostaglandina sintetasa en base a los estudios realizados sobre íleon de cobaya aislado que muestran acciones del amitraz similares a la aspirina, con depresión de las respuestas inducidas eléctricamente, las cuales fueron revertidas con prostaglandina E₁, pero no con naloxona (Holsapple et al., 1979; Ehrenpreis et al., 1976). En función de estos datos, Yim y colaboradores (1978) evaluaron las actividades antipiréticas y antiinflamatorias del amitraz (5 a 80 mg/kg) tras la administración por vía intraperitoneal a ratas en comparación con dos inhibidores conocidos de la síntesis de prostaglandinas, la aspirina (20 a 320 mg/kg) y la indometacina (0,25 a 2 mg/kg). Los resultados mostraron que el amitraz se comporta como un agente antipirético y antiinflamatorio. Además, Yim y colaboradores (1978) encontraron que el amitraz causaba la inhibición de la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂) con una CI₅₀ de 880 µM. Esta acción podría contribuir, además de a la actividad antipirética y antiinflamatoria descrita, a la inducción de hipertermia (Amateau y McCarthy, 2004; Hayaishi y Huang, 2004; Murakami y Kudo, 2004; Simmons et al., 2004; Chen y Bazan, 2005; Sang et al., 2005; Yang et al., 2009; Chen et al., 2002; Breyer et al., 2001), agresividad (Matsuoka et al., 2005) y toxicidad sobre el desarrollo (Wood, 2005, Dean et al., 2012a y 2012b; Lenz et al., 2013; Wong et al., 2014;) y reproductiva (Algire et al., 1992; Chandras et al., 2004; Murdoch et al., 1986; Nuttinck et al., 2002), entre otros efectos. No existen estudios sobre la actividad de los metabolitos del amitraz sobre la prostaglandina sintetasa ni tampoco si esta acción es mediada sólo por el amitraz, sus metabolitos o por ambos. Por lo tanto, es importante desarrollar más estudios para aclarar este punto. Por otra parte, los mecanismos a través de los cuales el amitraz inhibe dicha enzima y la cinética de la inhibición, así como los efectos tóxicos mediados a través de este mecanismo aún no se han establecido y se necesitan más estudios para dilucidarlos.

Inhibición de la monoaminoxidasa (MAO).

La vía más importante de metabolismo de numerosas aminas bioactivas está representada por la desaminación oxidativa realizada por la MAO tipos A y B, dos isoenzimas codificadas por dos genes relacionados, pero separados (Weyler et al., 1990). La MAO es una de las principales enzimas que participan en el metabolismo de los neurotransmisores dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e histamina como se puede ver en las Figuras 5, 6, 7 y 8, respectivamente (Meana y García-Sevilla, 1997). Entre los efectos tóxicos del amitraz que podrían estar mediados por la inhibición de la MAO están las alteraciones de la actividad motora (Florio et al., 1993), la agresividad (Godar et al., 2014; Bortolato et al., 2013), toxicidad sobre la reproducción (Mihalik et al., 2008, 2010) y sobre el desarrollo neurológico (Del Pino et al., 2011; Buznikov et al., 1996; Whitaker-Azmitia, 1991; Levitt et al., 1997; Ansorge et al., 2008), entre otros efectos tóxicos.

Figura 5. Metabolismo de la dopamina.

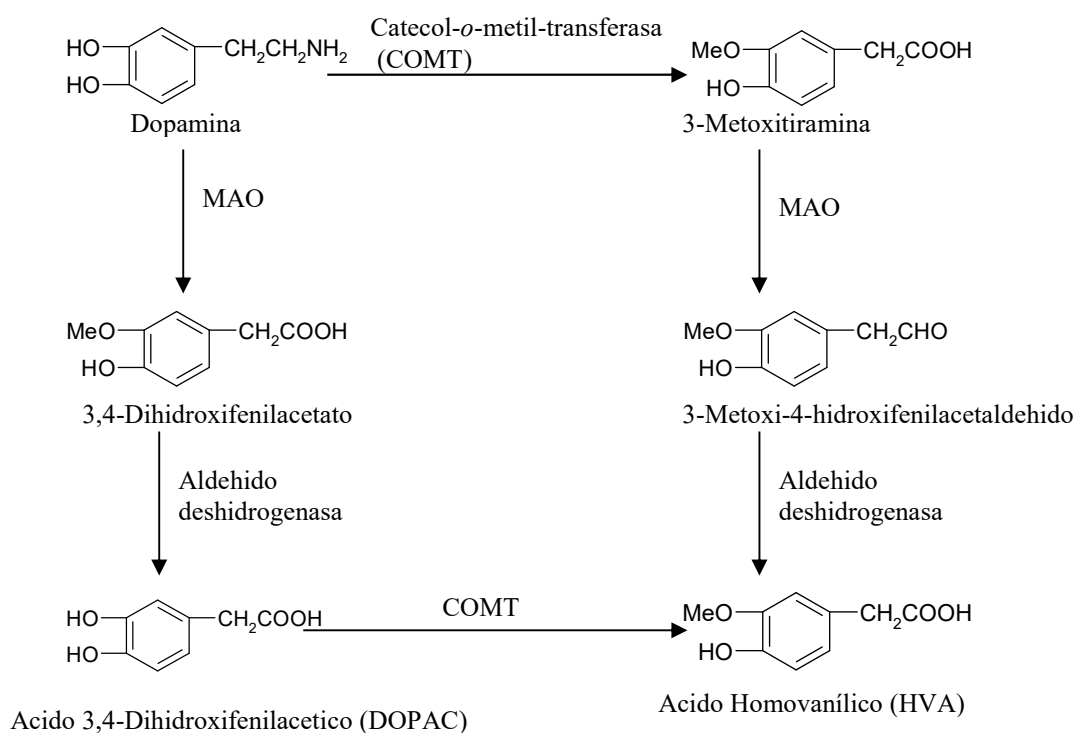


Figura 6. Metabolismo de la noradrenalina.

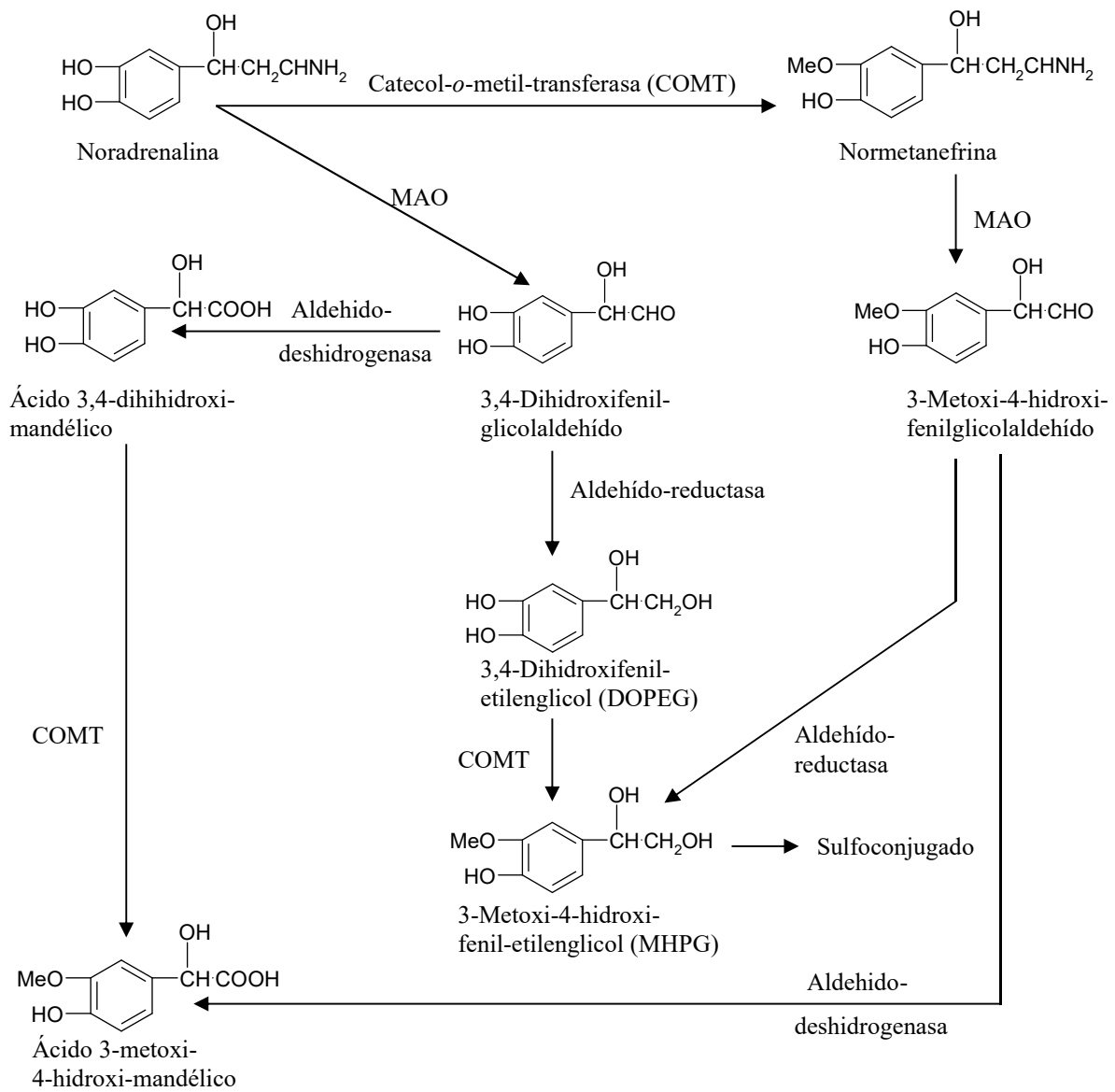


Figura 7. Metabolismo de la serotonina.

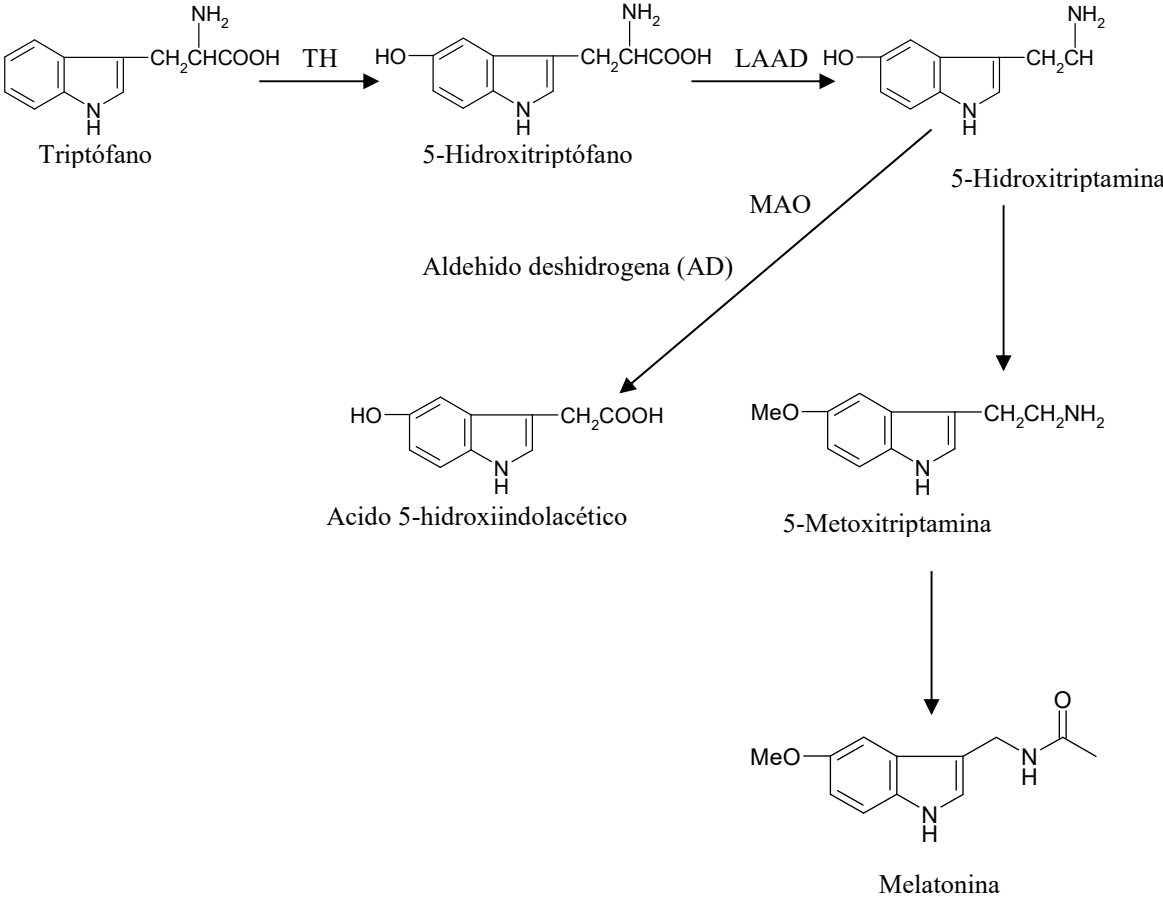
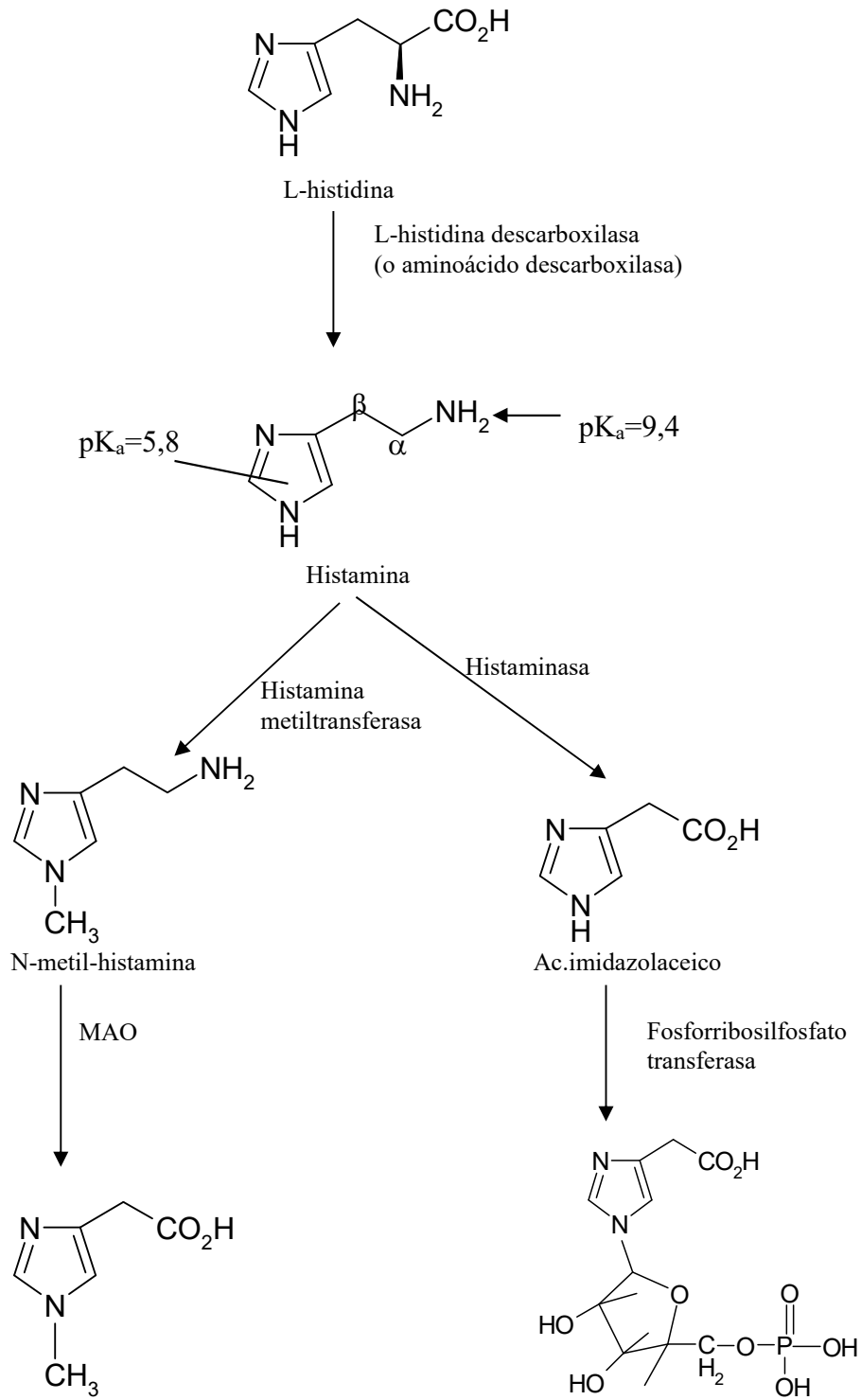


Figura 8. Metabolismo de la histamina.



Inicialmente, Knowles y Roulston (1972) hipotetizaron que las formamidinas son inhibidores de la MAO en función de los efectos de la toxicidad inducida por garrapatas y de la capacidad conocida de los compuestos de amidina de inhibir la MAO en los mamíferos. Esta hipótesis fue confirmada por Aziz y Knowles (1973) y Benezet y Knowles (1976) que estudiaron la inhibición de la MAO en hígado y cerebro de rata *in vitro* por el amitraz, el BTS-27271 y el BTS-27919, mostrando una CI_{50} en hígado de 6.6×10^{-7} M y 2.7×10^{-5} M para el amitraz y el BTS-27271, respectivamente y una CI_{50} en cerebro de 5×10^{-5} M, 3.8×10^{-5} M y 2.3×10^{-5} M para el amitraz, el BTS-27271 y el BTS-27919, respectivamente. De acuerdo con estos datos, el amitraz fue un inhibidor más potente de la MAO en el hígado que su metabolito el BTS-27271, pero esta diferencia no fue observada en los estudios sobre el cerebro.

Esto podría deberse al hecho de que el amitraz y su metabolito presentan una selectividad diferente para las isoformas de la MAO y la isoforma para la cual el amitraz es selectivo se expresa más en el cerebro, por lo tanto, la CI_{50} se incrementa. Posteriormente, los experimentos *in vitro* e *in vivo* realizados por Moser y MacPhail (1989) demostraron que el amitraz inhibía la MAO-A y la MAO-B de una manera dependiente de la dosis a partir de dosis ≥ 100 mg/kg. En dichos estudios el amitraz pareció ser más selectivo por la MAO-B cuando se administró *in vivo*, aunque la MAO-A también se inhibió, aunque a dosis ≥ 300 mg/kg, pero esta selectividad no se observó *in vitro* cuando sólo se evaluó el amitraz (Moser y McPhail, 1989). Se sugirió que las discrepancias observadas sobre la selectividad del amitraz sobre la inhibición de las isoformas de la MAO A y B entre experimentos *in vitro* e *in vivo* podían deberse al hecho de que el amitraz se metaboliza en los estudios *in vivo* y, por lo tanto, uno de sus metabolitos podría presentar selectividad sobre la MAO B. Aunque Moser y MacPhail (1989) no observaron selectividad por amitraz *in vitro*, los resultados de Aziz y

Knowles (1973) y Benezet y Knowles (1976) sugieren que el amitraz presenta selectividad para una isoforma.

Esta falta de selectividad observada por Moser y MacPhail (1989) podría deberse al hecho de que la isoenzima de la MAO para la cual el amitraz es selectivo se expresa más en el cerebro. En este sentido, se ha descrito que la MAO A presenta concentraciones más altas que la MAO B en el cerebro de rata, por lo que si el amitraz presentara más selectividad para la MAO A, esto estaría enmascarado por su expresión superior (Oreland et al., 1983), explicando las diferencias observadas. Estos datos sugieren que el amitraz podría presentar una mayor selectividad sobre la MAO A y algunos de sus metabolitos sobre la MAO B. Por otra parte, se ha descrito que la insulina aumenta las actividades enzimáticas de la MAO A y MAO B (Radojicic *et al.*, 1997), por lo tanto, una disminución de los niveles de insulina, como la producida por amitraz, podría reducir estas actividades, contribuyendo indirectamente a la inhibición por el amitraz de las actividades MAO A y MAO B. De acuerdo con todo lo expuesto anteriormente, se requieren más estudios para determinar los mecanismos de inhibición de la MAO por parte del amitraz y sus metabolitos, su selectividad sobre las isoenzimas de la MAO y los efectos tóxicos mediados a través de esta inhibición.

Inhibición de la adenilato ciclasa.

El adenosín monofosfato cíclico (AMPC) es un segundo mensajero que regula los procesos fisiológicos como son la adhesión y el crecimiento celular, la supervivencia celular, la homeostasis energética, la señalización neuronal y la relajación muscular. Se han observado alteraciones en la señalización del AMPC en varias alteraciones fisiopatológicas, como muerte celular, neurotoxicidad y toxicidad del desarrollo, entre otras (Fajardo et al., 2014; Kloster et al., 2013; Emery et al., 2014). Chen y Hsu (1994) formularon la hipótesis de que el amitraz y

sus metabolitos (0.1-10 μM) activan el receptor α_2 , el cual inhibe la liberación de insulina mediante la disminución de los niveles de AMP cíclico intracelular. Esta hipótesis fue confirmada porque el amitraz y su metabolito el BTS-27271 inhibieron la liberación de insulina estimulada por forskolina (1 μM), un activador de la adenilato ciclasa, que muestra una liberación de insulina dependiente de AMP cíclico en una línea de células β de rata (RINm5F). Además, el 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX; 100 μM), un inhibidor no específico de las fosfodiesterasas de AMP cíclico, elevó las concentraciones de AMP cíclico que produjo un aumento en la liberación de insulina, efectos que fueron revertidos por el amitraz, el BTS-27271 y la medetomidina (0.1 μM), un agonista selectivo del receptor α_2 . La yohimbina (0.01, 0.1 y 1 μM) también revirtió el efecto del amitraz y el BTS-27271 sobre la acumulación de AMP cíclico estimulada por el IBMX, pero no lo hizo la prazosina (1 μM). Por lo tanto, se demostró que el amitraz y su metabolito el BTS-27271 disminuyen el AMP cíclico al inhibir la adenilato ciclasa, a través de su acción sobre el receptor α_2 *in vitro*. Se necesitan más estudios para confirmar este efecto *in vivo*, las acciones de amitraz mediadas por este mecanismo y la relación dosis-respuesta.

Activación del canal de iones de calcio (Ca^{2+}) dependiente de voltaje.

El Ca^{2+} es un segundo mensajero que regula procesos fisiológicos como el metabolismo mitocondrial, la entrada en el ciclo celular y la supervivencia celular. La alteración de su señal conduce a efectos patológicos tales como neurotoxicidad (Lason et al., 2013), muerte celular (Jiang et al., 2011; Chang et al., 2014), y toxicidad del desarrollo neurológico (Lepski et al., 2013; Willoughby y Cooper, 2007). Shin y Hsu (1994) describieron que el amitraz y su metabolito activo el BTS-27271 (10^{-8} - 10^{-5}M) causaron un aumento dependiente de la concentración en la contractilidad del miometrio evaluado en tiras de miometrio en la fase luteal *in vitro*. El antagonista de los receptores adrenérgicos α_2 ,

yohimbina (10^{-8} - 3×10^{-7} M), bloqueó este efecto del amitraz y el BTS-27271 de una manera dependiente de la concentración. Cuando las tiras uterinas se pretrataron con la solución de Tyrode libre de Ca^{2+} o con el verapamilo (3×10^{-5} M), bloqueante de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, los efectos contráctiles se abolieron por completo. Estos resultados sugieren que el amitraz y su metabolito son capaces de inducir un aumento en la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje, mediado por su actividad adrenoceptora α_2 que produce contracciones miométricas. Sin embargo, se necesitan estudios posteriores para confirmar estos datos tanto *in vitro* como *in vivo* y los posibles efectos mediados por este mecanismo.

Generación de especies reactivas de oxígeno

El estrés oxidativo puede ser el resultado de un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o una reducción en los mecanismos de eliminación de estas. Las ERO pueden modificar directamente macromoléculas celulares que conducen a una variedad de efectos tóxicos, incluyendo la peroxidación de lípidos, la disfunción de proteínas, la oxidación de ácidos nucleicos y la muerte celular. Kruk y Bounias (1992) describieron que la oxidación del amitraz (50 μM a 2 mM) conduce a la generación de las especies OH^\cdot y O_2^\cdot . Recientemente, Radakovic y colaboradores (2013) evaluaron la influencia del estrés oxidativo sobre el daño del ADN y la muerte celular inducida por el amitraz en linfocitos humanos. Este estudio mostró que el co-tratamiento de amitraz (3.5 $\mu\text{g/ml}$) y de la catalasa como antioxidante (100 UI/ml o 500 UI/ml) redujo significativamente el daño sobre el ADN y el porcentaje de células apoptóticas y necróticas en comparación con el tratamiento con amitraz solo. Estos resultados indicaron que el tratamiento con amitraz induce radicales libres, generando daño sobre el ADN y muerte celular. Además, se describió que el amitraz (5 mg/kg por vía intraperitoneal) disminuye el glutatión hepático y los sulfhidrilos no proteicos (SHNP)

(hasta un 40% como máximo) debido a su acción agonista α_2 que debilita los mecanismos de defensa antioxidante (Costa et al., 1991), lo que podría dar lugar a estrés oxidativo. Se requieren más estudios para confirmar estos datos *in vivo* y si este efecto está mediado por amitraz, sus metabolitos o ambos. La generación de ERO podría conducir a genotoxicidad (Ivanova et al., 2013; Mishra et al., 2009; Ohshima, 2008), muerte celular (Elmore et al., 2001; Bensaad et al., 2009), carcinogénesis (Ivanova et al., 2013) y toxicidad sobre el desarrollo (Hansen y Harris, 2013; Ornoy, 2007) entre otros efectos.

El mecanismo por el cual el amitraz podría inducir estrés oxidativo es desconocido. Cada vez está más claro que varios isoenzimas CYP inducibles por xenobióticos están asociados con diferentes vías de señalización que contribuyen a la producción de ERO (superóxido, H_2O_2 y OH^*) y causan lesiones celulares/tisulares (Sangar et al., 2010). Además, se ha descrito que el metabolismo de estrógenos por las CYP genera quinonas y semiquinonas reactivas que conducen a la producción de ERO y estrés oxidativo (Sangar et al., 2010). El aumento de los niveles de glucosa en sangre también puede producir lesión mitocondrial y una disfunción endotelial al generar especies de oxígeno reactivas e inhibir la producción de óxido nítrico, respectivamente (Xiu et al., 2014) y contribuir a la generación de ERO. En este sentido, se ha descrito que el amitraz induce el citocromo P450 1A1, 2B1, 2E1 y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) citocromo P450 reductasa (Bentley et al., 1985; Chou et al., 2008), que se han relacionado con la generación de ERO (Sangar et al., 2010; Reed et al., 2011; Tian et al., 2010; Shah et al., 2013; Khatua y Bhattacharyya, 2001; Caro y Cederbaum, 2004), el aumento de los niveles de glucosa y el metabolismo del estradiol, siendo estos los mecanismos más probables de generación de estrés oxidativo por amitraz. Por lo tanto, se requieren más estudios para determinar los mecanismos a través de los cuales el amitraz, sus metabolitos o ambos pueden inducir estrés oxidativo y los efectos que podrían ser mediados a través de esta acción.

Muerte celular

Múltiples autores han descrito la capacidad potencial del amitraz para inducir la muerte celular. Gregorc y Bowen (2000) fueron los primeros en estudiar la muerte celular inducida por el amitraz (0,174 $\mu\text{g/larva}$) en larvas de abejas melíferas. Observaron la muerte celular por necrosis y apoptosis en el 82% de las células columnares del intestino medio y en el 50% de las células epiteliales regenerativas, tras 24 horas desde el tratamiento con amitraz. La muerte celular se redujo al 36% en las células epiteliales tras 48 h desde el tratamiento. Este estudio demostró que el amitraz es capaz de inducir la muerte celular apoptótica y necrótica. Posteriormente, Ueng y colaboradores (2004) evaluaron la viabilidad celular en células de cáncer de mama humano MCF-7 tratadas con amitraz usando el método del bromuro de 3-[4,5 dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT). Estos investigadores encontraron que el tratamiento con 0.1, 1 y 10 μM de amitraz durante 3 h, 1 día y 2 días no tuvo efectos sobre la viabilidad celular, pero el tratamiento con 100 μM de amitraz produjo un 22%, 27% y 69% de disminución en la viabilidad celular, respectivamente, mientras que 500 μM de amitraz produjeron disminuciones del 40%, 69% y 70%, respectivamente. Además, Young y colaboradores (2005b) describieron también los efectos sobre la viabilidad celular en células linfoblastoides humanas WIL2NS tratadas con amitraz (11,9 μM , 119 μM , 1,19 mM y 11,9 mM) utilizando el ensayo del MTT. Las concentraciones estudiadas, excepto las concentraciones de amitraz de 11.9 μM y 119 μM , causaron una reducción en la viabilidad celular. Young y colaboradores (2005a) también estudiaron los efectos del amitraz sobre la viabilidad de las células de la granulosa tratadas con luteína mediante el ensayo del MTT, encontrando que la exposición durante períodos de 2 a 72 h a las concentraciones de 3.4 μM y 34.1 μM de amitraz no causó la muerte celular. Sin embargo, tras 24 h de exposición a la concentración de amitraz de 341 μM , indujo citotoxicidad y tras 72 h causó la muerte celular.

Recientemente, Padula y colaboradores (2012) analizaron la muerte celular mediante la prueba de la tinción con yoduro de anexina V-propidio (AnnV-PI) en células CHO, que mostró un aumento de la frecuencia de muerte celular apoptótica, a concentraciones de 8,5 μM y 12,8 μM . Finalmente, Radakovic y colaboradores (2013) también estudiaron la muerte celular usando la prueba de apoptosis por tinción de AnnV-PI, mostrando células apoptóticas y necróticas en linfocitos humanos tratados con 11,9 μM de amitraz. De acuerdo con todo lo expuesto anteriormente, existe una discrepancia en la concentración de amitraz que induce la muerte celular *in vitro*, que podría estar relacionada con el uso de diferentes líneas celulares, disolventes y protocolos de cultivo celular. Además, Oglesbya y colaboradores (2006) describieron que la intoxicación por amitraz (78 mg/kg) indujo necrosis en hígado y riñón de perro terrier escocés.

Todos estos estudios muestran la capacidad del amitraz para inducir la muerte celular, probablemente sea muerte celular apoptótica y/o necrótica, pero se desconoce si este efecto está mediado por amitraz, sus metabolitos o ambos, así como los mecanismos mediante los cuales podrían producir este efecto. Se ha descrito que el amitraz induce la CYP2E1, cuya inducción se describió como generadora de estrés oxidativo y muerte celular apoptótica. Además, el amitraz puede bloquear los receptores H_1 y se ha demostrado que los antagonistas H_1 inducen la muerte celular apoptótica en células de melanoma maligno que involucran daño en el ADN, activación de la caspasa-2 y la vía mitocondrial. Además, el amitraz podría inducir la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, aumentando los niveles celulares de Ca^{2+} y se ha establecido que la elevación anormal de Ca^{2+} conduce a la inducción de apoptosis. El amitraz también inhibe la adenilatoclasa, disminuyendo los niveles de AMP cíclico, cuya reducción puede inducir la muerte celular apoptótica. Finalmente, se describió que el amitraz genera estrés oxidativo, que es capaz de inducir la muerte celular. El

mecanismo que conduce a la muerte celular podría ser cualquiera de los anteriores o una combinación de ellos. Por otro lado, no se han desarrollado estudios para investigar si el amitraz es capaz de inducir el último tipo de muerte celular, la autofagia, que puede ser inducida por el estrés oxidativo. Se requieren más estudios para determinar la relación dosis-respuesta *in vivo* para la muerte celular, los tipos de muerte celular producidos y los mecanismos a través de los cuales amitraz, sus metabolitos o ambos podrían inducirlos. La inducción por amitraz de la muerte celular podría conducir a la disrupción endocrina, a neurotoxicidad, inmunotoxicidad, toxicidad reproductiva y del desarrollo, siendo necesarios más estudios para aclarar estas posibles implicaciones.

Disrupción endocrina

La disrupción endocrina es un mecanismo importante de toxicidad reproductiva y del desarrollo de pesticidas y xenobióticos. Los disruptores endocrinos pueden provocar sus efectos al interferir con la síntesis, el transporte, el metabolismo, la unión, la acción o la eliminación de hormonas endógenas críticas en la homeostasis, reproducción y el desarrollo.

Varios informes han descrito la capacidad del amitraz para alterar las hormonas por diferentes mecanismos. En primer lugar, se ha descrito que el amitraz altera el sistema endocrino a través de la activación del receptor α_2 -adrenérgico. En este sentido, se ha demostrado que el amitraz (30 mg/kg/día) inhibe la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina hipotalámica (GnRH) y la hormona luteinizante ovulatoria (LH) en ratas, probablemente a través de la activación del receptor α_2 -adrenérgico. Además, Young y colaboradores (2005a) estudiaron la esteroidogénesis del estradiol y la progesterona en células de granulosa luteinizadas humanas tratadas con 3.4, 34.1, 170.4 y 340 μM de amitraz durante periodos de 2 a 72 h. Estos autores observaron que la exposición a concentraciones de amitraz

desde 34.1 a 340 μM inhibió la producción de progesterona tras una exposición de 4 h, mientras que no tuvo ningún efecto sobre la producción de estrógenos. La administración conjunta de amitraz con el antagonista del receptor α_2 -adrenérgico yohimbina evitó la inhibición mediada por amitraz de la producción de progesterona, sugiriendo que este efecto está mediado por el receptor α_2 -adrenérgico. El amitraz también inhibió la producción de progesterona estimulada por gonadotropina coriónica humana (HCG), pero no la producción de estrógenos. Estos autores sugirieron que esta inhibición diferencial de la producción de progesterona, pero no de estrógenos puede deberse a una acción del amitraz sobre la enzima esteroidogénica 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa ($3\beta\text{HSD}$), que convierte la pregnenolona en progesterona porque la pregnenolona también es un precursor de la síntesis de estrógenos y la cantidad de pregnenolona convertida en progesterona depende de la actividad de esta enzima solamente. Se necesitan estudios posteriores para confirmar la alteración de la progesterona *in vivo* y la implicación de los metabolitos del amitraz en ella. Además, se ha descrito que el amitraz (1.85 mg/kg, tópicamente) suprime la liberación de insulina y aumenta la glucosa plasmática en perros, y se mostró que este efecto está mediado por receptores α_2 . Además, Chen y Hsu (1994) encontraron que el amitraz y su metabolito el BTS-27271 (0.1-10 μM) inhibe la liberación de insulina en la línea de células β de rata RINm5F de una manera dependiente de la concentración a través de la activación de receptores α_2 . Finalmente, Abu-Basha y colaboradores (1999) demostraron que el amitraz y el BTS-27271 (0.01, 0.1, 1 y 10 μM) inhiben la secreción de insulina de una manera dependiente de la concentración, pero estimulan la secreción de glucagón (10 μM y 1 μM , respectivamente) en un modelo de páncreas de rata perfundido mediado por receptores α_{2D} .

Por otra parte, la inducción de las isoenzimas del CYP450 puede reducir las concentraciones endógenas de hormonas séricas y, en consecuencia, disminuir la actividad

hormonal. Chou y colaboradores (2008) estudiaron el efecto del amitraz (25 y 50 mg/kg/día) sobre los niveles en el suero de estradiol (E2) y de testosterona (T) y sus respectivos metabolitos. Se administró amitraz por vía intraperitoneal a ratas macho durante 4 días y a ratas hembras intactas o ratas hembras ovariectomizadas (OVX) suplementadas con 0,5 mg/kg/día de E2 durante 7 días. En ratas OVX suplementadas con E2 se encontró que la dosis de 50 mg/kg/día de amitraz causó una disminución del 85% de la concentración sérica de E2 y un marcado aumento de la concentración de 2-OH-E2. El amitraz a las dosis de 25 y 50 mg/kg/día produjo un incremento de 9,0 veces o más en los niveles séricos de testosterona y 2β-OH-testosterona en los machos. El amitraz a la dosis de 25 mg/kg/día dio como resultado un aumento nulo o mínimo de la síntesis de E2 o de los metabolitos de testosterona en microsomas hepáticos. El amitraz a la dosis de 50 mg/kg/día produjo un aumento de la formación de metabolitos del E2 y la testosterona en machos y hembras intactas. Conforme a estos datos, los autores sugirieron que el amitraz induce el metabolismo hepático de E2 y testosterona en ratas macho y hembra, lo que es respaldado por un estudio previo que muestra que el amitraz es un inductor de las proteínas CYP1A, 2B y 3A en hígado de hembras de rata inmaduras. La modulación de las enzimas hepáticas P450 puede alterar el metabolismo y la eliminación de E2 o testosterona, lo que puede provocar cambios en el nivel de esteroides circulantes como se muestra en este estudio.

Por ultimo, Ueng y colaboradores (2004) investigaron el efecto del amitraz sobre la actividad estrogénica en células MCF-7, realizando pruebas de unión a receptores de estrógenos y estudios de síntesis de ADN. El tratamiento de las células de cáncer de mama humano MCF-7 con amitraz (0.1, 1 y 10 μM) antagonizó la unión del E2 al receptor de estrógeno (sin efecto, 8% y 17%, respectivamente) y el tratamiento con E2 (10 nM) no marcado desplazó el [³H] E2 del receptor en un 72%. La síntesis de ADN en las células

tratadas con amitraz (0.1 y 1 μM) sólo disminuyó (15% y 24%, respectivamente) y en células tratadas conjuntamente con amitraz (0.01, 0.1 y 1 μM) y E2 (10 nM) fue similar a las células tratadas con E2 solamente. Estos datos muestran que el amitraz es un débil antiestrógeno, pero se necesita la confirmación *in vivo* de este resultado. Estudios adicionales que utilicen ensayos más sensibles, como la activación del gen reportero *in vitro*, pueden ayudar a identificar los productos de degradación del amitraz que muestran efectos antiestrogénicos y de alteración endocrina. La relación entre la inducción de la P450 inducida por amitraz y la antiestrogenicidad aún no se ha investigado. Se necesitan estudios futuros para definir las funciones de estas enzimas P450 en la antiestrogenicidad, la relación dosis-respuesta entre la exposición al amitraz y la disrupción endocrina y los posibles efectos neurológicos, inmunológicos, reproductivos y de toxicidad sobre el desarrollo mediados por la acción de la disrupción endocrina inducida por el amitraz.

3.4. METABOLISMO

El amitraz se absorbe rápidamente, se distribuye, metaboliza y elimina principalmente a través de la orina cuando se administra por vía oral a los mamíferos. No se han descrito diferencias en las tasas ni en las rutas de excreción entre las especies y los sexos. En todas las especies estudiadas, entre el 55-74% de la dosis se excretó en la orina dentro de las primeras 24 horas tras la dosificación. Las principales rutas del metabolismo del amitraz se muestran en la Figura 9 (Knowles y Benezet, 1981; JMPR, 1998). Los productos de degradación presentes en la orina incluyen N'-[2,4-dimetilfenil]-N-metilformamida (BTS-27271), 2,4-dimetilformanilida (BTS-27919), 2,4-dimetilanilina (BTS-24868), ácido 4-formamido-3-metilbenzoico (BTS-39098), ácido 4-amino-3-metilbenzoico (BTS-28369) y varios metabolitos desconocidos. Además, el espectro de metabolitos observados fue similar en

todas las especies estudiadas. BTS-27271 y BTS-27919 son los principales metabolitos del amitraz. El metabolito 2,4-dimetilanilina es una causa de preocupación debido a que podría conducir a efectos tóxicos sobre el desarrollo y genotóxicos. Además, se ha encontrado que el metabolito BTS-27271 es más potente que el amitraz con respecto a su actividad micicida y la toxicidad de los mamíferos (). El metabolito 2,4-dimetilanilina (BTS-24868), tiene actividad metahemoglobinizante en perros y, presumiblemente, en el hombre (Jones, 1990). Los mayores niveles de residuos del amitraz en tejidos 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 y 1984b). La acción de estos metabolitos se ha descrito sólo para algunos de los mecanismos y efectos del amitraz, por lo que son necesarios más estudios para determinar su participación en el resto de mecanismos y efectos. Por otro lado, hay una falta de información sobre los niveles de amitraz y sus metabolitos que llegan a los diferentes tejidos de diferentes especies y géneros en el rango de dosis tóxicas. En este sentido, sólo hay dos estudios sobre niveles plasmáticos de amitraz, uno en ponis y ovinos tras la administración intravenosa de amitraz (Pass and Mogg, 1995) y otro en perros por vía oral (Hugnet et al., 1996), donde las dosis tóxicas plasmáticas observadas estaban entre 5 y 25 mg/l, pero no hay datos disponibles en otras especies. Con sólo esta información, una extrapolación de los resultados *in vitro* a la situación *in vivo* es muy difícil, si no imposible, por lo que se necesita una amplia gama de estudios para cubrir esta información faltante para la identificación de peligros y, por lo tanto, la evaluación de riesgos futuros de este compuesto.

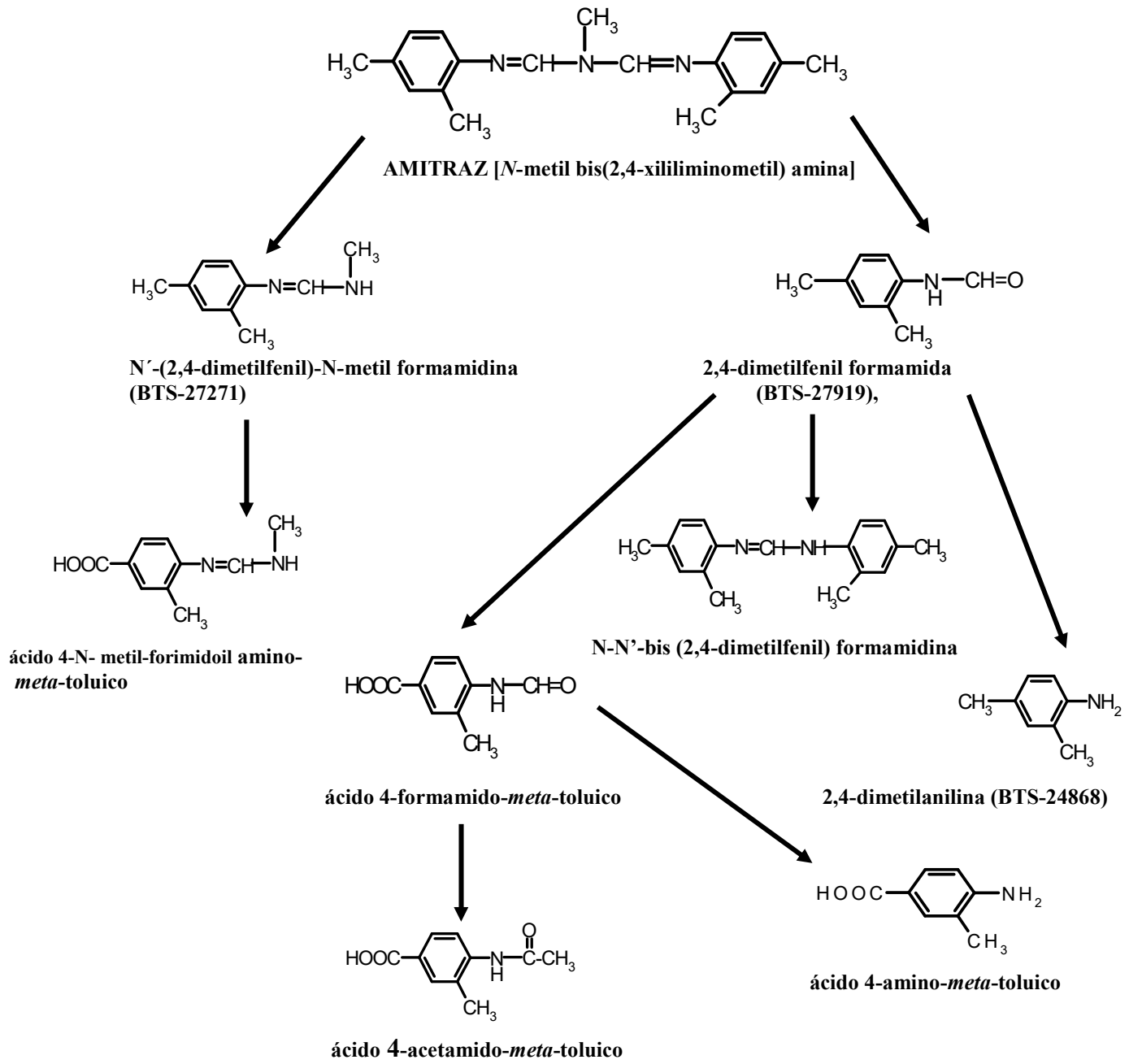


Figura 9. Metabolismo del amitraz en animales y en plantas

3.5. TOXICIDAD GENERAL

Toxicidad aguda

Diferentes agencias han evaluado la toxicidad del amitraz y determinado la dosis letal (DL₅₀) o la concentración letal (CL₅₀) por vía inhalatoria, dérmica y oral (Tabla 9), o de sus metabolitos por vía oral en diferentes especies (Tabla 10), basándose en estudios de toxicidad aguda (USEPA, 1996; JMPR, 1998). La EPA, de acuerdo a los estudios remitidos de toxicidad aguda, ha clasificado al amitraz como Clase III-ligeramente tóxico por vía oral e inhalatoria, como Clase II-moderadamente tóxico por vía dérmica y como Clase IV-no irritante dérmico y sólo ligeramente irritante para los ojos y no sensibilizante dérmico.

