

Efectos de la exposición prenatal a paraquat sobre el desarrollo de la transmisión sináptica aminoacídica en la corteza cerebral parietal del ratón.

Pedro Benítez-Díaz^{1,2} y Leticia Miranda-Contreras¹.

¹Centro de Microscopía Electrónica, ²Grupo de Ciencias Atmosféricas y del Espacio, Comisión Rectoral del Programa de Ciencias Espaciales, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Palabras clave: Paraquat, plaguicidas, aminoácidos neurotransmisores, desarrollo de la corteza cerebral parietal, ratón.

Resumen. Se estudiaron los efectos de la exposición prenatal al paraquat (PQ), sobre el desarrollo postnatal de la transmisión sináptica aminoacídica de la corteza cerebral parietal del ratón. Las ratonas NMRI preñadas del grupo experimental recibieron 5 dosis de 10mg/kg de peso corporal de PQ, entre el día de gestación (G)12 y G20, y el grupo control recibió solución salina. Mediante HPLC, se determinaron los niveles de aspartato, glutamato, glicina, GABA y taurina de las crías, entre la edad postnatal (P)1 y P30. Entre P3 y P15, se observó un incremento significativo de los neurotransmisores excitatorios, aspartato y glutamato, en los ratones expuestos a PQ. Con respecto a la neurotransmisión inhibitoria, los cambios más importantes se observaron en glicina: sus niveles se mantuvieron significativamente por debajo del grupo control entre P1 y P7, y significativamente por encima en P11 y P15. Para taurina, entre P1 y P7 sus niveles se mantuvieron significativamente altos con respecto al grupo control. En P30, los niveles de todos los neurotransmisores se encontraron significativamente por debajo del grupo control. En conclusión, podríamos decir que la exposición prenatal a PQ tuvo efectos tóxicos que se reflejaron en una alteración de los niveles basales de los neurotransmisores aminoacídicos durante el desarrollo postnatal de la corteza parietal del ratón, predominando la excitación sobre la inhibición durante todo el período estudiado. Estas alteraciones podrían indicar la ocurrencia de importantes daños corticales, tales como la disminución de algunas poblaciones neuronales, la inadecuada formación de los circuitos corticales y alteraciones en el proceso de sinaptogénesis.

Effects of prenatal exposure to paraquat on the development of amino acid synaptic transmission in mouse cerebral parietal cortex.

Invest Clin 2009; 50(4): 465 - 478

Key words: Paraquat, pesticides, amino acid neurotransmitters, parietal cerebral cortex development, mouse.

Abstract. The effects of prenatal exposure to paraquat (PQ) were studied on postnatal development of mouse parietal cerebral cortex, in particular, the ontogenesis of amino acid synaptic transmission. Pregnant NMRI mice were separated into two groups: the experimental group received 5 doses of 10mg PQ/kg body weight, between days of gestation (G)12 and G20, whereas the control group received physiological saline solution. Levels of neurotransmitter amino acids: Asp, Glu, Gly, GABA and Tau were determined by HPLC between postnatal (P) days P1 and P30. Between P3 and P15, a significant increment in the levels of excitatory amino acids, Asp and Glu, were observed in mice exposed to PQ, as compared with the control group. With respect to the inhibitory neurotransmitter levels, in the group exposed to PQ, the more important changes were observed in Gly between P1 and P15. In relation to taurine, its levels remained significantly higher between P1 and P7 with respect to the control group. It is important to emphasize that at P30, the levels of all neurotransmitters in the experimental group were significantly lower than those of control. In conclusion, prenatal exposure to PQ caused neurotoxicity in the developing mouse parietal cortex, as shown by the alterations in the basal levels of amino acid neurotransmitters, with the excitatory predominating over inhibitory neurotransmission, throughout the studied developmental period. These alterations could indicate the occurrence of important cortical injuries, such as decrement in some neuronal populations, inadequate formation of intrinsic cortical circuits and alterations in synaptogenic processes.

Recibido: 27-02-2009. Aceptado: 23-04-2009.

INTRODUCCIÓN

Estudios recientes indican que las perturbaciones ocurridas durante el período prenatal del desarrollo cortical, podrían estar relacionadas con el padecimiento de algunos desordenes neurológicos que se expresan durante el desarrollo postnatal y la vida adulta de los organismos (1, 2). Hay muchos factores de riesgo que pueden influir de manera negativa en el desarrollo

cortical, uno de ellos es la exposición ambiental a sustancias químicas neurotóxicas como los plaguicidas, los cuales son ampliamente utilizados en las actividades agrícolas alrededor del mundo y la disposición de sus residuos se ha convertido en un serio problema ambiental para los países en desarrollo (3-6).

El paraquat (PQ), un herbicida de contacto del grupo de los bupiridilos, se utiliza en más de 120 países alrededor del mundo

y en más de 120 cultivos, dentro de los que se incluyen los principales cultivos alimentarios (7). Varios estudios, han considerado al PQ como un importante factor de riesgo ambiental para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (8-10), razón por la cual, las investigaciones sobre los efectos de la exposición a PQ durante el desarrollo se han enfocado principalmente en su toxicidad sobre las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra (11, 12). La neurotoxicidad de este plaguicida ha sido atribuida principalmente a su capacidad para producir estrés oxidativo (13,14), el PQ actúa por tanto, induciendo la formación de radicales libres que causan la peroxidación lipídica que a su vez ocasiona la muerte celular (15,16).

Algunos investigadores han reportado que el PQ es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica e inducir muerte neuronal en otras regiones del cerebro diferentes a la substantia nigra (17, 18). Por ejemplo, se ha determinado que entre 1 y 24 horas después de una inyección subcutánea de 5mg/kg de PQ, el herbicida se encuentra presente en la corteza cerebral frontal de la rata, incrementándose en una forma dosis-dependiente (17, 19, 20). Adicionalmente, se han realizado estudios *in vitro* sobre el efecto del PQ en las neuronas corticales, obteniéndose evidencias de que el PQ induce la apoptosis y afecta en mayor medida a las células neuronales que a los astrocitos (21-23). Más aún, hay evidencias que indica que el PQ podría generar una liberación anormal del neurotransmisor excitador Glu, induciendo también muerte neuronal por excitotoxicidad (17,21). Toda la evidencia descrita, nos indica que adicionalmente a la degeneración de las neuronas del sistema nigroestriado, en un organismo expuesto a los efectos tóxicos del PQ también podrían verse afectadas otras áreas del cerebro (23).

En el presente trabajo, se estudiaron los efectos inducidos por la exposición pre-

natal a PQ sobre la ontogénesis de la transmisión sináptica aminoacídica en la corteza cerebral parietal del ratón, con la finalidad de incrementar nuestro conocimiento sobre la afectación de áreas cerebrales diferentes a la substantia nigra por la intoxicación con este herbicida. Adicionalmente, la región cortical bajo estudio es importante debido a que consiste en un mosaico de áreas, que en el humano median algunas funciones relacionadas con la cognición como la atención, representación espacial, memoria de trabajo, movimiento ocular y la guía de acciones (24, 25).

Los aminoácidos neurotransmisores aspartato (Asp), glutamato (Glu), ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina (Gly) y taurina (Tau), y sus correspondientes receptores ionotrópicos, juegan un rol esencial en el desarrollo del SNC (26). Como se ha demostrado en trabajos previos (27-32), las variaciones en los niveles de los neurotransmisores aminoacídicos son excelentes marcadores del desarrollo y maduración del SNC. Más recientemente, se ha utilizado esta metodología para estudiar los efectos de la exposición prenatal a PQ y al fungicida mancozeb, sobre el desarrollo de la corteza cerebelosa del ratón (33). Nuestros hallazgos, indican que los circuitos básicos del cerebelo fueron severamente afectados por los efectos tóxicos de ambos agroquímicos.

El objetivo específico del presente trabajo, fue determinar las alteraciones en los niveles de neurotransmisores aminoacídicos durante el desarrollo de la corteza cerebral parietal del ratón, entre P1 y P30, en animales expuestos a bajas dosis de PQ, entre los días G12 y G20. En estudios previos, se ha identificado el período que abarca las dos primeras semanas de desarrollo postnatal como un período crítico para el desarrollo y la sinaptogénesis en la corteza cerebral parietal del ratón, a partir de P15 esta zona de la corteza cerebral tiene práctica-

mente las mismas características que en el animal adulto (31, 32). Por esta razón se estudia con mayor énfasis el período que va desde P1 hasta P15, la determinación de los niveles de aminoácidos neurotransmisores en P30 nos permitirá evaluar las condiciones en el animal adulto joven. Nuestros hallazgos, sugieren que adicionalmente al daño producido en la sustancia nigra y el cerebelo, la exposición prenatal a PQ también podría alterar el proceso de sinaptogénesis y la formación de los circuitos locales en la corteza cerebral parietal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y reactivos

Las ratonas NMRI preñadas, de 10 días de gestación, se obtuvieron del bioterio de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, y fueron ambientadas en el bioterio de nuestro laboratorio dos días antes de comenzar la fase experimental. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, y provistos de agua y comida *ad libitum*.

El PQ fue adquirido de Sigma. Los solventes para cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), fueron obtenidos de J.T. Baker. Todos los otros reactivos químicos utilizados fueron grado analítico y se compraron a Sigma o Merck.