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 (6 h)	65 mg/m ³
Rata	Intraperitoneal	800
Cobaya	Oral	400-800
Perro	Oral	100
Conejo	Oral	100
Conejo	Dérmica	200
Babuino	Oral	100-250

Tabla 10. Toxicidad aguda de los metabolitos del amitraz

ESPECIE	VÍA	DL ₅₀ o CL ₅₀ (mg/ kg de peso o mg/m ³ aire)	REFERENCIA
N'-(2,4-dimetilfenil)-N-metil formamida (BTS-27271)			
Ratón	Oral	150	Sutton (1970a)
Rata	Oral	200	Sutton (1970b)
Perro	Oral	>20	Morgan y Williams (1974)
ácido 4-Amino-<i>meta</i>-toluoico			
Ratón	Oral	>1600	Shaw y Williams (1973a)
Rata	Oral	>1600	Shaw y Williams (1973b)
2,4-Dimetilfenil formamida (BTS-27919)			
Rata	Oral	1600	Shaw (1973)

Toxicidad subcrónica y crónica

En la Tabla 11 se resumen las toxicidades subcrónica y crónica del amitraz, datos recogidos de informes enviados a la EPA (USEPA, 1996) y la OMS (JMPR, 1998); se indican 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 Ratones: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 et al. (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	Patton 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 et al. (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 (1973)

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-dimetilfenil)-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-dimetilfenil)-N-metil formamidina (BTS-27271) grado técnico (pureza, sin especificar)</p>	<p>Administración oral: N'(2,4-dimetilfenil)-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 cardíaca, electrocardiograma, temperatura corporal, peso corporal, consumo de alimentos, bioquímica sanguínea y hematocrito, peso de los órganos o apariencia de alteración histopatológica.</p>	<p>Morgan <i>et al.</i> (1974)</p>

3.6. INMUNOTOXICIDAD

El conocimiento de los efectos del amitraz sobre el sistema inmune es muy limitado. Se ha descrito que el amitraz inhibe la prostaglandina sintetasa (5 a 80 mg/kg) que da lugar a actividad antiinflamatoria. Además, bloquea el receptor H₁ (1 y 2 mg/kg, iv) lo que podría reforzar este efecto antiinflamatorio y puede tener un efecto antialérgico debido a las respuestas alérgicas e inflamatorias mediadas por la histamina a través de los receptores H₁. El JMPR también ha probado el potencial del amitraz para causar hipersensibilidad retardada por contacto usando dos estudios no publicados. El primer estudio desarrolló un test de maximización de cobayas inyectando a los animales amitraz al 5% p/p (17 mg/kg/día) en Alembicol D (aceite de coco) en un área recortada de 4x6 cm de la piel dorsal en la región escapular. Una semana después, los animales se volvieron a tratar con una aplicación tópica de amitraz al 15 o 30% p/p (50 o 100 mg/kg/día) en Alembicol D durante 48 h. Dos semanas después, los animales se expusieron tópicamente al amitraz al 15 o 30% (50 o 100 mg/kg/día) en Alembicol D, describiendo una reacción dérmica más marcada y persistente que la observada en el grupo control a las 24, 48 y 72 h después de la prueba. El segundo estudio realizó una prueba de buehler, administrando 500 mg (417 mg/kg/día) de amitraz a cobayas en el flanco derecho anterior durante 6 h usando compresas los días 1, 8 y 15. Tras dos semanas de periodo de descanso, los animales recibieron una exposición de 500 mg de amitraz. Las reacciones cutáneas se evaluaron a las 12 y 48 h tras el tratamiento, sin describir reacciones cutáneas. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el diferente tipo de prueba utilizada, el vehículo y el tiempo de exposición, siendo necesarios más estudios para confirmar el potencial que causa la hipersensibilidad de contacto retardada de amitraz.

Recientemente, Institoris y colaboradores (2007) evaluaron los efectos del amitraz (5.29, 10.6, 21.1 y 26.5 mg/kg/día durante 4 semanas, por vía oral) sobre la respuesta inmune humoral y la inmunidad mediada por células, realizando un ensayo de células formadoras de placa (PFC) y una prueba de hipersensibilidad de tipo diferido (DTH), respectivamente. En todas las dosis ensayadas, el número de placas formadas no cambió, pero a la dosis más alta el número de células del bazo de los animales inmunizados con glóbulos rojos de oveja (SRBC) se redujo significativamente. Como consecuencia, el contenido de PFC del bazo también se redujo a esta dosis. Estos datos sugieren una falta de efectos sobre la respuesta inmune humoral por amitraz. Por otra parte, las dos dosis más altas ensayadas redujeron el máximo y acortaron la disminución de la reacción de DTH, pero la diferencia fue estadísticamente significativa sólo a la dosis más alta ensayada, lo que sugiere que el amitraz afecta la inmunidad mediada por células. En base a estos hallazgos, la dosis más baja de efecto adverso observable (LOAEL) para la función inmune fue de 26.5 mg/kg/día.

Sin embargo, el sistema endocrino y nervioso participan en la regulación del sistema inmune y sus alteraciones pueden llevar a la inmunotoxicidad. El amitraz puede alterar los neurotransmisores monoaminérgicos que regulan varias funciones de las actividades del sistema inmune, tales como la proliferación, la actividad citolítica, la liberación de citocinas y anticuerpos, y la quimiotaxis. Por lo tanto, un aumento de sus niveles podría inhibir la actividad citotóxica de las células T, aumentar la movilidad y la proliferación de linfocitos, la fagocitosis, las propiedades citolíticas y la síntesis de quimiocinas y citocinas.

Además, como se comentó anteriormente, el amitraz presenta efectos disruptores endocrinos tales como la inhibición de la liberación de la GnRH y el aumento de la LH que modula el sistema inmune y su alteración puede desempeñar un papel en las enfermedades

mediadas por el sistema inmune. También, altera las hormonas sexuales progesterona, E2 y testosterona, que pueden influir en las diferentes células efectoras del sistema inmune, modulando su respuesta coordinada. De esta forma, se ha descrito que el estrógeno aumenta la respuesta inmune, mientras que la progesterona y los andrógenos lo disminuyen. La exposición a la testosterona reduce la actividad de las células asesinas naturales (NK) y aumenta la síntesis de productos proinflamatorios y citoquinas antiinflamatorias. El E2 puede tener efectos bipotenciales sobre las respuestas inflamatorias, de tal forma que a dosis bajas que mejoran la producción de citoquinas proinflamatorias y respuestas Th1 y mientras que a concentraciones altas o sostenidas reducen la producción de citoquinas proinflamatorias y aumentan las respuestas Th2 y la inmunidad humoral. La progesterona suprime las respuestas del sistema inmune innato, incluida la actividad de los macrófagos y las células NK, así como las transducción de señales mediadas por el factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de las células B activadas (NF- κ B).

Por último, el amitraz suprime la liberación de insulina, pero estimula la secreción de glucagón que está involucrado en forma opuesta a la respuesta inflamatoria. La insulina es una hormona proinflamatoria cuya falta de acción se ha relacionado con la inmunosupresión en la diabetes. Las alteraciones observadas en la enfermedad de la diabetes incluyen la disminución de las interacciones leucocito-endoteliales y reducción de la acumulación de leucocitos en las lesiones inflamatorias, reducción de la degranulación de los mastocitos, reducción de la inflamación de las vías respiratorias por la exposición al antígeno y reducción de la capacidad de retención de los ganglios linfáticos. Estas hormonas también pueden inducir anomalías inmunológicas y/o alteraciones en los órganos linfáticos. De acuerdo con estos efectos disruptores endocrinos comentados anteriormente, el amitraz podría inducir inmunosupresión, siendo importante evaluar sus posibles efectos sobre la inmunidad celular y humoral.

En resumen, el amitraz tiene actividad antiinflamatoria y parece tener inmunotoxicidad mediada por células y puede causar hipersensibilidad de contacto retardada, pero se necesitan más estudios para confirmar estos resultados, explorar si la alteración endocrina y los efectos neurotóxicos podrían afectar la respuesta inmune y dilucidar los posibles mecanismos mediante los cuales el amitraz, sus metabolitos o ambos inducen inmunotoxicidad, a fin de realizar una identificación de riesgo completa y, por lo tanto, una evaluación de riesgo exhaustiva de este compuesto.

3.7. GENOTOXICIDAD

Los posibles efectos genotóxicos del amitraz y sus metabolitos se han examinado utilizando estudios *in vitro* e *in vivo* no publicados. JMPR (1998) y EPA (1996) evaluaron el potencial genotóxico del amitraz y sus metabolitos usando el ensayo de mutación génica en *Salmonella* (prueba de Ames), el ensayo mediado por el huésped, el ensayo de linfoma de ratón L5178Y, pruebas de aberraciones cromosómicas *in vitro* e *in vivo*, el ensayo letal dominante de ratón para el daño del ADN y las pruebas de transformación morfológica celular (Tablas 13 y 14). Según estos estudios, el amitraz no mostró una inducción de aberraciones cromosómicas estructurales o daños en el ADN, por lo tanto, se consideró que no presentaba potencial genotóxico, mientras que la 2,4-dimetilanilina fue positiva en dichos ensayos. Los resultados analizados que concluyeron que el amitraz no es directamente mutágeno son contradictorios, observándose efectos mutágenos tanto positivos como negativos. Además, algunos de estos estudios tienen deficiencias y se consideran inaceptables según las directrices de FIFRA para fines regulatorios. En este sentido, algunos ensayos de mutación genética mostraron documentación insuficiente para respaldar los hallazgos, así como documentación inadecuada y/o datos imprecisos. Además, algunos de los estudios de aberración cromosómica *in vivo* no presentaron justificación para la selección de la dosis, la

falta de datos en hembras, los tiempos de muestreo eran inadecuados, los criterios de puntuación incorrectos, la pureza del artículo de prueba no se indicaba, falta de análisis de la solución dosificadora y un número inadecuado de hembras por grupo. También, algunas pruebas de daño sobre el ADN tenían una documentación incompleta sobre los procedimientos desarrollados y ninguna indicación de la pureza del producto de ensayo. De acuerdo con estas deficiencias, se requieren más estudios para aclarar el potencial genotóxico del amitraz, no siendo descartable un efecto mutágeno directo. De forma similar a estas evaluaciones, Kimmel y colaboradores (1986) demostraron efectos mutagénicos sólo para la 2,4-dimetilanilina en la prueba de Ames, pero no para el amitraz, y Grilli y colaboradores (1991) describieron que el amitraz no pudo inducir rupturas de cadenas de ADN en hepatocitos de rata.

Tabla 13. 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 vía intubación intragástrica durante 5 días	No descrito	Negativo
	Mutación letal dominante	Ratón macho CFLP	0, 12, 50 mg/animal vía intubación intragástrica durante 5 días	No descrito	Negativo

S9, 9000xg de fracción microsomal de hígado de roedor

Tabla 14. 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 et al. (1983a)	
Lesión de ADN	Fibroblastos pulmonares de células de hámster chino V79	0,03-3,0 mmol/L ±S9	Negativo	Petzold et al. (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 et al. (1983b)	
Lesión de ADN	Fibroblastos pulmonares de células de hámster chino V79	0,01-1,0 mmol/L ±S9	Negativo	Petzold et al. (1977)	
In vitro	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 et al. (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 et al. (1977)
	In vivo	2,4-Dimetilanilina (BTS-24868)			
Formación de micronúcleos		Hueso medular de ratón	56, 113, 225 mg/kg p.c., dos veces, separadas 24h	Negativo	Hounsell y Walker (1983)

Posteriormente, Osano y colaboradores (2002a) utilizaron la prueba de genotoxicidad Mutatox, que determina sustancias que dañan o se intercalan en el ADN, que inhiben la síntesis de nuevo ADN, que son mutágenos directos que causan sustitución de bases o cambios de marco de lectura o que son agentes inductores de ERO, para evaluar la genotoxicidad del amitraz y su metabolito la 2,4-dimetilanilina, demostrando que ambos eran genotóxicos a concentraciones muy bajas ($<5 \mu\text{M} \approx 1,5 \mu\text{g/ml}$) en la prueba directa, por lo que deberían considerarse genotóxicos potenciales capaces de alterar las funciones génicas. Estos resultados contrastan con los resultados previos. Es posible que estos compuestos proporcionen modificaciones al ADN que nunca conducen a eventos mutagénicos en la prueba de Ames o que la prueba de Mutatox dependa de eventos reguladores en el Vibrio que

difieren de la dosis en Salmonella.

Recientemente, Padula y colaboradores (2012) describieron que el amitraz es capaz de inducir daño al ADN y apoptosis *in vitro* en células de mamíferos a las concentraciones evaluadas de 5.3 y 12.8 μM , y Radakovic y colaboradores (2013) evaluaron respuestas *in vitro* de linfocitos humanos después del tratamiento con diferentes concentraciones de amitraz (0.12, 1.2, 12, 120, 1200 μM) mediante el ensayo Cometa. Los resultados muestran que todas las concentraciones seleccionadas de amitraz indujeron un aumento significativo en el nivel de daño en el ADN en comparación con el control negativo y también mostraron que la catalasa antioxidante redujo significativamente el daño en el ADN causado por amitraz. Estos resultados indicaron la participación de radicales libres en los efectos dañinos sobre el ADN. Las ERO inducen casi todas las formas de daño en el ADN, incluyendo modificaciones de las bases de nucleótidos, aberraciones cromosómicas, roturas de cadenas y enlaces cruzados de proteínas de ADN. En este sentido, se ha descrito que la inducción de isoenzimas CYP450 mediaba la generación de ERO y que transformaban los compuestos parentales en agentes mutagénicos como el metabolito 2,4-dimetilanilina del amitraz, lo que sugiere que el daño inducido en el ADN por el amitraz podría ser mediado por la CYP450.

Los mecanismos a través de los cuales el amitraz y sus metabolitos pueden inducir daño sobre el ADN aún no se han identificado y se necesitan más datos experimentales para dilucidar todos los posibles mecanismos que subyacen a los efectos genotóxicos del amitraz. Según los últimos resultados, el amitraz podría inducir mutación y daño en el ADN que no fueron considerados en la identificación del peligro y, por lo tanto, en la evaluación del riesgo de este compuesto, lo que constituye una subestimación del riesgo del compuesto. La posibilidad de la permanencia de residuos en animales destinados al consumo humano o para

los trabajadores que usan amitraz destaca la importancia de una nueva evaluación de riesgos para amitraz teniendo en cuenta su efecto genotóxico.

3.8. CARCINOGENESIS

El amitraz fue clasificado por la EPA en 1991 como carcinógeno del Grupo C, "posiblemente carcinógeno para los humanos", basado en la detección combinada de adenomas y carcinomas hepatocelulares en ratones hembra B6C3F1 (Tabla 15). Se calculó que el potencial máximo carcinógeno para el amitraz (Q1, cuantificado utilizando el modelo de riesgo de cáncer) fue de 5×10^{-2} (mg/kg/día)⁻¹. Posteriormente, el Comité de Revisión de la Evaluación del Riesgo de Cáncer (CARC) de la EPA (1996) recomendó que se clasificara el amitraz como "Posible evidencia de carcinogenicidad". El CARC completó una reevaluación del amitraz (memorando titulado Reevaluación de la carcinogenicidad de Amitraz, del 6 de julio de 2006), a la luz de las Directrices para el cáncer de 2005 y el documento de orientación provisional de CARC de 2003 (n.º G2003.02) para la selección de dosis. Con base en esta reevaluación, el CARC recomendó que el amitraz se clasificara como "Evidencia sugestiva de carcinogenicidad" no cuantificable por los motivos que se describen a continuación:

- Sin respuesta tumoral en rata.
- La única respuesta tumoral en ratones se encontró con la dosis más alta evaluada (400 ppm).
- Se encontró respuesta tumoral en hígado y pulmón en ratones, que son tumores espontáneos comunes en ratones.
- El amitraz no es mutagénico, aunque forma un metabolito 2,4-dimetilanilina que es mutagénico *in vitro*.
- El amitraz es estructuralmente similar al clordimeformo, otro pesticida formamidínico,

que se ha informado que es cancerígeno en ratones.

Tabla 15. Efectos carcinógenos del amitraz.

Ensayos		Resultados	Referencia
Duración: 80 semanas Ratones: CFLP Grupos de 50 ratones macho y 50 ratones hembra Amitraz grado técnico (pureza, no especificada)	Dieta conteniendo 0; 25; 100; y 400 ppm (equivalente a 0; 3,75; 15; y 60 mg/kg p.c./día)	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 NOAEL sistémico: 3,75 mg/kg p.c./día	BURNETT <i>et al.</i> (1976); KAKUK (1979)
Duración: 2 años Ratas: B6C3F1 Grupos de 75 ratas macho y 75 ratas hembra, ambos de 33 días de edad Amitraz grado técnico (pureza, 97,9%)	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)	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. NOAEL sistémico: 2,3 mg/kg p.c./ día basándose en: Hiperqueratosis en el estómago Hematopoyesis en el bazo Alteraciones del hígado (nódulos, focos telangiectásicos y basofílicos)	COLLEY <i>et al.</i> (1983)
Duración: 2 años Ratas: Wistar Grupos de 12 ratones macho y 12 ratones hembra Amitraz grado técnico (pureza, 97,8%)	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)	No se observó en el estudio efectos de carcinogenicidad. NOAEL sistémico: 0,97 mg/kg p.c./día en hembras y 0,77 mg/kg p.c./día en machos 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 (↓) ganancia de peso	SUTTON y OFFER (1973)

Los mecanismos por los cuales el amitraz podría inducir tumores no están totalmente dilucidados. El amitraz ha demostrado un potencial antiestrogénico débil, por lo que es difícil que pueda inducir tumores a través de una acción similar a la promoción tumoral, por lo que

probablemente estaría mediada por la actividad genotóxica del amitraz o sus metabolitos. Sin embargo, no se pueden descartar otros mecanismos. En este sentido, el amitraz induce isoenzimas del CYP450, que están involucradas en la biotransformación de importantes procarcinógenos a carcinógenos, y en la generación de estrés oxidativo, siendo la última ampliamente aceptada como un importante contribuyente a la carcinogénesis. Se necesitan más estudios para aclarar los mecanismos por los que amitraz, sus metabolitos o ambos inducen carcinogenicidad. Además, teniendo en cuenta los datos recientes, el amitraz podría ser mutagénico y genotóxico, por lo que es importante desarrollar más estudios sobre sus efectos carcinogénicos para aclarar su potencial carcinogénico y si es necesario, reconsiderar su clasificación, así como una nueva evaluación de riesgo de carcinogenicidad por amitraz.

3.9. NEUROTOXICIDAD

Amitraz induce efectos tóxicos sobre el sistema nervioso periférico y es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (BBB), lo que también induce toxicidad en el sistema nervioso central (SNC). Los efectos neurotóxicos observados por la exposición a amitraz son midriasis, vómitos, depresión del sistema nervioso central, sedación, pérdida del reflejo de enderezamiento, incoordinación motora, coma, así como efectos conductuales como hiperreactividad a estímulos externos, agresividad y efectos neuroquímicos, entre otros. Sin embargo, el mecanismo a través del cual se median algunos de estos efectos es desconocido en parte o por completo.

El amitraz, como se ha descrito en apartados previos, altera las hormonas sexuales, la insulina, el glucagón y la PGE₂. En este sentido, las hormonas sexuales esteroideas (estrógeno, progesterona y testosterona) son moduladores importantes de la función cerebral de los mamíferos, regulando la actividad neuronal y el comportamiento. Además, se ha

demostrado que la PGE₂ presenta múltiples funciones en el sistema nervioso, incluido su papel regulador sobre la fiebre, el dolor, la inflamación, el sueño, la regulación de la excitabilidad de la membrana, el comportamiento sexual y la transmisión, integración y plasticidad sináptica. Estudios recientes han confirmado que los niveles basales endógenos de PGE₂ son necesarios para el mantenimiento de la plasticidad sináptica y la adquisición de la memoria. Además, se ha descrito que la insulina modula la despolarización neuronal mediante acciones en los canales K_{ATP}, altera la plasticidad sináptica y modula los procesos cognitivos, por lo tanto, la falta de insulina o la resistencia a la misma se asocia con déficits cognitivos. También, se ha demostrado que el estradiol y la progesterona mejoran los resultados en modelos animales de enfermedades, incluida la lesión cerebral traumática, isquemia, lesión de la médula espinal, lesión del nervio periférico, de enfermedad mielínica, trastornos neuromusculares y convulsiones, a través de la reducción del edema, la mejora de la supervivencia neuronal y la modulación de la inflamación y la apoptosis. La alteración endocrina, inducida por el amitraz, de estas hormonas podría mediar algunas de las alteraciones conductuales y cognitivas observadas.

Según la literatura, el amitraz induce varios de sus efectos neurotóxicos principalmente a través de la activación de receptores alfa-adrenérgicos, específicamente receptores α_2 -adrenérgicos. Las hormonas sexuales regulan la expresión y la actividad de estos receptores. En este sentido, se ha descrito que la testosterona regula positivamente la expresión de los receptores adrenérgicos α_1 (Tsang et al., 2008) y α_2 (Dygal et al., 2002; Flugge et al., 2001). Además, se ha demostrado que los estrógenos aumentan la densidad del adrenoceptor α_1 , pero disminuyen la afinidad sobre su ligando, mientras que la progesterona disminuye la densidad de los mismos, pero los sitios de unión disponibles aumentan su afinidad. También se ha descrito que el estradiol aumenta la expresión del receptor α_2 adrenérgico, mientras que la

progesterona la disminuye y desensibiliza los receptores adrenérgicos $\alpha_{2A/D}$ presinápticos. La alteración endocrina inducida por el amitraz sobre estas hormonas podría afectar a la expresión y la actividad de estos receptores, lo cual podría contribuir a la inducción de los efectos neurotóxicos descritos. Además, las hormonas también regulan la expresión de otros receptores de neurotransmisores que también podrían contribuir a los efectos neurotóxicos. En este sentido, se ha descrito que el tratamiento con estradiol en combinación con progesterona aumenta el ARNm del receptor 5-HT_{2A} en el hipocampo ventral en ratas hembra y disminuye la expresión del transportador de recaptación de serotonina y el ARNm del autorreceptor 5-HT_{1A} en el núcleo dorsal del rafe (NDR) de macacos ovariectomizados. Además, el estradiol disminuye la expresión génica del receptor 5-HT_{2C} en el hipocampo ventral en ratas hembra. También se ha demostrado que la progesterona aumenta la expresión del transportador de serotonina, de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}, y puede actuar sobre receptores de neurotransmisores como el receptor GABA-A. También se ha demostrado que la insulina modula el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), el receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los receptores de GABA.

Por otro lado, existe controversia sobre los mecanismos por los cuales el amitraz ejerce efectos neurotóxicos tales como la reducción de la actividad motora, la agresividad y la inducción de convulsiones. En ratas, dosis bajas a intermedias de amitraz (6.25-25 mg/kg/día) mostraron una disminución en la actividad motora. Altas dosis de amitraz (50-100 mg/kg/día) afectaron a la amplitud de los potenciales evocados y disminuyeron el peso corporal y la temperatura corporal de las ratas tratadas. Además, a dosis superiores a 100 mg/kg/día se produjo agresividad e inhibición de la MAO. Por lo tanto, la inhibición de MAO no sería el mecanismo principal involucrado en las alteraciones de la actividad motora causadas por amitraz. Según Moser y MacPhail (1989, 1986), los efectos motores podrían ser causados por

la acción de amitraz sobre el receptor α_2 -adrenérgico, debido a que el rango de dosis que produce la inhibición de la MAO es mucho más alto que la que suprime la actividad motora. Sin embargo, Florio y colaboradores (1993) describieron que los efectos del amitraz sobre la actividad motora fueron consecuencia de la inhibición de la MAO en el SNC, una acción que podría ser responsable del aumento de los niveles de catecolaminas, aunque estos efectos se observaron a la dosis de 100 mg/kg/día. En este sentido, Del Pino y colaboradores (2013) evaluaron los efectos de la exposición oral de amitraz (20, 50 y 80 mg / kg / día, 5 días) sobre los niveles de monoaminas en la región del cerebro de las ratas macho a los 30 y 60 días de edad. El amitraz causó cambios en los niveles de los neurotransmisores NA, DA y 5-HT y sus metabolitos diferenciados en función de la región, dosis y edad. En las regiones cerebrales (hipotálamo, mesencéfalo, hipocampo, cuerpo estriado y córtex prefrontal) estudiadas, el amitraz indujo un aumento estadísticamente significativo en el contenido de 5-HT, NA y DA y una disminución estadísticamente significativa en los niveles de sus metabolitos ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA), 3-metoxi-4-hidroxifenil-etilenglicol (MHPG), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y de ácido homovanílico (HVA), respectivamente, con interacción por edad, excepto en el aumento de NA en la corteza prefrontal y el hipocampo, en la disminución de 5-HIAA en el mesencéfalo y en la disminución de DOPAC en el hipotálamo y el cuerpo estriado que no presentaron dicha interacción. Además, el amitraz provocó una disminución estadísticamente significativa en la tasa de recambio de 5-HT, NA y DA en las regiones cerebrales estudiadas.

Estos hallazgos concuerdan con los datos descritos por Florio y colaboradores (1993), que observaron que el amitraz a la dosis de 100 mg/kg aumentó los niveles de NA y DA en el hipotálamo y el estriado, respectivamente, y disminuyeron los niveles de HVA en el estriado, lo que sugiere que los efectos sobre la actividad motora podrían estar relacionados con un aumento de los niveles de monoaminas probablemente por la inhibición de la MAO. En este

sentido, se ha sugerido que la actividad de la MAO-B aumenta en todo el cerebro de las ratas envejecidas, mientras que la MAO-A no cambia con la edad, por lo que el aumento del efecto observado puede estar relacionado con el aumento con la edad de la actividad MAO-B. Sin embargo, en relación con la edad de los animales, el amitraz no produjo su efecto en todas las regiones estudiadas para todos los neurotransmisores, lo que sugiere que podrían estar presentes otros mecanismos de acción, diferentes del efecto inhibitor de la MAO.

Alternativamente, los cambios en los niveles de NE, DA y 5-HT y sus metabolitos, en función de la región, dosis y edad observados en ratas podrían atribuirse también a un posible efecto del amitraz sobre las hormonas esteroides sexuales que modulan la expresión de enzimas tales como tirosina hidroxilasa (TH), dopamina- β -hidroxilasa (BDH), triptófano hidroxilasa (TRH), MAO, catecol-O-metiltransferasa (COMT), aldehído deshidrogenasa (AD) y aldehído reductasa (AR) requeridas para la síntesis y el metabolismo de estos neurotransmisores (Donner y Handa, 2009; Thiblin et al., 1999). En este contexto, el amitraz, posiblemente a través de la disrupción de la hormona T, podría mediar este efecto. Sin embargo, la testosterona en el SNC podría ser metabolizada a E2 por la aromatasa o la dihidrotestosterona (DHT) por las enzimas reductasa de una manera específica en función de la región (Castelli et al., 2013; Zhao et al., 2008), por esta razón el efecto final del amitraz podría ser mediado no sólo por cambios de T, sino también a través de E2 o DHT. Apoyando esta hipótesis, Del Pino y colaboradores (2011) demostraron que la exposición materna a amitraz (20 mg/kg/día, por vía oral los días 6-21 de embarazo y 1-10 de lactancia) afectó a los niveles de monoaminas en regiones cerebrales de ratas macho y hembras descendientes a los 60 días de edad, que muestran una interacción sexual cuyo efecto podría estar mediado por una alteración en los niveles de hormonas esteroideas sexuales.

Por otra parte, la agresividad inducida por el amitraz podría estar relacionada con su actividad de inhibición de la MAO. En este sentido, se ha descrito que niveles bajos de MAO en el cerebro resultan en una mayor predisposición a la agresividad. Se observó que los ratones knock-out (KO) para la MAO-A exhibían una serie de fenotipos aberrantes que incluyen altas concentraciones cerebrales de 5-HT y NA, alteraciones morfológicas en la corteza sensorimotora, agresión reactiva marcada, reactividad inadaptada a las señales ambientales y respuestas relacionadas con el autismo (Godar et al., 2014; Bortolato et al., 2013). Además, se ha descrito que los ratones deficientes en el subtipo EP1 del receptor de la prostaglandina manifiestan desinhibición del comportamiento, incluida la agresión impulsiva con interacción social defectuosa, evitación y una respuesta de sobresalto acústica exagerada (Matsuoka et al., 2005). Por lo tanto, la inhibición de la síntesis de PGE2 podría perjudicar la actividad de este receptor que podría contribuir al comportamiento agresivo. Además, Al-Thani y colaboradores (2003) mostraron una disminución en el peso de las glándulas prepuciales en ratones suizos machos adultos expuestos a amitraz a un nivel de dosis de 40 ppm (equivalente a aproximadamente 5,4 mg/kg/día) durante 12 semanas. Las glándulas prepuciales producen feromonas moduladoras del comportamiento que alteran los comportamientos de combate y otros comportamientos en roedores (Thompson et al., 2008; Brain et al., 1983). Este también sería un mecanismo posible a través del cual el amitraz podría alterar el comportamiento, siendo necesarios más estudios para dilucidar los efectos del amitraz sobre la producción de feromonas y sus efectos sobre el comportamiento.

Finalmente, Gilbert (1988) describió que el amitraz (50 mg/kg/día) fue capaz de inducir convulsiones en ratas macho Long-Evans que podrían estar mediadas por un efecto agonista adrenérgico alfa-2 y/o propiedades similares a los anestésicos locales de estos compuestos. Posteriormente, Gilbert y Mack (1989) mostraron que ambos mecanismos están

implicados en la inducción de convulsiones. Sin embargo, otros mecanismos además de los descritos podrían estar implicados en las convulsiones inducidas por amitraz. En este sentido, la inhibición del receptor histamínico H₁ también se ha relacionado en la inducción de convulsiones (Yokoyama et al.,1993; Swiader et al, 2004). También, se ha descrito que la inducción de convulsiones está relacionada con disfunciones en los sistemas GABAérgicos y glutamatérgicos, los canales de sodio, potasio y calcio dependientes de voltaje (Lason et al., 2013). Se necesitan más estudios para aclarar la implicación del amitraz en la inducción de convulsiones a través de una alteración de estos sistemas de neurotransmisores y canales de iones dependientes de voltaje.

Tomados en su conjunto, amitraz y sus metabolitos pueden ejercer neurotoxicidad principalmente a través de una combinación de inhibición de la MAO, actividad agonista alfa-adrenérgica, inhibición del receptor de histamina H₁, inhibición de la síntesis de PGE₂ y alteraciones de las hormonas sexuales, entre otros mecanismos. Se requieren más estudios para dilucidar las contribuciones relativas de estos mecanismos y la participación de los metabolitos en los efectos neurotóxicos del amitraz. La información con respecto a los niveles de hormonas esteroideas sexuales y a la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis y metabolismo de neurotransmisores monoaminérgicos en las diferentes regiones del SNC de ratas macho y hembra después de la exposición al amitraz sería necesaria para evaluar la implicación de la acción disruptora endocrina del amitraz en su efectos neurotóxicos. Además, aunque se han descrito efectos neurotóxicos agudos y crónicos en animales, sólo hay información sobre efectos neurotóxicos agudos en humanos. Este punto es importante debido al hecho de que la dosis de referencia (DR) y la dosis de población ajustada (PAD) se han calculado a partir de los valores NOAEL de datos de neurotoxicidad aguda en humanos (USEPA, 2006), pero como se ha observado en estudios en animales las dosis que producen

efectos neurotóxicos crónicos podrían ser más bajas que aquellas a partir de las cuales se producen efectos neurotóxicos agudos. Por lo tanto, estos niveles de exposición no podrían cubrir el riesgo de efecto neurotóxico crónico en la población. Esto es especialmente importante en los productores, manipuladores y aplicadores, así como en las poblaciones que viven en áreas cercanas a su uso porque los valores de seguridad podrían excederse si no se siguen las medidas de seguridad sugeridas. Por lo tanto, se requieren más estudios para confirmar este punto, para hacer una identificación completa de los peligros y si es necesario, reevaluar los niveles seguros de exposición para toda la población y hacer una evaluación de riesgos exhaustiva.

3.10. TOXICIDAD REPRODUCTIVA Y DEL DESARROLLO

3.10.1. TOXICIDAD REPRODUCTIVA

Varios estudios no publicados han sido utilizados por el JMPR (1998) y la USEPA (1996) para evaluar el efecto reproductivo del amitraz en ratas y ratones. En ratas, la exposición a amitraz se asoció con un aumento en el porcentaje de muertes y un estro prolongado. En ratones, la exposición a amitraz se asoció con una disminución en el consumo de alimentos, una disminución en el peso corporal, una prolongación del pro-estro y un acortamiento del diestro. Los niveles sin efectos adversos observables (NOAEL) propuestos para los efectos reproductivos (1,47 mg/kg/día/hombre y 1,69 mg/kg/día/mujer) fueron inferiores a los fijados para los NOAELs por toxicidad sistémica (4,84 mg/kg/día/hombre y 5,22 mg/kg/día/hembra). Estos estudios no cumplían con los requisitos establecidos por la Directriz 83-4 (Toxicidad reproductiva) de la EPA debido a deficiencias técnicas en su desarrollo por lo que eran inaceptables para fines regulatorios para la EPA (USEPA, 1996, 2006 y 2013) por lo que dicha evaluación requiere confirmación a través de la realización de

estudios sobre los posibles efectos de neurotoxicidad en el desarrollo y de toxicidad reproductiva del amitraz en ratas.

Recientemente, Al-Thani y colaboradores (2003) estudiaron el efecto del amitraz sobre la reproducción y la fertilidad en ratones Swiss machos adultos expuestos a través de agua potable a dosis de 0, 1.5, 3 y 6 mg/kg/día durante 12 semanas. Describieron que el amitraz a la dosis de 1,5 mg/kg/día produjo una disminución en el índice de fertilidad, la producción de esperma, el número de fetos viables y un aumento en la pérdida posterior a la implantación en ratones. También mostraron una disminución en el peso de las glándulas prepuciales, los testículos y el epidídimo, lo que podría estar relacionado con las disminuciones significativas en los recuentos de espermatozoides. La tasa de embarazo se redujo significativamente en las hembras preñadas por los machos evaluados, lo que podría estar relacionado con la reducción significativa en el recuento de espermatozoides y/o la mala calidad del semen. Además, la disminución significativa descrita en el aumento de peso corporal en los machos evaluados indica toxicidad general, lo cual podría haber afectado de forma indirecta en lugar de tener un efecto específico sobre la fertilidad.

Finalmente, Lim y colaboradores (2010) evaluaron los efectos del amitraz sobre el desarrollo y los parámetros reproductivos en ratas siguiendo la Guía de ensayo 421 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). El amitraz se administró a través de agua potable a dosis de 0, 1.5, 4.5 y 13 mg/kg/día a ratas macho desde 2 semanas antes del apareamiento hasta 14 días desde el final del período de apareamiento y a las hembras desde 2 semanas antes del apareamiento, durante el apareamiento, la gestación y hasta el día de lactancia 4. Observaron una disminución en el consumo de alimentos a la dosis de 4.5 mg/kg/día; la toxicidad materna en ratas se observó a la dosis de 13 mg/kg/día y la disminución del peso de la vesícula seminal, la motilidad de los espermatozoides y el número

de crías vivas y un aumento en la pérdida posterior a la implantación. Sin embargo, no se observaron efectos adversos por exposición al amitraz en los índices de apareamiento, fertilidad, embarazo y el tiempo precoital. Bajo estas condiciones experimentales, fijaron el NOAEL para la toxicidad general y de reproducción/ desarrollo a la dosis de 4.5 mg/kg/día. Existen discrepancias entre los estudios de Al-Thani y colaboradores (2003) y Lim y colaboradores (2010), que muestran que los ratones son más sensibles a la toxicidad por amitraz que las ratas. Según los valores DL₅₀, las ratas son más sensibles a la toxicidad por amitraz que los ratones, pero con respecto a su metabolito BTS-27271 esta sensibilidad se invierte, lo que sugiere que este metabolito podría estar más implicado en los efectos tóxicos para la reproducción que el amitraz. Además, estas discrepancias pueden explicarse por las diferencias en las especies animales, el metabolismo y los mecanismos que controlan la reproducción, la forma de dosificación y el protocolo utilizado para evaluar la toxicidad para la reproducción.

Según estos estudios, el amitraz puede tener efectos graves en la fertilidad y la reproducción. El mecanismo por el cual amitraz induce estos efectos podría estar mediado por su acción sobre los sistemas monoamínicos, la disrupción endocrina y la genotoxicidad, entre otros. Los sistemas de monoaminas participan en la regulación del comportamiento sexual, la ovulación y el implante entre otras funciones reproductivas, y una alteración en los niveles de neurotransmisores de monoaminas podría alterar la reproducción. En este sentido, se ha descrito que la administración de inhibidores de la MAO a ratas hembra aumenta la aparición de embriones degenerados o de desarrollo alterado, lo que demuestra que las catecolaminas y la serotonina pueden tener un impacto negativo en el desarrollo previo a la implantación (Mihalik et al. 2008; Mihalik et al. 2010). Además, el tratamiento con inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) durante el embarazo indica efectos potencialmente

peligrosos sobre la fertilidad y el desarrollo prenatal (Hemels et al., 2005; Wogelius et al., 2006). La exposición del embrión a serotonina o al agonista específico del receptor 5-HT_{1D}, sumatriptán, se ha descrito que perjudica el desarrollo preimplantatorio (Vesela et al., 2003; Il'kova et al., 2004). También, el tratamiento con los agonistas α_2 -adrenérgicos de embriones de ratones *in vitro* redujeron significativamente la proporción de embriones que alcanzaron estadios de desarrollo más altos y el número medio de células embrionarias fue significativamente menor (Cikos et al., 2005 y 2007).

Además, las hormonas esteroídicas como la progesterona y el estradiol, así como las gonadotropinas, están fundamentalmente involucradas en la regulación del comportamiento sexual femenino, el ciclo menstrual y el establecimiento y mantenimiento del embarazo (Schumacher et al., 2014; Richards y Pangas, 2010). Tanto el estradiol como la progesterona son necesarios para apoyar la implantación (Huet-Hudson et al., 1989; Lim et al., 1997). Alteraciones en este equilibrio pueden resultar en fallo de implantación. Además, como se comentó anteriormente, los esteroides sexuales afectan la expresión y actividad de los receptores α_1 -adrenérgicos que coordinan la expresión de los comportamientos reproductivos femeninos y el aumento de la LH (Etgen, A.M. 2003), o controlan la fertilidad masculina, la espermatogénesis y la capacidad esteroideogénica de las células de Leydig (Mhaouty-Kodja et al., 2007). Por lo tanto, su alteración por disrupción endocrina podría afectar estas acciones.

Las prostaglandinas (PG), también se consideran mediadores muy importantes para la regulación de los procesos reproductivos femeninos (Algire et al., J.E., 1992; Nuttinck et al., 2002). Se han implicado en la coordinación de la función ovárica, particularmente en la ovulación y la implantación. De esta forma, la PGE₂ parece ser una de las diferentes señales locales dentro del folículo que actúa para coordinar la maduración del ovocito con el

momento de la ruptura del folículo, asegurando la liberación de un ovocito óptimamente maduro en la ovulación (Duffy et al. 2010), estimula la síntesis de progesterona para regular la ovulación (Michael et al.,1993; Chandras et al., 2007) y es necesaria para la implantación embrionaria (Ruan et al., 2012; Toda et al., 2012). Además, la PGE2 participa en la fertilidad masculina (Toda et al., 2012) regulando la concentración de esperma (Kobayashi et al., 2013) y la motilidad de los espermatozoides (Reichard et al., 1978; Kennedy et al., 2003) Según estos estudios, la inhibición de las prostaglandinas inducida por amitraz podría ser uno de los mecanismos implicados en la toxicidad reproductiva.

Por último, se ha descrito que la histamina ejerce efectos sobre las funciones reproductivas femeninas desempeñando un papel en la esteroidogénesis, estimulando la secreción de progesterona y estradiol en células granulosas, en procesos de desarrollo folicular, ovulación e implantes (Kathpalia y Parshad, 1990; Liu et al., 2004; Paczoska-Eliasiewicz y Rzasa, 1998; Brandon y Wallis, 1977) La señalización del receptor H₁ media el efecto estimulante de la histamina en la implantación, siendo bloqueado por antagonistas H₁ (Liu et al., 2004). Además, se ha descrito que la histamina desempeña un papel en la erección del pene (Cara et al. 1995), estimula la esteroidogénesis y potencia los efectos de la LH en el parénquima testicular (Mayerhofer et al., 1989). El efecto antagonista del amitraz sobre el receptor H₁ podría también contribuir a los efectos de toxicidad reproductiva observados. Además, se ha descrito que la insulina está implicada en el proceso de reproducción y una disminución de sus niveles, como la inducida por el amitraz, se ha asociado con la neuroendocrinopatía reproductiva en modelos humanos y animales para la diabetes, que es el resultado de la disfunción multinivel en el hipotálamo eje hipofisario-gonadal (Mayerhofer et al., 1989; Dong et al., 1991).

Tomando todos estos datos en conjunto, la toxicidad reproductiva puede tener niveles de exposición más bajos que aquellos con los que se produce toxicidad sistémica y, dado que la DR se ha calculado a partir de datos de neurotoxicidad aguda en humanos, estos niveles de exposición seguros pueden no cubrir los efectos sobre la toxicidad reproductiva. Son necesarios más estudios que confirmen las dosis a partir de las cuales se produce la toxicidad para la reproducción, que determinen los mecanismos mediante los cuales se producen los efectos de toxicidad para la reproducción y la contribución de los metabolitos del amitraz a estos efectos para poder realizar una evaluación exhaustiva del riesgo del amitraz.

3.10.2. TOXICIDAD DEL DESARROLLO

Los posibles efectos adversos del amitraz en los resultados del desarrollo también se han examinado utilizando animales de experimentación. JMPR (1998) y EPA (1996) evaluaron los efectos potenciales del desarrollo del amitraz en ratas y conejos utilizando estudios no publicados que se les enviaron. Según estos estudios, el amitraz tenía un potencial teratogénico en animales de laboratorio. Estos estudios tenían una serie de deficiencias según las pautas de la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FIFRA) que incluían la ausencia de caracterización de las sustancias de ensayo, un número insuficiente de animales gestantes, la falta de observaciones clínicas, un análisis de dosificación, la justificación de niveles de dosis y exámenes inadecuados de tejidos blandos; por esta razón, la EPA los consideró inaceptables para propósitos regulatorios, requiriendo un estudio de la neurotoxicidad del desarrollo y el potencial de toxicidad reproductiva del amitraz en ratas (USEPA, 1996, 2006 y 2013; CALEPA, 1995).

Por otro lado, Palermo-Neto y colaboradores (1994) estudiaron los efectos sobre el desarrollo y el comportamiento de la exposición prenatal al amitraz. Las ratas preñadas

recibieron amitraz (20 mg/kg/día) por sonda en los días 1, 4, 7, 10, 13, 16 y 19 del embarazo, lo que provocó la apertura de la vagina, el desarrollo del pelaje a una edad más temprana del desarrollo, así como el retraso en la aparición de los incisivos en la descendencia. También produjo una mayor actividad y menor tiempo de inmovilidad cuando se les coloca en campo abierto a los 30 días tras el nacimiento, pero no a los 60 ni a los 90 días de edad. Un estudio posterior también mostró que la exposición postnatal de las crías tratadas con amitraz (10 mg/kg/día) causó cambios transitorios en el desarrollo y comportamiento de la descendencia expuesta (Palermo-Neto et al., 1997). Los resultados mostraron que el tiempo eficaz medio (ET50) para el desarrollo de la piel, el descenso de los testículos y el inicio de la respuesta de sobresalto aumentó y se tardó más tiempo (en segundos) en realizar el reflejo de enderezamiento de superficie en días postnatales (DPN) 3, 4 y 5. La exposición postnatal a amitraz no modificó las frecuencias de locomoción o el tiempo de inmovilidad en el campo abierto en los DPN 30, 60 y 90.

Posteriormente, Osano y colaboradores (2002b) evaluaron los efectos del desarrollo de amitraz (0.34, 0.68, 1.7, 3.4, 6.8, 17, 34 μM) y su metabolito la 2,4-dimetilanilina (12.9, 26.8, 51.6, 103.1, 206.3, 412.5, 825.1 μM) en embriones de *Xenopus laevis*. Estos autores describieron que la 2,4-dimetilanilina no indujo letalidad a los embriones de *Xenopus laevis* en las concentraciones ensayadas. En este estudio, se observaron flexiones axiales y un efecto prominente de edema generalizado inducido por amitraz, que pueden deberse a una alteración de la osmorregulación resultante de la disrupción de la bicapa lipídica de la membrana celular. Además, se observó que los embriones supervivientes a la concentración de 17 μM de amitraz estaban edematosos. El efecto significativo de la 2,4-dimetilanilina fue una pérdida progresiva de pigmento junto con encefalomegalia que fue observable a partir de las concentraciones de 206,3 μM . A partir de la concentración de 825,1 μM hubo pérdida total del pigmento, lo que

provocó la pérdida de contraste de color entre los ojos y el resto del cuerpo, y la bifurcación en el cerebro anterior no se pudo distinguir como resultado del edema cerebral. El índice de teratogenicidad del amitraz (IT) fue de 2.7, lo que indica un efecto teratogénico del compuesto, que aumenta después de su degradación en 2,4-dimetilanilina (IT > 5).

Finalmente, Kim y colaboradores (2007) estudiaron los efectos del amitraz (3, 10 y 30 mg/ kg/día) sobre el inicio y el mantenimiento del embarazo y el desarrollo embriofetal en ratas Sprague-Dawley que recibieron amitraz desde el día 1 hasta el día 19 de gestación. Los resultados mostraron que una dosis oral de amitraz repetida durante 19 días durante el embarazo es embriotóxica y teratogénica en ratas a dosis tóxicas para la madre. Se observó toxicidad maternal significativa en los grupos expuestos a las dosis de 10 y 30 mg/kg/día, que se evidenció por la disminución del peso corporal, de la ganancia de peso corporal y del consumo de alimentos. La toxicidad sobre el desarrollo embriofetal se observó en los grupos de 10 y 30 mg/kg/día e incluyó una mayor muerte fetal y pérdida postimplantación, disminución del tamaño de la camada y del peso corporal fetal, aumento de las anomalías fetales externas, viscerales y esqueléticas, y reducción de las osificaciones fetales. Por lo tanto, no está claro que el efecto tóxico sobre el desarrollo observado en este estudio inducido por amitraz fuera un efecto secundario a la toxicidad materna o un efecto directo sobre los embriones-fetos de rata. Estos autores estimaron que el NOAEL del amitraz es de 3 mg/kg/día para el desarrollo embriofetal.

Sin embargo, estos informes toxicológicos sobre el amitraz no cumplieron totalmente con las directrices específicas de ensayo de la toxicidad para el desarrollo. En este sentido, Lim y colaboradores (2010) evaluaron la toxicidad en desarrollo por amitraz en ratas siguiendo la Guía de ensayo 421 (OECD, 1995). Los resultados de este estudio mostraron que el amitraz causaba toxicidad materna y sobre el desarrollo a ratas a la dosis de 13 mg/kg/día.

La toxicidad del desarrollo por exposición a amitraz incluyó una disminución del número de crías vivas al nacer el DPN 4 y un mayor número de abortos posteriores a la implantación. El aumento significativo de abortos posteriores a la implantación sugiere que se produjo una interrupción del embarazo durante la etapa de desarrollo embriofetal, pero no en la etapa de desarrollo germinal.

Según estos estudios, el amitraz induce embriotoxicidad y teratogenicidad en animales expuestos durante el embarazo y la lactancia. Los trabajos recientes proporcionan cierta información sobre la toxicidad del desarrollo del amitraz que puede constituir una contribución significativa en el proceso de identificación de peligros dentro del proceso de evaluación del riesgo del amitraz. Existen discrepancias entre los estudios de Palermo-Neto y colaboradores (Palermo-Neto et al., 1994; Palermo-Neto et al., 1997) y los estudios de Kim y colaboradores (2007) y Lim y colaboradores (2010) sobre la dosis que causa toxicidad materna, siendo para los últimos menores de 20 mg/kg/día. Además, también hay desacuerdo sobre si la toxicidad del desarrollo tiene lugar al mismo tiempo que la toxicidad materna descrita por Kim y colaboradores (2007) y Lim y colaboradores (2010), siendo importante aclarar estas discrepancias porque si la toxicidad maternal tiene lugar al mismo tiempo que la toxicidad del desarrollo, los efectos observados podrían deberse a la toxicidad maternal más que a un efecto directo del amitraz.