Administración del tratamiento y obtención de las muestras

En este estudio se utilizaron 40 ratonas preñadas, las cuales fueron aleatoriamente asignadas a dos grupos de tratamiento ($n=20$ por grupo), el grupo control y el grupo experimental. Al grupo experimental se le administró una dosis de PQ correspondiente a 10 mg/kg de peso corporal, disuelto en solución salina fisiológica, cada 48 horas, entre G12 y G20, acumulando un total de 5 dosis durante el período prenatal.

Durante el mismo período de tiempo y con la misma frecuencia que al grupo experimental, al grupo control se le administró solución salina fisiológica. La dosis de PQ se escogió basándonos en estudios previos realizados en nuestro laboratorio y en las dosis empleadas por otros investigadores en trabajos similares (13, 33, 34), con la finalidad de lograr condiciones similares a una exposición sub-crónica. Tanto la solución salina como la dosis de PQ se suministraron a través de inyecciones intraperitoneales, utilizando una aguja de 26 GA, en un volumen aproximado de $0,3 \text{ mL}$. Una vez completado el período de gestación, fue suspendido el tratamiento y las crías fueron mantenidas en el bioterio bajo las mismas condiciones (temperatura $24 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, agua y comida *ad libitum*), para posteriormente ser sacrificadas por decapitación a P1, P3, P7, P11, P15 y P30. Para obtener las muestras de corteza cerebral parietal, el cerebro fue extraído inmediatamente después del sacrificio y mantenido en tampón fosfato $0,1\text{M}$, pH 7,5 y 4°C , mientras se realizaba la disección. Las muestras fueron colectadas en tubos Eppendorf y almacenadas a -70°C hasta su utilización para el análisis de neurotransmisores. Dependiendo de la edad, se utilizaron de 10 a 20 crías por cada muestreo.

Análisis de los aminoácidos neurotransmisores por HPLC

Se analizaron simultáneamente los neurotransmisores aminoacídicos Glu, Asp, Gly, GABA y Tau, utilizando derivatización con cloruro de dansilo y HPLC (35). A continuación, se describe brevemente el procedimiento: las muestras, obtenidas según lo descrito en la sección anterior, fueron homogeneizadas en $100 \mu\text{L}$ de ácido perclórico $0,05\text{N}$. Después de tomar las alícuotas para la determinación de proteínas, el homogeneizado fue centrifugado durante 15 min a 10.000 g (4°C). Posteriormente, alí-

cuotas del sobrenadante fueron derivatizadas con cloruro de dansilo y filtradas a través de una membrana Millipore de $0,45\ \mu\text{m}$, para posteriormente ser inyectadas en el HPLC. Para el análisis, se utilizó una columna de fase reversa, Waters Spherisorb ODS2 ($4,6 \times 150\ \text{mm}$, $3\ \mu\text{m}$ de tamaño de partícula) mantenida a 33°C . La separación de los analitos se llevó a cabo en un gradiente donde la fase móvil A estaba constituida por una solución de 5% de acetonitrilo en un tampón fosfato 30 mM, pH 6,5; y la fase móvil B, 60% de acetonitrilo en un tampón fosfato 30 mM, pH 6,5. Los aminoácidos dansilados fueron eluidos a una velocidad de flujo de $0,6\ \text{mL/min}$ y detectados por su absorbancia a 215 nm. Los niveles de neurotransmisores aminoacídicos fueron calculados por el método del estándar externo y expresados en $\mu\text{mol}/100\text{mg}$ de proteínas. La determinación de proteínas se llevó a cabo empleando una modificación del método de Lowry (36) y utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron expresados como la media $\pm$ DE (desviación estándar). La significación estadística entre los valores del control y el experimental fueron calculados por método ANOVA unifactorial ($p < 0,05$) utilizando el programa GraphPad InStat 3.

RESULTADOS

En la Fig. 1 se muestran las variaciones de los niveles de neurotransmisores aminoacídicos excitadores, Asp y Glu, durante el desarrollo de la corteza cerebral parietal de ratones expuestos durante la gestación a bajas dosis de PQ. Prácticamente durante todo el período estudiado, las crías expuestas mostraron cambios significativos en el contenido de Asp con respecto al grupo control: en P3 hubo una reducción

de alrededor del 12% ($p < 0,002$) y un incremento del 40% ($p < 0,005$) en P7, 24% ($p < 0,005$) en P11 y 68% ($p < 0,0001$) en P15. En el adulto joven (P30), los niveles de Asp fueron 41% ($p < 0,0001$) más bajos que los del grupo control (Fig. 1a). Por otra parte, durante la primera semana de desarrollo postnatal, se observaron incrementos significativos en los niveles de Glu en las crías expuestas a PQ: alrededor de 27% ($p < 0,005$) en P3 y de 53% ($p < 0,0001$) en P7. Durante la segunda semana de desarrollo postnatal, no se observaron cambios en P11 pero en P15 se observó un incremento significativo, alrededor del 30% ($p < 0,0001$), en los niveles de Glu de las crías que fueron expuestas a PQ, al compararlas con el grupo control. A P30, los niveles de Glu del grupo expuesto a PQ cayeron 21% ($p < 0,005$) por debajo del grupo control (Fig. 1b).

El patrón de cambio de los neurotransmisores inhibitorios Gly y GABA, durante el desarrollo de la corteza cerebral parietal de ratones expuestos a PQ durante el período de gestación, se muestra en la Fig. 2. Durante la primera semana de desarrollo, los niveles de Gly en el grupo experimental se mantuvieron significativamente por debajo de los del grupo control: en P1 50% ($p < 0,0001$), en P3 44% ($p < 0,0001$) y en P7 51% ($p < 0,0001$). A este cambio, siguió un incremento significativo durante la segunda semana postnatal: alrededor de 33% en P11 ($p < 0,005$) y 42% ($p < 0,005$) en P15. En P30, el contenido de Gly cayó drásticamente, cerca de un 68% ($p < 0,0001$) con respecto al control (Fig. 2a). En relación a los niveles de GABA (Fig. 2b), sólo se observaron cambios significativos con respecto al grupo control en P3, P11 y P30: en P3 disminuyó 16% ($p < 0,03$), en P11 se incrementó 24% ($p < 0,005$) y en P30 cayó 40% ($p < 0,0001$).

Con respecto a los cambios en el contenido de Tau (Fig. 3), durante la primera

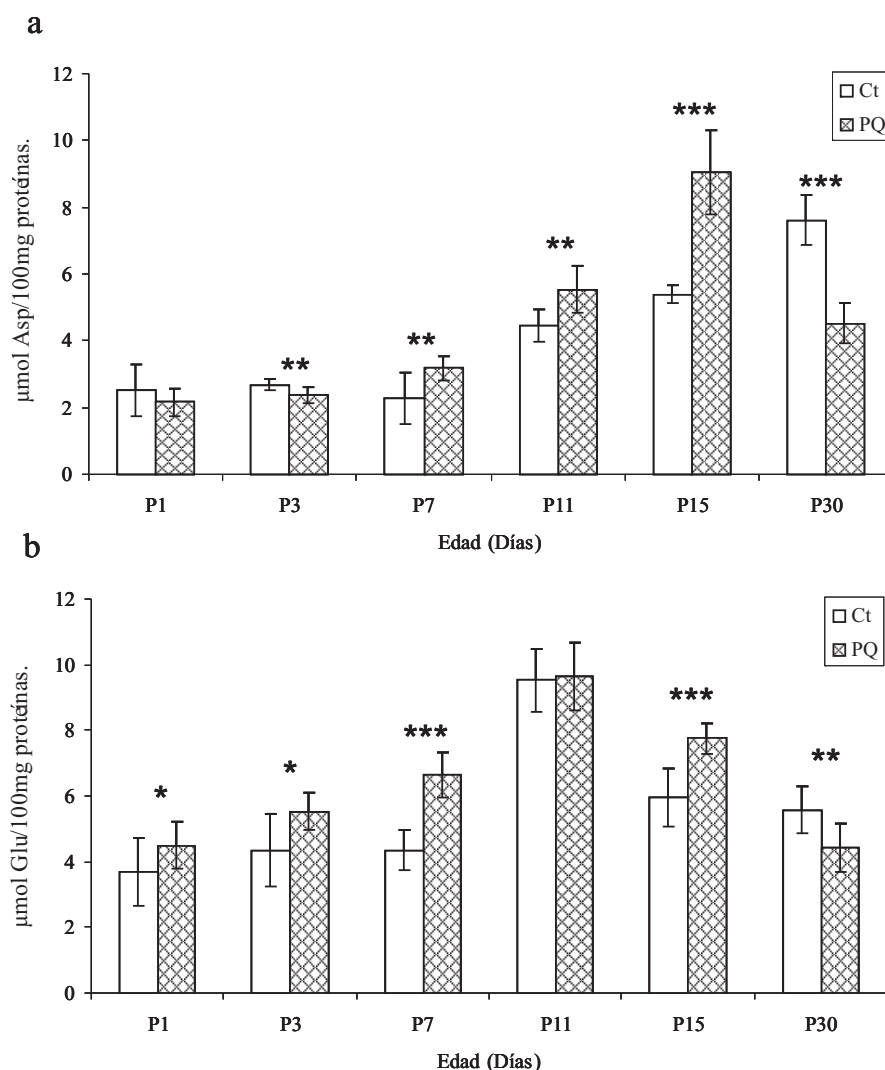


Fig. 1. Gráficos comparativos, grupo control-grupo experimental, de la variación de los niveles de neurotransmisores aminoácidos excitatorios, durante el desarrollo postnatal de la corteza cerebral parietal de ratones expuestos a PQ durante la gestación: a) niveles de Asp y b) niveles de Glu. Los valores representan el promedio $\pm$ D.E. ($n = 10$), * $p < 0,03$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$.