El mecanismo por el cual el amitraz induce la toxicidad sobre el desarrollo puede ser directo o por toxicidad maternal. Entre los mecanismos directos de toxicidad del desarrollo causados por amitraz, uno podría ser a través de la acción genotóxica, pero existe controversia sobre el potencial genotóxico del amitraz. Otros posibles mecanismos son el estrés oxidativo o la alteración endocrina inducida por amitraz. Los embriones en desarrollo parecen ser muy sensibles a las ERO, especialmente durante la organogénesis temprana, aparentemente debido

a su capacidad antioxidante reducida, lo que conduce a la producción de estrés oxidativo y daño embrionario (Hansen y Harris, 2013). Además, los esteroides sexuales controlan la diferenciación sexual del cerebro y el cuerpo (Orrego et al., 2011) y su interrupción durante los periodos de tiempo críticos podría inducir cambios profundos en la diferenciación sexual. Además, se ha descrito que la alteración de las hormonas esteroideas sexuales durante el desarrollo produce efectos teratogénicos (Orrego et al., 2011; Bournias-Vardiabasis et al., 1983). La acumulación de evidencias indica que los neurotransmisores monoaminérgicos desempeñan un papel importante en los procesos básicos del desarrollo como la embriogénesis y la morfogénesis, controlando la proliferación celular, la diferenciación y la migración (Buznikov et al. 1996; Pendleton et al., 1998; Lazarini et al., 2001).

En función de todo lo expuesto, son necesarios más estudios para aclarar los efectos del amitraz y sus metabolitos durante el desarrollo, ya sean los efectos producidos transitorios o permanentes, para determinar los mecanismos a través de los cuales el amitraz y sus metabolitos inducen toxicidad del desarrollo y si estos son independientes de los mecanismos de toxicidad maternal. Finalmente, de acuerdo con los estudios realizados en animales, las dosis que se observan para producir toxicidad del desarrollo pueden ser más bajas que las que producen toxicidad sistémica, por lo que la DR puede no cubrir los efectos de toxicidad del desarrollo. Por lo tanto, para evitar la subestimación del riesgo que este compuesto representa para la salud humana, son necesarios todos estos estudios para tener una evaluación de riesgos exhaustiva.

Toxicidad del desarrollo neurológico

La neurotoxicidad del desarrollo implica alteraciones en el comportamiento, neuroquímica, neurohistología y/o dismorfología macroscópica del sistema nervioso central en la descendencia, como resultado de la exposición química de la madre durante el embarazo

o la lactancia (Lazarini et al., 2001). Diversos estudios han investigado los efectos neurotóxicos del amitraz durante el desarrollo en ratas (Palermo-Neto et al., 1994; Palermo-Neto et al., 1997). En estos estudios, se observó que el tratamiento de ratas hembras preñadas con amitraz durante la gestación (20 mg/kg/día) o durante la lactancia (10 mg/kg/día) produjo cambios transitorios en el desarrollo y en el comportamiento en la descendencia expuesta, como se comentó anteriormente.

Recientemente, Del Pino y colaboradores (2011) evaluaron el efecto de la exposición materna a amitraz (20 mg/kg/día, oralmente en los días 6 a 21 de embarazo y 1 a 10 de lactancia) sobre los niveles de monoamina y su tasa de recambio en diferentes regiones cerebrales en ratas descendientes machos y hembras a los 60 días de edad. Los resultados de este estudio mostraron que todos estos sistemas de neurotransmisores son alterados de una manera región-dependiente. En descendientes masculinos y femeninos, el amitraz indujo una disminución significativa en la corteza prefrontal de 5-HT (mayor disminución en las hembras) y su metabolito 5-HIAA (mayor disminución en los machos) y de DA y sus metabolitos DOPAC y HVA (mayor disminución en las hembras). Sin embargo, los autores describieron que en el estriado la DA, la 5-HT y sus correspondientes metabolitos disminuyeron en los descendientes masculinos y femeninos sin distinción estadística de sexo. Por el contrario, el amitraz no modificó el contenido de 5-HT, pero causó un aumento en el contenido del 5-HIAA en el bulbo raquídeo y en el hipocampo en la descendencia masculina y femenina. También se observaron alteraciones en los niveles de DA, DOPAC y HVA en el hipocampo tras la exposición a amitraz, mostrando una interacción por sexo (mayor efecto en las hembras). Los niveles de NA también mostraron una disminución tras el tratamiento con amitraz en la corteza prefrontal y el cuerpo estriado sin diferencia estadística por sexo, pero los niveles de MHPG disminuyeron en ambas regiones con interacción por sexo (mayor

disminución en el estriado femenino y mayor disminución en la corteza prefrontal de los machos). El amitraz indujo aumentos en la tasa de recambio de la 5-HT en la corteza prefrontal, así como de la DA en el estriado e hipocampo y una disminución en la tasa de recambio de la NA en el hipotálamo, corteza prefrontal y cuerpo estriado. No se observó toxicidad materna tras la exposición al amitraz. Los hallazgos que obtuvieron indicaron que la exposición maternal al amitraz indujo una alteración a largo plazo en los sistemas noradrenérgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos en sus descendientes en la corteza prefrontal, estriado e hipocampo y esas variaciones podrían estar relacionadas con varias alteraciones en las funciones en las que estas regiones cerebrales están involucradas.

Se desconoce el mecanismo de los efectos neurotóxicos sobre el desarrollo por la exposición prenatal y postnatal a amitraz. El amitraz podría afectar la replicación, diferenciación, sinaptogénesis y axonogénesis de las células neuronales, el metabolismo de los esteroides y el desarrollo funcional de los sistemas de neurotransmisores, efectos que podrían dar lugar a las alteraciones neuroquímicas y del comportamiento observadas en estos estudios. En este sentido, se supone que los neurotransmisores monoaminérgicos desempeñan un papel durante el desarrollo definido como "morfo genético" antes de asumir sus roles como transmisores en el cerebro maduro (Del Pino et al., 2011; Ansorge et al., 2008). Cualquier cambio en los niveles de catecolaminas durante el desarrollo o cualquier acción agonista en sus receptores podría tener un efecto profundo en el desarrollo estructural y funcional del cerebro (Herlenius y Lagercrantz, 2001; Lakshmana y Raju, 1994). Dado que los niveles endógenos de estos transmisores están altamente regulados por la MAO, cualquier cambio en esta enzima puede afectar profundamente al cerebro en desarrollo. Como el amitraz se clasifica como un agente inhibidor de la MAO, este mecanismo podría inducir las alteraciones en los sistemas noradrenérgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos observados en el estudio

de Del Pino y colaboradores (2011) en las ratas adultas expuestas durante el desarrollo. Además, la acción agonista del amitraz sobre el receptor adrenérgico α_2 también podría contribuir a estas alteraciones. Son necesarios estudios adicionales que determinen si la actividad de la MAO se alteró permanentemente después de la exposición durante el desarrollo al amitraz. Por otra parte, la posibilidad de un efecto directo del amitraz sobre el desarrollo funcional de los sistemas monoaminérgicos del sistema nervioso central no se puede omitir. La disrupción de estos sistemas es probable que desempeñe un papel importante en las alteraciones descritas. En este sentido, los trabajos previos realizados en ratas, que estudiaron los efectos gestacionales de la exposición de los inhibidores de la MAO a la inervación serotoninérgica y dopaminérgica, mostraron que la administración de clorgilina y deprenilo durante la gestación y varios días después del nacimiento produce, en la descendencia a los 30 días de edad, una reducción significativa de la inervación serotoninérgica, particularmente en la corteza cerebral, sin cambios observados en el desarrollo del sistema dopaminérgico (Whitaker-Azmitia et al., 1994). Además, las condiciones que aumentan la tasa de recambio de la DA, como las observadas por Del Pino y colaboradores (2011), podrían potencialmente aumentar la formación de metabolitos reactivos, especialmente en condiciones en las que la proporción de dopamina disponible respecto a la capacidad antioxidante es alta, lo que conduce a la muerte neuronal.

Por otro lado, el amitraz mostró efectos dependientes de la región que podrían explicarse por diferencias cinéticas regionales que aumentan los niveles de amitraz en las regiones afectadas, pero los efectos dependientes del sexo sugieren una intervención de las hormonas sexuales en los efectos del amitraz. En este sentido, se ha descrito que el amitraz modulaba las concentraciones séricas de E2 y testosterona en ratas (Chou et al., 2008) que desempeñan un papel en el desarrollo de sistemas de catecolaminas (Stewart y Rajabi, 1994;

Pappas et al., 2010) y en la diferenciación sexual en mamíferos (Konkle y McCarthy, 2011). Además, se ha descrito que las hormonas esteroideas sexuales modulan la expresión de enzimas que regulan el metabolismo y la síntesis de neurotransmisores monoaminérgicos de una manera dependiente del género y la región (Donner y Handa, 2009; Castelli et al., 2013). Este podría ser otro mecanismo por el cual la exposición al amitraz puede alterar permanentemente los niveles de monoamina en corteza prefrontal, estriado e hipocampo y no sólo por la inhibición de la MAO, lo que sugiere que las diferencias de sexo observadas en estos sistemas de neurotransmisores podrían estar relacionadas con la alteración endocrina inducida por amitraz.

Además de la alteración endocrina y la inhibición de la MAO, otros mecanismos podrían inducir la neurotoxicidad del desarrollo por amitraz. En este sentido, el amitraz puede inhibir la adenilato ciclasa y activar los canales de calcio dependientes de voltaje aumentando los niveles de AMP cíclico (Chen y Hsu, 1994) y las concentraciones de calcio intracelular (Shin y Hsu, 1994). De esta forma, los niveles de AMP cíclico controlan los procesos intracelulares subyacentes a la plasticidad sináptica y los procesos de aprendizaje y memoria, guían la elongación axonal y apoyan la supervivencia neuronal en el cerebro en desarrollo (Emery et al., 2014) y junto con el Ca^{2+} desempeña un papel fundamental en la diferenciación y maduración neuronal (Lepski et al., 2013; Willoughby y Cooper, 2007). Además, el amitraz inhibe la prostaglandina sintetasa, disminuyendo la producción de prostaglandina E2 (Yim et al., 1978) mecanismos que también podrían estar relacionados con el deterioro del neurodesarrollo. Además, se ha descrito que la prostaglandina E2 participa durante el desarrollo, junto con las hormonas sexuales, en la organización de las diferencias sexuales regionales del cerebro, como se muestra en las diferencias en el número y forma de las espinas dendríticas, que son necesarios para desarrollar el comportamiento sexual. Además, la

PGE2 y las hormonas sexuales regulan la plasticidad sináptica, la muerte celular neuronal y la apoptosis, la diferenciación neural, la proliferación y la migración (Wood, 2005; Wong et al., 2014), y en la etapa adulta regulan el sueño, el comportamiento sexual y la transmisión, integración y plasticidad sináptica (Sang et al., 2005; Yang et al., 2009).

La exposición prenatal a amitraz puede ocasionar daño directo o una mayor vulnerabilidad de los sistemas de neurotransmisión a futuros daños tóxicos. Estos efectos pueden representar un gran número de acciones involucradas en el desarrollo de la disfunción sináptica en estos sistemas de neurotransmisores que, en última instancia, contribuyen a las anomalías conductuales. Sin embargo, se necesitan más pruebas de comportamiento para confirmar esta sugerencia. Además, es importante confirmar que estos efectos de amitraz no son transitorios, así como la posible implicación de los metabolitos del amitraz en ellos. Por último, como se indicó anteriormente, las dosis a partir de las cuales se produce la toxicidad del desarrollo pueden ser más bajas que las que producen toxicidad sistémica, por lo que es posible que no estén cubiertas por la DR. Por lo tanto, se requieren más estudios para determinar si las dosis que producen toxicidad del neurodesarrollo están dentro de la DR. Estos datos ayudarán a realizar una evaluación de riesgos exhaustiva del amitraz.

MATERIAL Y METODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Productos químicos

Los compuestos amitraz (98%), idazoxan, n-metilhistaprodifeno, ácido gamma-aminobutírico (GABA), glutamato, poli-L-lisina y dimetilsulfóxido (DMSO), S-adenosil-L-metionina, m-hidroximetilhidrazina (NSD-1015), paraformaldehído y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) se obtuvieron de Sigma (Madrid, España). El anticuerpo anti-proteína asociado a microtúbulos-2 (MAP2) y el anticuerpo de proteína ácida anti-glialfibrilar (GFAP) se obtuvieron de Millipore (Madrid, España). Todos los demás productos químicos fueron de grado reactivo de la pureza más alta disponible de laboratorio.

4.2. Cultivo primario de neuronas del hipocampo

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Directiva de la Unión Europea (2010/63/EU) y la normativa española (BOE-A-2013-1337) sobre el uso de animales de laboratorio. Ratas Wistar gestantes (Charles River, Barcelona, España) fueron anestesiadas, entre los días 17-18 de gestación, con pentobarbital sódico, se extrajeron los embriones y se diseccionaron sus cerebros bajo un microscopio estereoscópico (Olympus SZ51, Barcelona, España) (Schnitzler et al., 2008). Se recogió el hipocampo en Hibernate E (Life Technologies, Madrid, España) y se disoció por incubación durante 10 minutos a 37°C en 1 ml de solución de tripsina-EDTA (0,25%, Invitrogen, Madrid, España) y 0,5 ml DNasa (Sigma, D4263, Madrid, España). Tras la tripsinización, se aspiró la solución de tripsina/DNasa y se añadieron 0,5 ml de albúmina sérica bovina al 4% (ASB, Sigma, Madrid, España), 1 ml de medio Eagle

modificado de Dulbecco (DMEM/F-12 con Glutamax-1, Life Technologies, Madrid, España), complementado con un 20% de suero bovino fetal (SBF, Sigma, Madrid, España), antibióticos (penicilina/estreptomicina 1 ml/l, Sigma, Madrid, España) y 2 ml de solución de DNasa. Las células se disociaron posteriormente mediante trituración suave usando una pipeta Pasteur pulida con fuego. La suspensión se centrifugó a 250 x g (Eppendorf 5804R, Madrid, España) durante 5 minutos y el sedimento se resuspendió en medio de crecimiento (véase más arriba) y se obligó a pasar a través de un filtro de malla de nylon de 40 mm. Esta suspensión se recentrifugó (250 x g, 5 min) y se resuspendió en medio de crecimiento (véase más arriba). La suspensión de células se sembró a una densidad de 10^6 células/ml en cubres de vidrio (22 mm de diámetro) revestidos de poli-L-lisina (0,10 mg/ml) colocados en placas Petri de plástico (35 mm de diámetro) recubiertas con poli-L-lisina. Tras la incubación durante 12 horas a 37°C en una atmósfera humidificada al 95% de aire/CO₂ al 5%, se cambió el medio con un medio nutritivo libre de suero compuesto por DMEM, insulina (400 µl, Sigma, Madrid, España), transferrina (50 µl, Sigma, Madrid, España), progesterona (100 µl, Sigma, Madrid, España), putrescina (16 mg/l, Sigma, Madrid, España), selenita sódica (100 µl, Merck, Madrid, España) y penicilina/estreptomicina (Gensburger et al., 1986).

La viabilidad celular se evaluó mediante el método de exclusión del colorante azul tripan al 0,4% (Sigma, Madrid, España), la cual fue rutinariamente superior al 95%. Las células primarias del cultivo fueron inmunohistoquímicamente caracterizadas con MAP2 (marcador neuronal) y GFAP (marcador astrocítico) para comprobar la pureza del cultivo celular y se observó un predominio de neuronas (92%).

Este cultivo primario neuronal, tras unos días de cultivo (6-7 días *in vitro*), forma una red de contactos sinápticos funcionales, adquiriendo las características de neuronas maduras. La CI_{50} del amitraz sobre el receptor α_2 es 0.1 μM y sobre el receptor H_1 es 10 μM (Costa et al., 1988), por lo que elegimos un rango de concentración de amitraz de 0.01 μM a 100 μM para probar nuestra hipótesis. Al séptimo día, las células del hipocampo fueron tratadas con amitraz con o sin idazoxan (1 μM) y/o n-metilhistaprodifeno (30 nM) durante 24 h. La concentración seleccionada de idazoxan se basó en el pK_B del receptor α_2 (6 a 8) en ratas (Dantas da Silva Junior et al., 2014). Para seleccionar la concentración de n-metilhistaprodifeno se realizó un estudio de concentración-respuesta (datos no mostrados) de 10 nM a 1 μM , que mostró que la concentración mínima que producía la reversión máxima de los efectos de amitraz estudiados era de 30 nM. Se realizaron al menos 3 repeticiones/tratamiento. Se empleó un grupo vehículo que contenía 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) en paralelo para cada experimento como control.

4.3. Animales

Se siguieron la Directiva de la Unión Europea (2010/63/EU) y las reglamentaciones españolas (BOE-A-2013-1337) con respecto al uso de animales de laboratorio al realizar todos los experimentos. Se utilizaron ratas Wistar macho, con 60 días de edad, cada una con un peso de 200-210g (Charles River, Barcelona, España), que se alojaron individualmente y se mantuvieron en una habitación con la temperatura y luz controladas, con comida y agua disponible *ad libitum*. La temperatura del animalario fue de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y los animales se mantuvieron con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luz de 8:00 a 20:00). Asignamos aleatoriamente 6 animales a cada uno de los grupos de control y tratamiento. Utilizamos grupos independientes de controles y tratamientos para todos los diferentes análisis

realizados. Los animales fueron tratados oralmente con aceite de maíz como vehículo, tamoxifeno (TMX, 1 mg/kg de peso corporal por vía subcutánea) o amitraz a la dosis de 20, 50 y 80 mg/kg de peso corporal por vía oral con o sin TMX, todo durante 5 días consecutivos. La comida del grupo tratado se retiró 6 h antes del tratamiento, pero a los animales se les permitió agua *ad libitum*. Las dosis de 20, 50 y 80 mg/kg de peso corporal [equivalentes a 1/30, 1/12 y 1/7.5 de la DL_{50} (la DL_{50} media se calculó previamente, datos no mostrados)] se eligieron porque se describieron previamente que producían una alteración dosis-dependiente de los neurotransmisores monoaminérgicos 5-HT, NE, DA y sus metabolitos tras 5 días consecutivos de tratamiento (Del Pino et al., 2013) y porque se ha descrito que a estas dosis se inhibe la MAO (Moser y MacPhail, 1989) que fue el mecanismo sugerido para producir esta alteración (Florio et al., 1993). Por lo tanto, las dosis seleccionadas son relevantes para estudiar los mecanismos de alteración de estos neurotransmisores monoaminérgicos. Se usó el TMX, un antagonista selectivo del receptor de estrógeno, a la dosis de 1 mg/kg de peso corporal por ser la dosis efectiva según la literatura (Okamoto et al., 2012; Nayebi et al., 2014) y por ser la dosis mínima que indujo el máximo bloqueo de los efectos del amitraz (datos no mostrados).

Tres horas después de la última dosis de tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación. Los cerebros se eliminaron rápidamente y el hipocampo, la corteza prefrontal y el cuerpo estriado se disecaron a 4 °C (Glowinski e Iversen 1966) bajo un estereomicroscopio (Olympus SZ51, Barcelona, España). Las muestras de tejidos se pesaron rápidamente y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

4.4. Diseño experimental

La Figura 10 representa el diseño experimental seguido en la investigación sobre los animales y sobre el cultivo primario de neuronas procedentes del hipocampo.

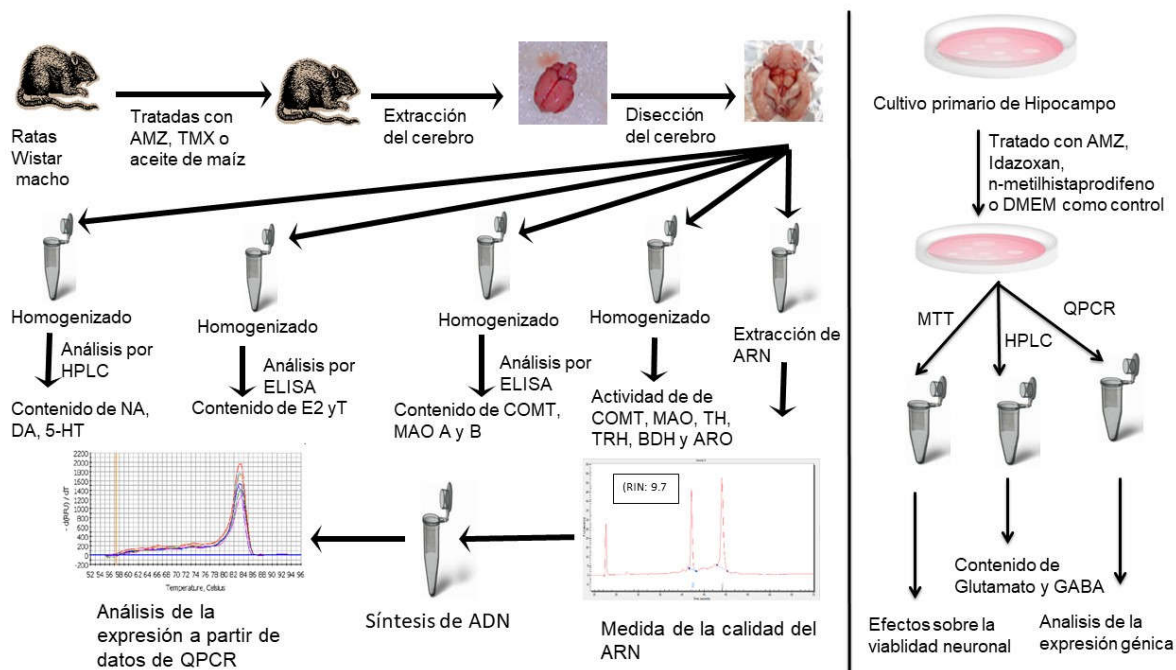


Figura 10. Representación esquemática del diseño experimental de la investigación.

Análisis de la viabilidad celular

La determinación de los efectos del amitraz sobre la viabilidad celular fue realizada a través del método del MTT. El método del MTT se basa en la ruptura de la sal de MTT tetrazolio de color amarillo a cristales de formazán de color púrpura por la acción de la deshidrogenasa mitocondrial. Las células se incubaron con 100 μ l de solución de MTT (concentración final 0,5 mg/ml) durante 4 h después del tratamiento con amitraz. Después de 4 h a 37°C, el medio se eliminó y la sal de formazán se disolvió en 250 μ l de DMSO. La formación de producto de formazán solubilizado se midió espectrofotométricamente a 570 nm

(Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorometer and Luminometer, ThermoFisher Scientific, Madrid, España). Se tomó como 100% de viabilidad las células control tratadas con DMSO.

Determinación de la concentración de glutamato y GABA

Los niveles de glutamato y GABA se determinaron en neuronas procedentes de un cultivo primario de hipocampo tras el cotratamiento de amitraz con o sin idazoxan y/o n-metilhistaprodifeno para estudiar el efecto sobre la transmisión glutamatérgica y GABAérgica. El medio de cultivo se centrifugó a 200 xg durante 5 minutos y los sobrenadantes se congelaron y almacenaron para el análisis usando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se analizó una alícuota de cada muestra para determinar la concentración de proteína total usando el kit BCA (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España).

Se prepararon las muestras del medio de cultivo para el análisis por HPLC mediante la precipitación con perclorato y derivatización con o-ftalaldehído, y se analizaron mediante HPLC siguiendo el protocolo descrito previamente (Crooks et al., 2007; Gwiazda et al., 2002). Las medidas de las concentraciones de aminoácidos en el medio tratado incubado sin células se sustrajeron de las concentraciones en el medio tratado incubado con células para obtener la cantidad total liberada por las células. Los niveles de aminoácidos extracelulares se normalizaron por la concentración de proteína celular total medida en cada pocillo usando el ensayo de BCA y se presentaron como porcentaje de control no tratado.

Análisis de la expresión génica

Para la realización de la determinación de los cambios en la expresión genética tras la exposición al amitraz se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa semicuantitativa (QPCR). El ARN total fue extraído mediante el método del Trizol (Invitrogen, Madrid, España). La concentración final de ARN se determinó usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Madrid, España) y la calidad de las muestras del ARN total se evaluó utilizando el LabChip Experion (Bio-Rad, Madrid, España). La síntesis del ADN complementario del ARN se realizó con 1.000 ng de ARN usando el kit de síntesis PCR Array First Strand-Synthesis Kit (C0₂; SuperArray Bioscience, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante, incluyendo un paso de eliminación de ADN genómico y controles de ARN externos. Después se realizó la QPCR utilizando conjuntos de cebadores prevalidados de los genes en estudio, incluyendo una etapa de eliminación de ADN genómico y controles de ARN externos. Después de la transcripción inversa, se realizó una QPCR utilizando conjuntos de cebadores prevalidados (SuperArray Bioscience) que codifican para el ARNm de glutaminasa (PPR43448C), 4-aminobutirato aminotransferasa (GABAT, PPR06756A), glutamato descarboxilasa 65 (GAD65; PPR48349A), succinato-semialdehído deshidrogenasa (SSADH; PPR44654A), ARO (PPR47164A), MAO A (PPR46359A), MAO B (PPM03990A), COMT (PPR06789A), TH (PPR45220F), TRH (PPR48244A), BDH (PPR52652A) y ACTB (PPM02945B). Las reacciones se realizaron en un CFX96 mediante Real-Time PCR SYBR Green Master Mix PA-012 (SuperArray Bioscience). Los parámetros del termociclador fueron 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos. Se utilizó el gen de la beta actina (ACTB) como un control interno para la normalización. Los cambios relativos en la expresión génica se calcularon utilizando el método de Ct (ciclo umbral). Los datos de expresión se presentan como múltiplos de cambio reales (Livak y Schmittgen, 2001).

Elegimos el estudio de los genes de glutaminasa, GAD65, GABAT y SSADH para determinar el efecto del amitraz sobre la transmisión glutamatérgica/GABAérgica, debido a que el neurotransmisor glutamato se sintetiza principalmente a partir de glutamina por la enzima glutaminasa (Bradford et al., 1978) y el GABA es sintetizado por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), específicamente por la isoforma GAD 65, que controla la disponibilidad de GABA como transmisor (Lange et al., 2014). Además, elegimos analizar GABAT y SSADH debido a que el metabolismo del GABA está mediado por la actividad sincrónica de GABAT, que convierte GABA en semialdehído succínico, y de la SSADH, que oxida el semialdehído succínico en ácido succínico (Parviz et al., 2014).

Análisis del contenido de estradiol y testosterona

El contenido de E2 y T se midió en plasma, hipocampo, corteza prefrontal y estriado de animales tratados con el fin de determinar si las hormonas sexuales se alteran por exposición al amitraz. El contenido de E2 y T se midió usando un kit de inmunoensayo enzimático (Estradiol EIA Kit, Cayman Chemical Company). De acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de plasma se extrajeron dos veces con acetato de etilo y las muestras de tejidos se homogeneizaron en 300-500 µl de una mezcla igual de acetato de etilo y solución salina tamponada con fosfato 0,1 M. Los homogeneizados se centrifugaron a 21,000 x g durante 15 minutos a 4 °C. La mezcla se incubó después en un baño de MeOH/hielo seco para solidificar la fase acuosa, mientras que la fase orgánica se eluyó en un nuevo tubo. Después, la porción de acetato de etilo se recogió y se secó. El material seco se reconstituyó en 120 µl de tampón EIA y se usaron 100 µl de la muestra para EIA por duplicado. Se obtuvieron valores de ELISA (ng/ml) y se corrigieron por el volumen plasmático (ml/ml) o el peso del tejido (mg/ml), produciendo una unidad final de pg/ml o pg mg, respectivamente, y se presentaron como porcentaje del control sin tratamiento.

Análisis de actividad de la aromatasasa

La actividad cerebral de la ARO se determinó usando el método de liberación de agua tritiada ($^3\text{H}_2\text{O}$), basado en la producción de $^3\text{H}_2\text{O}$ durante la aromatización de un sustrato androgénico marcado. La formación de agua tritiada es proporcional a la cantidad de estrógeno producido durante la aromatización. Los tejidos cerebrales se homogeneizaron y después se sometieron al ensayo de liberación de $^3\text{H}_2\text{O}$ como fue descrito previamente (Grote et al., 2006; Hobler et al., 2010). Brevemente, las muestras de cerebro diseccionadas se homogeneizaron en tampón TEKS (Tris HCl 50 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, KCl 100 mM, pH 7,4) que contenía 0,1% (p/v) de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Las muestras homogeneizadas (20 μl) se incubaron a 37 °C durante 30 min, con 20 μl de tampón TEKS y 10 μl de NADPH (5 mg/ml) en placas de 96 pocillos, que contienen el trazador [1β - ^3H (N)]-androst-4-eno-3,17-diona (Perkin Elmer, Madrid, España) previamente agregado. La concentración de proteína se determinó en una alícuota del homogeneizado usando un kit de BCA (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). La reacción se terminó en un baño de etanol-hielo seco y se añadió agua fría hasta un volumen de 150 μl por pocillo. El contenido de los pocillos se transfirió después a las columnas de extracción clean-up C-18, precondicionadas con metanol y etanol y, posteriormente, se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm y 4 °C. Las columnas se centrifugaron nuevamente después de agregar 200 μl de agua destilada en las mismas condiciones. La radioactividad correspondiente al producto de reacción se midió por medio de un contador de cuentas. La actividad de la ARO se expresó como fmol/mg de proteína/15 min y los valores se expresaron como el porcentaje de actividad de la enzima.

Determinación de los niveles de neurotransmisores monoamínicos

Se determinaron los niveles de neurotransmisores monoamínicos en hipocampo, corteza prefrontal y cuerpo estriado tras el tratamiento con amitraz con o sin TMX, para estudiar el efecto sobre la transmisión monoaminérgica. Los tejidos se homogeneizaron en 300-500 µl de HClO₄ 0,4 M que contenía Na₂S₂O₅ al 0,1% (p/v) por sonicación. Los homogeneizados se centrifugaron a 4 °C durante 15 min a 20,000 xg y se tomaron alícuotas de sobrenadantes para el análisis de 5-HT y su metabolito ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA), DA y sus metabolitos [Ácido 3,4-hidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA)] y NA y su metabolito [3-metoxi-4-hidroxifeniletilén glicol (MHPG)] por HPLC como fue descrito anteriormente (Del Pino et al., 2013). Las áreas de los picos de los cromatogramas de muestra se cuantificaron como se ha descrito previamente por Del Pino y colaboradores (2013). El límite de cuantificación (LOQ) fue 2 pg para DA, DOPAC, NA, 5-HT y 5-HIAA y 20 pg para HVA y MPHG en las diferentes matrices de tejido. Se calcularon las tasas de recambio de 5-HT, DA y NA como relaciones entre las concentraciones de los metabolitos y los neurotransmisores. Las concentraciones se calcularon como ng por g de tejido húmedo y los valores se expresaron como porcentaje respecto del control.

Análisis de la actividad de la TH y la TRH

Las actividades de la TH y la TRH en las regiones cerebrales estudiadas se calcularon indirectamente como se ha descrito previamente (Johnston y Moore 1983; Nissbrandt et al. 1988), midiendo la acumulación de la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y el 5-hidroxitriptófano (5-HTP), respectivamente, tras la inhibición de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AAADC), con m-hidroximetilhidrazina (NSD-1015). Se inyectó NSD-1015 (100 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal) a todos los grupos de

animales utilizados para este experimento particular 30 minutos antes del sacrificio de los animales. A esta dosis, el NSD-1015 puede bloquear por completo la actividad de la AAADC, lo cual conduce a la acumulación de DOPA y 5-HTP. Los homogeneizados preparados como hemos descrito se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 20,000 x g y se tomaron alícuotas de sobrenadantes para el análisis de los niveles de DOPA y 5-HTP usando la técnica de HPLC como fue descrito previamente por Chapin y colaboradores (1986). Las concentraciones de 5-HTP y L-DOPA se calcularon como ng por mg de proteína por 30 min y los valores se expresaron como el porcentaje de actividad enzimática.

Análisis de la actividad y del contenido de la catecol-O-metiltransferasa

La actividad de la COMT se midió en la corteza prefrontal, el hipocampo y el estriado siguiendo el protocolo previamente descrito (Nissinen y Männistö 1984; Reenilä et al., 1995). Brevemente, se incubaron 100 µl de la preparación enzimática a 37°C durante 30 minutos en presencia de MgCl₂ 5 mM, ácido dihidroxibenzoico 240 µM y S-adenosil-L-metionina 200 µM en tampón de fosfato de sodio 100 mM, pH 7,4. La reacción se detuvo con ácido perclórico 0,4 M enfriado con hielo y se centrifugó, a 4 °C, a 5530 x g durante 10 min. Se empleó un sistema de HPLC con detección electroquímica para cuantificar los productos de la reacción, el ácido vanílico e isovanílico, y se cuantificó la concentración de proteínas mediante el kit BCA (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). La actividad de la COMT se cuantificó como picomoles de ácido vanílico formado en un minuto por mg de proteína en la muestra y los valores se expresaron como el porcentaje de actividad enzimática.

Se usó el kit comercial de ELISA (MBS2880296, MyBiosource, CA, EEUU) Para analizar la concentración de proteína de la COMT según las instrucciones del fabricante. Las

concentraciones se calcularon como ng/mg de proteína y los valores se expresaron como el porcentaje respecto al de contenido de control de enzima.

Análisis de actividad de la dopamina- β -hidroxilasa

La actividad de la BDH se determinó usando el método espectrofotométrico de dos longitudes de onda de Kato y colaboradores (1974). El ensayo de la BDH se basa en la conversión enzimática de tiramina a octopamina. El producto formado de octopamina se aisló usando una columna pequeña que contenía 0,2 ml de resina DOWEX-50WX4 activada (H⁺, de tamaño de 200-400 de malla). La octopamina adsorbida se eluyó con 1,0 ml de NH₄OH 3N y luego se convirtió en p-hidroxibenzaldehído mediante la adición de 10 μ l de solución de NaIO₄ al 2%. El exceso de NaIO₄ se redujo mediante la adición de 10 μ l de solución de Na₂S₂O₃ al 10%. La solución se extrajo con 5 ml de éter etílico, la fase de éter se extrajo de nuevo con 1 ml de NH₄OH 3N para realizar las mediciones de absorbancia a 330 nm. La actividad de la BDH se expresó como nmol (octopamina)/min/g de tejido húmedo y los valores se expresaron como el porcentaje de actividad enzimática respecto al control.

Análisis y determinación del contenido de la monoaminoxidasa

La actividad de la MAO se determinó en el homogeneizado de las muestras procedentes del hipocampo, la corteza prefrontal y el cuerpo estriado mediante un método luminiscente que utiliza un derivado de luciferina de escarabajo como sustrato luminogénico de la MAO. Los tejidos se homogeneizaron en tampón de fosfato frío 0,1 M (pH 8; 4 μ l/mg de tejido) suplementado con inhibidores de proteasa y el contenido de proteína se midió mediante el kit BCA (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Cuarenta y cinco μ g de proteína por tejido de rata, por triplicado, se utilizaron en el ensayo MAO-Glo (Promega,

Madrid, España) siguiendo el protocolo del fabricante, aumentando la incubación con el sustrato de 20 minutos a 3 horas. La señal luminiscente se detectó usando un lector de placas Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). La actividad de la MAO, medida en unidades de luz relativa (RLU), se corrigió con la señal del fondo usando un control sólo de tampón y los valores se expresaron como el porcentaje de actividad de la enzima respecto del control. Las muestras inactivadas por calor arrojaron valores de fondo similares a los controles sólo con tampón. Dado que este ensayo podría detectar la actividad amina oxidasa distinta de la MAO, para confirmar que la señal obtenida en homogeneizados se debía a la MAO y no a otras amino oxidasas, los homogeneizados tisulares se analizaron en presencia de los inhibidores específicos MAO A y B, clorgilina y deprenilo, respectivamente, que inhibieron por completo la señal luminiscente. Se usaron kits comerciales de ELISA (MBS9328595 y MBS2881432, MyBiosource, CA, EEUU) Para analizar la concentración proteica de la MAO A y la MAO B, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones se calcularon como ng/mg de proteína y los valores se expresaron como el porcentaje de contenido de control enzimático respecto del control.

Análisis estadístico

Los datos se representan como media \pm desviación estándar (DS). Las comparaciones entre los grupos experimentales y control se realizaron mediante análisis ANOVA de una vía (análisis de diferentes tratamientos) o análisis ANOVA de dos vías (región cerebral frente a tratamiento), seguido por la prueba post-hoc de Tukey o de Duncan. La diferencia estadística fue aceptada cuando $p \leq 0,05$. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo por ordenador utilizando el software GraphPad.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Efectos tóxicos del tratamiento con amitraz

El tratamiento con amitraz solo indujo a la dosis más alta (80 mg/kg de peso corporal, durante 5 días) una ligera incoordinación motora, aproximadamente de 1 a 2 horas después del tratamiento. Estos signos fueron reversibles y aproximadamente a las 6 horas después del tratamiento, las ratas se comportaron normalmente.

El tratamiento con amitraz a las dosis evaluadas (20, 50 y 80 mg/kg de peso corporal, 5 días) no mostró un efecto estadísticamente significativo sobre la ganancia o pérdida de peso corporal, el peso de los tejidos (regiones cerebrales) o sobre la relación peso de tejido/peso corporal (%) en comparación con el control (datos no mostrados).

5.2 La cuantificación de estradiol y testosterona

El contenido de E2 y T se evaluó en plasma y en las regiones cerebrales del cuerpo estriado, corteza prefrontal e hipocampo tras 5 días de tratamiento con vehículo o amitraz a las dosis de 20, 50 y 80 mg/kg de peso corporal. El tratamiento con amitraz no mostró efecto sobre el contenido de E2 en plasma, ni sobre el contenido de T en las regiones cerebrales estudiadas (datos no mostrados). Sin embargo, el amitraz indujo un aumento dosis-dependiente del contenido de T en el plasma y del contenido de E2 de mayor a menor en este orden en las regiones de la corteza prefrontal, el estriado e hipocampo (Figuras 11A y 11B).

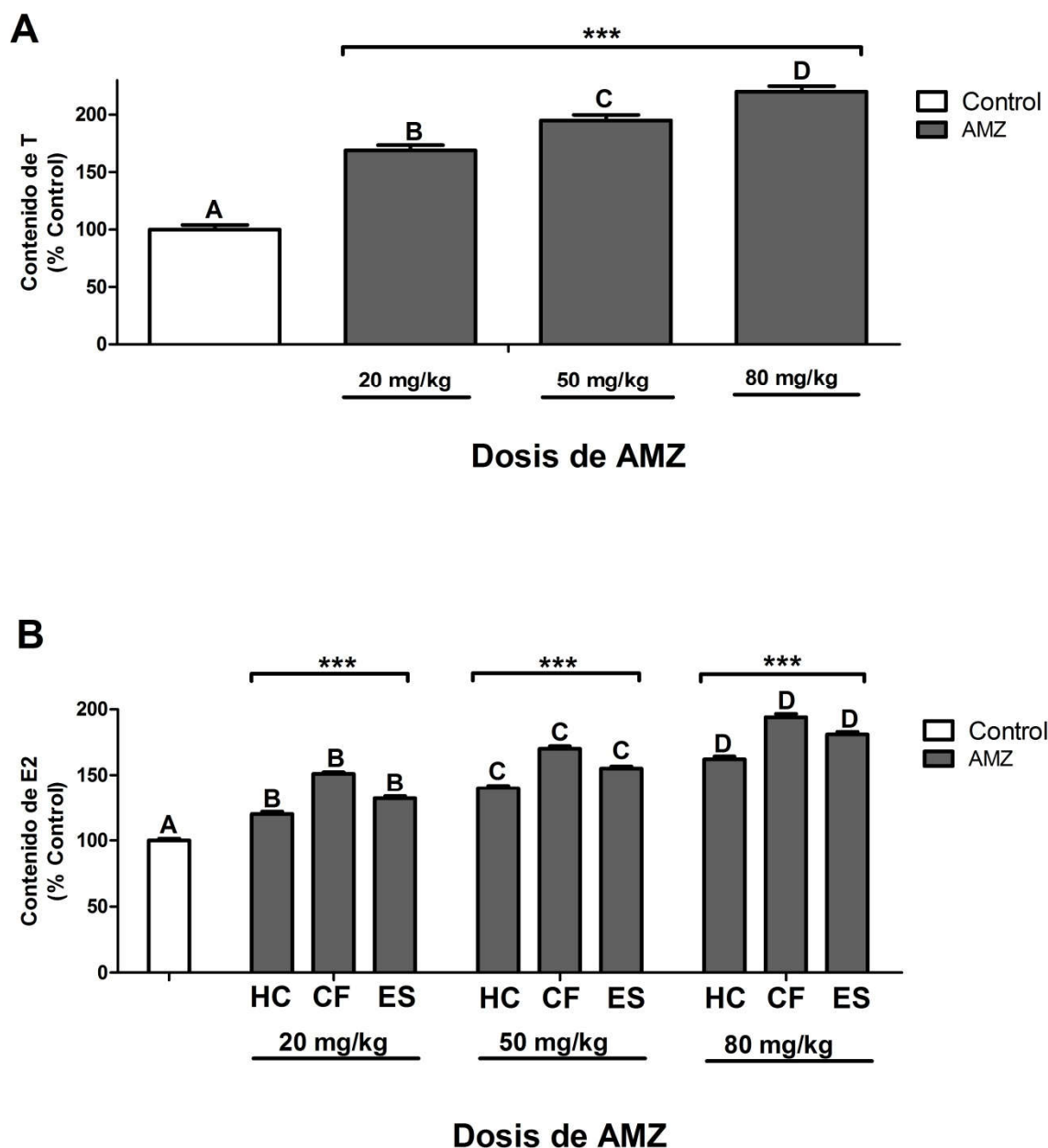


Figura 11. Evaluación del efecto del amitraz (AMZ) sobre el contenido de (A) testosterona serica y sobre el contenido de (B) estradiol cerebral mediante análisis ELISA en las regiones del hipocampo (HC), corteza prefrontal (CF) y cuerpo estriado (ES) de ratas macho adultas. Los valores de control absoluto del contenido de T (ng/ml) en plasma fueron de $4,0 \pm 0,4$ y del contenido de E2 cerebral (ng/mg) fueron de $0,4 \pm 0,08$ en HC; $0,82 \pm 0,014$ en CF y $0,51 \pm 0,012$ en ES, respectivamente. Los datos se presentan como un porcentaje relativo al grupo de control y fueron significativamente diferentes del grupo de control respectivo en $p < 0,001$. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre las diferentes dosis para cada estructura (prueba de Duncan). ***Diferencia significativa entre las regiones cerebrales para cada dosis de amitraz ($p < 0,001$).

5.3 Análisis de actividad de aromatasa

La actividad de la ARO se evaluó en las regiones del cuerpo estriado, corteza prefrontal e hipocampo tras 5 días de tratamiento con amitraz a la dosis de 20, 50 y 80 mg/kg de peso corporal. El amitraz indujo un aumento dosis-dependiente de la actividad de la ARO de mayor a menor en este orden en la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo (Figura 12).

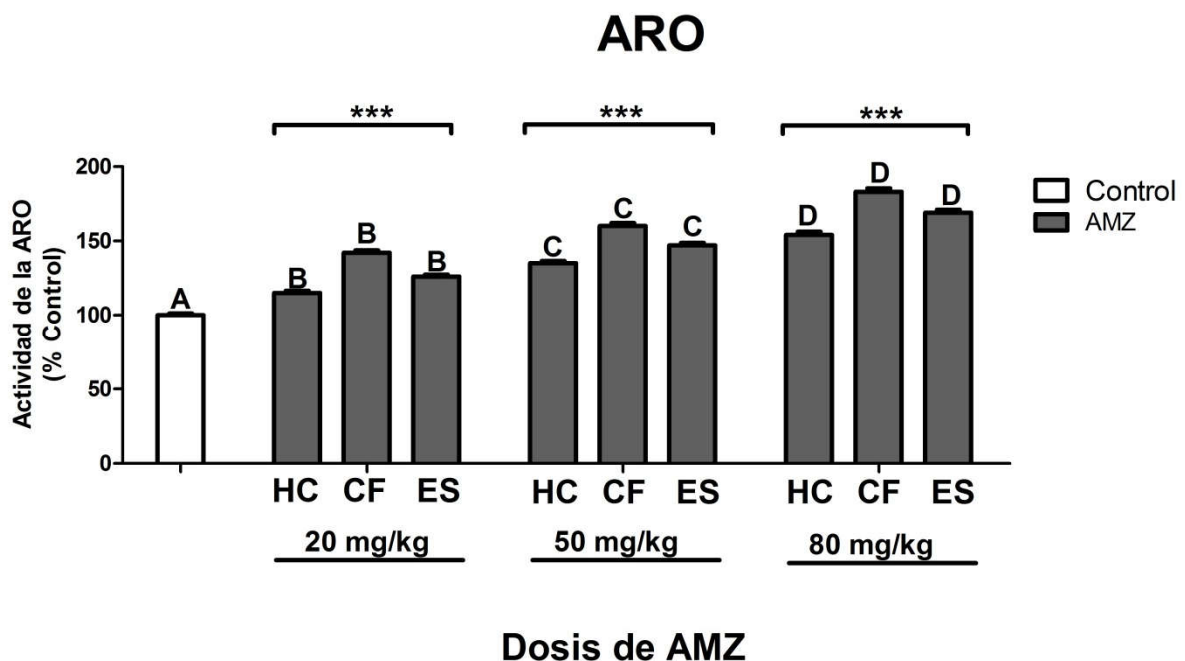


Figura 12. Evaluación del efecto amitraz (AMZ) la actividad de la aromatasa (ARO) en el hipocampo (HC), la corteza prefrontal (CF) y el cuerpo estriado (ES) de ratas macho adultas. Los valores de control absoluto de la actividad de la ARO (fmol/mg/15 min) fueron $22 \pm 0,20$ en HC, 40 ± 0.53 en CF y 31 ± 0.41 en ES, respectivamente. Los datos se presentan como porcentaje relativo al grupo de control y fueron significativamente diferentes del grupo de control respectivo en $p < 0,001$. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre las diferentes dosis para cada estructura (prueba de Duncan). ***Diferencia significativa entre las regiones cerebrales para cada dosis de amitraz ($p < 0.001$).

5.4 Determinación de los niveles de monoaminas

El amitraz produjo un aumento dosis-dependiente de los niveles de 5-HT, DA y NA en todas las regiones del cerebro estudiadas en comparación con el grupo control (Figuras 13, 14

y 15). El aumento de la 5-HT varió de mayor a menor en la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo (Figura 13). El aumento de la NA varió de mayor a menor en el cuerpo estriado, el hipocampo y la corteza prefrontal (Figura 14). El aumento en la DA varió de mayor a menor en la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo (Figura 15).