semana de desarrollo postnatal, sus niveles fueron significativamente mayores en el grupo que fue expuesto a PQ: un 35% ($p < 0,005$) en P1, cerca de 56% ($p < 0,0001$) en P3 y un 26% ($p < 0,0001$) en P7. Durante la segunda semana postnatal, no se observaron cambios significativos en el contenido de Tau al comparar el grupo experimental con el control. En el adulto joven (P30), los niveles de Tau cayeron cerca de 32% ($p < 0,0001$) por debajo del control.

DISCUSIÓN

Ha sido bien establecido que la neurogénesis en la corteza cerebral del ratón ocurre entre G11 y G17 (37,38). A partir de G17 comienza un proceso de diferenciación que se extiende hasta el período postnatal, cuando ocurre la sinaptogénesis; esta etapa va acompañada de una expansión cortical que dará origen a las 6 capas celulares que conforman la corteza cerebral del animal

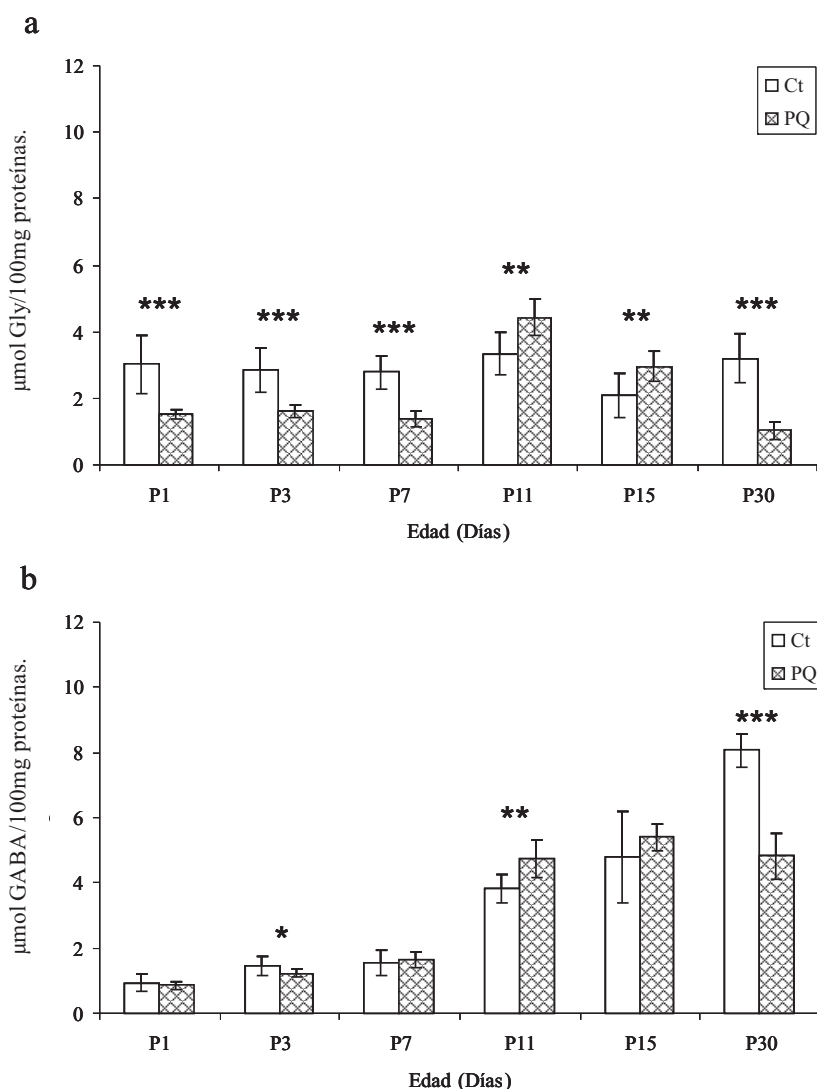


Fig. 2. Gráficos comparativos, grupo control-grupo experimental, de las variaciones de los niveles de neurotransmisores aminoacídicos inhibitorios, durante el desarrollo postnatal de la corteza cerebral parietal de ratones expuestos a PQ durante la gestación: a) niveles de Gly y b) niveles de GABA. Los valores representan el promedio $\pm$ D.E. (n = 10), * $p < 0,03$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$.

adulto (31, 38-40). Por tanto, la exposición de fetos a plaguicidas neurotóxicos, como el PQ, durante el período comprendido entre G12 y G21, podría influir negativamente tanto en los procesos de proliferación, diferenciación y migración neuronal que ocurren en esta etapa del desarrollo, como en los procesos de sinaptogénesis y la maduración de los circuitos locales, que ocurren durante el período postnatal del desarrollo.