Además, el amitraz indujo una disminución, dosis-dependiente, del contenido del metabolito 5-HIAA y su tasa de recambio (5-HIAA/5-HT), del contenido de metabolito MHPG y su tasa de recambio (MHPG/NA) y del contenido de los metabolitos DOPAC y HVA y su tasa de recambio (DOPAC+HVA/DA) en todas las regiones cerebrales estudiadas en comparación con el grupo de control. La disminución del 5-HIAA y de la tasa de recambio varió de mayor a menor en la corteza prefrontal, el hipocampo y el cuerpo estriado (Figura 13). La disminución de MHPG varió de mayor a menor en la corteza prefrontal, estriado e hipocampo y la disminución de la tasa de recambio varió de mayor a menor en el estriado, la corteza prefrontal y el hipocampo (Figura 14). No hubo diferencias entre la disminución en el contenido de DOPAC y HVA en el hipocampo, pero la disminución en el contenido de DOPAC fue mayor que la disminución en el contenido de HVA en el cuerpo estriado, y la disminución en el contenido de HVA fue mayor que la disminución en el contenido de DOPAC en la corteza prefrontal (Figura 15). La disminución de la tasa de recambio de DA (DOPAC+HVA/DA) varió de mayor a menor en la corteza prefrontal, el hipocampo y el cuerpo estriado (Figura 15).

El co-tratamiento de TMX con amitraz revirtió parcialmente la alteración inducida por amitraz sobre el contenido de los neurotransmisores 5-HT, NA y DA y sus metabolitos, así como de las tasas de recambio de estos en todas las regiones del cerebro estudiadas (Figuras 13, 14 y 15).

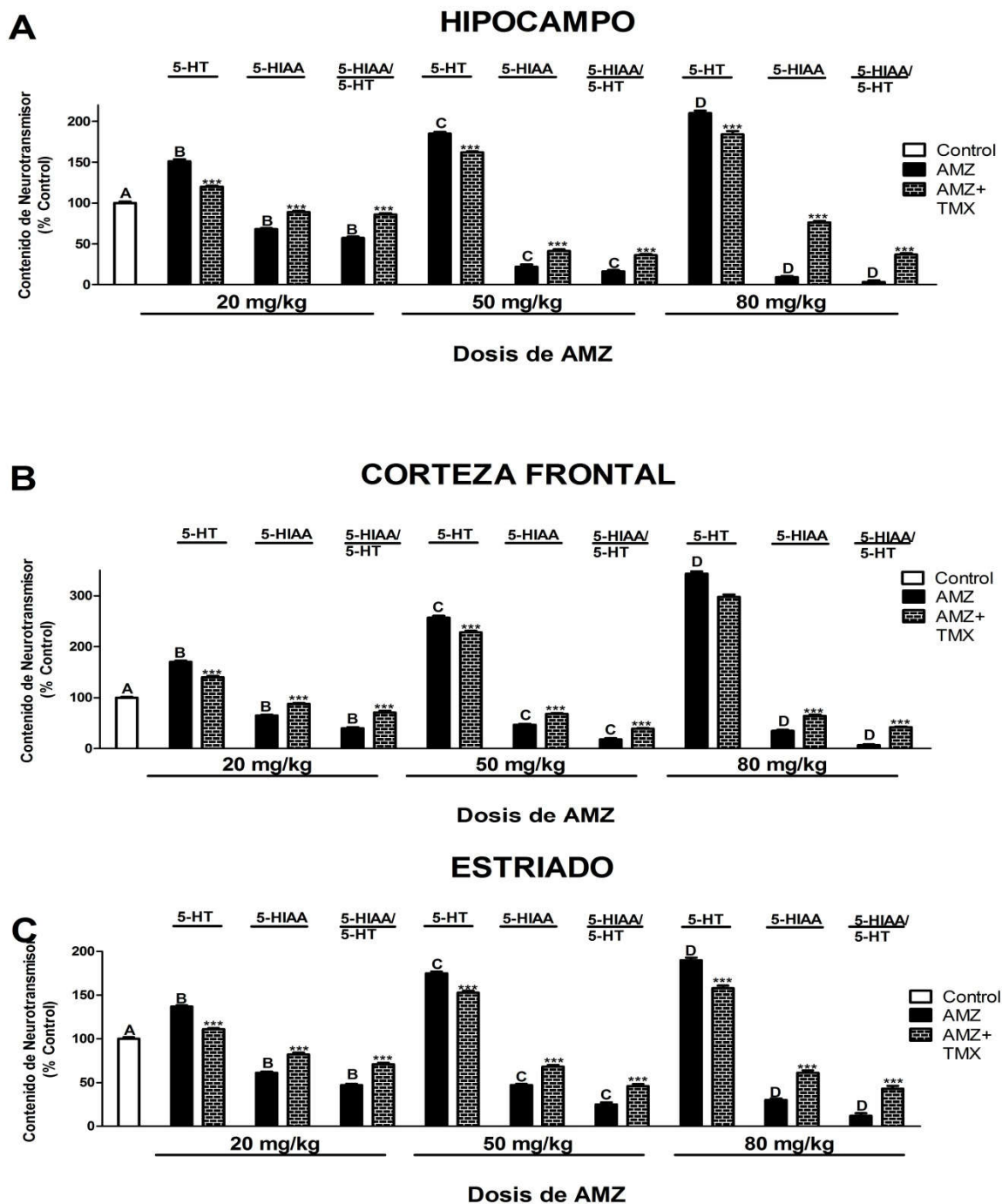


Figura 13. Efecto del cotratamiento del amitraz (AMZ, 20, 50 y 80 mg/kg de peso corporal por vía oral, durante 5 días) con o sin tamoxifeno (TMX, 1 mg/kg de peso corporal por vía subcutánea) sobre el contenido de 5-HT, 5-HIAA y su tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) en el hipocampo (A), la corteza frontal (B), y en el cuerpo estriado (C). Los datos se presentan en porcentaje respecto al grupo control y fueron significativamente diferentes respecto a su grupo de control respectivo en $p < 0,001$. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre las diferentes dosis de neurotransmisor, metabolito y tasa de recambio (prueba de Duncan). ***Diferencia significativa ($p < 0,001$) en comparación con cada dosis de amitraz.

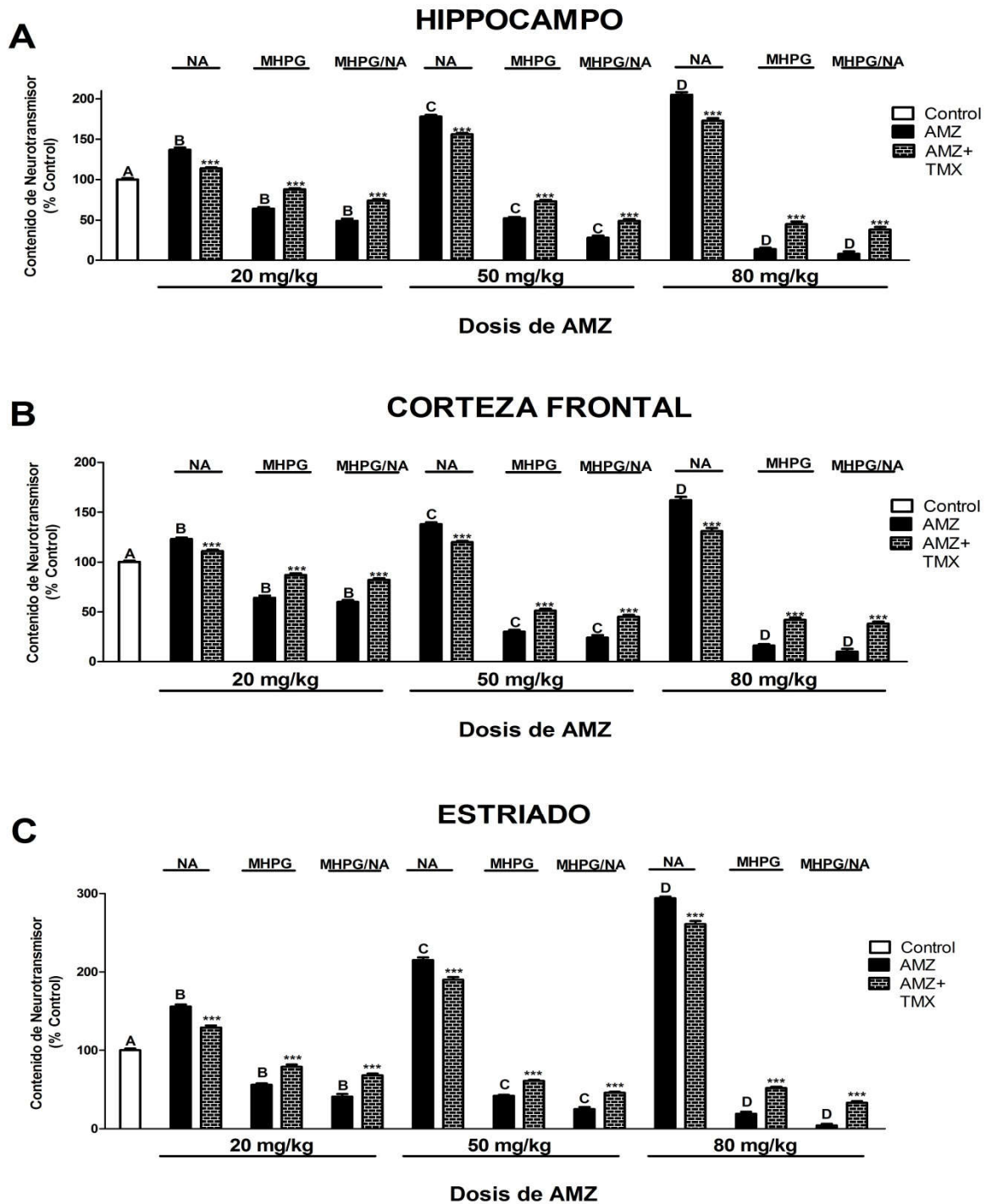


Figura 14. Efecto del cotratamiento del amitraz (AMZ, 20, 50 y 80 mg/kg de peso corporal por vía oral, durante 5 días) con o sin tamoxifeno (TMX, 1 mg/kg de peso corporal por vía subcutánea) sobre el contenido de NA, MHPG y su tasa de recambio (MHPG/NA) en el hipocampo (A), la corteza frontal (B) y en el cuerpo estriado (C). Los datos se presentan en porcentaje respecto al grupo control y fueron significativamente diferentes respecto a su grupo de control respectivo en $p < 0,001$. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre las diferentes dosis de neurotransmisor, metabolito y tasa de recambio (prueba de Duncan). ***Diferencia significativa ($p < 0.001$) en comparación con cada dosis de amitraz.

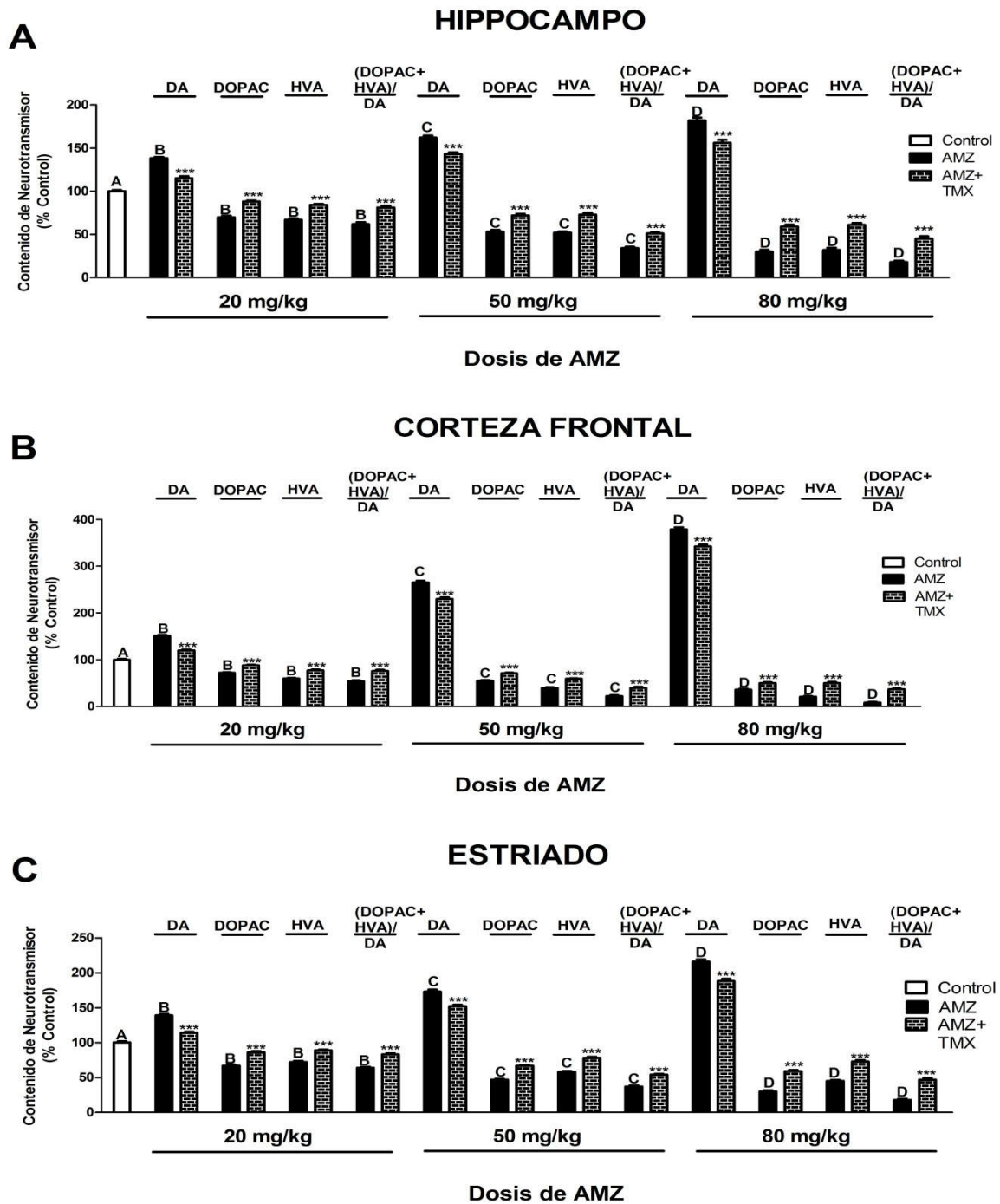


Figura 15. Efecto del cotratamiento del amitraz (AMZ, 20, 50 y 80 mg/kg de peso corporal por vía oral, durante 5 días) con o sin tamoxifeno (TMX, 1 mg/kg de peso corporal por vía subcutánea) sobre el contenido de DA, DOPAC, HVA y su tasa de recambio (DOPAC+HVA/DA) en el hipocampo (A), la corteza frontal (B) y en el cuerpo estriado (C). Los datos se presentan en porcentaje respecto al grupo control y fueron significativamente diferentes respecto a su grupo de control respectivo en $p < 0,001$. Letras diferentes indican una diferencia significativa entre las diferentes dosis de neurotransmisor, metabolito y tasa de recambio (prueba de Duncan). ***Diferencia significativa ($p < 0,001$) en comparación con cada dosis de amitraz.

El tratamiento con TMX indujo una disminución, dosis-dependiente, de los niveles de 5-HT, DA y NA, y un aumento, dosis-dependiente en sus metabolitos y sus tasas de recambio en todas las regiones cerebrales estudiadas en comparación con el grupo control (Figura 16).

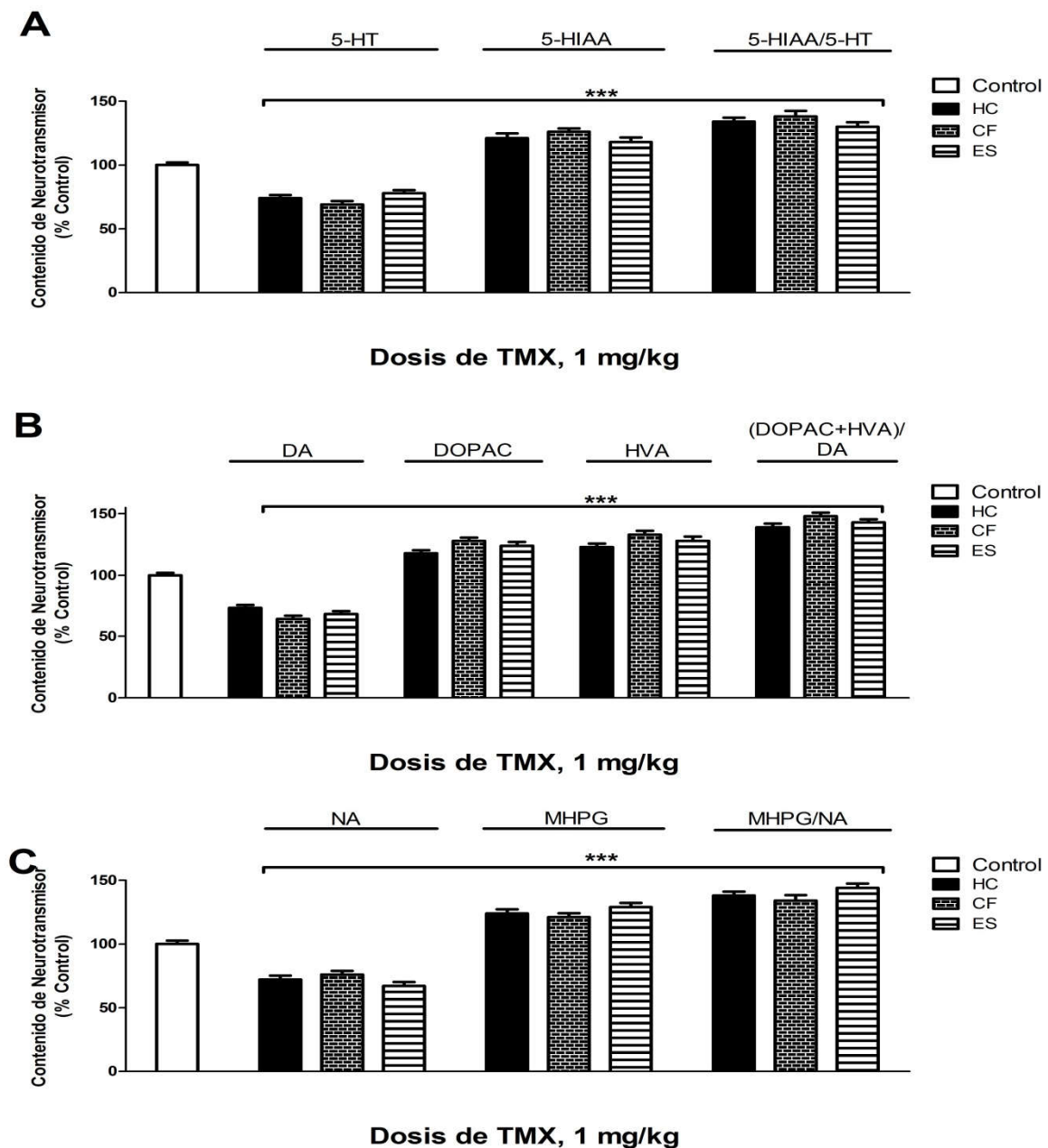


Figura 16. Efecto del tamoxifeno (TMX, 1 mg/kg de peso corporal por vía subcutánea) sobre el contenido de 5-HT, DA, NA, sus metabolitos y su tasa de recambio en el hipocampo (A), la corteza frontal (B) y en el cuerpo estriado (C). Los datos se presentan en porcentaje respecto al grupo control y fueron significativamente diferentes respecto a su grupo de control respectivo con $p < 0,001$. ***Diferencia significativa ($p < 0,001$) en comparación con cada dosis de TMX.

5.5 Análisis de la actividad de la TH y la TRH

El tratamiento solo con TMX indujo una disminución dosis-dependiente de la actividad de la TH y la TRH en las regiones del cerebro estudiadas (Figura 17). El tratamiento con amitraz indujo un aumento dosis-dependiente de la actividad de la TH y la TRH en la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo de mayor a menor en este orden (Figuras 18A y 18B, respectivamente). El cotratamiento de TMX con amitraz revirtió parcialmente el efecto observado en la actividad de la TH y la TRH tras el tratamiento solo con amitraz (Figuras 18A y 18B, respectivamente).

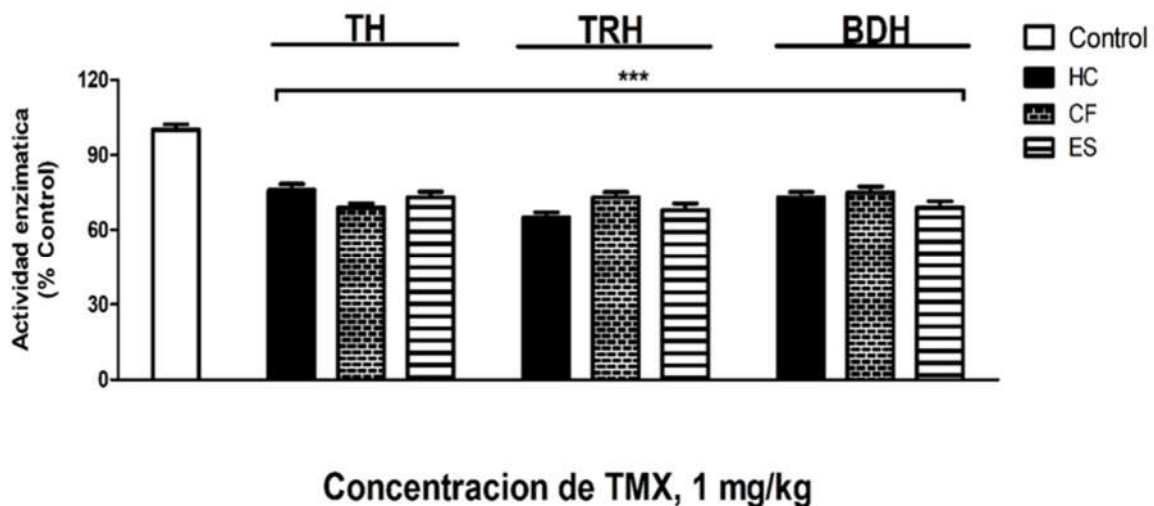


Figura 17. Efecto del tamoxifeno (TMX, 1 mg/kg de peso corporal por vía subcutánea) sobre la actividad enzimática de la TH, la TRH y la BDH en el hipocampo, la corteza frontal, y en el cuerpo estriado. Los datos se presentan en porcentaje respecto al grupo control y fueron significativamente diferentes respecto a su grupo de control respectivo con $p < 0,001$. ***Diferencia significativa ($p < 0.001$) en comparación con cada dosis de TMX.

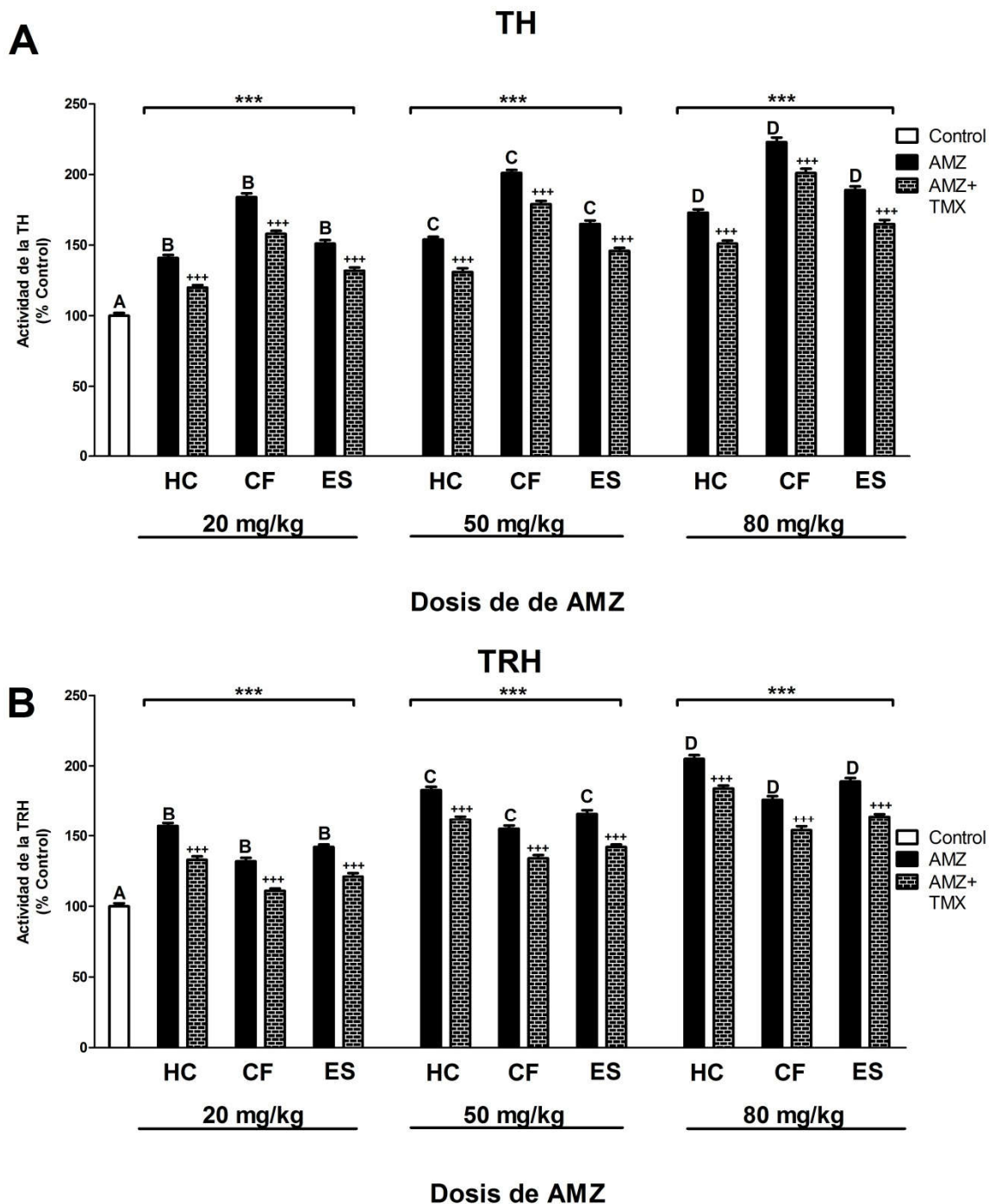


Figura 18. Efecto del cotratamiento de amitraz con o sin tamoxifeno sobre la actividad de la TH (A) y la TRH (B) (ng/mg/30 min) en el hipocampo (HC), corteza (CF) y cuerpo estriado (ES) de ratas macho adultas. Los valores absolutos de la actividad del control de la TH y TRH fueron 165.12 ± 3.45 y 311.23 ± 6.19 en HC, 272.31 ± 5.89 y 241.28 ± 4.78 en CF y 2823.52 ± 59.28 y 381.34 ± 7.56 en ES, respectivamente. Los datos se presentan en porcentaje con respecto al grupo control. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre las diferentes dosis para cada estructura (prueba de Duncan). ***Diferencia significativa entre las regiones cerebrales para cada dosis de amitraz ($p < 0.001$); ###Diferencia significativa en comparación con cada dosis de amitraz y estructura ($p < 0.001$).

5.6. Análisis de actividad de dopamina-β-hidroxilasa

Después del tratamiento individual con amitraz se observó un aumento dosis-dependiente en la actividad de la BDH en el cuerpo estriado, el hipocampo y la corteza prefrontal, de mayor a menor en este orden, respectivamente (Figura 19). El tratamiento solo con TMX produjo un efecto opuesto al observado con amitraz (Figura 17). El cotratamiento de TMX con amitraz revirtió parcialmente el efecto observado sobre la actividad de la BDH tras el tratamiento solo con amitraz (Figura 19).

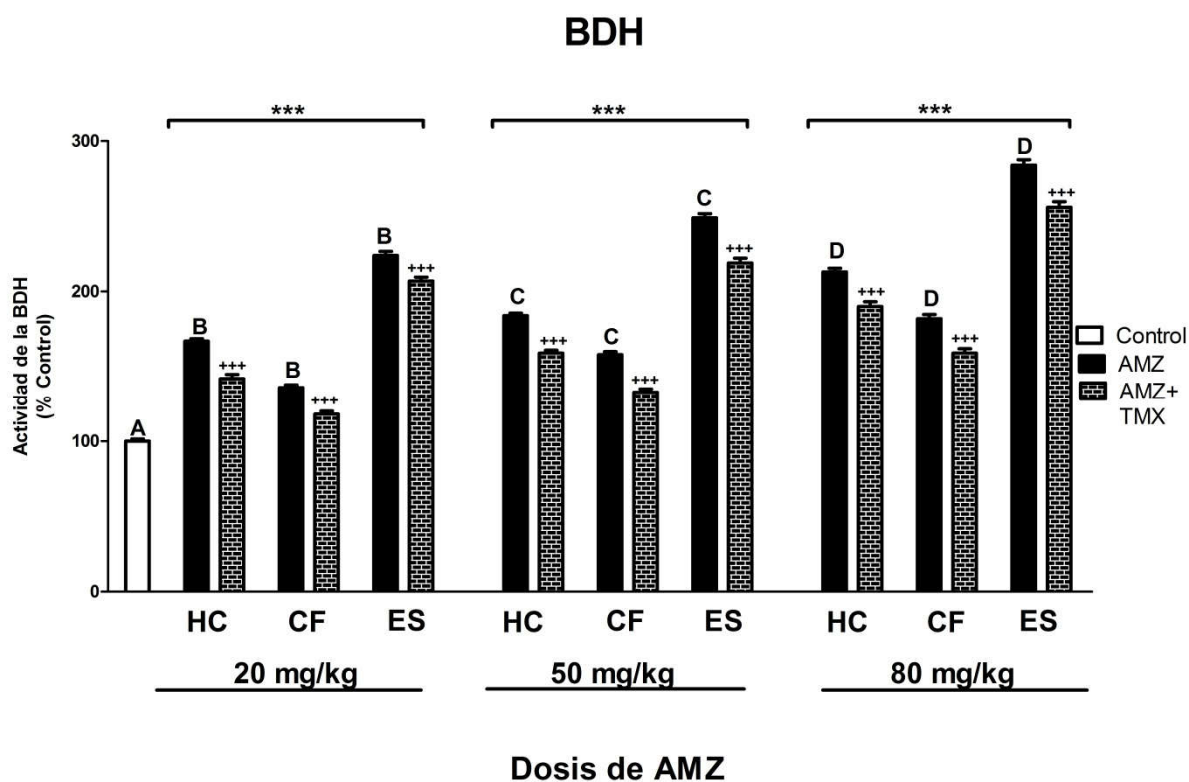


Figura 19. Efecto del cotratamiento del amitraz con o sin tamoxifeno sobre la actividad de la BDH (nmol/min/g) en el hipocampo (HC), corteza (CF) y cuerpo estriado (ES) de ratas macho adultas. Los valores absolutos de la actividad del control de la BDH fueron 4.41 ± 0.64 en HC, 8.65 ± 0.13 en CF y 9.12 ± 0.14 en ES, respectivamente. Los datos se presentan en porcentaje con respecto al grupo control. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre las diferentes dosis para cada estructura (prueba de Duncan). ***Diferencia significativa entre las regiones cerebrales para cada dosis de amitraz ($p < 0.001$); ####Diferencia significativa en comparación con cada dosis de amitraz y estructura ($p < 0.001$).

5.7. Medida del contenido y la actividad de la monoaminoxidasa

El análisis de la actividad de la MAO en la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo tras 5 días de tratamiento con vehículo, amitraz a la dosis de 20, 50 y 80 mg/kg de peso corporal y TMX no mostró ningún efecto en las regiones cerebrales estudiadas (datos no mostrados). El tratamiento sólo con TMX indujo una disminución y un aumento, respectivamente, en el contenido de la MAO A y la MAO B en la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo de mayor a menor en este orden, respectivamente (Figuras 20A y 20B y Figura 21, respectivamente). Además, el tratamiento individual con TMX o con amitraz indujo un aumento y una disminución, respectivamente, en el contenido de la MAO A y la MAO B en la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo de mayor a menor en este orden, respectivamente (Figura 20 y Figuras 21A y 21B, respectivamente). El cotratamiento de TMX con amitraz revirtió parcialmente el efecto observado sobre el contenido de MAO A y B tras el tratamiento sólo con amitraz (Figuras 21A y 21B).

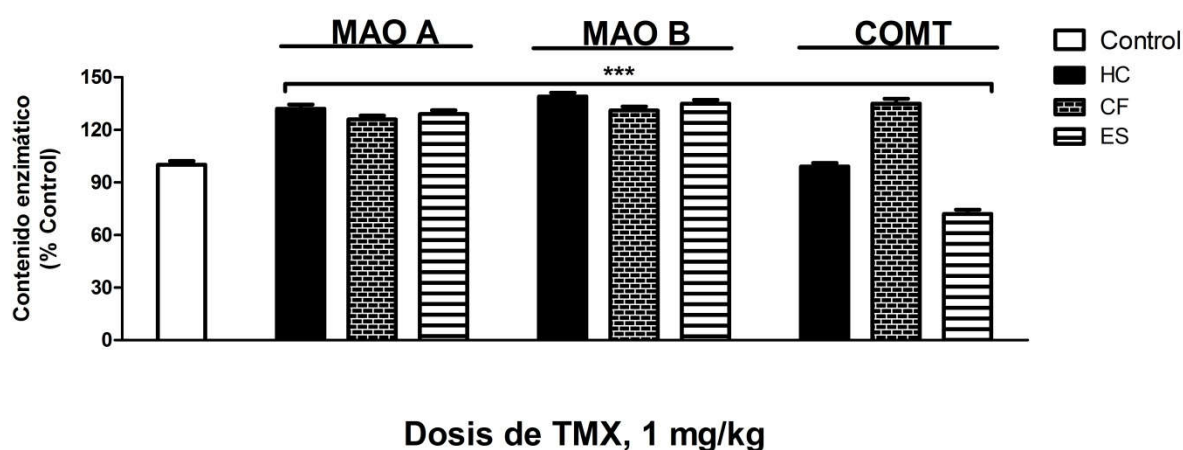


Figura 20. Efecto del tamoxifeno (TMX, 1 mg/kg de peso corporal por vía subcutánea) sobre el contenido enzimático de la MAO A, la MAO B y la COMT en el hipocampo, la corteza frontal, y en el cuerpo estriado. Los datos se presentan en porcentaje respecto al grupo control y fueron significativamente diferentes respecto a su grupo de control respectivo con $p < 0,001$. ***Diferencia significativa ($p < 0.001$) en comparación con cada dosis de TMX.

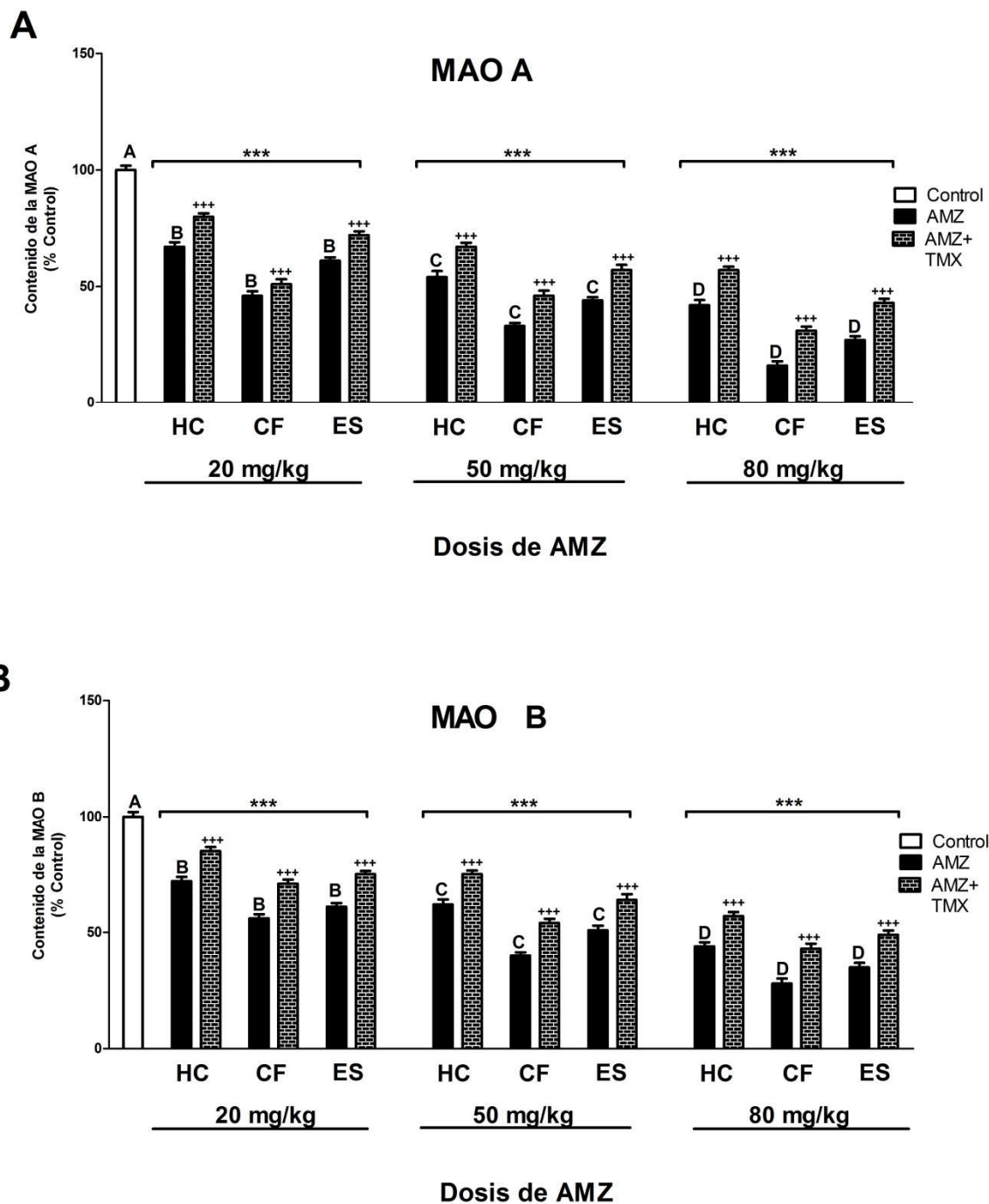


Figura 21. Efecto del cotratamiento del amitraz con o sin tamoxifeno sobre el contenido de la MAO A (A) y la MAO B (B) (ng/mg) en el hipocampo (HC), corteza (CF) y cuerpo estriado (ES) de ratas macho adultas. Los valores absolutos del contenido de la MAO A y la MAO B fueron 7.41 ± 0.12 y 5.32 ± 0.11 en HC, 9.34 ± 0.14 y 7.32 ± 0.15 en CF y 10.18 ± 0.15 y 8.49 ± 0.18 en ES, respectivamente. Los datos se presentan en porcentaje con respecto al grupo control. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre las diferentes dosis para cada estructura (prueba de Duncan). ***Diferencia significativa entre las regiones cerebrales para cada dosis de amitraz ($p < 0.001$); ####Diferencia significativa en comparación con cada dosis de amitraz y estructura ($p < 0.001$).

5.8. Análisis sobre la actividad y el contenido de la catecol-O-metiltransferasa

El tratamiento individual con amitraz o TMX no mostró ningún efecto sobre la actividad de la COMT en las regiones cerebrales estudiadas (datos no mostrados). Sin embargo, el amitraz indujo una disminución dosis-dependiente en el contenido de la COMT en la corteza prefrontal y un aumento en el cuerpo estriado, pero no produjo efecto sobre el contenido de COMT en el hipocampo (Figura 22). El tratamiento sólo con TMX indujo un aumento dosis-dependiente en el contenido de la COMT en la corteza prefrontal y una disminución en el cuerpo estriado, pero no produjo efecto sobre el contenido de la COMT en el hipocampo (Figura 21). El cotratamiento de TMX con amitraz revirtió parcialmente el efecto observado en el contenido de COMT tras tratamiento sólo con amitraz (Figura 22).

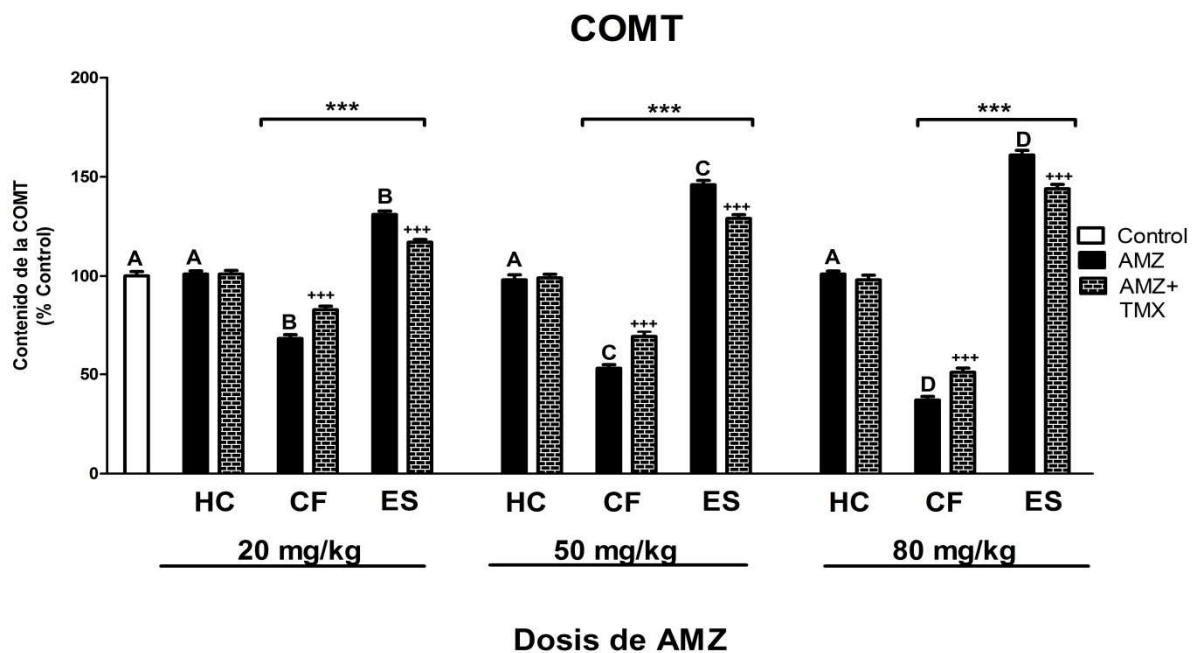


Figura 22. Efecto del cotratamiento del amitraz con o sin tamoxifeno sobre el contenido de la COMT (ng/mg) en el hipocampo (HC), corteza (CF) y cuerpo estriado (ES) de ratas macho adultas. Los valores absolutos del contenido de la COMT fueron 5.32 ± 0.13 en HC, 8.16 ± 0.17 en CF y 6.38 ± 0.14 en ES, respectivamente. Los datos se presentan en porcentaje con respecto al grupo control. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre las diferentes dosis para cada estructura (prueba de Duncan). ***Diferencia significativa entre las regiones cerebrales para cada dosis de amitraz ($p < 0.001$); ###Diferencia significativa en comparación con cada dosis de amitraz y estructura ($p < 0.001$).

5.9. Análisis de la expresión génica

Tras el tratamiento durante 24 h con diferentes concentraciones de amitraz del cultivo primario de neuronas del hipocampo, la expresión génica de la GAD65 se incrementó significativamente de forma concentración-dependiente desde la concentración de 0,1 μM a 1 μM y se redujo de forma concentración-dependiente desde la concentración de 10 μM (Figura 23A), pero no hubo modificación en la expresión de la GABAT y la SSADH (datos no mostrados). Además, la expresión génica de la glutaminasa se incrementó significativamente de forma concentración-dependiente a partir de la concentración de 10 μM de amitraz (Figura 23B). El tratamiento simple o simultáneo con idazoxan y n-metilhistaprodifeno no produjo un efecto sobre la expresión del gen de la GAD65 y la glutaminasa (Figura 23). El cotratamiento con amitraz e idazoxan revirtió parcialmente la alteración de la expresión de la GAD65 inducida por el amitraz. El cotratamiento de N-metilhistaprodifeno con amitraz revirtió parcialmente el incremento de la expresión de la glutaminasa y la disminución de la expresión de la GAD65 inducida por el amitraz. Además, el cotratamiento con idazoxan y n-metilhistaprodifeno revirtió en mayor proporción la disminución de la expresión de la GAD65 que cada cotratamiento con amitraz por separado, pero no completamente (Figura 23).

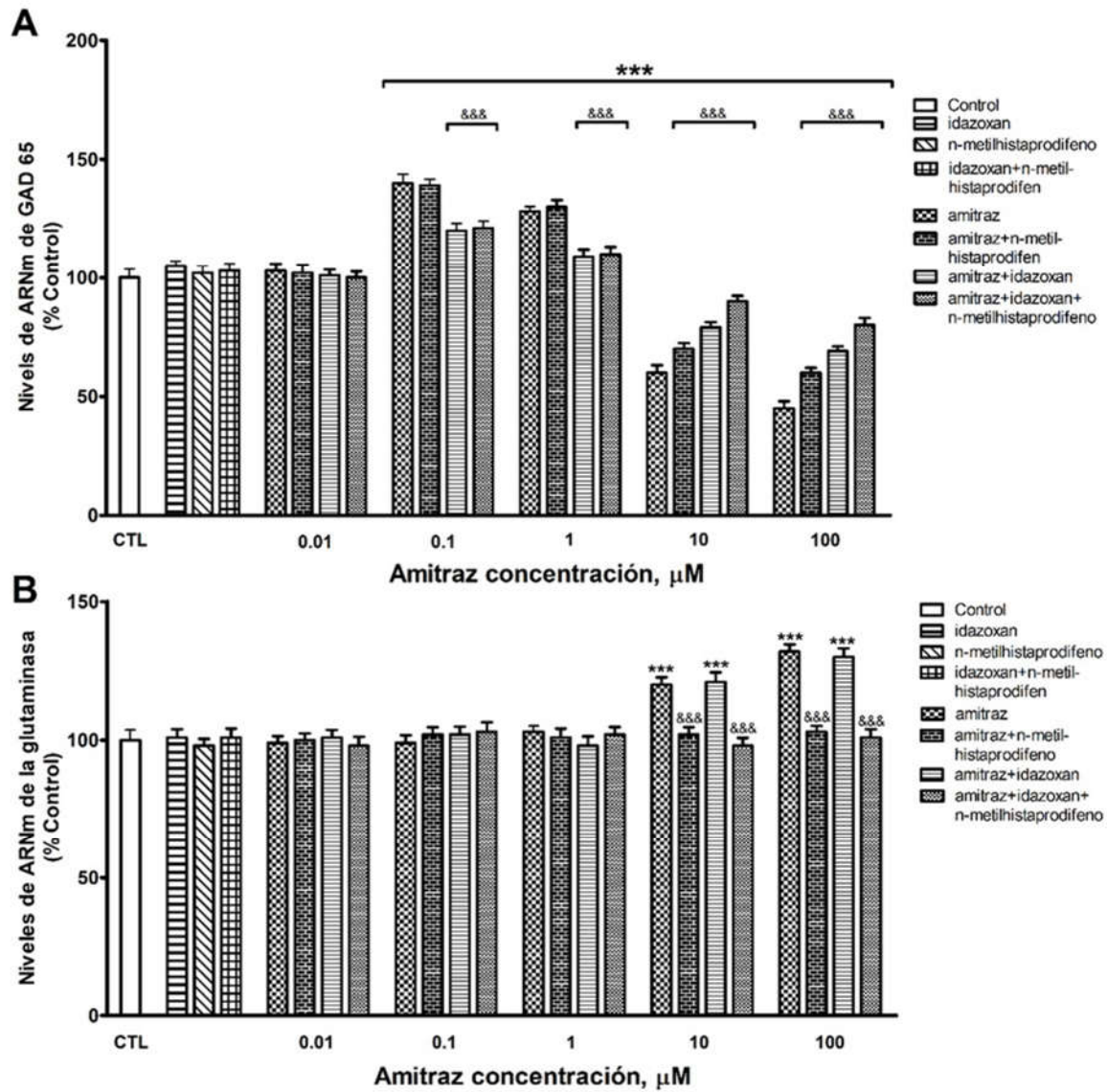


Figura 23. Efecto sobre la expresión génica de (A) GAD 65 y (B) glutaminasa tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de amitraz. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control. &&& $p < 0.001$ comparado con el tratamiento de amitraz.

El tratamiento con amitraz a las dosis de 20, 50 y 80 mg/kg de peso corporal durante 5 días indujo un aumento en la expresión de la ARO en la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo de mayor a menor en este orden, respectivamente (Figura 24). Además, el amitraz indujo un aumento en la expresión de la TH, en la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo de mayor a menor en este orden, y de la TRH en el hipocampo, el

cuerpo estriado y la corteza prefrontal de mayor a menor en este orden (Figuras 25A y 25B). El tratamiento con amitraz no produjo un efecto sobre la expresión de COMT en el hipocampo, pero indujo una disminución en su expresión en la corteza prefrontal y un aumento en su expresión en el cuerpo estriado (Figura 26A). El amitraz aumentó la expresión de la BDH en el cuerpo estriado, el hipocampo y la corteza prefrontal, de mayor a menor en este orden, respectivamente (Figura 26B). Finalmente, el amitraz disminuyó la expresión de la MAO A y MAO B en la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo de mayor a menor en este orden, respectivamente (Figuras 27A y 27B). El tratamiento con TMX indujo un efecto opuesto al observado sobre la expresión de estas enzimas tras el tratamiento sólo con amitraz (Figura 28) y su cotratamiento con amitraz revirtió parcialmente los efectos inducidos tras el tratamiento solo con amitraz (Figuras 25A, 25B, 26A, 26B, 27A y 27B).

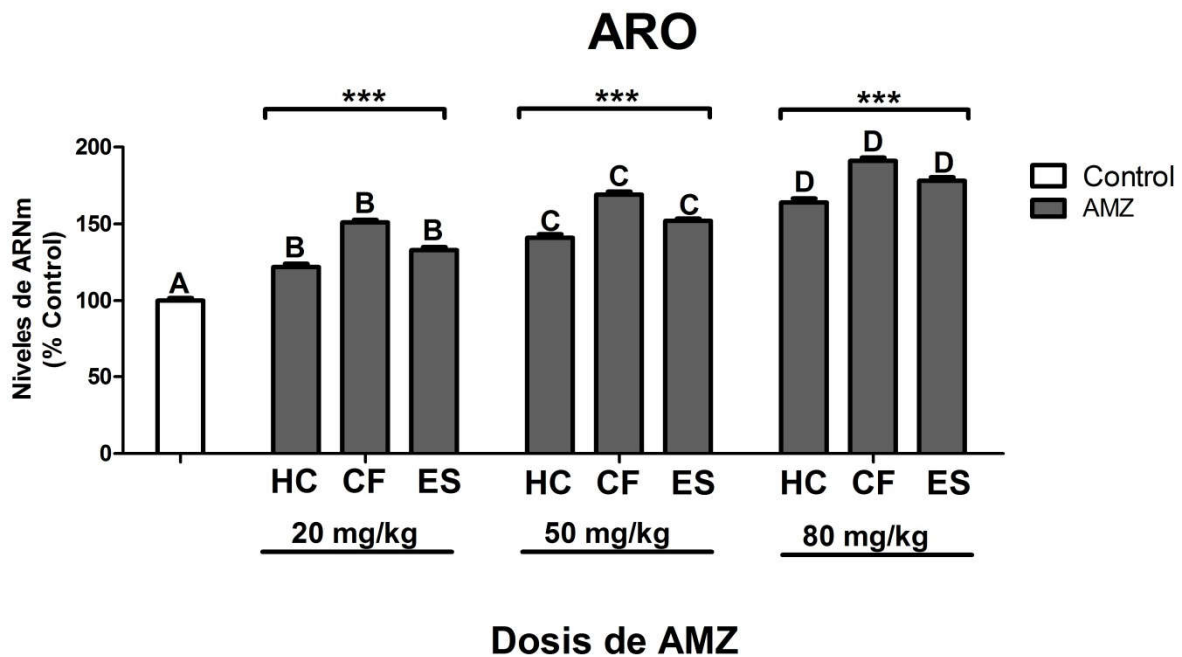


Figura 24. Efecto sobre la expresión génica de la ARO tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de amitraz. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan en porcentaje con respecto al grupo control. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre las diferentes dosis para cada estructura (prueba de Duncan). ***Diferencia significativa entre las regiones cerebrales para cada dosis de amitraz ($p < 0.001$).

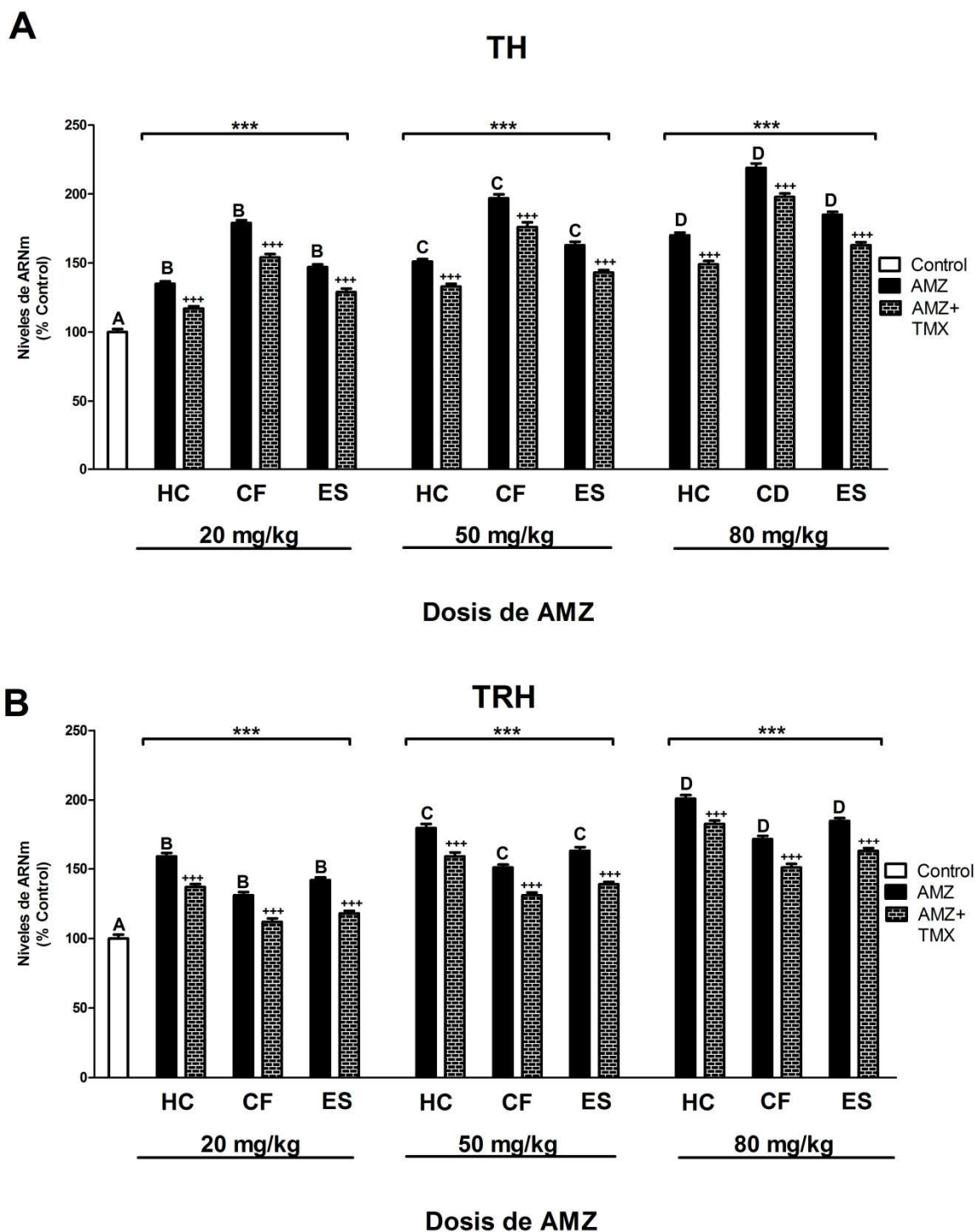


Figura 25. Efecto sobre la expresión génica de (A) TH y (B) TRH tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de amitraz con o sin TMX. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan en porcentaje con respecto al grupo control. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre las diferentes dosis para cada estructura (prueba de Duncan). ***Diferencia significativa entre las regiones cerebrales para cada dosis de amitraz ($p < 0.001$); ###Diferencia significativa en comparación con cada dosis de amitraz y estructura ($p < 0.001$).

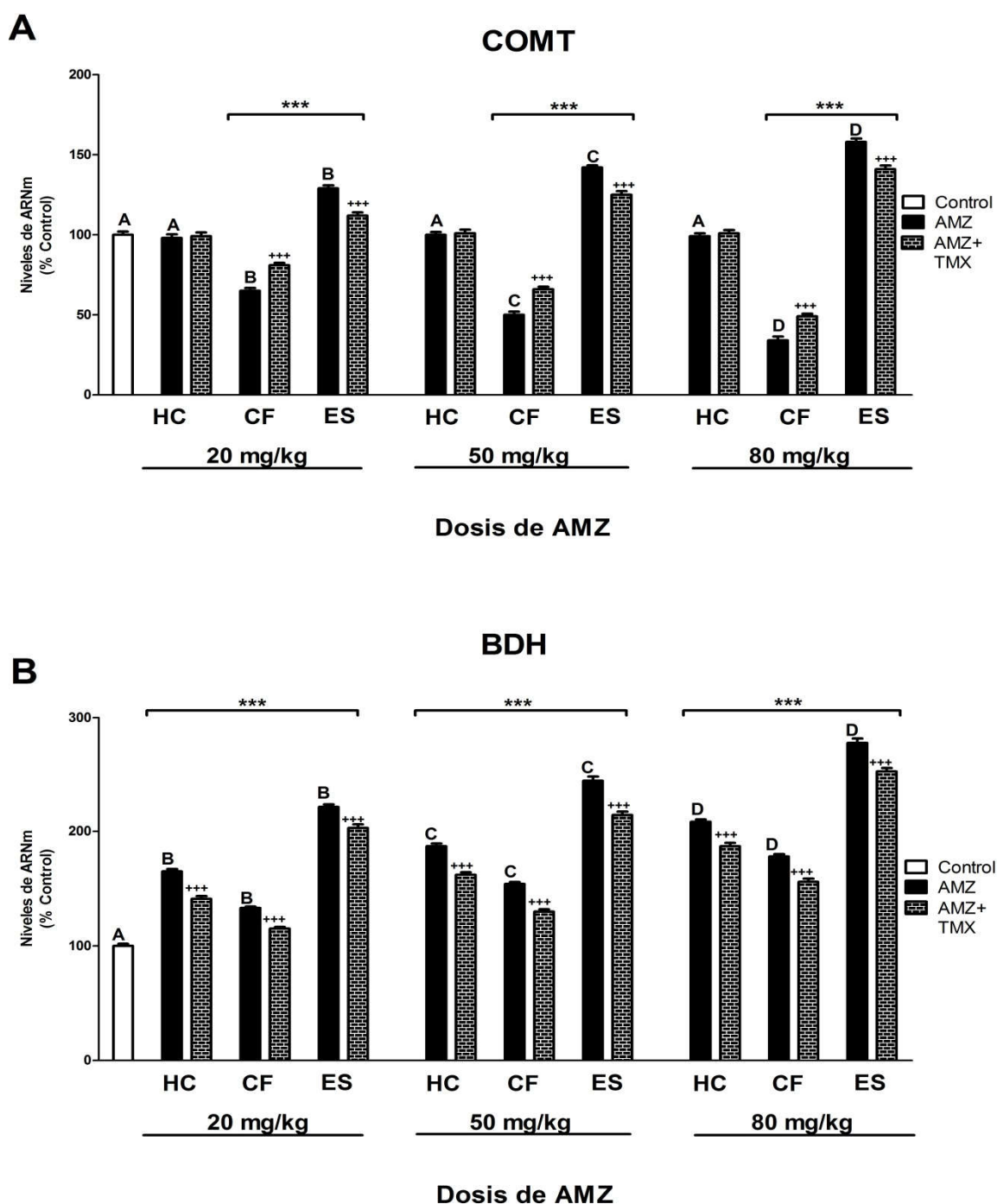


Figura 26. Efecto sobre la expresión génica de (A) COMT y (B) BDH tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de amitraz con o sin TMX. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan en porcentaje con respecto al grupo control. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre las diferentes dosis para cada estructura (prueba de Duncan). ***Diferencia significativa entre las regiones cerebrales para cada dosis de amitraz ($p < 0.001$); ###Diferencia significativa en comparación con cada dosis de amitraz y estructura ($p < 0.001$).

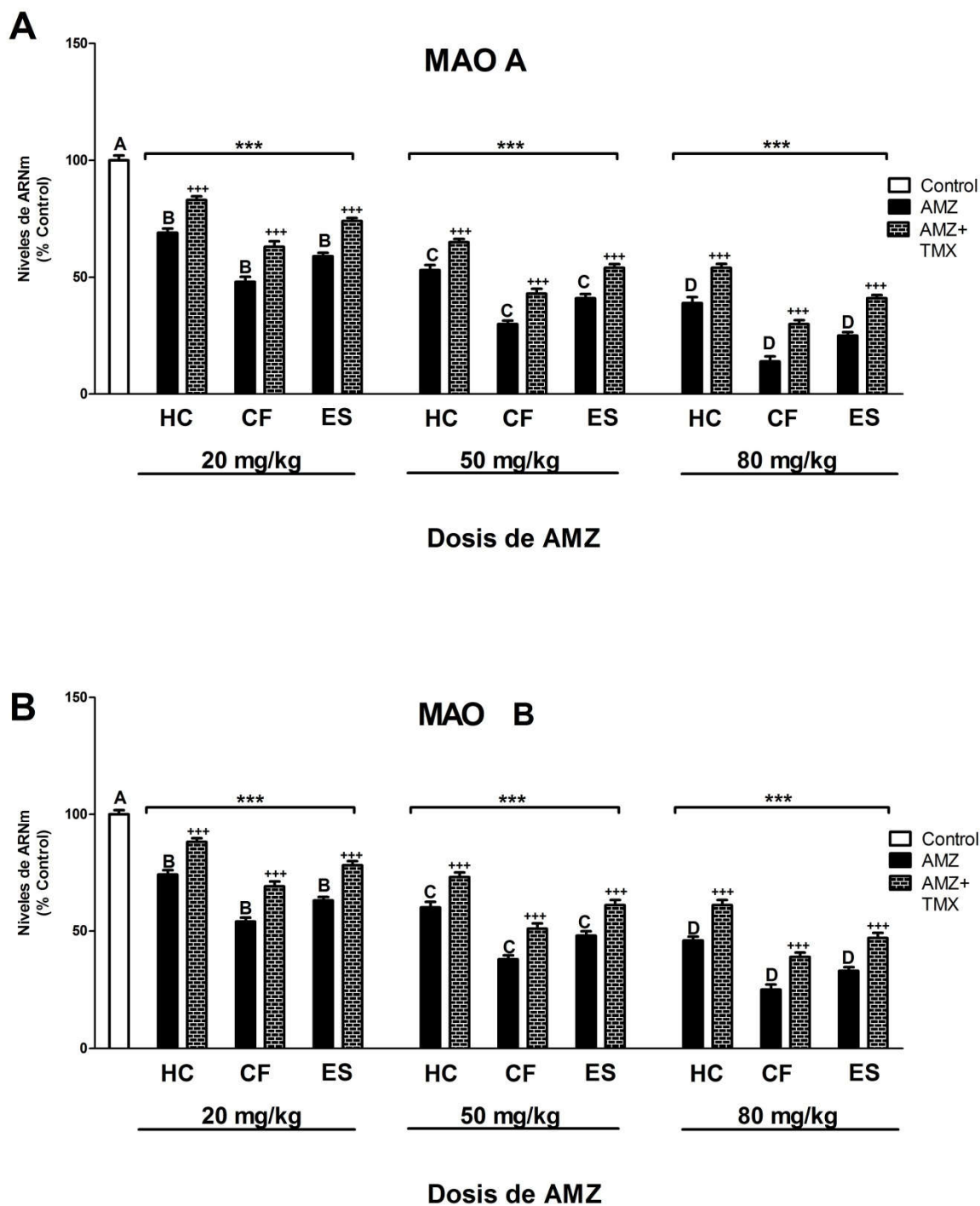


Figura 27. Efecto sobre la expresión génica de (A) MAO A y (B) MAO B tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de amitraz con o sin TMX. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan en porcentaje con respecto al grupo control. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre las diferentes dosis para cada estructura (prueba de Duncan). ***Diferencia significativa entre las regiones cerebrales para cada dosis de amitraz ($p < 0.001$); ###Diferencia significativa en comparación con cada dosis de amitraz y estructura ($p < 0.001$).

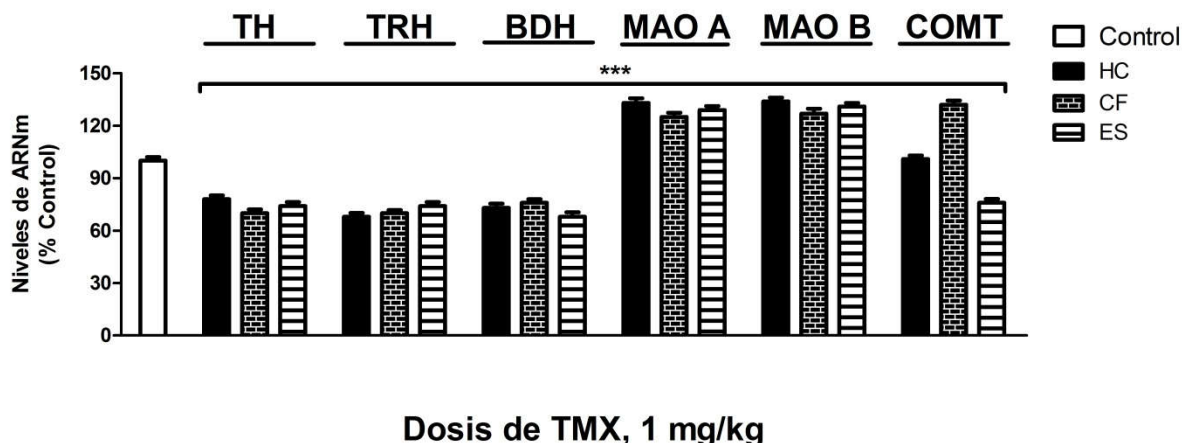


Figura 28. Efecto sobre la expresión génica de la TH, TRH, MAO A, MAO B, COMT y BDH tras 24 h de exposición a TMX. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. Los datos se presentan en porcentaje con respecto al grupo control. ***Diferencia significativa entre cada región cerebral y su control ($p < 0.001$).

5.10. Efecto del amitraz sobre la viabilidad celular

Utilizamos la prueba del MTT para evaluar el efecto del tratamiento con amitraz con o sin idazoxan y con o sin n-metilhistaprodifeno sobre la viabilidad celular de las neuronas procedentes del cultivo primario de hipocampo (Figura 29). La prueba del MTT mostró una reducción en la viabilidad celular sólo a la concentración de amitraz más alta evaluada en comparación con las células tratadas con vehículo (control negativo). El tratamiento solo con idazoxan o el tratamiento solo con n-metilhistaprodifeno o el cotratamiento de idazoxan más n-metilhistaprodifeno no afectó a la viabilidad celular (Figura 29). Sin embargo, el tratamiento con amitraz más idazoxan o amitraz más n-metilhistaprodifeno o amitraz en combinación con idazoxan y n-metilhistaprodifeno redujo la muerte celular inducida por el tratamiento solo con amitraz a la concentración más alta utilizada (Figura 29).

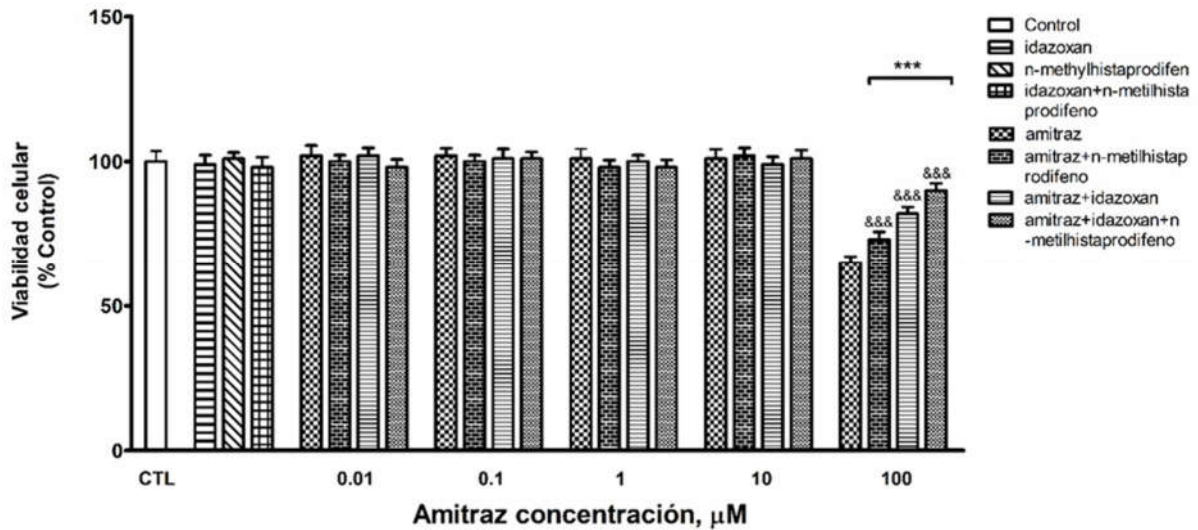


Figura 29. Efecto sobre la viabilidad celular tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de AMZ. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control. &&& $p < 0.001$ comparado con el tratamiento de AMZ.

5.11. Determinación del contenido de glutamato y GABA

Los niveles de glutamato y GABA fueron evaluados en el sobrenadante del cultivo primario de neuronas procedentes del hipocampo tras 24 horas de exposición al amitraz a concentraciones crecientes con o sin idazoxan y con o sin n-metilhistaprodifeno (Figura 30). Los niveles de GABA fueron incrementados significativamente desde la concentración de 0,1 μ M a 1 μ M y los disminuyeron desde la concentración de 10 μ M tras la exposición a amitraz durante 24 h (Figura 30B). Por el contrario, el amitraz tuvo los efectos opuestos sobre los niveles de glutamato (Figura 30A). El tratamiento único o simultáneo con idazoxan y n-metilhistaprodifeno no afectó a los niveles de GABA y glutamato. El cotratamiento con amitraz e idazoxan revirtió parcialmente la alteración en los niveles de glutamato y GABA inducidos por el tratamiento solo con amitraz. El cotratamiento con N-metilhistaprodifeno revirtió parcialmente el aumento de glutamato y la disminución de los niveles de GABA inducidos por el tratamiento solo con amitraz. Además, el cotratamiento de idazoxan y n-

metilhistaprodifeno no revirtió completamente los cambios en los niveles de GABA y glutamato (Figura 30). Dado que la reducción de los niveles de glutamato y GABA podría deberse a la reducción de la viabilidad celular, estos niveles se normalizaron por la concentración de proteínas, demostrando que no se deben a la pérdida de glutamato y GABA sino a la síntesis neurotransmisora reducida por la alteración en la expresión génica de la glutaminasa y la GAD 65.

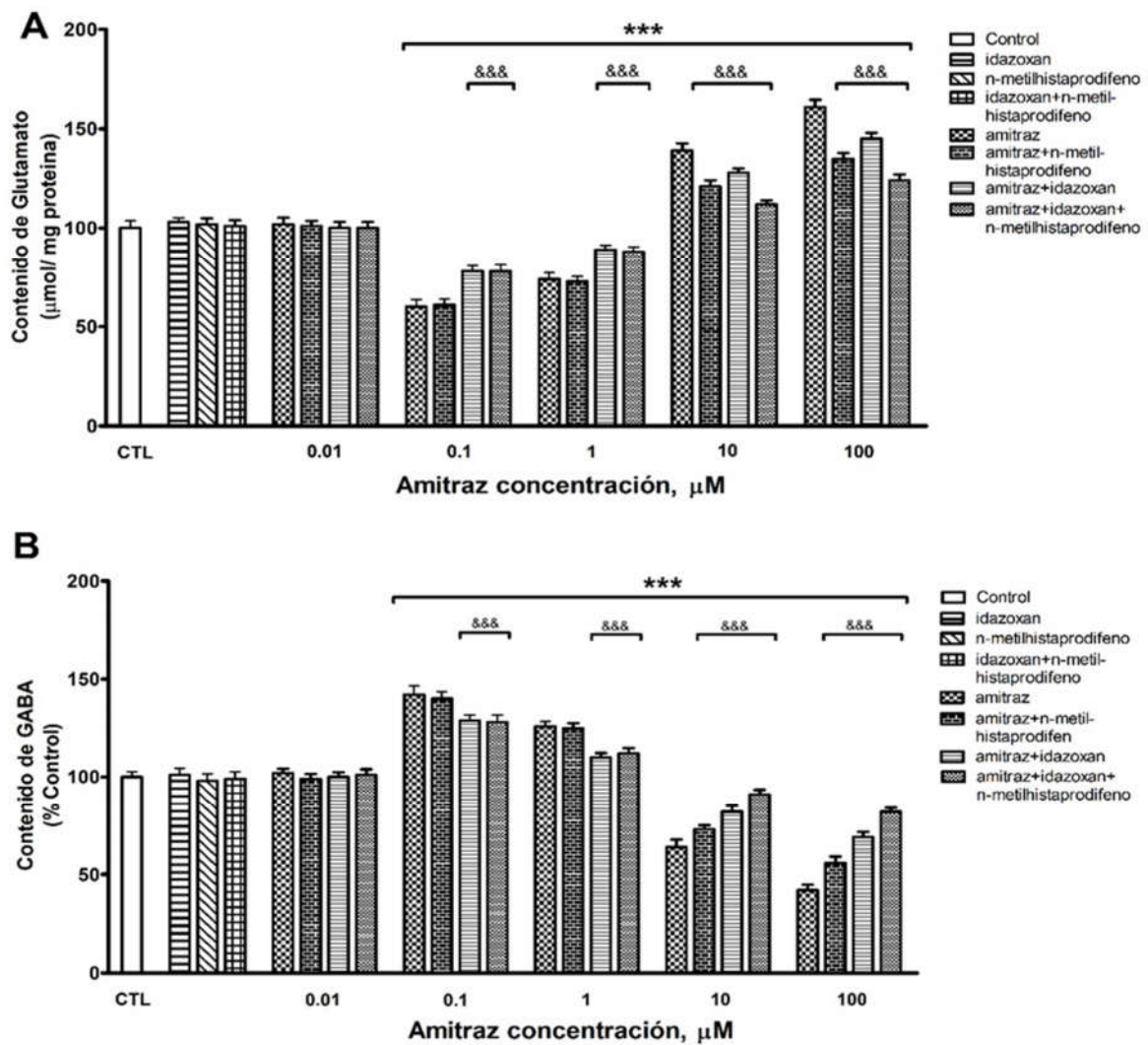


Figura 30. Efecto sobre el contenido de glutamato (A) y GABA (B) tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes de AMZ. Los datos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes en triplicado. *** $p < 0.001$ comparado con el control. &&& $p < 0.001$ comparado con el tratamiento de AMZ.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

6. DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que los niveles de glutamato y GABA fueron alterados tras 24 horas de exposición al amitraz a partir de la concentración de 0,1 μM en cultivos primarios neuronales de hipocampo. El cotratamiento de amitraz con idazoxan revirtió parcialmente esta alteración, pero el cotratamiento con n-metilhistaprodifeno sólo revirtió parcialmente el aumento de los niveles de glutamato y la reducción de los niveles de GABA a partir de la concentración de amitraz de 10 μM . Estos resultados sugieren que ambos mecanismos median la alteración de la transmisión GABAérgica y glutamatérgica, pero la inhibición del receptor H_1 media parcialmente la hiperactividad neuronal inducida por el amitraz solamente a partir de la concentración de amitraz de 10 μM . Este efecto podría deberse al hecho de que la CI_{50} del amitraz sobre el receptor H_1 es 10 μM (Costa et al., 1988). Además, esta reversión no fue completa cuando ambos cotratamientos tuvieron lugar, lo que sugiere que otros mecanismos están implicados en estos efectos. La reducción de los niveles de GABA podría deberse a la disminución de la viabilidad celular, pero como la muerte celular sólo se observó a la concentración más alta probada y se revirtió parcialmente por el cotratamiento simple o simultáneo con idazoxan y n-metilhistaprodifeno, esto sugiere que la muerte celular fue el resultado de la hiperactividad neuronal. Este hecho fue confirmado por la normalización de los niveles de neurotransmisores con la concentración de proteína, evitando la posible confusión inducida por la muerte neuronal.

Además, el amitraz indujo la expresión génica de la GAD65 a partir de la concentración de 0,1 μM , pero indujo la expresión de la glutaminasa y reprimió la de la GAD65 desde la concentración de 10 μM , de manera concentración-dependiente, mostrando que el amitraz altera los niveles de glutamato y GABA a través de una alteración en la síntesis de estos neurotransmisores, aunque otros mecanismos no pueden descartarse como una

alteración en la recaptación o el metabolismo de estos neurotransmisores. La alteración de la expresión de la GAD65 fue revertida parcialmente cuando las células del hipocampo fueron co-tratadas con amitraz (desde 0,1 μM) más idazoxan o con amitraz (desde 10 μM) más n-metilhistaprodifeno, pero no completamente cuando se realizaban ambos tratamientos. Esto indica que tanto la activación del receptor α_2 como la inhibición del receptor H_1 están parcialmente implicadas en la alteración de la síntesis de GABA. Por último, solo el cotratamiento de amitraz con n-metilhistaprodifeno revirtió la expresión alterada de la glutaminasa, lo que sugiere que la inhibición del receptor H_1 es el único mecanismo a través del cual el amitraz produce este efecto.

La neurotransmisión excitadora e inhibitoria en el SNC está mediada principalmente por glutamato y GABA, respectivamente, y un desequilibrio entre excitación e inhibición producido por una disminución en la transmisión GABAérgica y/o un aumento en la transmisión glutamatérgica se ha asociado con la generación de convulsiones (Pena y Tapia, 2000). Se ha descrito que el amitraz produce tanto depresión del SNC como convulsiones (Folz et al., 1984; Hsu y Schaffer, 1988), lo que podría ser producido a través de la alteración de los niveles de glutamato y GABA observados. A este respecto, se ha descrito que los agonistas de los receptores adrenérgicos α_2 son tanto anticonvulsivantes a dosis bajas como agentes convulsivantes a dosis altas (Shouse et al., 1996; Sitnikova y van Luijtelaaar, 2005). Además, se ha mostrado que la activación de los adrenoceptores α_2 modula la liberación de GABA (Alachkar et al., 2006; Zhang y Ordway, 2003). También, se ha descrito que el agonista del receptor α_2 clonidina aumenta los niveles de GABA a través del aumento de la expresión de descarboxilasa del ácido glutámico (Lu et al., 2015). Finalmente, la activación de los receptores α_{2A} y en algunos casos de los α_{2D} en muchas regiones cerebrales como el hipocampo podría inhibir la liberación de glutamato (Jiménez-Rivera et al., 2012). Todos

estos datos apoyan la hipótesis de que el amitraz, a través de su acción sobre los α_2 -adrenoceptores, podría alterar los niveles de GABA y glutamato observados tras el tratamiento con amitraz.

Por otra parte, la histamina es un neurotransmisor anticonvulsivante (Li et al., 2005) que abre directamente los receptores GABA-A (Saras et al., 2008) y estimula la liberación de GABA a través de la activación del receptor H_1 (Soria-Jasso y Arias-Montano, 1996). Además, la inhibición selectiva del receptor H_1 se ha asociado con la inducción de convulsiones (Kukko-Lukjanov et al., 2012; Zolaly, 2012) y se ha descrito que los antagonistas selectivos del receptor H_1 bloquean la liberación de GABA (Soria-Jasso y Arias - Montano, 1996). En este sentido, se ha descrito que el tratamiento crónico con bloqueantes de receptores H_1 produce un aumento de la susceptibilidad a convulsiones en roedores no epilépticos a través de la degeneración de la vía de síntesis del glutamato y GABA (Hu et al., 2012). Además, se ha descrito que el receptor H_1 modula la transmisión glutamatérgica (Jin et al., 2005). Por último, las convulsiones generalizadas observadas después de la exposición a amitraz respondieron al tratamiento con diazepam, un modulador alostérico positivo de los receptores GABA (Ertekin et al., 2002). De acuerdo con estos datos, la inhibición del amitraz sobre el receptor H_1 y el posterior incremento y reducción de los niveles de glutamato y GABA observados podrían mediar la inducción de las convulsiones descritas tras el tratamiento con amitraz. Se necesitan más estudios para confirmar este efecto.

Existe una carencia de información sobre los niveles de amitraz alcanzados en los diferentes tejidos en función de las especies y el sexo en el rango de dosis tóxicas. En este sentido, sólo hay dos estudios sobre los niveles plasmáticos de amitraz, uno en ponis y otro en ovejas tras la administración intravenosa de amitraz, y otro en perros por vía oral, pero no hay

datos disponibles en otras especies. Por lo tanto, una extrapolación de los resultados *in vitro* a la situación *in vivo* es muy difícil, si no imposible. Sin embargo, Costa y colaboradores (1989b) mostraron que existe una buena correlación entre la inhibición del adrenoceptor α_2 por amitraz en cerebro de rata *in vitro* (0,01-10 μ M) y en plasma *in vivo* (6,25-100 mg/kg). Además, la CI_{50} del amitraz sobre el receptor H_1 está en el rango de concentraciones evaluadas por Costa y colaboradores (1989b). También, se describió que la mayor susceptibilidad a la inducción de convulsiones se producía a partir de 50 mg/kg y la depresión del SNC a partir de dosis más bajas en ratas (Gilbert, 1988), que están en el rango de dosis correlacionado con las concentraciones utilizadas en nuestro trabajo. Según estos datos, las concentraciones utilizadas serían relevantes *in vivo* a la dosis que induce estos efectos. Se necesitan más estudios para cubrir esta información carente para la identificación de los peligros por exposición al amitraz y una evaluación completa del riesgo para el hombre de este compuesto.

Por otra parte, en el presente trabajo, demostramos que el amitraz aumenta los niveles séricos de T de una manera dosis-dependiente como fue descrito previamente en ratas macho (Chou et al., 2008), lo cual apoya nuestros resultados. También encontramos que el amitraz aumentó los niveles de E2 y la expresión y actividad de la enzima ARO partiendo desde menor a mayor efecto en la corteza prefrontal, el estriado y el hipocampo. Parece probable que el aumento en los niveles séricos de T conduzca a un aumento de los niveles cerebrales de T y esta por la regulación positiva inducida por el amitraz sobre la ARO convierta la T en E2. Además, se ha descrito que en el cerebro tiene lugar una síntesis endógena de E2, independientemente de la síntesis gonadal (Ikeda et al., 2015). Por lo tanto, no podemos descartar que pueda haber una síntesis endógena de E2 neural inducida por amitraz, independientemente de los niveles de T circulantes que podrían controlar o contribuir a los

efectos observados.

A las dosis ensayadas, el amitraz no alteró la actividad de la MAO, lo que indica que la desregulación de la MAO no explica los efectos observados sobre los neurotransmisores de monoaminas a dosis inferiores a 100 mg/kg de peso corporal como sugirieron previamente Moser y MacPhail (1989). Sin embargo, a dosis inferiores a 100 mg/kg de peso corporal, el amitraz regula negativamente, de forma dosis-dependiente, la expresión y el contenido de la MAO, siguiendo un orden de mayor a menor disminución en la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo. Por lo tanto, la inhibición de la síntesis de la MAO podría explicar, en parte, los efectos observados sobre los neurotransmisores monoaminérgicos, a dosis inferiores a 100 mg/kg de peso corporal.

El amitraz también alteró, de una manera dependiente de la dosis y de la región, la actividad y expresión de TH, TRH y BDH y la expresión y el contenido de la COMT, lo cual también podría explicar, en parte, los efectos observados sobre los neurotransmisores monoaminérgicos en las regiones cerebrales estudiadas. En este sentido, la inducción de la TH y la TRH en la corteza prefrontal, el estriado e hipocampo se correlaciona con el aumento en el contenido de 5-HT y DA. De hecho, las regiones con los niveles más altos de TH también tuvieron el mayor incremento en DA. Sin embargo, el aumento de la actividad y la expresión de la TH no se correlacionó con el aumento de NA en el cuerpo estriado, el hipocampo y la corteza prefrontal; en su lugar, se correlacionaron con los aumentos en la actividad y la expresión de la BDH, la enzima que sintetiza la NA a partir de DA. Por lo tanto, el efecto del amitraz en la síntesis de NA probablemente esté mediado por la BDH, no por la TH y podría explicar las diferencias observadas entre los neurotransmisores DA y NA en estas regiones. Además, la inducción de la TRH no se correlacionó con el orden de mayor a menor aumento

de la 5-HT en la corteza, cuerpo estriado e hipocampo siendo su mayor incremento de mayor a menor en el hipocampo cuerpo estriado y corteza. En este sentido, la disminución del contenido de la MAO en estas regiones se correlacionó con el incremento de 5-HT y con la disminución de los metabolitos de 5-HT, DA y NA, lo que puede explicar sus alteraciones. Además, los cambios en el contenido de la COMT en el cuerpo estriado y la corteza prefrontal podrían explicar los efectos observados sobre el contenido de DOPAC y HVA en estas regiones. La alteración en todas las enzimas y neurotransmisores estudiados se revirtió parcialmente en todos los casos por cotratamiento con tamoxifeno, un antagonista del receptor de estrógenos. Esto sugiere que el amitraz altera varios sistemas de neurotransmisores, al menos en parte, al alterar la regulación del E2 sobre las enzimas que sintetizan y metabolizan estos neurotransmisores.

Las hormonas sexuales alteran los sistemas de neurotransmisores monoaminérgicos e indolaminérgicos en el SNC a través de los efectos sobre la síntesis, la liberación vesicular y/o sináptica y la regulación del metabolismo (Meyers et al., 2010). Particularmente, la actividad y la expresión de las enzimas que sintetizan y metabolizan la DA, NA y 5-HT son alteradas por el E2 (Babu y Vijayan 1984; Chaube y Joy 2011; Donner y Handa 2009; Luine y Rhodes 1983; Luine y otros 1973; Rahman y Thomas 2013; Scardapane y Cardinali 1977; Schendzielorz et al., 2011; Serova et al., 2002). Además, el E2 aumenta los niveles de ARNm y la actividad de la TH y la TRH, las principales enzimas limitantes de la velocidad en la biosíntesis de catecolaminas e indolaminas, respectivamente (Babu y Vijayan 1984; Chaube y Joy 2011; Rahman y Thomas 2013; Serova y otros 2002; Donner y Handa 2009; Aggarwal et al., 2012; Hiroi et al., 2006). Alternativamente, disminuye los niveles de ARNm de la MAO (Aggarwal et al., 2012). Curiosamente, aunque la actividad de la COMT es considerablemente resistente a los efectos de TMX y E2, el E2 disminuye los niveles de la proteína COMT en la

corteza prefrontal y el TMX los aumenta (Schendzielorz et al., 2011). Estos datos previos son consistentes con los efectos del amitraz que observamos en estas enzimas y los neurotransmisores monoaminérgicos. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que el amitraz actúe alterando los transportadores de neurotransmisores monoaminérgicos, que también se ha demostrado que están regulados por el E2 (Le Saux y Di Paolo 2006; Meyers y Kritzer 2009; Rivera y otros 2009; Yu y otros 2009).

La reversión inducida por el cotratamiento del amitraz con el TMX sobre los efectos producidos por el amitraz sobre estas enzimas no fue completa, lo que sugiere que, además de la desregulación de E2, podrían estar involucrados otros mecanismos en estos efectos. Se ha sugerido que la acción agonista del receptor α_2 -adrenérgico del amitraz es uno de los principales mecanismos de sus efectos neurotóxicos (Costa et al., 1989a y 1989b; Hsu y Lu, 1984; Hsu y Kakuk, 1984; Yilmaz y Yildizdas, 2003), posiblemente contribuyendo a los efectos observados. A este respecto, se ha descrito que la actividad de la TH y la liberación de la NA están reguladas por el receptor α_2 -adrenérgico (Fornai et al., 1995; Owesson et al., 2003). Además, se ha descrito que el amitraz inhibe la liberación de la insulina a través de la acción de los receptores α_2 -adrenérgicos (Chen y Hsu 1994) y conduce a hiperglucemia y glucosuria, un efecto persistente observado en la mayoría de los casos de intoxicación por amitraz (Proudfoot, 2003; Yilmaz y Yildizdas, 2003). También se ha descrito que la síntesis y la recaptación de la NA, DA y 5-HT en el SNC están fisiológicamente reguladas por la insulina (Figlewicz et al., 1996; Herrera et al., 2005) y que la hiperglucemia inducida experimentalmente produce un aumento significativo en los niveles de catecolaminas en diferentes áreas del cerebro (Ramakrishnan et al., 2003). Por último, se ha demostrado que la hipoinsulinemia y la hiperglucemia alteran las actividades de la COMT, BDH y TH, lo que podría explicar la desregulación monoaminérgica observada (Gupta et al., 1992; Muñoz et al.,

1984; Wang et al., 2002). Por lo tanto, la acción del amitraz sobre los receptores α_2 -adrenérgicos podría contribuir directa o indirectamente, a través de la desregulación de la insulina, a los efectos observados sobre los neurotransmisores monoaminérgicos. El amitraz, además, altera otras hormonas como la prostaglandina E2 (Yim et al., 1978). En este sentido, se ha demostrado que la expresión de la TH está regulada por la prostaglandina E2 *in vitro* (Kim et al., 1996). Además, el receptor de histamina H₁ es inhibido por el amitraz (Costa et al., 1988). A este respecto, la expresión de la TH y la síntesis de catecolaminas en el cerebro están moduladas por el receptor de histamina H₁ (Moniri y Booth, 2006). Por lo tanto, todos los mecanismos comentados también podrían contribuir a los efectos observados sobre los neurotransmisores monoaminérgicos.

Las funciones efectivas cognitivas, motoras y de comportamiento están controladas en gran medida por los sistemas de 5-HT, NA y DA. Por lo tanto, la desregulación inducida por amitraz de estos neurotransmisores podría conducir a trastornos de estas funciones (Aghajanian y Sanders-Bush 2002; Antelman y Caggiula 1977; Somerville et al., 2007; Scholes et al., 2007). Además de su función bien documentada en el control neuronal de la reproducción, el E2 modula funciones neurales tales como el afecto, la ansiedad, el estado de ánimo, el miedo y la función cognitiva, así como el aprendizaje y la memoria (Jacome et al., 2010). Por lo tanto, los efectos conductuales del amitraz, incluida la hiperreactividad a los estímulos externos, la agresividad y la falta de coordinación motriz (Florio et al., 1993) podrían estar mediados por las alteraciones observadas en las enzimas que regulan la síntesis y el metabolismo de catecolaminas e indolaminas. Por otra parte, se ha descrito que una reducción en la expresión de la MAO en el cerebro da lugar a una mayor predisposición a la agresividad. En este sentido, se ha observado en ratones knockout (KO) para la MAO-A un incremento de las concentraciones de NA y de 5-HT a nivel cerebral con una marcada

agresividad reactiva hacia los intrusos (Godar et al., 2014; Bortolato et al., 2013). Por lo tanto, la agresividad inducida por amitraz podría estar relacionada con su regulación negativa de la expresión de la MAO.

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que muestra que amitraz desregula los sistemas de neurotransmisores glutamatérgicos y GABAérgicos mediada, en parte, por la activación del receptor α_2 y la inhibición del receptor H_1 en función de la concentración, así como de los sistemas de neurotransmisores NA, 5-HT y DA mediada, en parte, a través de la alteración en los niveles cerebrales de estradiol. Las alteraciones inducidas por amitraz en estos sistemas de neurotransmisores pueden diferir entre las ratas macho y hembra debido a las diferencias en las hormonas sexuales. Sin embargo, como los efectos neurotóxicos descritos en animales adultos después de la exposición al amitraz no se diferenciaron por sexo, estos efectos pueden ser similares en ambos sexos, pero probablemente con diferente intensidad. Futuros estudios deben caracterizar el resto de los mecanismos implicados en la alteración de estos sistemas de neurotransmisores inducida por el amitraz, los efectos neurotóxicos mediados por estas alteraciones y las posibles diferencias sexuales en estos efectos neurotóxicos. Estos resultados son de gran interés porque permiten una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes a los efectos neurotóxicos y pueden ofrecer una nueva visión en el diseño de estrategias terapéuticas contra los efectos neurotóxicos inducidos por el amitraz. Además, se están desarrollando nuevas moléculas de la familia de las formamidinas con un uso terapéutico, por lo que es muy importante determinar los mecanismos a través de los cuales este compuesto podría inducir estos efectos.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

(1) Los resultados de nuestra investigación demuestran que el amitraz tras 24 horas de exposición (desde 0,1 μM) induce una alteración de los niveles de glutamato y GABA, concentración-dependiente, en neuronas de cultivos primarios de hipocampo de rata.