Es muy importante destacar que, en los ratones expuestos durante la gestación a PQ, hemos observado incrementos estadísticamente significativos de los niveles de neurotransmisores excitatorios Asp y Glu al final de la primera semana del desarrollo postnatal, siendo esta tendencia particularmente marcada en el caso del Glu. Nuestros resultados coinciden con lo observado por otros investigadores, que han reportado

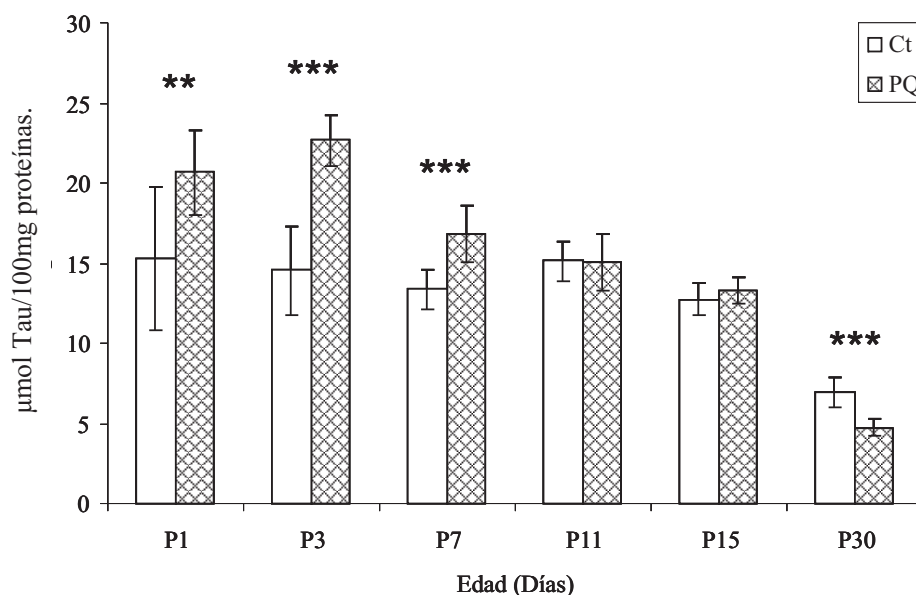


Fig. 3. Gráficos comparativos, grupo control-grupo experimental, de las variaciones de los niveles del neurotransmisor aminoacídico Tau, durante el desarrollo postnatal de la corteza cerebral parietal de ratones expuestos a PQ durante la gestación. Los valores representan el promedio $\pm$ D.E. (n = 10), * $p < 0,03$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$.

una elevación de los niveles extracelulares de Glu anormalmente alta, en el SNC de animales de laboratorio perfundidos con PQ, indicando además el efecto excitotóxico que esto conlleva (23). Por tanto, este comportamiento podría indicarnos que el efecto que el PQ indujo sobre la liberación de Glu durante la exposición prenatal, se mantiene por lo menos durante la primera semana de desarrollo postnatal. Esta situación es tremendamente desfavorable para el desarrollo cortical por las siguientes razones: en primer lugar, normalmente la corteza cerebral parietal del ratón está expuesta a una alta excitotoxicidad durante la primera semana de desarrollo postnatal, debido a que a la acción despolarizante del Glu se suma la acción despolarizante que tienen GABA, Gly y Tau antes de P6 (31); por lo tanto, en los ratones expuestos durante la gestación a PQ esta situación está exacerbada y la elevada cantidad de estímulos excitatorios puede traer como consecuencia un incremento en el número de células que muere por apoptosis (41, 42). En segundo lugar,

ha sido establecido que entre P5 y P7 se dispara un importante período de sinaptogénesis en la corteza cerebral parietal del ratón (31) y los elevados niveles de Glu podrían influir negativamente en este proceso (43).