(2) El amitraz induce muerte celular, tras 24 horas de exposición (desde 100 μM), mediada, en parte, por la activación del receptor α_2 y la inhibición del receptor H_1 , en neuronas de cultivos primarios de hipocampo de rata.

(3) El amitraz altera la expresión, de manera concentración-dependiente, de la glutaminasa (desde 10 μM) mediada, en parte, por la activación del receptor α_2 y la inhibición del receptor H_1 y de la expresión de la GAD65 (desde 0,1 μM), mediada, en parte, sólo por la inhibición del receptor H_1 , en neuronas de cultivos primarios de hipocampo de rata.

(4) El amitraz altera los niveles de los neurotransmisores GABA y glutamato a través de una alteración en la síntesis de estos neurotransmisores, mediada, en parte, por la activación del receptor α_2 y la inhibición del receptor H_1 .

(5) El amitraz (20, 50 y 80 mg/kg, durante 5 días) incrementó los niveles séricos de T y los niveles de E2 y la expresión y actividad de la enzima ARO, de una manera dosis-dependiente, partiendo desde menor a mayor efecto en la corteza prefrontal, el estriado y el hipocampo, en ratas macho.

(6) El amitraz (20, 50 y 80 mg/kg, durante 5 días) incrementó el contenido de NA, DA y 5-HT y redujo el contenido de sus metabolitos y la tasa de recambio, de manera dosis- y región-dependiente, en las regiones del hipocampo, corteza frontal y estriado en ratas macho.

(7) El amitraz (20, 50 y 80 mg/kg, durante 5 días) alteró, de una manera dosis- y región-dependiente, la actividad y expresión de TH, TRH y BDH y de la expresión y el contenido de la COMT en las regiones del hipocampo, corteza frontal y estriado en ratas macho.

(8) El amitraz alteró los niveles de los neurotransmisores NA, DA y 5-HT y sus metabolitos a través de la alteración de las enzimas que regulan su síntesis y metabolismo, mediando, en parte, este efecto a través de la disrupción de los niveles cerebrales de estradiol.

(9) Estos resultados son de gran interés porque pueden ofrecer una nueva visión en el diseño de estrategias terapéuticas contra los efectos neurotóxicos inducidos por el amitraz.

(10) Se requieren estudios posteriores para determinar el resto de mecanismos implicados en la alteración de estos sistemas de neurotransmisores inducida por el amitraz, los efectos neurotóxicos mediados por estas alteraciones y las posibles diferencias sexuales en estos efectos neurotóxicos.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

Abu-Basha, E.A., Yibchok-Anun, S., Hopper, D.L., and 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 alpha₂D-adrenergic receptors. *Metabolism*. 48, 1461-1469.

Aggarwal, M., Puri, V., and Puri, S. (2012) Effects of estrogen on the serotonergic system and calcitonin gene-related peptide in trigeminal ganglia of rats. *Ann. Neurosci.* 19(4), 151-157.

Aghajanian, G.K., and Sanders-Bush, E. (2002) Serotonin. In: Davis, K.L., Charney, D., Coyle, J.T., and Nemeroff, C.B. (Eds) *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia (PA), pp 15-34.

Alachkar, A., Brotchie, J., and Jones, O.T. (2006) alpha₂-Adrenoceptor-mediated modulation of the release of GABA and noradrenaline in the rat substantia nigra pars reticulata. *Neurosci. Lett.* 395, 138-142.

Algire, J.E., Srikandakumar, A., Guilbault, L.A., and Downey, B.R. (1992) Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle. *Can. J. Vet. Res.* 56, 67-69.

Al-Thani, R.K., Al-Thani, A.S., Elbetieha, A., and Darmani, H. (2003) Assessment of reproductive and fertility effects of amitraz pesticide in male mice. *Toxicol. Lett.* 138, 253-60.

Altobelli, D., Martire, M., Maurizi, S., and Preziosi, P. (2001) Interaction of formamidine pesticides with the presynaptic alpha(2)-adrenoceptor regulating. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 179-185.

Amateau, S.K., and McCarthy, M.M. (2004) Induction of PGE₂ by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. *Nat. Neurosci.* 7, 643-650.

Ansorge, M.S., Morelli, E., and Gingrich, J.A. (2008) Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice. *J. Neurosci.* 28, 199-207.

Antelman, S.M., and Caggiula, A.R. (1977) Norepinephrine–dopamine interactions and behavior. *Science*. 195, 646-653.

Aziz, S.A., and Knowles, C.O. (1973) Inhibition of monoamine oxidase by the pesticide chlordimeform and related compounds. *Nature*. 242, 417-418.

Babu, G.N., and Vijayan, E. (1984) Hypothalamic tyrosine hydroxylase activity and plasma gonadotropin and prolactin levels in ovariectomized-steroid treated rats. *Brain. Res. Bull.* 12(5), 555-558.

Beeman, R.W. (1982) Recent advances in mode of action of insecticides. *Annual Review of Entomology*. 27, 253-281.

Benezet, H.J., and Knowles, C.O. (1976) Inhibition of rat brain monoamine oxidase by formamidines and related compounds. *Neuropharmacology*. 15, 369-73.

Bensaad, K., Cheung, E.C., and Vousden, K.H. (2009) Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. *EMBO J*. 28, 3015-3026.

Bentley, P., Staubli, W., Bieri, F., Muecke, W., and Waechter, F. (1985) Induction of hepatic drug-metabolising enzymes following treatment of rats and mice with chlordimeform. *Toxicol. Lett*. 28, 143-149.

Bortolato, M., Godar, S.C., Tambaro, S., Li, F.G., Devoto, P., Coba, M.P., Chen, K., and Shih, J.C. (2013) Early postnatal inhibition of serotonin synthesis results in long-term reductions of perseverative behaviors, but not aggression, in MAO A-deficient mice. *Neuropharmacology*. 75, 223-232.

Bournias-Vardiabasis, N.R., Teplitz, L., Chernoff, G.F., and Seecof, R.L. (1983) Detection of teratogens in the *Drosophila* embryonic cell culture test: assay of 100 chemicals. *Teratology*. 28, 109-22.

Bradford, H.F., Ward, H.K., and Thomas, A.J. (1978) Glutamine--a major substrate for nerve endings. *J. Neurochem*. 30, 1453-1459.

Brain, P.F., Homady, M.H., and Mainardi, M. (1983) Preputial glands, dominance and aggressiveness, in mice. *Bolletino di zoologia*. 50, 173-187.

Brandon, J.M., and Wallis, R.M. (1977) Effect of mepyramine, a histamine H₁-, and burimamide, a histamine H₂-receptor antagonist, on ovum implantation in the rat. *J. Reprod. Fertil*. 50, 251-254.

Breyer, R.M., Bagdassarian, C.K., Myers, S.A., and Breyer, M. (2001) Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 41, 661-690.

Burrows, A.K. (2000) Generalised demodicosis in the dog: the unresponsive or recurrent case. *Australian Veterinary Journal*. 78 (4), 244-246.

Buznikov, G.A, Lambert, H.W., and Lauder, J.M. (2001) Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell. Tissue Res*. 305, 177-86.

Buznikov, G.A., Shmukler, Y.B., and Lauder J.M. (1996) From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? *Cell. Mol. Neurobiol*. 16, 537-559.

CALEPA (California Environmental Protection Agency). (1995) Amitraz risk characterization document volume 1, Health Assessment Section Medical Toxicology Branch, Department Pesticide Regulation, California Environmental Protection Agency, Sacramento, CA.

Campbell, J.K., and 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., and 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.

Cara, A.M., Lopes-Martins, R.A., Antunes, E., Nahoum, C.R., and De Nucci, G. (1995) The role of histamine in human penile erection. *Br. J. Urol.* 75, 220-224.

Caro, A.A., and Cederbaum, A.I. (2004) Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 27-42.

Castelli, M.P., Casti, A., Casu, A., Frau, R., Bortolato, M., Spiga, S., Ennas, and M.G. (2013) Regional distribution of 5 α -reductase type 2 in the adult rat brain: an immunohistochemical analysis. *Psychoneuroendocrinology.* 38(2), 281-293.

Chandras, C., Ragoobir, J., Barrett, G.E., Bruckdorfer, K.R., Graham, A., Abayasekara, D.R., and Michael, A.E. (2004) Roles for prostaglandins in the steroidogenic response of human granulosa cells to high-density lipoproteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 222, 1-8.

Chandras, C., Harris, T.E., Bernal, A.L., Abayasekara, D.R., and Michael, A.E. (2007) PTGER1 and PTGER2 receptors mediate regulation of progesterone synthesis and type 1 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity by prostaglandin E2 in human granulosa lutein cells. *J. Endocrinol.* 194, 595-602.

Chang, M.J., Zhong, F., Lavik, A.R., Parys, J.B., Berridge, M.J., and Distelhorst, C.W. (2014) Feedback regulation mediated by Bcl-2 and DARPP-32 regulates inositol 1,4,5-trisphosphate receptor phosphorylation and promotes cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 1186-1191.

Chapin, D.S., Lookingland, K.J., and Moore, K.E. (1986) Effects of LC mobile phase composition on retention times for biogenic amines, and their precursors and metabolites. *Curr. Sep.* 7, 68-70.

Chaube, R., and Joy, K.P. (2011) Estradiol-17 β modulates dose-dependently hypothalamic tyrosine hydroxylase activity inhibited by α -methylparatyrosine in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Endocrine.* 40(3), 394-399.

Chen, C., and Bazan, N.G. (2005) Endogenous PGE2 regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 93, 929-941.

Chen, C., Magee, J.C., and Bazan, N.G. (2002) Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *J. Neurophysiol.* 87, 2851-2857.

Chen, T.H., and Hsu, W.H. (1994) Inhibition of insulin release by a formamidine pesticide amitraz and its metabolites in a rat beta-cell line: an action mediated by alpha-2 adrenoceptors, a GTP-binding protein and a decrease in cyclic AMP. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 1240-1245.

Chesterman, H., Skerrett, K., Street, A.E. and 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.

Chou, C.P., Lu, S.Y., and Ueng, T.H. (2008) Modulation of serum concentrations and hepatic metabolism of 17beta-estradiol and testosterone by amitraz in rats. *Arch. Toxicol.* 82, 729-737.

Cikos, S., Rehak, P., Czikkova, S., Vesela, J., and Koppel, J. (2007) Expression of adrenergic receptors in mouse preimplantation embryos and ovulated oocytes. *Reproduction.* 133, 1139-1147.

Cikos, S., Vesela, J., Il'kova, G., Rehak, P., Czikkova, S., and Koppel, J. (2005) Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 145-153.

Costa, L.G., Gastel, J., and Murphy, S.D. (1991) The formamidine pesticides chlordimeform and amitraz decrease hepatic glutathione in mice through an interaction with alpha 2-adrenoceptors. *J. Toxicol. Environ. Health.* 33, 349-358.

Costa, L.G., Olibet, G., and Murphy, S.D. (1988) Alpha 2-adrenoceptors as a target for formamidine pesticides: in vitro and in vivo studies in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 93, 319-328.

Costa, L.G., Olibet, G., Wu, D.S., and Murphy, S.D. (1989a) Acute and chronic effects of the pesticide amitraz on alpha 2-adrenoceptors in mouse brain. *Toxicol. Lett.* 47, 135-143.

Costa, L.G., Wu, D.S., Olibet, G., and Murphy, S.D. (1989b) Formamidine pesticides and alpha 2-adrenoceptors: studies with amitraz and chlordimeform in rats and development of a radioreceptor binding assay. *Neurotoxicol. Teratol.* 11, 405-411.

Colley, J., Dawe, S., Heywood, R., Street, A.E., Gibson, W.A., and 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.

Croft, B.A., and 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.

Crooks, D.R., Welch, N., and Smith, D.R. (2007) Low-level manganese exposure alters glutamate metabolism in GABAergic AF5 cells. *Neurotoxicology.* 28, 548-554.

Cullen, L.K., and Reynoldson, J.A. (1990) Central and peripheral alpha-adrenoceptor actions of amitraz in the dog. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 13, 86-92.

Dantas da Silva Junior, E., Palmieri de Souza, B., Rodrigues, J.Q., Caricati-Neto, A., Jurkiewicz, A., and Jurkiewicz, N.H. (2014) Effects of clonidine in the isolated rat testicular capsule. *Eur. J. Pharmacol.* 726, 16-26.

Dean, S.L., Knutson, J.F., Krebs-Kraft, D.L., and McCarthy, M.M. (2012a) Prostaglandin E2 is an endogenous modulator of cerebellar development and complex behavior during a sensitive postnatal period. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1218-1229.

Dean, S.L., Wright, C.L., Hoffman, J.F., Wang, M., Alger, B.E., and McCarthy, M.M. (2012b) Prostaglandin E2 stimulates estradiol synthesis in the cerebellum postnatally with associated effects on Purkinje neuron dendritic arbor and electrophysiological properties. *Endocrinology.* 153, 5415-5427.

Del Pino, J., Martinez, M.A., Castellano, V.J., Ramos, E., Martínez-Larrañaga, M.R., and Anadón, A. (2011) Effects of prenatal and postnatal exposure to amitraz on norepinephrine, serotonin and dopamine levels in brain regions of male and female rats. *Toxicology.* 287, 145-152.

Del Pino, J., Martínez, M.A., Castellano, V., Ramos, E., Martínez-Larrañaga, M.R., and Anadón, A. (2013) Effects of exposure to amitraz on noradrenaline, serotonin and dopamine levels in brain regions of 30 and 60 days old male rats. *Toxicology.* 308, 88-95.

Dong, Q., Lazarus, R.M., Wong, L.S., Vellios, M., and Handelsman, D.J. (1991) Pulsatile LH secretion in streptozotocin-induced diabetes in the rat. *J. Endocrinol.* 131, 49-55.

Donner, N., and Handa, R.J. (2009) Estrogen receptor beta regulates the expression of tryptophan-hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei. *Neuroscience.* 163, 705-718.

Douglas, W.W. (1980) Histamine and 5-hydroxytryptamine (serotonin) and their antagonist. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* (Gilman, A.F., Goodman, L.S., and Gilman, A.I. Eds.), pp.609-646, Macmillan, New York.

Duclos, D.D., Jeffers, J.G., and 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.

Duffy, D.M., McGinnis, L.K., Vandevort, C.A., and Christenson, L.K. (2010) Mammalian oocytes are targets for prostaglandin E2 (PGE2) action. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 131.

Dygal, N.N., Kalinina, T.S., Sournina, N.Y., and Shishkina, G.T. (2002) Effects of testosterone on alpha2A-adrenergic receptor expression in the rat brain. *Psychoneuroendocrinology.* 27, 585-592.

Ehrenpreis, S., Greenberg, J., and Comaty, J.E. (1976) Block of electrically induced contractions of guinea pig longitudinal muscle by prostaglandin synthetase and receptor inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 39, 331-340.

Elmore, S.P., Qian, T., Grissom, S. F., Lemasters, J.J. (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J.* 15, 2286-2287.

Emery, A.C., Eiden, M.V., and Eiden, L.E. (2014) Separate cyclic AMP sensors for neuriteogenesis, growth arrest, and survival of neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.* 289, 10126-10139.

- Ertekin, V., Alp, H., Selimoglu, M.A., and Karacan, M. (2002) Amitraz poisoning in children: retrospective analysis of 21 cases. *J. Int. Med. Res.* 30, 203-205.
- Estrada-Pena, A., and 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., and 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.
- Etgen, A.M. (2003) Ovarian steroid and growth factor regulation of female reproductive function involves modification of hypothalamic alpha 1-adrenoceptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1007, 153-161.
- Fajardo, A.M., Piazza, G.A., and Tinsley, H.N. (2014) The role of cyclic nucleotide signaling pathways in cancer: targets for prevention and treatment. *Cancers (Basel).* 6, 436-458.
- 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, 1-59.
- Farmer, H., and 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.
- Figlewicz, DP., Brot, MD., McCall, AL., Szot, P. (1996) Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain. Res.* 736(1-2), 54-60.
- Florio, J.C., Sakate, M., and Palermo-Neto, J. (1993) Effects of amitraz on motor function. *Pharmacol. Toxicol.* 73, 109-114.
- Flugge, G., Kramer, M., and Fuchs, E. (2001) Chronic subordination stress in male tree shrews: replacement of testosterone affects behavior and central alpha(2)-adrenoceptors. *Physiol. Behav.* 73, 293-300.
- Folz, S.D., Kakuk, T.J., Henke, C.L., Rector, D.L., and Tesar, F.B. (1984) Clinical evaluation of amitraz as a treatment for canine demodicosis. *Vet. Parasitol.* 16, 335-341.
- Fornai, F., Alessandrì, M.G., Fascetti, F., Vaglini, F., Corsini, G.U. (1995) Clonidine suppresses 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced reductions of striatal dopamine and tyrosine hydroxylase activity in mice. *J. Neurochem.* 65(2), 704-709.
- García-Martín, E., Ayuso, P., Luengo, A., Martínez, C. and Agundez, J. A. (2008) Genetic variability of histamine receptors in patients with Parkinson's disease. *BMC Med. Genet.* 9, 1471-2350.

Gensburger, C., Labourdette, G., Sensenbrenner, M. (1986) Influence of meningeal cells on the proliferation and maturation of rat neuroblasts in culture. *Exp. Brain Res.* 63, 321–330.

Gilbert, M.E. (1988) Formamidine pesticides enhance susceptibility to kindled seizures in amygdala and hippocampus of the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 10, 221-227.

Gilbert, M.E., and Dyer, R.S. (1988) Increased hippocampal excitability produced by amitraz. *Neurotoxicol. Teratol.* 10, 229-235.

Gilbert, M.E., and Mack, C.M. (1989) Enhanced susceptibility to kindling by chlordimeform may be mediated by a local anesthetic action. *Psychopharmacology.* 99, 163-167.

Glowinski, J., and 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. *J. Neurochem.* 13, 655-669.

Godar, S., Bortolato, C.M., Castelli, M.P., Casti, A., Casu, A., Chen, K., Ennas, M.G., Tambaro, S., and Shih, J.C. (2014) The aggression and behavioral abnormalities associated with monoamine oxidase A deficiency are rescued by acute inhibition of serotonin reuptake. *J. Psychiatr. Res.* 56, 1-9.

Gregorc, A., and Bowen, I.D. (2000) Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus* larvae, Amitraz and Oxytetracycline. *Cell. Biol. Int.* 24, 319-324.

Grilli, S., Ancora, G., Rani, P., Valenti, A.M., Mazzullo, M., and Colacci, A. (1991) In vivo unwinding fluorimetric assay as evidence of the damage induced by fenarimol and DNOC in rat liver DNA. *J. Toxicol. Environ. Health.* 34, 485-494.

Grote, K., Andrade, A.J., Wichert Grande, S., Kuriyama, S.N., Talsness, C.E., Appel, K.E., and Chahoud, I. (2006) Effects of peripubertal exposure to triphenyltin on female sexual development of the rat. *Toxicology.* 22 (1–2), 17-24.

Gupta, G., Azam, M., and Baquer, N.Z. (1992) Effect of experimental diabetes on the catecholamine metabolism in rat brain. *J. Neurochem.* 58(1), 95-100.

Gwiazda, R.H., Lee, D., Sheridan, J., and Smith, D.R. (2002) Low cumulative manganese exposure affects striatal GABA but not dopamine. *Neurotoxicology.* 23, 69-76.

Hansen, J.M., and Harris, C. (2013) Redox control of teratogenesis. *Reprod. Toxicol.* 35, 165-179.

Harrison, I.R., Antonin, K., McCarthy, J.F., Palmer, B.H., Wakerley, S.B., Watkinson, T.I., and Weighton, D.M. (1973). 1,3,5-Triazapenta-1,4-dienes: Chemical Aspects of a New Group of Pesticides. *Pesticides Science.* 4, 901-910.

Hayaishi, O., and Huang, Z.L. (2004) Role of orexin and prostaglandin E(2) in activating histaminergic neurotransmission. *Drug News Perspect.* 17, 105-109.

Hemels, M.E., Einarson, A., Koren, G., Lanctot, K.L., and Einarson, T.R. (2005)

Antidepressant use during pregnancy and the rates of spontaneous abortions: a meta-analysis. *Ann. Pharmacother.* 39, 803-809.

Herlenius, E., and Lagercrantz, H. (2001) Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Early Hum. Dev.* 65, 21-37.

Herrera, R., Manjarrez, G., and Hernandez, J. (2005) Inhibition and kinetic changes of brain tryptophan-5-hydroxylase during insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Nutr. Neurosci.* 8(1), 57-62.

Hill, S. J. and Young, J. M. (1980) Histamine H₁-receptors in the brain of the guinea-pig and the rat: differences in ligand binding properties and regional distribution. *Br. J. Pharmacol.* 68, 687-696.

Hiroi, R., McDevitt, RA., and Neumaier, JF. (2006) Estrogen selectively increases tryptophan hydroxylase-2 mRNA expression in distinct subregions of rat midbrain raphe nucleus: association between gene expression and anxiety behavior in the open field. *Biol. Psychiatry.* 60(3), 288-295.

Hobler, C., Andrade, AJ., Grande, SW., Gericke, C., Talsness, CE., Appel, KE., Chahoud, I., and Grote, K. (2010) Sex-dependent aromatase activity in rat offspring after pre- and postnatal exposure to triphenyltin chloride. *Toxicology.* 276(3), 198-205.

Hollingworth, R.M. (1976). Chemistry, biological activity, and uses of formamidine pesticides. *Environmental Health Perspectives.* 14, 57-69.

Hollingworth, R.M., and 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.

Hollingworth, R.M., and Murdock, L. (1980) Formamidine pesticides: octopamine-like actions in a firefly. *Science.* 208, 74-76.

Holsapple, M.P., Blake, D.E., and Yim, G.K. (1979) Reversible depression of electrically-induced contractions of guinea pig longitudinal muscle by a reversible inhibitor of prostaglandin synthetase. *Prostaglandins Med.* 3, 215-221.

Hounsell, I.A.G., and 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.

Hsu, W.H., and Hopper, D.L. (1986) Effect of yohimbine on amitraz-induced CNS depression and bradycardia in dogs. *J. Toxicol. Environ. Health.* 18, 423-429.

Hsu, W.H., and Kakuk, T.J. (1984) Effect of amitraz and chlordimeform on heart rate and pupil diameter in rats: mediated by alpha 2-adrenoreceptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73, 411-415.

Hsu, W.H., and Lu, Z.X. (1984) Amitraz-induced delay of gastrointestinal transit in mice: Mediated by α 2-adrenergic receptors. *Drug Dev. Res.* 4, 655-660.

Hsu, W.H., Lu, Z.X., and Hembrough, F.B. (1986) Effect of amitraz on heart rate and aortic blood pressure in conscious dogs: influence of atropine, prazosin, tolazoline, and yohimbine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 84, 418-422.

Hsu, W.H., and Schaffer, D.D. (1988) Effects of topical application of amitraz on plasma glucose and insulin concentrations in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 49, 130-131.

Hu, W.W., Fang, Q., Xu, Z.H., Yan, H.J., He, P., Zhong, K., Fan, Y.Y., Yang, Y., Zhang, X.N., Zhang, C.Y., Ohtsu, H., Xu, T.L., and Chen, Z. (2012) Chronic h1-antihistamine treatment increases seizure susceptibility after withdrawal by impairing glutamine synthetase. *CNS Neurosci. Ther.* 18, 683-690.

Huet-Hudson, Y.M., Andrews, G.K., and Dey, S.K. (1989) Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology.* 125, 1683-1690.

Hugnet, C., Bruchon-Hugnet, C., Royer, H., and 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.

Hugnet, C., Buronfosse, F., Pineau, X., Cadore, J. L., Lorgee, G., and Berny, P. J. (1996) Toxicity and kinetics of amitraz in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1506-1510.

Ikeda, T., Makino, Y., and Yamada, M.K. (2015) 17alpha-estradiol is generated locally in the male rat brain and can regulate GAD65 expression and anxiety. *Neuropharmacology.* 90, 9-14.

Il'kova, G., Rehak, P., Vesela, J., Cikos, S., Fabian, D., Czikkova, S., and Koppel, J. (2004) Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote.* 12, 205-213.

Institoris, L., Banfi, H., Lengyel, Z., Papp, A., and Nagymajtenyi, L. (2007) A study on immunotoxicological effects of subacute amitraz exposure in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 26, 441-445.

Ivanova, D., Bakalova, R., Lazarova, D., Gadjeva, V., and Zhelev Z. (2013) The impact of reactive oxygen species on anticancer therapeutic strategies. *Adv. Clin. Exp. Med.* 22, 899-908.

Jacome, L.F., Gautreaux, C., Inagaki, T., Mohan, G., Alves, S., Lubbers, L.S., Luine, V. (2010) Estradiol and ER β agonists enhance recognition memory, and DPN, an ER β agonist, alters brain monoamines. *Neurobiol. Learn Mem.* 94(4), 488-498.

Jangi, S.M., Diaz-Perez, J.L., Ochoa-Lizarralde, B., Martin-Ruiz, I., Asumendi, A., Perez-Yarza, G., Gardeazabal, J., Diaz-Ramon, J.L., and Boyano, M.D. (2006) H₁ histamine receptor antagonists induce genotoxic and caspase-2-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Carcinogenesis.* 27, 1787-1796.

Jiang, Q., Bai, T., Shen, S., Li, L., Ding, H., and Wang, P. (2011) P. Increase of cytosolic

calcium induced by trichosanthin suppresses cAMP/PKC levels through the inhibition of adenylyl cyclase activity in HeLa cells. *Mol. Biol. Rep.* 38, 2863-2868.

Jiménez-Rivera, C.A., Figueroa, J., Vázquez-Torres, R., Vélez-Hernández, M.E., Schwarz, D., Velasquez-Martínez, M.C., and Arencibia-Albite, F. (2012) Presynaptic inhibition of glutamate transmission by alpha2 receptors in the VTA. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1406-1415.

Jin, C.L., Yang, L.X., Wu, X.H., Li, Q., Ding, M.P., Fan, Y.Y., Zhang, W.P., Luo, J.H., and Chen, Z. (2005). Effects of carnosine on amygdaloid-kindled seizures in Sprague-Dawley rats. *Neuroscience.* 135, 939-947.

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.

Johansen, C.A. (1972) Toxicity of field-weathered insecticide residues to four kinds of bees. *Environmental Entomology.* 67, 445.

Johnston, C.A., and Moore, K.E. (1983) Measurement of 5-hydroxytryptamine synthesis and metabolism in selected discrete regions of the rat brain using high performance liquid chromatography and electrochemical detection: pharmacological manipulations. *J. Neural Transm.* 57, 49-63.

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

Kathpalia, K., and Parshad, R.K. (1990) Mast cell dynamics in relation to ovulation in rat ovary. *Indian J. Exp. Biol.* 28, 287-288.

Kato, T., Kuzuya, H., and Nagatsu, T. (1974) A simple and sensitive assay for dopamine- β -hydroxylase activity by dual-wavelength spectrophotometry. *Biochem. Med.* 10, 320-328.

Kennedy, J.H., Korn, N., and Thurston, R.J. (2003) Prostaglandin levels in seminal plasma and sperm extracts of the domestic turkey, and the effects of cyclooxygenase inhibitors on sperm mobility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 74.

Khatua, A.K., and Bhattacharyya, M. (2001) NADPH-induced oxidative damage of rat liver microsomes: protective role of chlorpromazine and trifluoperazine. *Pol. J. Pharmacol.* 53, 629-634.

Kim, J.S., Chae, H.D., Choi, S.Y., and Kim, K.T. (1996) Transcriptional enhancement of tyrosine hydroxylase by prostaglandin E2 in SK-N-BE(2) C cells. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 39(1-2), 177-184.

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., and Chung, M.K. (2007) Evaluation of developmental toxicity of amitraz in Sprague-Dawley rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 137-144.

Kimmel, E.C., Casida, J.E., and Ruzo, L.O. (1986) Formamidin insecticides and chloroacetanilide herbicides: disubstituted anilines and nitrosobenzenes as mammalian

metabolites and bacterial mutagens. *J. Agric. Food Chem.* 34, 157-161.

Kloster, M.M., Naderi, E.H., Haaland, I., Gjertsen, B.T., Blomhoff, H.K., and Naderi, S. (2013) cAMP signalling inhibits p53 acetylation and apoptosis via HDAC and SIRT deacetylases. *Int. J. Oncol.* 42, 1815-1821.

Knowles, C.O., and Benezet, H.J. (1981) Excretion balance, metabolic fate and tissue residues following treatment of rats with amitraz and N¹-(2,4-dimethylphenyl)-N-methylformamidine. *J. Environ. Sci. Health B.* 16, 547-555.

Knowles, C.O., and Roulston, W.J. (1972) Antagonism of chlorphenamide toxicity to the cattle tick *Boophilus microplus* by piperonyl butoxide. *Aust. J. Entomol.* 11, 349-350.

Kobayashi, M., Hori, T., and Kawakami, E. (2013) Changes in prostaglandin E2 levels in seminal plasma during ejaculation and the effect of exogenous prostaglandin E2 on semen volume in the dog. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 1249-1252.

Konkle, A.T., and McCarthy, M.M. (2011) Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology.* 152, 223-235.

Kruk, I., and Bounias, M. (1992) Chemiluminescence from oxidation of formamidine amitraz. The generation of cytotoxic oxygen species and electronically excited compounds. *Sci. Total Environ.* 123-124, 195-203.

Kukko-Lukjanov, T.K., Gronman, M., Lintunen, M., Lauren, H.B., Michelsen, K.A., Panula, P., and Holopainen, I.E. (2012) Histamine 1 receptor knock out mice show age-dependent susceptibility to status epilepticus and consequent neuronal damage. *Epilepsy Res.* 100, 80-92.

Kwochka, K.W., Kunkle, G.A., and Foil, C.O. (1985) The efficacy of amitraz for generalized demodiosis in dogs: a study of two concentrations and frequencies of application. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian.* 7, 8-18.

Lakshmana, M.K., and 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, 139-150.

Lange, M.D., Jungling, K., Paulukat, L., Vieler, M., Gaburro, S., Sosulina, L., Blaesse, P., Sreepathi, H.K., Ferraguti, F., and Pape, H.C. (2014) Glutamic acid decarboxylase 65: a link between GABAergic synaptic plasticity in the lateral amygdala and conditioned fear generalization. *Neuropsychopharmacology.* 39, 2211-2220.

Lason, W., Chlebicka, M., and Rejdak, K. (2013) Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol. Rep.* 65, 787-801.

Lazarini, C.A., Florio, J.C., Lemonica, I.P., and 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. *Neurotoxicol. Teratol.* 23, 665-673.

Lenz, K.M., Nugent, B.M., Haliyur, R., and McCarthy, M.M. (2013) Microglia are essential to

masculinization of brain and behavior. *J. Neurosci.* 33, 2761-2772.

Lepski, G., Jannes, C.E., Nikkhah, G., and Bischofberger, J. (2013) cAMP promotes the differentiation of neural progenitor cells in vitro via modulation of voltage-gated calcium channels. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 155.

Le Saux, M., and Di Paolo, T. (2006) Influence of oestrogenic compounds on monoamine transporters in rat striatum. *J. Neuroendocrinol.* 18(1), 25-32.

Levitt, P., Harvey, J.A., Friedman, E., Simansky, K., and Murphy, E.H. (1997) New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci.* 20, 269-274.

Li, Q., Jin, C.L., Xu, L.S., Zhu-Ge, Z.B., Yang, L.X., Liu, L.Y., and Chen, Z. (2005) Histidine enhances carbamazepine action against seizures and improves spatial memory deficits induced by chronic transauricular kindling in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 26, 1297-1302.

Lim, J.H., Kim, S.H., Kim, K.H., Park, N.H., Shin, I.S., Moon, C., Park, S.H., and Kim, J.C. (2010) Reproductive and developmental toxicity of amitraz in sprague-dawley rats. *Toxicol. Res.* 26, 67-74.

Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M., and Dey, S.K. (1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell.* 91, 197-208.

Lingren, P.D., Wolfenbarger, D.A., Nosky, J.B., and Díaz, M. (1972) Response of *Campoplex perdistinctus* and *Apanteles marginiventris* to insecticides. *Journal of Economic Entomology.* 65(5), 1295-1299.

Liu, Z., Kilburn, B.A., Leach, R.E., Romero, R., Paria, B.C., and Armant, D.R. (2004) Histamine enhances cytotrophoblast invasion by inducing intracellular calcium transients through the histamine type-1 receptor. *Mol. Reprod. Dev.* 68, 345-353.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods.* 25, 402-408.

Lu, Y., Li, C., Zhou, M., Luo, P., Huang, P., Tan, J., Lu, Q., Xu, X., He, Z., and Guo, L. (2015) Clonidine ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via up-regulation of the GABAR1 and GAD67 in hippocampal CA1 in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 132, 96-102.

Luine, V.N., Khylchevskaya, R.I., and McEwen, B.S. (1973) Effect of gonadal steroids on activities of monoamine oxidase and choline acetylase in rat brain. *Brain. Res.* 86, 293-306.

Luine, V.N., and Rhodes, J.C. (1983) Gonadal hormone regulation of MAO and other enzymes in hypothalamic areas. *Neuroendocrinology.* 36, 235-241.

Matsuoka, Y., Furuyashiki, T., Yamada, K., Nagai, T., Bito, H., Tanaka, Y., Kitaoka, S., Ushikubi, F., Nabeshima, T., and Narumiya, S. (2005) Prostaglandin E receptor EP1 controls impulsive behavior under stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 16066-16071.

Mayerhofer, A., Bartke, A., Amador, A.G., and Began, T. (1989) Histamine affects testicular steroid production in the golden hamster. *Endocrinology*. 125, 2212-2214.

McGregor, D.B., and 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., and 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.

Meana, J.J., and 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., and 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., and Willemse, T. (1995b) Efficacy of daily amitraz on generalised demodicosis in dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 36, 3-6.

Meyers, B., D'Agostino, A., Walker, J., and Kritzer, MF. (2010) Gonadectomy and hormone replacement exert region- and enzyme isoform-specific effects on monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase activity in prefrontal cortex and neostriatum of adult male rats. *Neuroscience*. 165(3), 850-862.

Meyers, B., and Kritzer, MF. (2009) In vitro binding assays using (3)H nisoxetine and (3)H WIN 35,428 reveal selective effects of gonadectomy and hormone replacement in adult male rats on norepinephrine but not dopamine transporter sites in the cerebral cortex. *Neuroscience*. 159(1), 271-282.

Mhaouty-Kodja, S., Lozach, A., Habert, R., Tanneux, M., Guigon, C., Brailly-Tabard, S., Maltier, J.P., and Legrand-Maltier, C. (2007) Fertility and spermatogenesis are altered in 1b-adrenergic receptor knockout male mice. *J. Endocrinol.* 195, 281-292.

Michael, A.E., Abayasekara, D.R., and Webley, G.E. (1993) The luteotrophic actions of prostaglandins E2 and F2 alpha on dispersed marmoset luteal cells are differentially mediated via cyclic AMP and protein kinase C. *J. Endocrinol.* 138, 291-298.

Mihalik, J., Maslankova, J., Spakovska, T., Marekova, M., Hodorova, I., Kusnir, J., Rybarova, S., Ferenc, P., and Schmidtova, K. (2010) Impact of 2 doses of clorgyline on the rat preimplantation embryo development and the monoamine levels in urine. *Reprod. Sci.* 17, 734-741.

Mihalik, J., Spakovska, T., Prokopcakova, L., and Schmidtova, K. (2008) Antagonistic effect of low deprenyl dose on the preimplantation embryo development in rat. *Bratisl. Lek. Listy*. 109, 151-154.

- Mishra, P.K., Raghuram, G.V., Panwar, H., Jain, D., Pandey, H., and Maudar, K.K. (2009) Mitochondrial oxidative stress elicits chromosomal instability after exposure to isocyanates in human kidney epithelial cells. *Free radical res.* 43, 718-728.
- Moniri, NH., and Booth, RG. (2006) Role of PKA and PKC in histamine H1 receptor-mediated activation of catecholamine neurotransmitter synthesis. *Neurosci. Lett.* 407(3), 249-253.
- Morgan, H.E., and 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.
- Morgan, H.E., Patton, D.S.G., and 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., and 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.
- Moser, V.C., Boyes, W.K., and MacPhail, R.C. (1987) Investigations of amitraz neurotoxicity in rats. I. Effects on operant performance. *Fundam. Appl. Toxicol.* 9, 131-139.
- Moser, V.C., and MacPhail, R.C. (1985) Yohimbine attenuates the delayed lethality induced in mice by amitraz, a formamidine pesticide. *Toxicol. Lett.* 28, 99-104.
- Moser, V.C., and MacPhail, R.C. (1986) Differential effects of formamidine pesticides on fixed-interval behavior in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 84, 315-324.
- Moser, V.C., and MacPhail, R.C. (1989) Investigations of amitraz neurotoxicity in rats. III. Effects on motor activity and inhibition of monoamine oxidase. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12(1), 12-22.
- Muller, G.H. (1983) Amitraz treatment of demodicosis. *Journal American Animal Hospital Association.* 16, 435-441.
- Muñoz, A., Serrano, C., García-Estaño, J., Quesada, T., and Miras-Portugal, MT. (1984) Effect of Diabetic Hyperglycemia and Other Sugars on Plasma Dopamine- β -Hydroxylase Activity. *Diabetes.* 33(12), 1127-1132.
- Murakami, M., and Kudo, I. (2004) Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog. Lipid. Res.* 43, 3-35.
- Murdoch, W.J., Peterson, T.A., Van Kirk, E.A., Vincent, D.L., and Inskeep, E.K. (1986) Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol. Reprod.* 35, 1187-1194.
- Nath, C. & Gupta, M. B. (2001) Role of central histaminergic system in lorazepam withdrawal syndrome in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 68, 777-782.

- Nayebi, AM., Pourrabi, S., and Hossini, S. (2014) Testosterone ameliorates streptozotocin-induced memory impairment in male rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 35(6), 752-757.
- Nissbrandt, H., Engberg, G., Wikstrom, H., Magnusson, T., and Carlsson, A. (1988) NSD 1034: an amino acid decarboxylase inhibitor with a stimulatory action on dopamine synthesis not mediated by classical dopamine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 338, 148-161.
- Nissinen, E., and Männistö, PT. (1984) Determination of catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Biochem.* 137, 69-73.
- Nuttinck, F., Reinaud, P., Tricoire, H., Vigneron, C., Peynot, N., Mialot, J.P., Mermillod, P., Charpigny, G. (2002) Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 93-101.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). (1995) Guideline 421: Reproduction/Developmental Screening Test, Available online from <http://www.oecd.org/ehs/test/health.htm>.
- Oglesbya, P.A., Jouberta, K.E., and Meiringb, T. (2006) Canine renal cortical necrosis and haemorrhage following ingestion of an Amitraz-formulated insecticide dip. *Tydskr. S. Afr. Vet. Ver.* 77, 160-163.
- Ohshima, S. (2008) Abnormal mitosis in hypertetraploid cells causes aberrant nuclear morphology in association with H₂O₂-induced premature senescence. *Cytometry A.* 73, 808-815.
- Okamoto, M., Hojo, Y., Inoue, K., Matsui, T., Kawato, S., McEwen, BS., and Soya, H. (2012) Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109(32), 13100-13105.
- Okamoto, T., Iwata, S., Ohnuma, K., Dang, N.H., and Morimoto, C. (2009) Histamine H₁-receptor antagonists with immunomodulating activities: potential use for modulating T helper type 1 (Th1)/Th2 cytokine imbalance and inflammatory responses in allergic diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 157, 27-34.
- Oreland, L., Arai, Y., and Stenstrom, A. (1983) The effect of deprenyl (selegiline), and intra- and extraneuronal dopamine oxidation. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 95, 81-85.
- Ornoy, A. (2007) Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. *Reprod. Toxicol.* 24, 31-41.
- Orrego, R., Guchardi, J., Beyger, L., Krause, R., and Holdway, D. (2011) Comparative embryotoxicity of pulp mill extracts in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American flagfish (*Jordanella floridae*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 104, 299-307.
- Osano, O., Admiraal, W., Klamer, H.J., Pastor, D., and Bleeker, E.A. (2002a) Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environ. Pollut.* 119, 195-202.

- Osano, O., Oladimeji, A.A., Kraak, M.H., and Admiraal, W. (2002b) Teratogenic effects of amitraz, 2,4-dimethylaniline, and paraquat on developing frog (*Xenopus*) embryos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 42-9.
- Owesson, CA., Seif, I., McLaughlin, DP., and Stamford, JA. (2003) Different alpha(2) adrenoceptor subtypes control noradrenaline release and cell firing in the locus coeruleus of wildtype and monoamine oxidase-A knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 18(1), 34-42.
- Paczoska-Eliasiewicz, H., and Rzasa, J. (1998) Distribution of histamine in laying hen ovary. *Zentralbl. Veterinarmed. A.* 45, 491-497.
- Padula, G., Ponzinibbio, M.V., Picco, S., and Seoane, A. (2012) Assessment of the adverse effects of the acaricide amitraz: in vitro evaluation of genotoxicity. *Toxicol. Mech. Methods.* 22, 657-661.
- Palermo-Neto, J., Florio, J.C., and Sakate, M. (1994) Developmental and behavioral effects of prenatal amitraz exposure in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 16, 65-70.
- Palermo-Neto, J., Sakate, M., and Florio, J.C. (1997) Developmental and behavioral effects of postnatal amitraz exposure in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 989-97.
- Pappas, S.S., Tiernan, C.T., Behrouz, B., Jordan, C.L., Breedlove, S.M., Goudreau, J.L., and Lookingland, K.J. (2010) Neonatal androgen-dependent sex differences in lumbar spinal cord dopamine concentrations and the number of A11 diencephalospinal dopamine neurons. *J. Comp. Neurol.* 518, 2423-2436.
- Paradis, M. (1999) New approaches to the treatment of canine demodicosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 29 (6), 1425-1436.
- Parviz, M., Vogel, K., Gibson, K.M., and Pearl, P.L. (2014) Disorders of GABA metabolism: SSADH and GABA-transaminase deficiencies. *J. Pediatr. Epilepsy.* 3, 217-227.
- Pass, M.A., and Mogg, T.D. (1991) Effect of amitraz and its metabolites on intestinal motility. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 99, 169-172.
- Pass, M.A., and Mogg, T.D. (1995) Pharmacokinetics and metabolism of amitraz in ponies and sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 18, 210-215.
- Pass, M.A., and Seawright, A.A. (1982) Effect of amitraz on contractions of the guinea-pig ileum in vitro. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 73, 419-422.
- Patton, D.S.G., and 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.
- Pena, F., and Tapia, R. (2000) Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience.* 101, 547-561.

Pendleton, R.G., Rasheed, A., Roychowdhury, R., and Hillman, R. (1998) A new role for catecholamines: ontogenesis. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 248-251.

Petzold, G.L., Swenberg, J.A., and 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.

Pierpoint, A.C., Hapeman, C.J., and Torrents, A. (1997) Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 45, 1937-1939.

Proudfoot, A.T. (2003) Poisoning with amitraz. *Toxicol. Rev.* 22(2), 71-74.

Radakovic, M., Stevanovic, J., Djelic, N., Lakic, N., Knezevic-Vukcevic, J., Vukovic-Gacic, B., and Stanimirovic, Z. (2013) Evaluation of the DNA damaging effects of amitraz on human lymphocytes in the Comet assay. *J. biosci.* 38, 53-62.

Radojicic, R., Cvijic, G., Djordjevic, J., Djurasevic, S., and Davidovic, V. (1997) Chronic effect of insulin on monoamine oxidase and antioxidant enzyme activities in the rat brainstem. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 117, 187-192.

Rahman, MS., and Thomas, P. (2013) Interactive effects of hypoxia with estradiol-17 β on tryptophan hydroxylase activity and serotonin levels in the Atlantic croaker hypothalamus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 71-76.

Ramakrishnan, R., Nazer, MY., Suthanthirarajan, N., and Namasivayam, A. (2003) An experimental analysis of the catecholamines in hyperglycemia and acidosis-induced rat brain. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 16(3), 233-239.

Reed, J.R., Cawley, G.F., and Backes, W.L. (2011) Inhibition of cytochrome P450 1A2-mediated metabolism and production of reactive oxygen species by heme oxygenase-1 in rat liver microsomes. *Drug Metab. Lett.* 5, 6-16.

Reenilä, I., Tuomainen, P., and Männistö, PT. (1995) Improved assay of reaction products to quantitate catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 663, 137-142.

Reichard, L.A., Hafis, H.D., Haynes, N.B., Collier, R.J., Kiser, T.E., and McCarthy, M.S. (1978) Sperm output and serum testosterone in rabbits given prostaglandin F2 alpha or E2. *Prostaglandins.* 16, 135-142.

Richards, J.S., and Pangas, S.A. (2010) New insights into ovarian function. *Handb. Exp. Pharmacol.* 198, 3-27.

Richold, M., Jones, E., and Fenner, L.A. (1983a) Technical BTS 27271, Ames bacterial mutagenicity test. Unpublished report No. FSB 61A/83580 from Huntingdon Research Centre plc, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.

Richold, M., Jones, E., and Fenner, L.A. (1983b). Technical BTS 27919, Ames bacterial mutagenicity test. Unpublished report No. FSB 61B/83581 from Huntingdon Research

Centre plc, Huntindon, Cambridgeshire, United Kingdom. Submitted to WHO by Schering Agrochemicals Ltd.

Rivera, H.M., Oberbeck, D.R., Kwon, B., Houpt, T.A., and Eckel, L.A. (2009) Estradiol increases Pet-1 and serotonin transporter mRNA in the midbrain raphe nuclei of ovariectomized rats. *Brain. Res.* 1259, 51-58.

Roberts, M.C., and Seawright, A.A. (1979) Amitraz induced large intestinal impaction in the horse. *Aust. Vet. J.* 55, 553-554.

Ruan, Y.C., Guo, J.H., Liu, X., Zhang, R., Tsang, L.L., Dong, J.D., Chen, H., Yu, M.K., Jiang, X., Zhang, X.H., Fok, K.L., Chung, Y.W., Huang, H., Zhou, W.L., and Chan, H.C. (2012) Activation of the epithelial Na⁺ channel triggers prostaglandin E(2) release and production required for embryo implantation. *Nat. Med.* 18, 1112-1117.

Sang, N., Zhang, J., Marcheselli, V., Bazan, N.G., and Chen, C. (2005) Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. *J. Neurosci.* 25, 9858-9870.

Sangar, M.C., Bansal, S., and Avadhani, N.G. (2010) Bimodal targeting of microsomal cytochrome P450s to mitochondria: implications in drug metabolism and toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 6, 1231-1251.

Saras, A., Gisselmann, G., Vogt-Eisele, A.K., Erlkamp, K.S., Kletke, O., Pusch, H., and Hatt, H. (2008) Histamine action on vertebrate GABAA receptors: direct channel gating and potentiation of GABA responses. *J. Biol. Chem.* 283, 10470-10475.