Se podría decir entonces, que a la muerte celular que podría causar el PQ durante la intoxicación prenatal, debido al estrés oxidativo y la peroxidación lipídica (44, 45), se sumaría la muerte celular causada por la alta excitotoxicidad en los primeros días del desarrollo postnatal, lo cual podría disminuir de forma importante las poblaciones neuronales corticales e influiría negativamente en su posterior desarrollo. Adicionalmente, se ve afectado el delicado balance excitación/inhibición que es necesario para el adecuado desarrollo, maduración y funcionamiento de los circuitos corticales (33, 46, 47). Aún al final de la segunda semana de desarrollo postnatal, los niveles de Asp y Glu del grupo expuesto a PQ son más elevados que los del grupo control, lo cual podría afectar los ajustes en los circuitos

cerebrales que se producen en el ratón durante la pubertad (31). Contrariamente a la tendencia observada durante las dos primeras semanas de desarrollo postnatal, en el adulto joven se observa una caída de los niveles de Glu en el grupo que fue expuesto a PQ. Esto podría indicar una disminución en la población de células piramidales, que constituyen el principal grupo de células excitadoras de la corteza cerebral, y de las células estrelladas espinosas, que constituyen un grupo de células glutamatérgicas importantes en la capa IV de las regiones somatosensoriales que se encuentran en la corteza cerebral parietal del ratón (48).

Las desviaciones en los niveles de neurotransmisores, observadas durante el desarrollo postnatal de los ratones expuestos a PQ durante la gestación, además de afectar la neurotransmisión sináptica excitadora rápida mediada por los receptores ionotrópicos de Glu (NMDA, AMPA y Kainato), también podría afectar la activación de los receptores metabotrópicos de Glu, los cuales están involucrados en el control de la excitabilidad neuronal durante el desarrollo y el normal funcionamiento de la corteza cerebral (49).

Se ha comprobado que durante el desarrollo de la corteza cerebral de la rata, los receptores de Gly comienzan a expresarse en las neuronas corticales alrededor de G18 y se incrementan hacia los períodos tempranos del desarrollo postnatal, observándose un máximo en P14, después de lo cual disminuye drásticamente siendo su expresión prácticamente imperceptible en el adulto (50, 51). Los receptores de Gly de la corteza cerebral son expresados en ausencia de terminales sinápticos glicinérgicos, localizándose en las dendritas apicales, en los cuerpos de las células piramidales y en las interneuronas corticales (52, 53). Se ha indicado que Gly y sus receptores tienen una participación importante en el proceso de

desarrollo y maduración de la corteza cerebral (53, 54).

Nuestros resultados indican, que la neurotransmisión glicinérgica también fue afectada por la exposición prenatal a PQ, lo cual se refleja en la disminución estadísticamente significativa de los niveles de Gly durante la primera semana de desarrollo postnatal, cuando Gly ejerce un importante papel neurotrófico (31, 54). Contrariamente a lo que ocurre en la primera semana, los niveles de Gly entre P11 y P15 son anormalmente altos, lo cual podría indicar perturbaciones en los ajustes de los circuitos corticales que ocurren durante la pubertad (31). Finalmente en P30, los niveles de Gly en los animales expuestos a PQ se encuentran 70% por debajo de los del grupo control. Aunque Gly no está involucrada en la neurotransmisión inhibitoria rápida en la corteza cerebral en el animal adulto, la disminución de sus niveles podría influir negativamente en dos aspectos: en primer lugar, se vería seriamente afectado el papel de Gly en la regulación de la excitabilidad neuronal, lo cual es importante bajo condiciones fisiológicas normales y algunas condiciones fisiopatológicas (54, 55). En segundo lugar, esta disminución podría estar afectando la ontogénesis de la neurotransmisión excitadora, debido a que Gly además de ser coagonista de Glu en los receptores NMDA, al parecer también interviene en la regulación de la expresión de estos últimos (56).

En cuanto a GABA, que es el neurotransmisor inhibitorio más importante de la corteza cerebral, hemos encontrado que durante la primera semana de desarrollo postnatal, prácticamente no hay diferencias entre el grupo experimental y el grupo control, lo cual podría indicar que la exposición prenatal a PQ afectó en menor medida a la población de interneuronas GABAérgicas corticales, coincidiendo con lo observado por otros investigadores en la substantia nigra, el hipocampo y el cerebelo (8, 33).

Contrastando con esta tendencia, en P11 observamos un incremento significativo de los niveles de GABA y en P30 una disminución muy significativa. Estas diferencias podrían indicar perturbaciones del proceso de ajuste que ocurre durante la pubertad y un inadecuado establecimiento de los circuitos corticales en el adulto (31), probablemente como consecuencia de un proceso de sinaptogénesis afectado por el exceso de estímulos excitatorios entre P1 y P15, como fue descrito anteriormente.

En cuanto a Tau, sabemos que este neurotransmisor está involucrado en una multitud de procesos fisiológicos que son importantes para el adecuado desarrollo y funcionamiento del SNC (31, 32), como son: prevenir la muerte celular por excitotoxicidad a través de su efecto neuroprotector y su influencia sobre la homeostasis de Ca^{2+} , actúa como agonista endógeno de los receptores de Gly, también puede activar los receptores GABA_A , es uno de los compuestos orgánicos osmóticamente activos más importantes del SNC de los mamíferos y actúa como antioxidante (57-61).