Scardapane, L., and Cardinali, D.P. (1977) Effect of estradiol and testosterone on catechol-O-methyl transferase activity of rat superior cervical ganglion, pineal gland, anterior hypophysis and hypothalamus. *J. Neural. Transm.* 40, 81-86.

Schendzielorz, N., Rysa, A., Reenila, I., Raasmaja, A., and Männistö, P.T. (2011) Complex estrogenic regulation of catechol-O-methyltransferase (COMT) in rats. *J. Physiolarmacol.* 62(4), 483-490.

Schnitzler, A.C., Lopez-Coviella, I., and Blusztajn, J.K. (2008) Purification and culture of nerve growth factor receptor (p75)-expressing basal forebrain cholinergic neurons. *Nat. Protoc.* 3, 34-40.

Scholes, K.E., Harrison, B.J., O'Neill, B.V., Leung, S., Croft, R.J., Pipingas, A., Phan, K.L., and Nathan, P.J. (2007) Acute serotonin and dopamine depletion improves attentional control: findings from the stroop task. *Neuropsychopharmacology.* 32 (7), 1600-1610.

Schumacher, A., Costa, S.D., and Zenclussen, A.C. (2014) Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. *Front. Immunol.* 5, 196.

Serafim, K. R., Kishi, M. S., Canto-De-Souza, A., and Mattioli, R. (2013) H(1) but not H(2) histamine antagonist receptors mediate anxiety-related behaviors and emotional memory deficit in mice subjected to elevated plus-maze testing. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 46, 440-446.

Serova, L., Rivkin, M., Nakashima, A., and Sabban, E.L. (2002) Estradiol stimulates gene

expression of norepinephrine biosynthetic enzymes in rat locus coeruleus. *Neuroendocrinology*. 75, 193-200.

Shah, A., Kumar, S., Simon, S.D., Singh D.P., Kumar, A. (2013) HIV gp120- and methamphetamine-mediated oxidative stress induces astrocyte apoptosis via cytochrome P450 2E1. *Cell. Death Dis.* 10, 374.

Shaw, J.W. (1973) 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., and 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., and 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., and 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.

Shin, D.H., and Hsu, W.H. (1994) Influence of the formamidine pesticide amitraz and its metabolites on porcine myometrial contractility: involvement of alpha 2-adrenoceptors and Ca²⁺ channels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128, 45-49.

Shipstone, M. (2000) Generalised demodicosis in dogs, clinical perspective. *Australian Veterinary Journal.* 78(4), 240-242.

Shouse, M.N., Langer, J., Bier, M., Farber, P.R., Alcalde, O., Moghimi, R., Richkind, M., and Szymusiak, R. (1996) The alpha 2 adrenoceptor agonist clonidine suppresses seizures, whereas the alpha 2 adrenoceptor antagonist idazoxan promotes seizures: pontine microinfusion studies of amygdala-kindled kittens. *Brain. Res.* 731, 203-207.

Simmons, D.L., Botting, R.M., and Hla, T. (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56, 387-437.

Sitnikova, E., and van Luijtelaar, G. (2005) Reduction of adrenergic neurotransmission with clonidine aggravates spike-wave seizures and alters activity in the cortex and the thalamus in WAG/Rij rats. *Brain. Res. Bull.* 64, 533-540.

Somerville, EM., Horwood, JM., Lee, MD., Kennett, GA., and Clifton, PG. (2007) 5-HT(2C) receptor activation inhibits appetitive and consummatory components of feeding and increases brain c-fos immunoreactivity in mice. *Eur. J. Neurosci.* 25 (10), 3115-3124.

Soria-Jasso, L.E., and Arias-Montano, J.A. (1996) Histamine H1 receptor activation stimulates [3H]GABA release from human astrocytoma U373 MG cells. *Eur. J. Pharmacol.* 318, 185-192.

Stewart, J., and Rajabi, H. (1994) Estradiol derived from testosterone in prenatal life affects the development of catecholamine systems in the frontal cortex in the male rat. *Brain. Res.* 646, 157-160.

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. (1973) 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., and 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., and 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.

Swan, C., Richards, S. A., Duroudier, N. P., Sayers, I. and Hall, I. P. (2006) Alternative promoter use and splice variation in the human histamine H₁ receptor gene. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 35, 118-126.

Swiader, M., Wielosz, M., and Czuczwar, S.J. (2004) Influence of antazoline and ketotifen on the anticonvulsant activity of conventional antiepileptics against maximal electroshock in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 14, 307-318.

Thiblin, I., Finn, A., Ross, S.B., and Stenfors, C. (1999) Increased dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic activities in male rat brain following long-term treatment with anabolic androgenic steroids. *Br. J. Pharmacol.* 126 (6), 1301-1306.

Thompson, A., Angelotti, T., Nag, S., and Mokha, S.S. (2008) Sex-specific modulation of spinal nociception by alpha2-adrenoceptors: differential regulation by estrogen and testosterone. *Neuroscience.* 153, 1268-1277.

Tian, N., Arany, I., Waxman, D.J., and Baliga, R. (2010) Cytochrome-P450 2B1 gene silencing attenuates puromycin aminonucleoside-induced cytotoxicity in glomerular epithelial cells. *Kidney Int.* 78, 182-190.

Toda, K., Ono, M., Yuhki, K., Ushikubi, F., and Saibara, T. (2012) 17beta-Estradiol is critical for the preovulatory induction of prostaglandin E(2) synthesis in mice. *Mol. Cell. Endocrinol.*

362, 176-182.

Tsang, S., Wu, S., Liu, J., and Wong, T.M. (2008) Testosterone protects rat hearts against ischaemic insults by enhancing the effects of alpha(1)-adrenoceptor stimulation. *Br. J. Pharmacol.* 153, 693-709.

Ueng, T.H., Hung, C.C., Wang, H.W., and Chan, P.K. (2004) Effects of amitraz on cytochrome P450-dependent monooxygenases and estrogenic activity in MCF-7 human breast cancer cells and immature female rats. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1785-94.

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, Pesticide and Toxic Substances, Washington, DC.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). (2013) Amitraz Proposed Tolerance Actions, Federal Register Volume 78, Number 54, US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticide and Toxic Substances, Washington, DC.

Vehof, J., Risselada, A. J., Al Hadithy, A. F., Burger, H., Snieder, H., Wilffert, B., Arends, J., Wunderink, L., Knegeting, H., Wiersma, D., Cohen, D., Mulder, H. and Bruggeman, R. (2011) Association of genetic variants of the histamine H₁ and muscarinic M₃ receptors with BMI and HbA_{1c} values in patients on antipsychotic medication. *Psychopharmacology.* 216, 257-265.

Vesela, J., Rehak, P., Mihalik, J., Czikkova, S., Pokorny, J., and Koppel, J. (2003) Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Physiol. Res.* 52, 223-228.

Wang, JP., Liu, IM., Tzeng, TF., and Cheng, JT. (2002) Decrease in catechol-O-methyltransferase activity in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29(5-6), 419-422.

Weighton, D.M., Kerry, J.C., McCarthy, J.T., and 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., and 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., and Breakefield, X.O. (1990) Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacol. Ther.* 47, 391-417.

Whitaker-Azmitia, P.M. (1991) Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 553-561.

Whitaker-Azmitia, P.M., Zhang, X., and Clarke, C. (1994) Effects of gestational exposure to monoamine oxidase inhibitors in rats: preliminary behavioral and neurochemical studies. *Neuropsychopharmacology*. *11*, 125-132.

Willoughby, D., and Cooper, D.M. (2007) Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol. Rev.* *87*, 965-1010.

Wogelius, P., Norgaard, M., Gislum, M., Pedersen, L., Munk, E., Mortensen, P.B., Lipworth, L., and Sorensen, H.T. (2006) Maternal use of selective serotonin reuptake inhibitors and risk of congenital malformations. *Epidemiology*. *17*, 701-704.

Wong, C.T., Ahmad, E., Li, H., and Crawford, D.A. (2014) Prostaglandin E2 alters Wnt-dependent migration and proliferation in neuroectodermal stem cells: implications for autism spectrum disorders. *Cell. Commun. Signaling*. *12*, 19.

Wood, C.E. (2005) Estrogen/hypothalamus-pituitary-adrenal axis interactions in the fetus: The interplay between placenta and fetal brain. *J. Soc. Gynecol. Invest.* *12*, 67-76.

Xiu, F., Stanojcic, M., Diao, L., and Jeschke, M.G. (2014) Stress Hyperglycemia, Insulin Treatment, and Innate Immune Cells. *Int. J. Endocrinol.* *2014*, 486403.

Yang, H., Zhang, J., Breyer, R.M., and Chen, C. (2009) Altered hippocampal long-term synaptic plasticity in mice deficient in the PGE2 EP2 receptor. *J. Neurochem.* *108*, 295-304.

Yilmaz, H.L., and Yildizdas, D.R. (2003) Amitraz poisoning, an emerging problem: epidemiology, clinical features, management, and preventive strategies. *Arch. Dis. Child.* *88(2)*, 130-134.

Yim, G.K., Holsapple, M.P., Pfister, W.R., and Hollingworth, R.M. (1978) Prostaglandin synthesis inhibited by formamidine pesticides. *Life Sci.* *23*, 2509-2515.

Yokoyama, H., Iinuma, K., Yanai, K., Watanabe, T., Sakurai, E., and Onodera, K. (1993) Proconvulsant effect of ketotifen, a histamine H₁ antagonist, confirmed by the use of d-chlorpheniramine with monitoring electroencephalography. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* *15*, 183-188.

Young, F.M., Menadue, M.F., and Lavranos, T.C. (2005a) Effects of the insecticide amitraz, an alpha2-adrenergic receptor agonist, on human luteinized granulosa cells. *Hum. Reprod.* *20*, 3018-3025.

Young, F.M., Phungtamdet, W., and Sanderson, B.J. (2005b). Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicol. In Vitro.* *19*, 1051-1059.

Yu, P.L., Wu, C.I., Lee, T.S., Pan, W.H., Wang, P.S., and Wang, S.W. (2009) Attenuation of estradiol on the reduction of striatal dopamine by amphetamine in ovariectomized rats. *J. Cell. Biochem.* *108(6)*, 1318-1324.

Zhang, W., and Ordway, G.A. (2003) The alpha2C-adrenoceptor modulates GABA release in

mouse striatum. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 112, 24-32.

Zhao, C., Fujinaga, R., Yanai, A., Kokubu, K., Takeshita, Y., Watanabe, Y., and Shinoda, K. (2008) Sex-steroidal regulation of aromatase mRNA expression in adult male rat brain: a quantitative non-radioactive in situ hybridization study. *Cell. Tissue Res.* 332(3), 381-391.

Zolaly, M.A. (2012) Histamine H1 antagonists and clinical characteristics of febrile seizures. *Int. J. Gen. Med.* 5, 277-281.

ANEXO I

Amitraz changes NE, DA and 5-HT biosynthesis and metabolism mediated by alterations in estradiol content in CNS of male rats.

Javier del Pino, Paula Moyano, Matilde Ruiz, María Jose Anadon, María Jesús Díaz, Jose Manuel García, Elena Labajo-Gonzalez, María Teresa Frejo

Revista: Chemosphere.

Email: chemosphere@elsevier.com

Naturaleza de la publicación: **Revista de Investigación Científica.**

Indexada: Journal Citation Reports

Categoría o materia de la revista: Ciencia Medioambientales

Posición relativa dentro de la materia: 32/229.

Índice de Impacto: 4.208



Amitraz changes NE, DA and 5-HT biosynthesis and metabolism mediated by alterations in estradiol content in CNS of male rats

Javier del Pino ^{a,*,1}, Paula Moyano ^{b,1}, Matilde Ruiz ^b, María José Anadón ^b,
María Jesús Díaz ^a, José Manuel García ^b, Elena Labajo-González ^b, María Teresa Frejo ^a

^a Department of Toxicology and Pharmacology, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Department of Toxicology and Legal Medicine, Medical School, Complutense University of Madrid, 28041 Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- Amitraz did not inhibit MAO at 20, 50 and 80 mg/kg doses.
- Amitraz altered MAO, COMT, DBH, TH and TRH expression and TH and TRH activity.
- Enzymes' expression alteration was partially mediated by estradiol levels alteration.
- Amitraz alter monoaminergic systems by estradiol levels disruption.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 January 2017

Received in revised form

20 April 2017

Accepted 23 April 2017

Available online 26 April 2017

Handling Editor: A. Gies

Keywords:

Amitraz

Male rats

Neurotoxicity

Monoaminergic neurotransmitters

Estradiol

ABSTRACT

Amitraz is a formamidine insecticide/acaricide that alters different neurotransmitters levels, among other neurotoxic effects. Oral amitraz exposure (20, 50 and 80 mg/kg bw, 5 days) has been reported to increase serotonin (5-HT), norepinephrine (NE) and dopamine (DA) content and to decrease their metabolites and turnover rates in the male rat brain, particularly in the striatum, prefrontal cortex, and hippocampus. However, the mechanisms by which these alterations are produced are not completely understood. One possibility is that amitraz monoamine oxidase (MAO) inhibition could mediate these effects. Alternatively, it alters serum concentrations of sex steroids that regulate the enzymes responsible for these neurotransmitters synthesis and metabolism. Thus, alterations in sex steroids in the brain could also mediate the observed effects. To test these hypothesis regarding possible mechanisms, we treated male rats with 20, 50 and 80 mg/kg bw for 5 days and then isolated tissue from striatum, prefrontal cortex, and hippocampus. We then measured tissue levels of expression and/or activity of MAO, catechol-O-methyltransferase (COMT), dopamine-β-hydroxylase (DBH), tyrosine hydroxylase (TH) and tryptophan hydroxylase (TRH) as well as estradiol levels in these regions. Our results show that amitraz did not

Abbreviations: AD, aldehyde dehydrogenase; AMZ, amitraz; ARO, aromatase; AAADC, aromatic amino acid decarboxylase; CNS, central nervous system; COMT, catechol-O-methyltransferase; Ct, cycle threshold; DA, dopamine; DBH, dopamine-β-hydroxylase; DOPA, 3,4-dihydroxyphenylalanine; DOPAC, 3,4-hydroxyphenylacetic acid; DHT, dihydrotestosterone; E2, 17β-estradiol; FC, prefrontal cortex; HC, hippocampus; HPLC, high performance liquid chromatography; HVA, homovanillic acid; 5-HT, serotonin; 5-HTP, 5-hydroxytryptophan; 5-HIAA, 5-hydroxy-3-indolacetic acid; LD₅₀, Lethal Dose 50; LOQ, Quantification limit; MAO, monoamine oxidase; MHPG, 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol; NE, norepinephrine; NSD-1015, *m*-hydroxymethylhydrazine; SD, standard deviation; ST, striatum; T, testosterone; TH, tyrosine hydroxylase; TMX, tamoxifen; TRH, tryptophan hydroxylase.

* Corresponding author. Department of Toxicology and Pharmacology, Veterinary School, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: jdelpino@pdi.ucm.es (J. del Pino).

¹ These authors have contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.113>
0045-6535/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

inhibit MAO activity at these doses, but altered MAO, COMT, DBH, TH and TRH gene expression, as well as TH and TRH activity and estradiol levels. The alteration of these enzymes was partially mediated by dysregulation of estradiol levels. Our present results provide new understanding of the mechanisms contributing to the harmful effects of amitraz.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Amitraz (1,5 di-(2,4-dimethylphenyl)-3-methyl-1,3,5-triazapenta-1,4-diene), a formamidine pesticide, is used worldwide on both animals and crops to control pests as an insecticide and acaricide (Yilmaz and Yildizdas, 2003). The pesticidal action of amitraz in invertebrates is related to activation of octopamine receptors (Nathanson, 1985). A cause of concern for health authorities is the number of amitraz human poisoning cases that have been attributed and are still being reported (Demirel et al., 2006; Veale et al., 2011).

Amitraz is a potent neurotoxic compound that induces signs such as loss of righting reflex, motor incoordination, appetite alteration, hyperreactivity to external stimuli, aggressiveness, among other effects. These effects are mediated in part by disruption of neurotransmitter systems (Del Pino et al., 2015). Amitraz (20, 50 and 80 mg/kg bw) increases serotonin (5-HT), norepinephrine (NE) and dopamine (DA) levels and decreases their metabolites levels and turnover rates in the central nervous system (CNS) of male rats with the striatum, prefrontal cortex, and hippocampus being the most affected (Del Pino et al., 2013). Although the mechanisms responsible for these alterations are not completely understood, amitraz inhibits monoamine oxidase (MAO), the main enzyme that metabolizes monoamine neurotransmitters (Aziz and Knowles, 1973). Therefore, amitraz could mediate the effects observed on monoaminergic neurotransmitters by blocking MAO. In this regard, Florio et al. (1993), showed that amitraz at dose of 100 mg/kg bw increased NE and DA levels in hypothalamus and striatum, respectively, and decreased the homovanillic acid (HVA) levels in striatum and attributed these effects to MAO inhibition. Moser and MacPhail (1989) reported that amitraz inhibits MAO only at doses of 100 mg/kg bw, so this mechanism could not explain the effect seen at lower doses. However, motor incoordination appears from doses lower than 100 mg/kg bw (from 6.25 to 25 mg/kg bw/day) in rats (Moser et al., 1987), and it has been reported that MAO inhibition mediates motor incoordination (Florio et al., 1993), suggesting this enzyme could mediate the monoamine neurotransmitters alteration observed at doses lower than 100 mg/kg bw.

Another explanation for amitraz-induced alterations in the NE, DA and 5-HT and its metabolites levels observed in male rats is that the pesticide may alter sex steroid hormones that regulate the activity and expression of enzymes important for neurotransmitter synthesis and metabolism. Such enzymes include aldehyde dehydrogenase (AD), catechol-O-methyltransferase (COMT), dopamine- β -hydroxylase (DBH), MAO, tyrosine hydroxylase (TH), and tryptophan hydroxylase (TRH), all important for neurotransmitters synthesis and metabolism (Babu and Vijayan, 1984; Chaube and Joy, 2011; Donner and Handa, 2009; De Souza Silva et al., 2009; Handa et al., 1997; Lubbers et al., 2010; Luine and Rhodes, 1983; Purves-Tyson et al., 2012; Rahman and Thomas, 2013; Scardapane and Cardinali, 1977; Schendzielorz et al., 2011; Thiblin et al., 1999). This hypothesis is reasonable considering that amitraz alters hepatic metabolism of 17 β -estradiol (E2) and testosterone (T) in rats, and increases serum T in male rats at doses of 25 and 50 mg/

kg bw (Chou et al., 2008).

Aromatase (ARO) or reductase enzymes can metabolize T in CNS to E2 or dihydrotestosterone (DHT) in a region-specific manner (Castelli et al., 2013; Zhao et al., 2007, 2008). Therefore, the amitraz effect on monoaminergic neurotransmitter in male rats could be mediated by changes in T or its E2 or DHT metabolites. This idea is supported by evidence that E2 regulates the expression of enzymes which form and metabolize 5-HT, DA and NE (Donner and Handa, 2009; Luine and Rhodes, 1983; Luine et al., 1973; Scardapane and Cardinali, 1977; Serova et al., 2002). In this regard, E2 has been reported to induce TRH-2 mRNA expression (Donner and Handa, 2009) and to increase levels of mRNA encoding TH, the major rate limiting enzyme in DA and NE biosynthesis (Serova et al., 2002). In addition, synthesis and metabolism of monoaminergic neurotransmitters are modulated by T and DHT hormones (Thiblin et al., 1999). These hormones increase COMT, MAO-A and MAO-B mRNAs levels and TH protein enzymes (Purves-Tyson et al., 2012). Also, DHT reduces 5-HT, DA and NE turnover rates of gonadectomized animals (Handa et al., 1997). Taking all the above into consideration, we hypothesized that amitraz effects on serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems may be mediated through a combination of MAO inhibition, and/or by altering sex steroid-dependent expression and activity of the enzymes that metabolize and synthesize these neurotransmitters.

This study sets out to analyze the presented hypothesis on the importance of monoaminergic neurotransmitter dysregulation for explaining amitraz neurotoxic effects. We evaluated this hypothesis by testing dose-dependent effects of amitraz (20, 50 and 80 mg/kg bw for 5 days) in striatum, prefrontal cortex, and hippocampus from male rats. Specifically, we tested whether amitraz inhibits MAO and/or alters the expression and activity enzymes that metabolize or synthesize the monoaminergic neurotransmitters and does so by altering sex hormones in these regions.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Amitraz (98%), dihydroxybenzoic acid, *S*-adenosyl-L-methionine, *m*-hydroxymethylhydrazine (NSD-1015) were obtained from Sigma (Madrid, Spain). All other chemicals were reagent grade of the highest laboratory purity available.

2.2. Animals and experimental design

European Union guidelines (2003/65/EC) and Spanish regulations (BOE 67/8509-12, 1988) regarding the use of laboratory animals were followed when performing all experiments. We used male Wistar rats, at 60 days old, each weighting 200–210 g (Charles River, Barcelona, Spain), which were individually housed and maintained in a temperature- and light-controlled room (14:10 light:dark cycle; lights on at 0500 h) with food and water available *ad libitum*. We randomly assigned 6 animals to each of the control and treatment groups. We used independent groups of controls and treatments for all different analyses performed. Animals were

orally treated with either corn oil, as a vehicle, tamoxifen (TMX, 1 mg/kg bw subcutaneously), or amitraz at the dose of 20, 50 and 80 mg/kg bw with or without TMX, all for 5 consecutive days. Food from treated group was removed 6 h before treatment, but animals were allowed water *ad libitum*. The doses of 20, 50 and 80 mg/kg bw [equivalent to 1/30, 1/12 and 1/7.5 of the LD₅₀ (mean LD₅₀ was previously calculated, data not shown)] were chosen because they were previously described to produce a dose-dependent alteration of monoamine neurotransmitters 5-HT, NE, DA and their metabolites after 5 consecutive days of treatment (Del Pino et al., 2013) and because they are under the doses that have been reported to inhibit MAO (Moser and MacPhail, 1989), which was the mechanism suggested to produce this alteration (Florio et al., 1993). Thus, the selected doses are relevant to study the mechanisms of alteration of these monoaminergic neurotransmitters. TMX, a selective estrogen receptor antagonist, was used at 1 mg/kg bw dose as an effective dose according to literature (Okamoto et al., 2012; Nayebi et al., 2014) and the minimum dose that induced the maximum blockage on amitraz effects (data not shown).

Three hours after the last dose of treatment, animals were euthanized by decapitation. Brains were rapidly removed, and hippocampus, prefrontal cortex and striatum were dissected out at 4 °C (Glowinski and Iversen, 1966) under a stereomicroscope (Olympus SZ51, Barcelona, Spain). Tissues samples were quickly weighed and stored at –80 °C until further analysis.

2.3. Estradiol and testosterone quantification

E₂ and T content was measured in plasma, hippocampus, prefrontal cortex and striatum from treated animals in order to determine whether sex hormones are altered by amitraz exposure. E₂ and T content was measured using an enzyme immunoassay kit (Estradiol EIA Kit, Cayman Chemical Company, MI, USA), according to the manufacturer's instructions. Plasma samples were extracted twice with ethyl acetate and tissues samples were homogenized in 300–500 µL of an equal mixture of ethyl acetate and 0.1 M phosphate-buffered saline. Homogenates were centrifuged at 21,000 ×g for 15 min at 4 °C. The mixture was afterwards incubated in a MeOH/dry ice bath to solidify the aqueous phase, while the organic phase was eluted into a new tube. After, ethyl acetate portion was gathered and dried. The dried material was reconstituted in 120 µL EIA buffer, and 100 µL of the sample was used for EIA at duplicate. ELISA values were obtained (ng/mL) and corrected for plasma volume (mL/mL) or weight tissue (mg/mL), producing a final unit of pg/mL or pg/mg, respectively, and presented as a percentage of the untreated control.

2.4. Aromatase activity analysis

Brain ARO activity was determined using the tritiated water (3H₂O) release method, based on the production of 3H₂O during aromatization of a labeled androgenic substrate. The formation of tritiated water is proportional to the amount of estrogen produced during aromatization. Brain tissues were homogenized and afterwards subjected to the 3H₂O release assay as previously described (Grote et al., 2006; Hobler et al., 2010). Briefly, dissected brain samples were homogenized in TEKS buffer (Tris HCl 50 mM, Na₂ EDTA 2H₂O 1 mM, KCl 100 mM pH 7.4) containing 0.1% (w/v) Na₂S₂O₅. The homogenized samples (20 µL) were incubated, at 37 °C for 30 min, with 20 µL TEKS buffer and 10 µL NADPH (5 mg/ml) in 96-well plates, containing the tracer [1β-3H(N)]-androst-4-ene-3,17-dione (Perkin Elmer, Madrid, Spain) previously added. Protein concentration was determined in one aliquot of the homogenate using a BCA kit (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). The reaction was finished in an ethanol-dry-ice bath and cold water

was added up to a volume of 150 µL per well. The content of the wells was afterwards transferred onto clean-up C-18 extraction columns (UCT, Bristol, England), preconditioned with methanol and ethanol, and subsequently centrifuged for 5 min at 2000 rpm and 4 °C. The columns were centrifuged again after adding 200 µL distilled water under the same conditions. Radioactivity corresponding to the reaction product was measured by organic liquid scintillation counting. ARO activity was expressed as fmol/mg protein/15 min and values were expressed as the percentage of enzyme activity.

2.5. Determination of monoamine levels

Monoamine levels were determined in hippocampus, prefrontal cortex and striatum after amitraz treatment with or without TMX to study the effect on monoaminergic transmission. The tissues were homogenized in 300–500 µL of 0.4 M HClO₄ containing 0.1% (w/v) Na₂S₂O₅ by sonication. Homogenates were centrifuged, at 4 °C, for 15 min at 20,000 ×g and aliquots of supernatants were taken for analysis of 5-HT and its metabolite [5-hydroxy-3-indolacetic acid (5-HIAA)], DA and its metabolites [3,4-hydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and HVA] and NE and its metabolite [3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol (MHPG)] using a high performance liquid chromatography (HPLC) technique as described previously (Del Pino et al., 2013).

The sample chromatograms' peak areas were quantified as described previously by Del Pino et al. (2013). Quantification limit (LOQ) was 2 pg for DA, DOPAC, NE, 5-HT and 5-HIAA and 20 pg for HVA and MHPG in the different tissue matrices. 5-HT, DA and NE turnover rates were calculated as ratios of metabolites to neurotransmitter. Concentrations were expressed as ng per g of wet tissue and values were expressed as the percentage of control.

2.6. TH and TRH activity analysis

The activities of TH and TRH in the brain regions studied were indirectly calculated as previously stated (Johnston and Moore, 1983; Nissbrandt et al., 1988), by measuring 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) and 5-hydroxytryptophan (5-HTP) accumulation, respectively, after aromatic amino acid decarboxylase (AAADC) inhibition, with *m*-hydroxymethylhydrazine (NSD-1015). 30 min before animals sacrifice, all groups of animals used for this particular experiment were injected intraperitoneally with NSD-1015 (100 mg/kg bw). At this dose, NSD-1015 is able to completely blockage AAADC activity, leading to DOPA and 5-HTP accumulation. Homogenates prepared as described above were centrifuged, at 4 °C, for 15 min at 20,000 ×g and aliquots of supernatants were taken for analysis of DOPA and 5-HTP levels using a HPLC technique as described previously by Chapin et al. (1986). 5-HTP and L-DOPA concentrations were expressed as ng per mg of protein per 30 min and values were expressed as the percentage of enzyme activity.

2.7. Catechol-O-methyltransferase activity and protein content analysis

COMT activity was measured in prefrontal cortex, hippocampus and striatum as described earlier (Nissinen and Männistö, 1984; Reenilä et al., 1995). Briefly, 100 µL enzyme preparation was incubated at 37 °C for 30 min in the presence of 5 mM MgCl₂, 240 µM dihydroxybenzoic acid, and 200 µM *S*-adenosyl-L-methionine in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4. The reaction was stopped with ice-cold 0.4 M perchloric acid and centrifuged, at 4 °C, at 5530 ×g for 10 min. A HPLC system with electrochemical detection was used to analyze the reaction products, vanillic and isovanillic

acid and protein content was measured by BCA kit (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). COMT activity is expressed as picomoles vanillic acid formed in one min per mg of protein in the sample and values were expressed as the percentage of enzyme activity.

Commercial ELISA kit (MBS2880296, MyBiosource, CA, USA) was used to assay COMT protein concentration according to the manufacturer's instructions. Concentrations were calculated as ng/mg of protein and values were expressed as the percentage of enzyme control content.

2.8. Dopamine- β -hydroxylase activity analysis

DBH activity was determined by using the two-wavelength spectrophotometric method of Kato et al. (1974). The DBH assay is based on the enzymatic conversion of tyramine to octopamine. The product octopamine was isolated by using small column that contained 0.2 mL of activated DOWEX-50WX4 (H^+ , 200–400 mesh) resin. The adsorbed octopamine was eluted with 1.0 mL of 3 N NH_4OH , and then converted into *p*-hydroxybenzaldehyde by addition of 10 μ L of 2% $NaIO_4$ solution. The $NaIO_4$ excess was reduced by adding 10 μ L of 10% $Na_2S_2O_3$ solution. The solution was extracted with 5 mL ethyl ether, the ether phase was again extracted with 1 mL of 3 N NH_4OH for absorbance measurements at 330 nm. DBH activity was expressed as nmol (octopamine)/min/g of wet tissue and values were expressed as the percentage of enzyme activity.

2.9. Real-time PCR analysis

The ARO expression, in control and amitraz treated animals, was measured in hippocampus, prefrontal cortex and striatum tissues, in order to determine whether its alteration by amitraz is a possible mechanism of E_2 disruption. Moreover, monoamine oxidase A (MAOA), monoamine oxidase B, (MAOB), COMT, TH, TRH and DBH expression was measured in hippocampus, prefrontal cortex and striatum tissues from control and amitraz treated animals with or without TMX in order to determine whether amitraz, through E_2 disruption, alters the expression of these enzymes. Total RNA was extracted using the Trizol Reagent method (Invitrogen, Madrid, Spain). The final RNA concentration was determined using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain), and the quality of total RNA samples was assessed using an Experion LabChip (Bio-Rad, Madrid, Spain) gel. First-strand cDNA was synthesized with 1000 ng of cRNA by using a PCR array first strand-synthesis kit (C-02; SuperArray Bioscience, Madrid, Spain) in accordance with the manufacturer's instructions and including a genomic DNA elimination step and external RNA controls. After reverse transcription, semi quantitative real-time PCR was carried out using prevalidated primer sets (SuperArray Bioscience) for mRNAs encoding ARO (PPR47164A), MAOA (PPR46359A), MAOB (PPM03990A), COMT (PPR06789A), TH (PPR45220F), TRH (PPR48244A), DBH (PPR52652A), and ACTB (PPM02945B). ACTB was used as an internal control for normalization. Reactions were run on a CFX96 using Real-Time SYBR Green PCR master mix PA-012 (SuperArray Bioscience). The thermocycler parameters were 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 72 °C for 30 s. Relative changes in gene expression were calculated using the cycle threshold (Ct) method. The expression data are presented as actual change multiples (Livak and Schmittgen, 2001).

2.10. Monoamine oxidase activity and content measurement

MAO activity was determined in hippocampus, prefrontal cortex and striatum homogenates by a luminescent method that uses a

derivative of beetle luciferin as a luminogenic MAO substrate. Tissues were homogenized in cold phosphate buffer 0.1 M (pH 8.0; 4 μ L/mg tissue) supplemented with protease inhibitors and protein content was measured by BCA kit (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). Forty-five μ g of protein in triplicate per rat tissue were used in the MAO-Glo Assay (Promega, Madrid, Spain) as described by the manufacturer, increasing the incubation with substrate from 20 min to 3 h. Luminescent signal was detected using a Fluoroskan Ascent FL plate reader (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). MAO activity, measured in relative light units (RLU), was background corrected using a buffer-only control and values were expressed as the percentage of enzyme activity. Heat-inactivated samples yielded similar background values to buffer-only controls. Since this assay could detect amine oxidases other than MAO, to confirm that the signal from rat tissues homogenates was due to MAO and not other amine oxidases, tissue homogenates were assayed in the presence of the specific MAO A and B inhibitors clorgyline and deprenyl, respectively, which completely inhibited the luminescent signal.

Commercial ELISA kits (MBS9328595 and MBS2881432, MyBiosource, CA, USA) were used to assay MAOA and MAOB, respectively, protein concentrations according to the manufacturer's instructions. Concentrations were calculated as ng/mg of protein and values were expressed as the percentage of enzyme control content.

2.11. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) of 6 animals per group and presented as percentage change from control (%). Comparisons between experimental and control groups' raw data were carried out with either one-way ANOVA analysis (analysis of different treatments) or two-way ANOVA analysis (brain region vs treatment), followed by the Duncan post-hoc test. Statistical difference was accepted when $p \leq 0.05$. Statistical analysis of data was carried out by computer using GraphPad software.

3. Results

Male rats treated with amitraz at the highest dose (80 mg/kg bw, 5 days) showed a slight motor incoordination, approximately 1–2 h after treatment. These signs were reversible and approximately at 6 h after treatment the rats behaved normally. Male rats treated with amitraz (20, 50 and 80 mg/kg bw, 5 days) showed no statistically significant effect on the gain or loss of body weight, weight of tissues (brain regions), or the ratio weight tissue/body weight (%) compared to control (data not shown).

3.1. Estradiol and testosterone quantification

E_2 and T content was assessed in plasma, striatum, prefrontal cortex and hippocampus after 5 days treatment with vehicle or amitraz at doses of 20, 50 and 80 mg/kg bw. Amitraz treatment showed no effect in the content of E_2 in plasma and T in the brain regions studied (data not shown). However, amitraz induced a dose-dependent increase in T content in plasma and E_2 content in the regions of prefrontal cortex, striatum and hippocampus from highest to lowest in this order (Fig. 1A and B).

3.2. Aromatase activity analysis

ARO activity was assessed in striatum, prefrontal cortex and hippocampus after 5 days treatment with amitraz at dose of 20, 50 and 80 mg/kg bw with or without TMX at dose of 1 mg/kg bw. Amitraz induced a dose-dependent increase in the activity of ARO

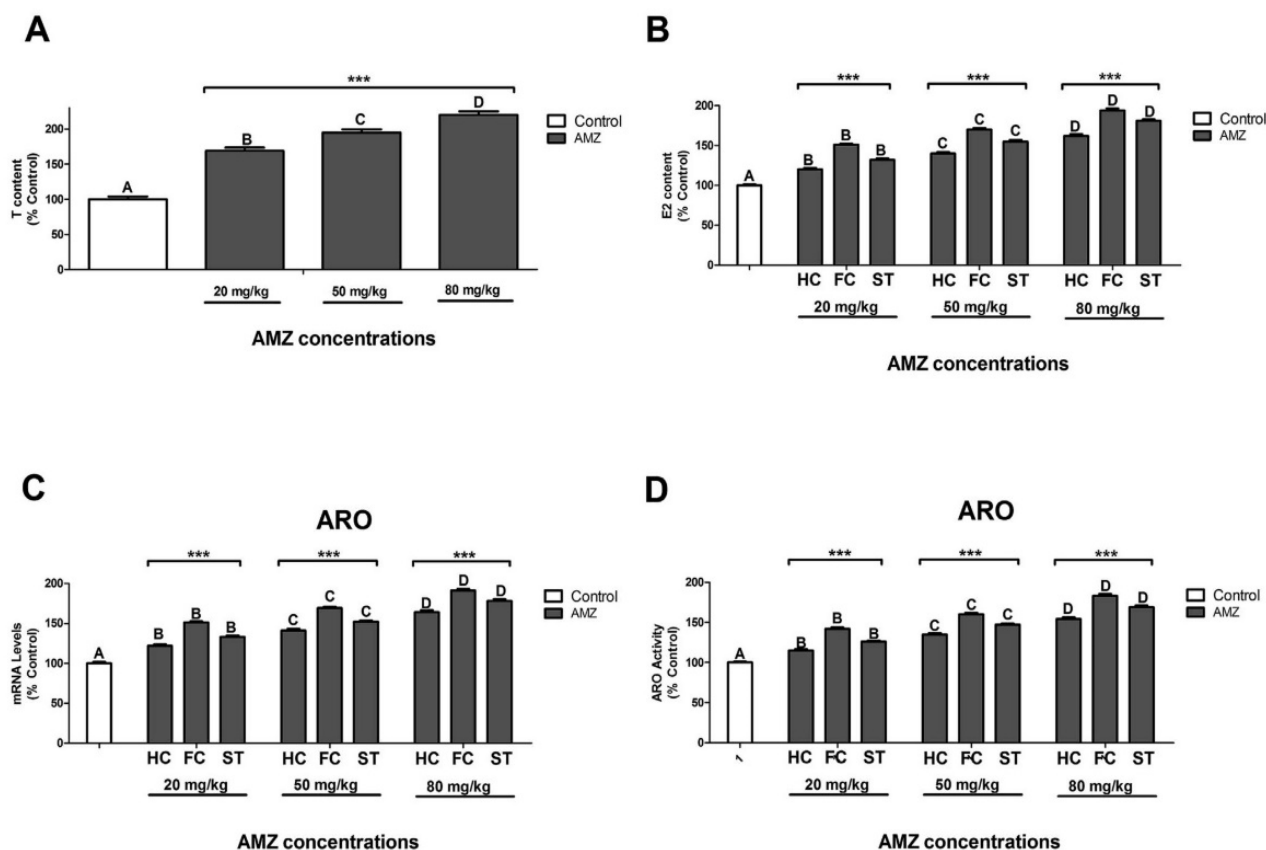


Fig. 1. Assessment of amitraz (AMZ) effect on testosterone (A) and estradiol content by ELISA analysis (B), aromatase (ARO) activity (C) and gene expression by semi quantitative real-time PCR analysis (D) in hippocampus (HC), prefrontal cortex (FC) and striatum (ST) from adult male rats. The absolute control values of T content (ng/mL) in plasma was 4.0 ± 0.4 and E2 content (ng/mg) and ARO activity (fmol/mg/15 min) were 0.4 ± 0.08 and 22 ± 0.20 in HC, 0.82 ± 0.014 and 40 ± 0.53 in FC and 0.51 ± 0.012 and 31 ± 0.41 in ST, respectively. Data are presented as a percentage relative to control group and were significantly different from the respective control group at $p < 0.001$. Different letters indicates significant difference among different doses for each structure (Duncan's test). ***Significant difference between brain regions for each amitraz dose ($p < 0.001$).

in prefrontal cortex, striatum, and hippocampus from highest to lowest in this order (Fig. 1C).

3.3. Determination of monoamine levels

Amitraz produced a dose-dependent increase of the 5-HT, DA and NE levels in all brain regions studied compared to the control group. Only the most affected brain region for each neurotransmitter is represented in Fig. 2 since data from the rest brain regions were similar, and the rest brain region of each neurotransmitter are represented in Supplementary Figures online. The increase of 5-HT ranged from highest to lowest in prefrontal cortex, striatum and hippocampus (Fig. 2A and Supplementary Fig. 1A and B). The increase of NE ranged from highest to lowest in striatum, hippocampus and prefrontal cortex (Fig. 2B and Supplementary Fig. 2A and B). The increase in DA ranged from highest to lowest in prefrontal cortex, striatum, and hippocampus (Fig. 2C and Supplementary Fig. 3A and B).

Moreover, amitraz induced a dose-dependent decrease of 5-HIAA metabolite content and its turnover rate (5-HIAA/5-HT), MHPG metabolite content and its turnover rate (MHPG/NE) and DOPAC and HVA metabolites content and turnover rate (DOPAC + HVA/DA) in all brain regions studied compared to the control group. 5-HIAA and turnover rate decrease ranged from highest to lowest in prefrontal cortex, hippocampus and striatum (Fig. 2A and Supplementary Fig. 1A and B). MHPG decrease ranged from highest to lowest in prefrontal cortex, striatum and

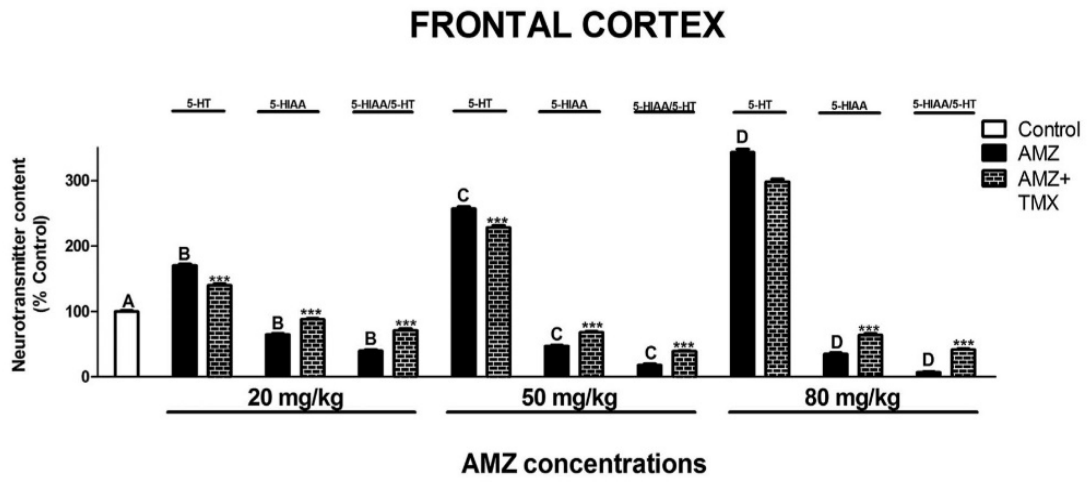
hippocampus and turnover rate decrease ranged from highest to lowest in striatum, prefrontal cortex and hippocampus (Fig. 2B and Supplementary Fig. 2A and B). There were no differences between the decrease in the DOPAC and HVA content in the hippocampus, but the decrease in the DOPAC content was higher than the decrease in the HVA content in the striatum, and the decrease in the HVA content was higher than the decrease in the DOPAC content in prefrontal cortex (Fig. 2C and Supplementary Fig. 3A and B). The decrease of DA turnover rate (DOPAC + HVA/DA) ranged from highest to lowest in prefrontal cortex, hippocampus and striatum (Fig. 2C and Supplementary Fig. 3A and B).

Treatment with TMX alone induced a dose-dependent decrease of the 5-HT, DA and NE levels, and a dose-dependent increase in their metabolites and their turnover rates in all brain regions studied compared to the control group (Fig. 3A–C). TMX co-treatment with amitraz partially reversed the change in 5-HT, NE and DA neurotransmitters and their metabolites levels as well as the turnover rates induced by amitraz alone in all brain regions studied (Fig. 2 and Supplementary Figs. 1–3).

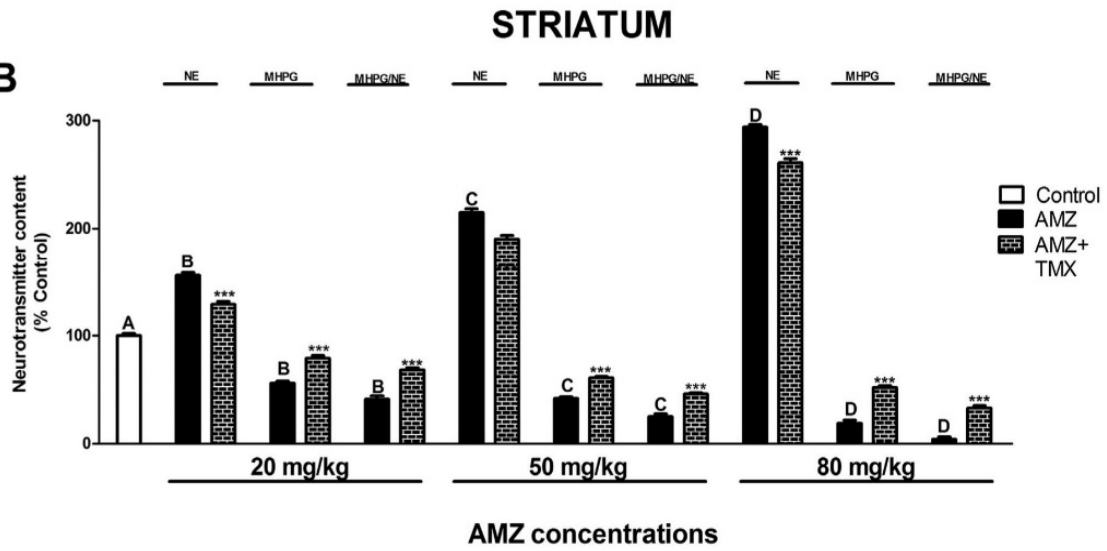
3.4. TH and TRH activity analysis

After treatment, amitraz induced a dose-dependent increase in the activity of TH and TRH in prefrontal cortex, striatum, and hippocampus from highest to lowest in this order (Fig. 4A and B, respectively). TMX alone treatment induced a dose-dependent decrease in the activity of TH and TRH in the brain regions

A



B



C

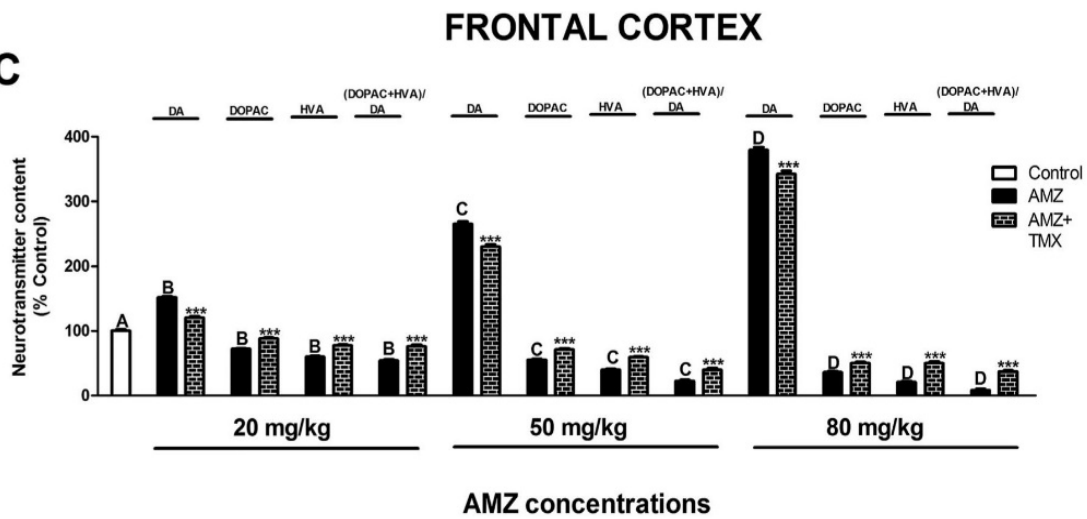


Fig. 2. Effect of amitraz (AMZ, 20, 50 and 80 mg/kg bw orally, for 5 days) with or without tamoxifen (TMX, 1 mg/kg bw subcutaneously) on 5-HT and 5-HIAA content and turnover rate (5-HIAA/5-HT) in prefrontal cortex (A), on NE and MHPG content and turnover rate (MHPG/NE) in striatum (B) and on DA, DOPAC and HVA content (ng/g) and turnover rate

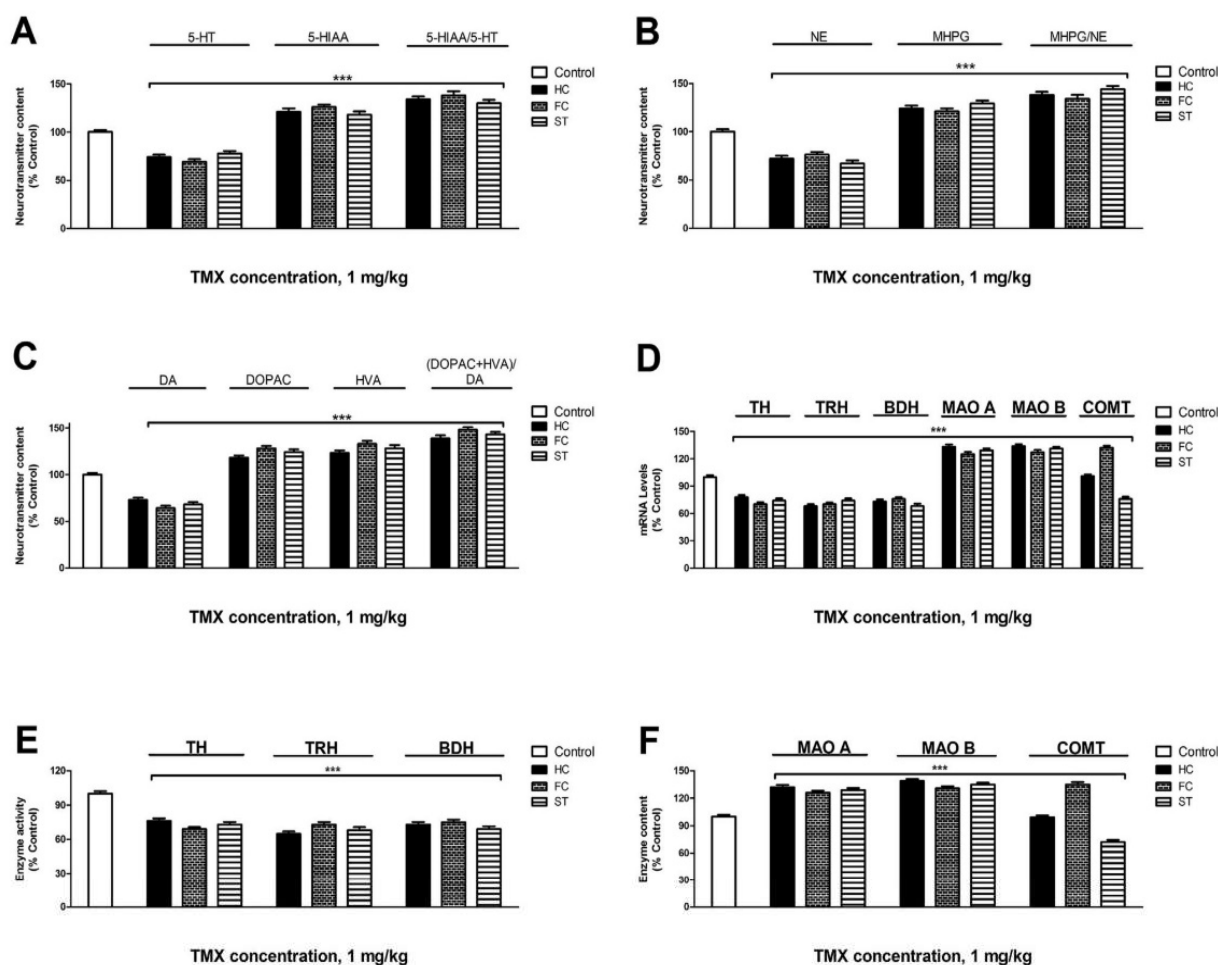


Fig. 3. Effect of tamoxifen (TMX, 1 mg/kg bw subcutaneously, for 5 days) on 5-HT and 5-HIAA content and turnover rate (5-HIAA/5-HT) (A), on NE and MHPG content and turnover rate (MHPG/NE) (B), on DA, DOPAC and HVA content (ng/g) and turnover rate (DOPAC + HVA/DA) (C), on enzymes gene expression (D) activity (E) and content (F) from hippocampus, prefrontal cortex and striatum adult male rats. The absolute control values of 5-HT, 5-HIAA, NE, MHPG, DA, DOPAC, HVA, MAOA, MAOB and COMT content and BDH, TH and TRH activity are those presented in Figs. 1, 2, 4–6 and Supplementary Figs. 1–3. Data are presented as a percentage relative to control group and were significantly different from the respective control group at $p < 0.001$. ***Significant difference ($p < 0.001$) compared to each amitraz dose.

studied (Fig. 3E). TMX co-treatment with amitraz partially reversed the effect observed on TH and TRH activity after amitraz alone treatment (Fig. 4A and B, respectively).

3.5. Catechol-O-methyltransferase activity and protein content analysis

Amitraz and TMX alone treatment showed no effect on COMT activity in the brain regions at the doses studied (data not shown). However, amitraz induced a dose-dependent decrease in COMT content in prefrontal cortex and an increase in striatum, but did not produced effect on COMT content in hippocampus (Fig. 5A). TMX alone treatment induced a dose-dependent increase in COMT content in prefrontal cortex and a decrease in striatum, but did not produced effect on COMT content in hippocampus (Fig. 3F). TMX co-treatment with amitraz partially reversed the effect observed on COMT content after amitraz alone treatment (Fig. 5A).

3.6. Dopamine- β -hydroxylase activity analysis

After treatment with amitraz or TMX alone a dose-dependent increase and decrease in the activity of DBH in striatum, hippocampus and prefrontal cortex, from highest to lowest in this order was observed, respectively (Figs. 5B and 3E, respectively). TMX co-treatment with amitraz partially reversed the effect observed on DBH activity after amitraz alone treatment (Fig. 5B).

3.7. Real-time PCR analysis

Amitraz treatment at dose of 20, 50 and 80 mg/kg bw for 5 days induced an increase in the expression of ARO in prefrontal cortex, striatum, and hippocampus from highest to lowest in this order (Fig. 1D). Moreover, amitraz induced an increase in the expression of TH and TRH in prefrontal cortex, striatum, and hippocampus from highest to lowest in this order (Fig. 4C and D). In addition,

(DOPAC + HVA/DA) in prefrontal cortex (C) from adult male rats. The absolute control values of 5-HT and 5-HIAA content (ng/g) were 771.73 ± 12.89 and 530.29 ± 8.82 in FC, respectively. The absolute control values of NE and MHPG content (ng/g) were 194.19 ± 4.23 and 176.66 ± 3.65 in ST, respectively. The absolute control values of DA, DOPAC and HVA content were 152.31 ± 3.19 , 27.41 ± 0.57 and 44.98 ± 0.94 in FC, respectively. Data are presented as a percentage relative to control group and were significantly different from the respective control group at $p < 0.001$. Different letters indicates significant difference among different doses for each neurotransmitter, metabolite and turnover rates (Duncan's test). ***Significant difference ($p < 0.001$) compared to each amitraz dose.

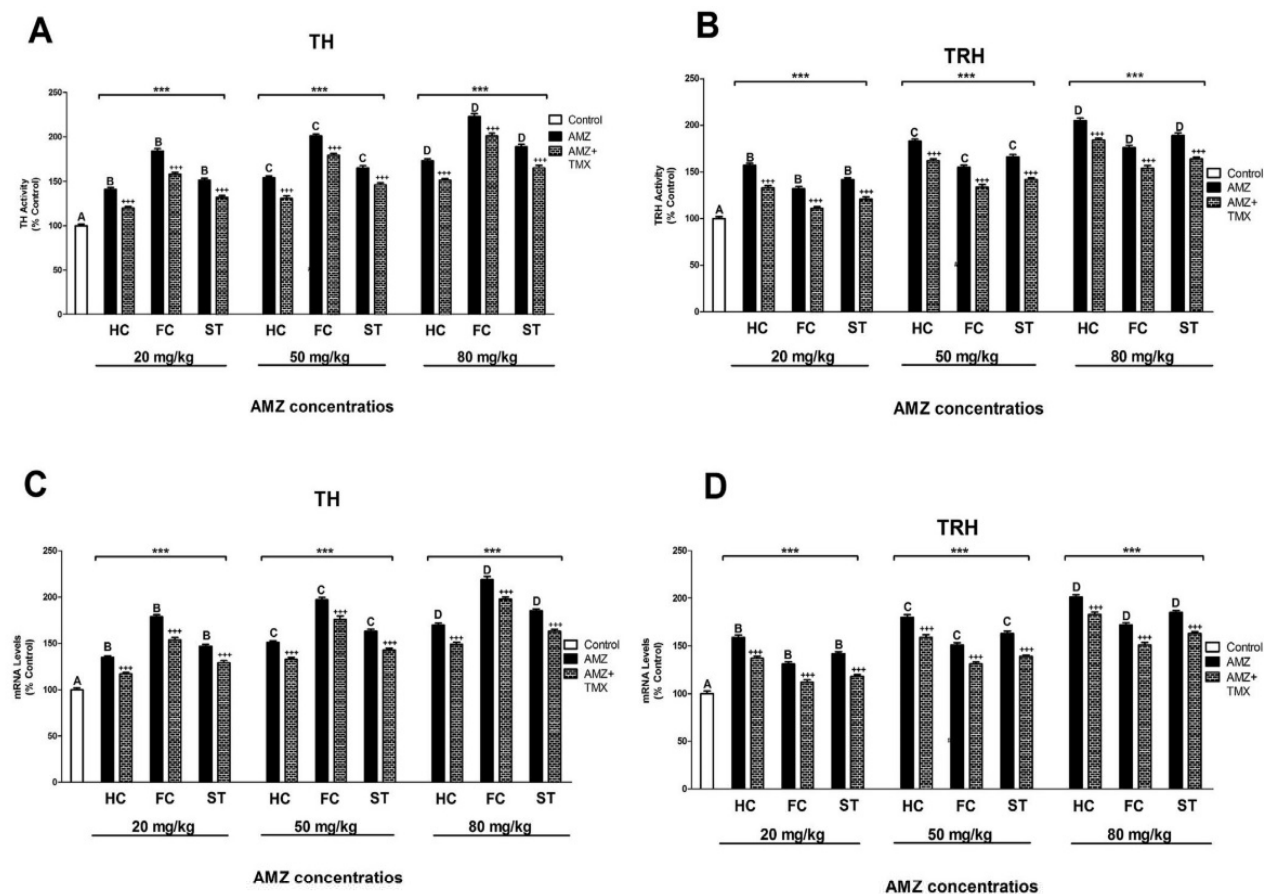


Fig. 4. Effect of amitraz (AMZ, 20, 50 and 80 mg/kg bw orally, for 5 days) with or without tamoxifen (TMX, 1 mg/kg bw subcutaneously) on TH (A) and TRH (B) activity (ng/mg/30 min), and TH (C) and TRH (D) gene expression by semi quantitative real-time PCR analysis in hippocampus (HC), prefrontal cortex (FC) and striatum (ST) from adult male rats. The absolute control values of TH and TRH activity were 165.12 ± 3.45 and 311.23 ± 6.19 in HC, 272.31 ± 5.89 and 241.28 ± 4.78 in FC and 2823.52 ± 59.28 and 381.34 ± 7.56 in ST, respectively. Data are presented as a percentage relative to control group and were significantly different from the respective control group at $p < 0.001$. Different letters indicates significant difference among different doses for each structure (Duncan's test). ***Significant difference between brain regions for each amitraz dose ($p < 0.001$); +++ $p < 0.001$, significantly different compared to each amitraz dose.

amitraz treatment did not produced effect on COMT expression in hippocampus, but induced a decrease in its expression in prefrontal cortex and an increase in its expression in striatum (Fig. 5C). Also, amitraz increased DBH expression in striatum, hippocampus and prefrontal cortex, from highest to lowest in this order (Fig. 5D). Finally, amitraz decreased MAO A and MAO B expression in prefrontal cortex, striatum, and hippocampus from highest to lowest in this order (Fig. 6A and B). TMX alone treatment induced an opposite effect on the expression of these enzymes than that observed after amitraz alone treatment (Fig. 3D) and its co-treatment with amitraz partially reversed the effects induced after amitraz alone treatment (Figs. 1D, 4C, D, 5C, D, 6A and B).

3.8. Monoamine oxidase activity and content measurement

MAO activity measurements in prefrontal cortex, striatum and hippocampus after 5 days vehicle or amitraz at the dose of 20, 50 and 80 mg/kg bw and TMX treatment showed no effect in the brain regions studied (Data not shown). In addition, amitraz and TMX induced a decrease and an increase in MAO A and MAO B content in prefrontal cortex, striatum, and hippocampus from highest to lowest in this order, respectively (Fig. 6C and D and Fig. 3F, respectively). TMX co-treatment with amitraz partially reversed the effect observed on MAO A and B content after amitraz alone treatment (Fig. 6C and D).

4. Discussion

In the present work, we showed that amitraz increases serum T levels in a dose-dependent way as reported previously in male rats (Chou et al., 2008). We also found that amitraz increases E₂ serum levels and ARO enzyme expression and activity in prefrontal cortex, striatum and hippocampus ranging from highest to lowest in this order. It seems likely that the increase in serum T levels increases brain levels of T and amitraz-induced upregulation of ARO that would be expected to convert T to E₂. Moreover, endogenous synthesis of E₂ in the brain, independent of gonadal synthesis, has been reported to take place (Ikeda et al., 2015). Therefore, we cannot rule out that there might be an endogenous synthesis of neural E₂ induced by amitraz, independently from circulating T levels that could control or contribute to the observed effects.

At the doses we used, amitraz did not alter the activity of MAO, indicating that MOA dysregulation does not explain the observed effects on monoamine neurotransmitters at doses lower than 100 mg/kg bw as suggested previously by Moser and MacPhail (1989). However, at doses lower than 100 mg/kg bw, amitraz downregulated, in a dose-dependent way, MAO expression and content following an order from highest to lowest decrease in prefrontal cortex, striatum and hippocampus. Thus, inhibition of MAO synthesis may explain, in part, the effects observed on

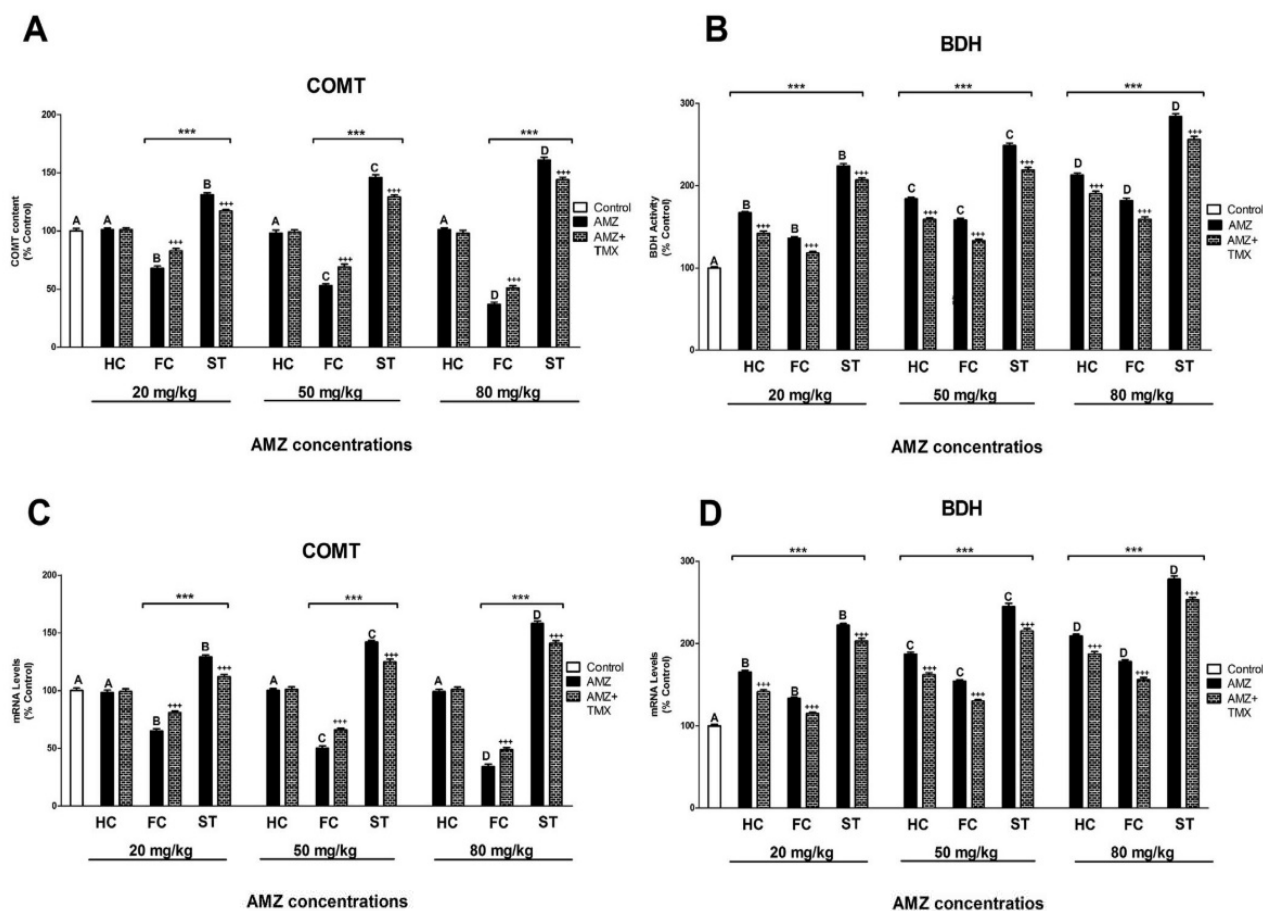


Fig. 5. Effect of amitraz (AMZ, 20, 50 and 80 mg/kg bw orally, for 5 days) with or without tamoxifen (TMX, 1 mg/kg bw subcutaneously) on COMT content (ng/mg) (A) and DBH activity (nmol/min/g) (B) and COMT (C) and DBH (D) gene expression by semi quantitative real-time PCR analysis in hippocampus (HC), prefrontal cortex (FC) and striatum (ST) from adult male rats. The absolute control values of COMT content and DBH activity were 5.32 ± 0.13 and 4.41 ± 0.64 in HC, 8.16 ± 0.17 and 8.65 ± 0.13 in FC and 6.38 ± 0.14 and 9.12 ± 0.14 in ST, respectively. Data are presented as a percentage relative to control group and were significantly different from the respective control group at $p < 0.001$. Different letters indicates significant difference among different doses for each structure (Duncan's test). ***Significant difference between brain regions for each amitraz dose ($p < 0.001$); ++ $p < 0.001$, significantly different compared to each amitraz dose.

monoaminergic neurotransmitters at doses lower than 100 mg/kg bw.

Our finding that amitraz altered, in a dose- and region-dependent way, the activity and expression of TH, TRH and DBH and of COMT expression and content, could also explain, in part, the effects observed effects on monoaminergic neurotransmitters in the brain regions studied. In this regard, the induction of TH and TRH in prefrontal cortex, striatum and hippocampus is correlated with the increase in the content of 5-HT and DA. In fact, the regions with the highest levels of TH and TRH also had the greatest increase in 5-HT and DA. However, the increase of TH activity and expression was not correlated with the increase of NE in striatum, hippocampus and prefrontal cortex; instead they were correlated with the increases in the activity and expression of DBH, the enzyme that synthesizes NE from DA. Thus, the effect of amitraz on NE synthesis is likely mediated by DBH, not TH and could explain the differences observed between DA and NE neurotransmitters in these regions. Similarly, the decrease of MAO content in these regions was correlated with the decrease in the metabolites of 5-HT, DA and NE and changes in COMT content in striatum and prefrontal cortex could explain the observed effects on DOPAC and HVA content in these regions. The alteration in all the studied enzymes and neurotransmitters was partially reversed in all cases by co-treatment with amoxifen, an estrogen receptor antagonist. This suggests

that amitraz alters a number of neurotransmitter systems, at least in part, by disrupting E_2 regulation of the enzymes that synthesize and metabolize these neurotransmitters.

Sex hormones alter monoaminergic and indolaminergic neurotransmitter systems in the CNS through effects on synthesis, vesicular and/or synaptic release and metabolism regulation (Meyers et al., 2010). Particularly, activity and expression of enzymes that synthesize and metabolize DA, NE and 5-HT are altered by E_2 (Babu and Vijayan, 1984; Chaube and Joy, 2011; Donner and Handa, 2009; Luine and Rhodes, 1983; Luine et al., 1973; Rahman and Thomas, 2013; Scardapane and Cardinali, 1977; Schendzielorz et al., 2011; Serova et al., 2002). In addition, E_2 increases mRNA levels and activity of TH and TRH, the major rate limiting enzymes in catecholamines and indoleamines biosynthesis, respectively (Babu and Vijayan, 1984; Chaube and Joy, 2011; Rahman and Thomas, 2013; Serova et al., 2002; Donner and Handa, 2009; Aggarwal et al., 2012; Hiroi et al., 2006). Alternatively, it decreases MAO mRNA levels (Aggarwal et al., 2012). Interestingly, although COMT activity is considerably resistant to TMX and E_2 effects, E_2 decreases COMT protein levels in prefrontal cortex and TMX increases them (Schendzielorz et al., 2011). These previous data are consistent with the amitraz effects we observed on these enzymes and the monoaminergic neurotransmitters. However, we cannot rule out the possibility that amitraz acts by altering

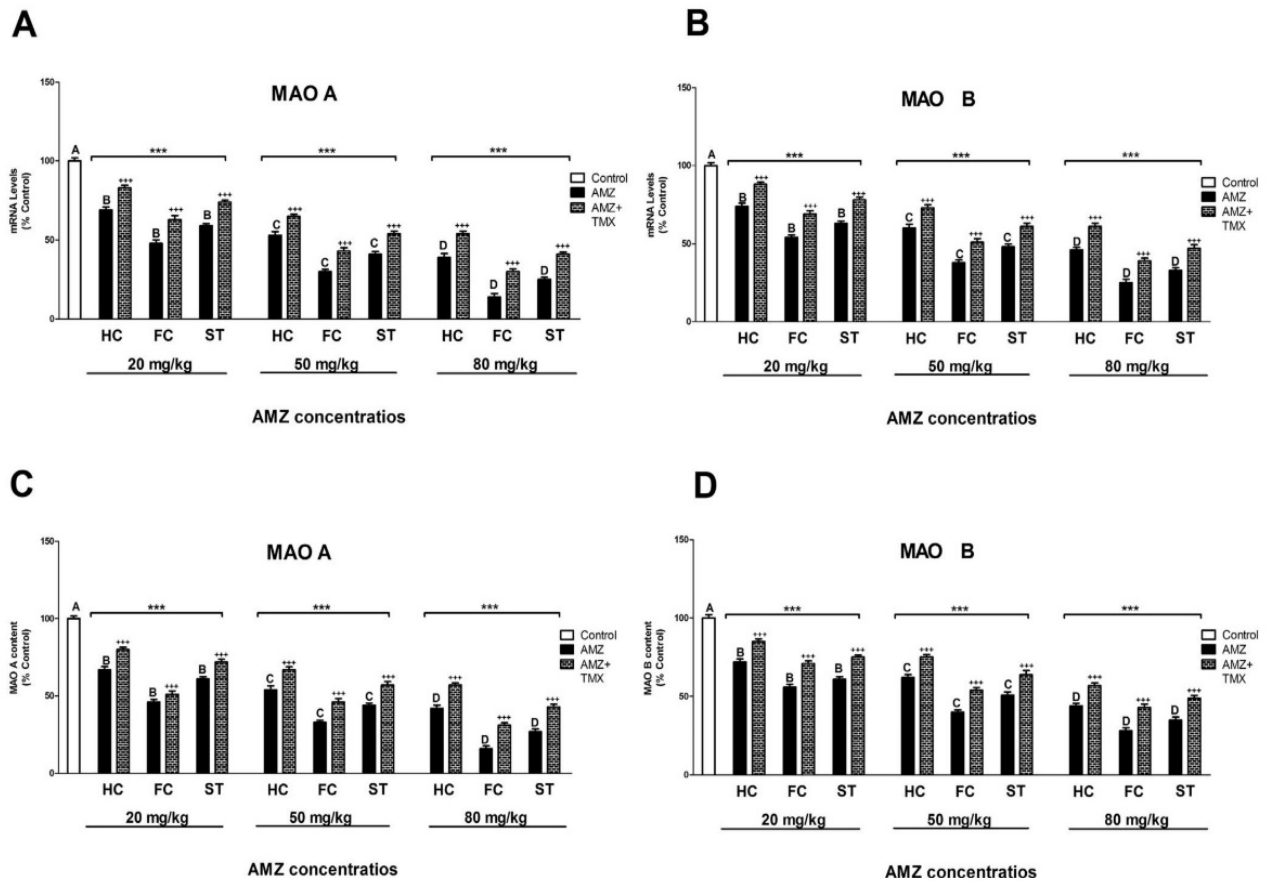


Fig. 6. Effect of amitraz (AMZ, 20, 50 and 80 mg/kg bw orally, for 5 days) with or without tamoxifen (TMX, 1 mg/kg bw subcutaneously) on MAOA (A) and MAOB (B) gene expression by semi quantitative real-time PCR analysis and MAOA (C) and MAOB (D) content (ng/mg) by ELISA analysis in hippocampus (HC), prefrontal cortex (FC) and striatum (ST) from adult male rats. The absolute control values of MAOA and MAOB content were 7.41 ± 0.12 and 5.32 ± 0.11 in HC, 9.34 ± 0.14 and 7.32 ± 0.15 in FC and 10.18 ± 0.15 and 8.49 ± 0.18 in ST, respectively. Data are presented as a percentage relative to control group and were significantly different from the respective control group at $p < 0.001$. Different letters indicates significant difference among different doses for each structure (Duncan's test). ***Significant difference between brain regions for each amitraz dose ($p < 0.001$); +++ $p < 0.001$, significantly different compared to each amitraz dose.

monoaminergic neurotransmitters transporters, which have been shown to be regulated by E_2 (Le Saux and Di Paolo, 2006; Meyers and Kritzer, 2009; Rivera et al., 2009; Yu et al., 2009).

The reversion induced by TMX co-treatment on amitraz effects in these enzymes was not complete, suggesting that, besides E_2 dysregulation, other mechanisms could be involved in these effects. Amitraz's α_2 -adrenergic receptor agonist action has been suggested to be one of the main mechanisms of its neurotoxic effects (Costa et al., 1989; Hsu and Lu, 1984; Hsu and Kakuk, 1984; Yilmaz and Yildizdas, 2003), possibly contributing to the observed effects. In this regard, TH activity and NE release have been described to be regulated by α_2 -adrenergic receptor (Fornai et al., 1995; Owesson et al., 2003). Moreover, it was reported that amitraz inhibits insulin release through α_2 -adrenergic receptors action (Chen and Hsu, 1994) leading to hyperglycemia and glycosuria, a persistent effect observed in most cases of amitraz poisoning (Proudfoot, 2003; Yilmaz and Yildizdas, 2003). Synthesis and re-uptake of NE, DA and 5-HT in the CNS have also been reported to be physiologically regulated by insulin (Figlewicz et al., 1996; Herrera et al., 2005). Besides, experimentally induced hyperglycemia has been reported to produce a significant increase in the catecholamine levels in different areas of the brain (Ramakrishnan et al., 2003). In addition, hypoinsulinemia and hyperglycemia have been shown to alter COMT, BDH and TH activities, which could explain the monoaminergic dysregulation observed (Gupta et al., 1992; Muñoz et al., 1984; Wang et al., 2002). Thus, amitraz's α_2 -adrenergic receptors

action could contribute either directly or indirectly, through insulin dysregulation, to the observed effects on monoaminergic neurotransmitters.

Amitraz alters other hormones such as prostaglandin E_2 (Yim et al., 1978). In this regard, the expression of TH has been shown to be regulated by prostaglandin E_2 *in vitro* (Kim et al., 1996). In addition, histamine H_1 receptor is inhibited by amitraz (Costa et al., 1988). In this respect, TH expression and catecholamines synthesis in the brain are modulated by histamine H_1 receptor (Moniri and Booth, 2006). Therefore, all the commented mechanisms could also contribute to the effects observed on monoaminergic neurotransmitters.

Affective, cognitive, motor and behavior functions are largely controlled by 5-HT, NE and DA systems. Thus, amitraz dysregulation of these neurotransmitters could lead to disorders of these functions (Aghajanian and Sanders-Bush, 2002; Antelman and Caggiola, 1977; Somerville et al., 2007; Scholes et al., 2007). Moreover, in addition to its well-documented role in the neural control of reproduction, E_2 modulates such neural functions such as affect, anxiety, mood, fear and cognitive function, as well as learning and memory (Jacome et al., 2010). Therefore, the behavioral effects of amitraz including hyperreactivity to external stimuli, aggressiveness, and motor incoordination (Florio et al., 1993) could be mediated by the alterations observed in the enzymes regulating catecholamines and indoleamines synthesis and metabolism. Otherwise, low levels of MAO expression in the brain result in a

higher predisposition to aggressiveness. In this regard, neurotoxic effect, including increased concentrations of brain NE and 5-HT levels and marked reactive aggressiveness toward intruders have been observed in MAO-A knockout (KO) mice (Godar et al., 2014; Bortolato et al., 2013). Therefore, the aggressiveness induced by amitraz could be related to its MAO gene expression downregulation.

To our knowledge, this is the first work showing that amitraz dysregulates NE, 5-HT and DA neurotransmitter systems by altering biosynthesis and metabolism of these neurotransmitters. Our results are also novel in that they show that amitraz effects on neurotransmitters in male rats can be partially blocked by antagonizing estrogen receptor activities. The amitraz-induced alterations in these neurotransmitter systems may differ between male and female rats due to the differences in sex hormones. However, as the neurotoxic effects described in adult animals after amitraz exposure were not differentiated by gender, these effects may be similar in both genders, but probably with different intensity. Future studies will further characterize mechanisms involved in amitraz alteration of these neurotransmitters systems, the neurotoxic effects mediated by these alterations and the possible sex differences in these neurotoxic effects. These results are of great interest because a better understanding of the underlying mechanisms may inform the development of therapeutic strategies to prevent or treat neurotoxicity induced by amitraz.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by research grants PR26/20326 from Santander Bank/UCM. The authors would like to thank Sandra L. Petersen, Professor of Neuroendocrinology from University of Massachusetts, for her revision of the present manuscript and Miguel Capo and Margarita Lobo, Professors of Toxicology from the Universidad Complutense de Madrid, for their counseling during the preparation of the present work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.113>.

References

- Aggarwal, M., Puri, V., Puri, S., 2012. Effects of estrogen on the serotonergic system and calcitonin gene-related peptide in trigeminal ganglia of rats. *Ann. Neurosci.* 19 (4), 151–157.
- Aghajanian, G.K., Sanders-Bush, E., 2002. Serotonin. In: Davis, K.L., Charney, D., Coyle, J.T., Nemeroff, C.B. (Eds.), *Neuropsychopharmacology: the Fifth Generation of Progress*. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia (PA), pp. 15–34.
- Antelman, S.M., Caggiula, A.R., 1977. Norepinephrine–dopamine interactions and behavior. *Science* 195, 646–653.
- Aziz, S.A., Knowles, C.O., 1973. Inhibition of monoamine oxidase by the pesticide chlordimeform and related compounds. *Nature* 242, 417–418.
- Babu, G.N., Vijayan, E., 1984. Hypothalamic tyrosine hydroxylase activity and plasma gonadotropin and prolactin levels in ovariectomized-steroid treated rats. *Brain Res. Bull.* 12 (5), 555–558.
- Bortolato, M., Godar, S.C., Tambaro, S., Li, F.G., Devoto, P., Coba, M.P., Chen, K., Shih, J.C., 2013. Early postnatal inhibition of serotonin synthesis results in long-term reductions of perseverative behaviors, but not aggression, in MAO A-deficient mice. *Neuropharmacology* 75, 223–232.
- Castelli, M.P., Casti, A., Casu, A., Frau, R., Bortolato, M., Spiga, S., Ennas, M.G., 2013. Regional distribution of 5 α -reductase type 2 in the adult rat brain: an immunohistochemical analysis. *Psychoneuroendocrinology* 38 (2), 281–293.
- Chapin, D.S., Lookingland, K.J., Moore, K.E., 1986. Effects of LC mobile phase composition on retention times for biogenic amines, and their precursors and metabolites. *Curr. Sep.* 7, 68–70.
- Chaube, R., Joy, K.P., 2011. Estradiol-17 β modulates dose-dependently hypothalamic tyrosine hydroxylase activity inhibited by α -methylparatyrosine in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Endocrine* 40 (3), 394–399.
- Chen, T.H., Hsu, W.H., 1994. Inhibition of insulin release by a formamidine pesticide amitraz and its metabolites in a rat beta-cell line: an action mediated by alpha-2 adrenoceptors, a GTP-binding protein and a decrease in cyclic AMP. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 1240–1245.
- Chou, C.P., Lu, S.Y., Ueng, T.H., 2008. Modulation of serum concentrations and hepatic metabolism of 17 β -estradiol and testosterone by amitraz in rats. *Arch. Toxicol.* 82 (10), 729–737.
- Costa, L.G., Olibet, G., Wu, D., Murphy, S.D., 1988. 2-Adrenoceptor as a target for formamidine pesticides: in vitro and in vivo studies in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 93, 319–328.
- Costa, L.G., Olibet, G., Wu, D.S., Murphy, S.D., 1989. Acute and chronic effects of the pesticide amitraz on alpha 2-adrenoceptors in mouse brain. *Toxicol. Lett.* 47, 135–143.
- De Souza Silva, M.A., Mattern, C., Topic, B., Buddenberg, T.E., Huston, J.P., 2009. Dopaminergic and serotonergic activity in neostriatum and nucleus accumbens enhanced by intranasal administration of testosterone. *Eur. Neuro-psychopharmacol.* 19 (1), 53–63.
- Del Pino, J., Martínez, M.A., Castellano, V., Ramos, E., Martínez-Larrañaga, M.R., Anadón, A., 2013. Effects of exposure to amitraz on noradrenaline, serotonin and dopamine levels in brain regions of 30 and 60 days old male rats. *Toxicology* 308, 88–95.
- Del Pino, J., Moyano-Cires, P.V., Anadón, M.J., Díaz, M.J., Lobo, M., Capo, M.A., Frejo, M.T., 2015. Molecular mechanisms of amitraz mammalian toxicity: a comprehensive review of existing data. *Chem. Res. Toxicol.* 28 (6), 1073–1094.
- Demirel, Y., Yilmaz, A., Gursoy, S., Kaygusuz, K., Mimaroglu, C., 2006. Acute amitraz intoxication: retrospective analysis of 45 cases. *Hum. Exp. Toxicol.* 25 (10), 613–617.
- Directive 2003/65/EC of the European Parliament and of the Council of 22 July 2003 amending Council Directive 86/609/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Off. J. Eur. Union L* 230/32, 16.9.2003.
- Donner, N., Handa, R.J., 2009. Estrogen receptor-beta regulates the expression of tryptophan hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei. *Neuroscience* 163, 705–718.
- Figlewicz, D.P., Brot, M.D., McCall, A.L., Szot, P., 1996. Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain Res.* 736 (1–2), 54–60.
- Florio, J.C., Sakate, M., Palemo-Neto, J., 1993. Effects of amitraz on motor function. *Pharmacol. Toxicol.* 73, 109–114.
- Fornai, F., Alessandri, M.G., Fascetti, F., Vaglini, F., Corsini, G.U., 1995. Clonidine suppresses 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced reductions of striatal dopamine and tyrosine hydroxylase activity in mice. *J. Neurochem.* 65 (2), 704–709.
- Godar, S., Bortolato, C.M., Castelli, M.P., Casti, A., Casu, A., Chen, K., Ennas, M.G., Tambaro, S., Shih, J.C., 2014. The aggression and behavioral abnormalities associated with monoamine oxidase A deficiency are rescued by acute inhibition of serotonin reuptake. *J. Psychiatr. Res.* 56, 1–9.
- 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. *J. Neurochem.* 13, 655–669.
- Grote, K., Andrade, A.J., Wichert Grande, S., Kuriyama, S.N., Talsness, C.E., Appel, K.E., Chahoud, I., 2006. Effects of peripubertal exposure to triphenyltin on female sexual development of the rat. *Toxicology* 22 (1–2), 17–24.
- Gupta, G., Azam, M., Baquer, N.Z., 1992. Effect of experimental diabetes on the catecholamine metabolism in rat brain. *J. Neurochem.* 58 (1), 95–100.
- Handa, R.J., Hejna, G.M., Lorens, S.A., 1997. Androgen inhibits neurotransmitter turnover in the medial prefrontal cortex of the rat following exposure to a novel environment. *Brain Res.* 751 (1), 131–138.
- Herrera, R., Manjarrez, G., Hernandez, J., 2005. Inhibition and kinetic changes of brain tryptophan-5-hydroxylase during insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Nutr. Neurosci.* 8 (1), 57–62.
- Hiroi, R., McDevitt, R.A., Neumaier, J.F., 2006. Estrogen selectively increases tryptophan hydroxylase-2 mRNA expression in distinct subregions of rat midbrain raphe nucleus: association between gene expression and anxiety behavior in the open field. *Biol. Psychiatry* 60 (3), 288–295.
- Hobler, C., Andrade, A.J., Grande, S.W., Gericke, C., Talsness, C.E., Appel, K.E., Chahoud, I., Grote, K., 2010. Sex-dependent aromatase activity in rat offspring after pre- and postnatal exposure to triphenyltin chloride. *Toxicology* 276 (3), 198–205.
- Hsu, W.H., Kakuk, T.J., 1984. Effect of amitraz and chlordimeform on heart rate and pupil diameter in rats: mediated by alpha 2-adrenoreceptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73, 411–415.
- Hsu, W.H., Lu, Z.X., 1984. Amitraz-induced delay of gastrointestinal transit in mice: mediated by α 2-adrenergic receptors. *Drug Dev. Res.* 4, 655–660.
- Ikeda, T., Makino, Y., Yamada, M.K., 2015. 17 α -estradiol is generated locally in the male rat brain and can regulate GAD65 expression and anxiety. *Neuropharmacology* 90, 9–14.
- Jacome, L.F., Gautreaux, C., Inagaki, T., Mohan, G., Alves, S., Lubbers, L.S., Luine, V., 2010. Estradiol and ER β agonists enhance recognition memory, and DPN, an ER β agonist, alters brain monoamines. *Neurobiol. Learn. Mem.* 94 (4), 488–498.
- Johnston, C.A., Moore, K.E., 1983. Measurement of 5-hydroxytryptamine synthesis

- and metabolism in selected discrete regions of the rat brain using high performance liquid chromatography and electrochemical detection: pharmacological manipulations. *J. Neural Transm.* 57, 49–63.
- Kato, T., Kuzuya, H., Nagatsu, T., 1974. A simple and sensitive assay for dopamine- β -hydroxylase activity by dual-wavelength spectrophotometry. *Biochem. Med.* 10, 320–328.
- Kim, J.S., Chae, H.D., Choi, S.Y., Kim, K.T., 1996. Transcriptional enhancement of tyrosine hydroxylase by prostaglandin E2 in SK-N-BE(2) C cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 39 (1–2), 177–184.
- Le Saux, M., Di Paolo, T., 2006. Influence of oestrogenic compounds on monoamine transporters in rat striatum. *J. Neuroendocrinol.* 18 (1), 25–32.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Lubbers, L.S., Zafian, P.T., Gautreaux, C., Gordon, M., Alves, S.E., Correa, L., Lorrain, D.S., Hickey, G.J., Luine, V., 2010. Estrogen receptor (ER) subtype agonists alter monoamine levels in the female rat brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 122 (5), 310–317.
- Luine, V.N., Khylichevskaya, R.I., McEwen, B.S., 1973. Effect of gonadal steroids on activities of monoamine oxidase and choline acetylase in rat brain. *Brain Res.* 86, 293–306.
- Luine, V.N., Rhodes, J.C., 1983. Gonadal hormone regulation of MAO and other enzymes in hypothalamic areas. *Neuroendocrinology* 36, 235–241.
- Meyers, B., D'Agostino, A., Walker, J., Kritzer, M.F., 2010. Gonadectomy and hormone replacement exert region- and enzyme isoform-specific effects on monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase activity in prefrontal cortex and neostriatum of adult male rats. *Neuroscience* 165 (3), 850–862.
- Meyers, B., Kritzer, M.F., 2009. In vitro binding assays using (3)H nisoxetine and (3)H WIN 35,428 reveal selective effects of gonadectomy and hormone replacement in adult male rats on norepinephrine but not dopamine transporter sites in the cerebral cortex. *Neuroscience* 159 (1), 271–282.
- Moniri, N.H., Booth, R.G., 2006. Role of PKA and PKC in histamine H1 receptor-mediated activation of catecholamine neurotransmitter synthesis. *Neurosci. Lett.* 407 (3), 249–253.
- Moser, V.C., Boyes, W.K., MacPhail, R.C., 1987. Investigations of amitraz neurotoxicity in rats. I. Effects on operant performance. *Fundam. Appl. Toxicol.* 9, 131–143.
- Moser, V.C., MacPhail, R., 1989. Investigations of amitraz neurotoxicity in rats. III. Effects on motor activity and inhibition of monoamine oxidase. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12 (1), 12–22.
- Muñoz, A., Serrano, C., García-Estaño, J., Quesada, T., Miras-Portugal, M.T., 1984. Effect of diabetic hyperglycemia and other sugars on plasma dopamine- β -hydroxylase activity. *Diabetes* 33 (12), 1127–1132.
- Nathanson, J.A., 1985. Characterization of octopamine-sensitive adenylate cyclase: elucidation of a class of potent and selective octopamine-2 receptor agonists with toxic effects in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 599–603.
- Nayebi, A.M., Pourrabi, S., Hossini, S., 2014. Testosterone ameliorates streptozotocin-induced memory impairment in male rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 35 (6), 752–757.
- Nissbrandt, H., Engberg, G., Wikstrom, H., Magnusson, T., Carlsson, A., 1988. NSD 1034: an amino acid decarboxylase inhibitor with a stimulatory action on dopamine synthesis not mediated by classical dopamine receptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 338, 148–161.
- Nissinen, E., Männistö, P.T., 1984. Determination of catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Biochem.* 137, 69–73.
- Okamoto, M., Hojo, Y., Inoue, K., Matsui, T., Kawato, S., McEwen, B.S., Soya, H., 2012. Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (32), 13100–13105.
- Owesson, C.A., Seif, I., McLaughlin, D.P., Stamford, J.A., 2003. Different alpha(2) adrenoceptor subtypes control noradrenaline release and cell firing in the locus coeruleus of wildtype and monoamine oxidase-A knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 18 (1), 34–42.
- Proudfoot, A.T., 2003. Poisoning with amitraz. *Toxicol. Rev.* 22 (2), 71–74.
- Purves-Tyson, T.D., Handelsman, D.J., Double, K.L., Owens, S.J., Bustamante, S., Weickert, C.S., 2012. Testosterone regulation of sex steroid-related mRNAs and dopamine-related mRNAs in adolescent male rat substantia nigra. *BMC Neurosci.* 13, 95.
- Rahman, M.S., Thomas, P., 2013. Interactive effects of hypoxia with estradiol-17 β on tryptophan hydroxylase activity and serotonin levels in the Atlantic croaker hypothalamus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 71–76.
- Ramakrishnan, R., Nazer, M.Y., Suthanthirarajan, N., Namasivayam, A., 2003. An experimental analysis of the catecholamines in hyperglycemia and acidosis-induced rat brain. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 16 (3), 233–239.
- Reenilä, I., Tuomainen, P., Männistö, P.T., 1995. Improved assay of reaction products to quantitate catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 663, 137–142.
- Rivera, H.M., Oberbeck, D.R., Kwon, B., Houpt, T.A., Eckel, L.A., 2009. Estradiol increases Pet-1 and serotonin transporter mRNA in the midbrain raphe nuclei of ovariectomized rats. *Brain Res.* 1259, 51–58.
- Scardapane, L., Cardinali, D.P., 1977. Effect of estradiol and testosterone on catecholmethyl transferase activity of rat superior cervical ganglion, pineal gland, anterior hypophysis and hypothalamus. *J. Neurotrans.* 40, 81–86.
- Schendzielorz, N., Rysa, A., Reenilä, I., Raasmaja, A., Männistö, P.T., 2011. Complex estrogenic regulation of catechol-O-methyltransferase (COMT) in rats. *J. Physiolarmacol.* 62 (4), 483–490.
- 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.
- Serova, L., Rivkin, M., Nakashima, A., Sabban, E.L., 2002. Estradiol stimulates gene expression of norepinephrine biosynthetic enzymes in rat locus coeruleus. *Neuroendocrinology* 75, 193–200.
- 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. *Eur. J. Neurosci.* 25 (10), 3115–3124.
- Thiblin, I., Finn, A., Ross, S.B., Stenfors, C., 1999. Increased dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic activities in male rat brain following long-term treatment with anabolic androgenic steroids. *Br. J. Pharmacol.* 126 (6), 1301–1306.
- Veale, D.J., Wium, C.A., Muller, G.J., 2011. Amitraz poisoning in South Africa: a two-year survey (2008–2009). *Clin. Toxicol. (Phila)* 49 (1), 40–44.
- Wang, J.P., Liu, I.M., Tzeng, T.F., Cheng, J.T., 2002. Decrease in catechol-O-methyltransferase activity in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29 (5–6), 419–422.
- Yilmaz, H.L., Yildizdas, D.R., 2003. Amitraz poisoning, an emerging problem: epidemiology, clinical features, management, and preventive strategies. *Arch. Dis. Child.* 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 Sci.* 23, 2509–2516.
- Yu, P.L., Wu, C.I., Lee, T.S., Pan, W.H., Wang, P.S., Wang, S.W., 2009. Attenuation of estradiol on the reduction of striatal dopamine by amphetamine in ovariectomized rats. *J. Cell. Biochem.* 108 (6), 1318–1324.
- Zhao, C., Fujinaga, R., Tanaka, M., Yanai, A., Nakahama, K., Shinoda, K., 2007. Region specific expression and sex-steroidal regulation on aromatase and its mRNA in the male rat brain: immunohistochemical and in situ hybridization analyses. *J. Comp. Neurol.* 500, 557–573.
- Zhao, C., Fujinaga, R., Yanai, A., Kokubu, K., Takeshita, Y., Watanabe, Y., Shinoda, K., 2008. Sex-steroidal regulation of aromatase mRNA expression in adult male rat brain: a quantitative non-radioactive in situ hybridization study. *Cell Tissue Res.* 332 (3), 381–391.