Por las razones antes expuestas, no es de sorprender que los niveles de Tau se encuentren más elevados en el grupo expuesto a PQ que en el grupo control. Como hemos discutido previamente, en los ratones expuestos a PQ la corteza cerebral se encuentra bajo estrés oxidativo y una alta excitotoxicidad, por lo tanto la producción de grandes cantidades de Tau podría ser uno de los mecanismos de protección o compensación contra estas condiciones adversas (60, 62). En oposición a esta tendencia, en P30 los niveles de Tau del grupo expuesto a PQ caen por debajo de los niveles del grupo control, lo cual podría ser otro indicativo de la perturbación que ha sufrido el tejido nervioso expuesto durante la gestación a PQ. Podríamos decir entonces, que la multitud de acciones fisiológicas en las que está involucrada Tau para el normal

funcionamiento de la corteza cerebral, se ven disminuidas en el animal adulto que fue expuesto durante la gestación a PQ.

En conclusión, nuestros resultados indican que la exposición a bajas dosis de PQ durante la gestación puede ocasionar perturbaciones que se manifiestan durante el desarrollo postnatal del SNC en áreas diferentes al nigroestriado. Específicamente, observamos un efecto negativo sobre la ontogénesis de la neurotransmisión sináptica aminoacídica en la corteza cerebral parietal del ratón, que se refleja en una alteración de los niveles basales de los aminoácidos neurotransmisores durante el desarrollo postnatal, predominando la excitación sobre la inhibición durante todo el período estudiado. Estas alteraciones, podrían indicar la ocurrencia de importantes daños en la corteza cerebral parietal, tales como la disminución de algunas poblaciones neuronales no dopaminérgicas, la inadecuada formación de los circuitos corticales y alteraciones en el proceso de sinaptogénesis. En el futuro, es necesario ahondar en estudios ultraestructurales y moleculares que permitan identificar los grupos celulares más afectados bajo las condiciones de intoxicación descritas. Algunos investigadores han propuesto que el balance excitación/inhibición en el humano está afectado en enfermedades de origen neurológico como el autismo, la epilepsia y las enfermedades de Parkinson y Alzheimer (63-65), en las cuales están seriamente deterioradas las habilidades cognitivas y motoras de los individuos que las padecen. Es decir, las personas expuestas al PQ podrían estar en riesgo de padecer problemas neurológicos graves.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Miranda-Contreras y col. para el cerebelo (33), aunque los patrones de variación de los niveles de los aminoácidos neurotransmisores es diferente, se demuestra que la exposición prenatal a PQ puede

alterar severamente el modelado de los circuitos básicos de la corteza cerebelosa, lo cual a su vez, podría ocasionar alteraciones en la conducta del animal adulto.

Finalmente, la evidencia experimental sugiere que la exposición a PQ, además de afectar las funciones relacionadas con el sistema nigroestriado y la corteza cerebelosa, podría estar afectando también las funciones cognitivas relacionadas con la corteza cerebral, lo cual acarrearía problemas aún más serios para los trabajadores agrícolas, las personas que habitan en las zonas de explotación agrícola y sus alrededores, y los consumidores de productos contaminados.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a Alirio Balza, Leisalba Zabala y José Sánchez por su excelente asistencia técnica. Esta investigación fue parcialmente financiada por el proyecto CDCHT-ULA M-859-06-03-B y FONACIT S1-2002000281.

REFERENCIAS

1. **Levitt P.** Developmental neurobiology and clinical disorders: lost in translation?. *Neuron* 2005; 46(3):407-412.
2. **Connor SL, Levitt P, Matthews SG, Slotkin TA, Johnston MV, Kinney HC, Johnson WG, Dailey RM, Zimmerman AW.** Fetal mechanism in neurodevelopmental disorders. *Pediatr Neurol* 2008; 38(3):163-176.
3. **García JE.** Intoxicaciones agudas por plaguicidas: costos humanos y económicos. *Rev Panam Salud Pública* 1998; 4(6):383-387.
4. **Eddleston M, Karalliedde L, Buckley N, Fernando R, Hutchinson G, Isbister G, Konradsen F, Murray D, Piola JC, Senanayake N, Sheriff Singh S, Siwach SB, Smith L.** Pesticide poisoning in the developing world - a minimum pesticides list. *Lancet* 2002; 360:1163-1167.
5. **FAO (2004).** Los residuos de plaguicidas son una bomba de tiempo para los países pobres. *FAO Sala de Prensa.* Update: 20/01/2009. Disponible en: <http://www.fao.org/newsroom/ES/news/2004/50119/index.html> ().
6. **WHO-UNEP.** Sound management of pesticides and diagnosis and treatment of pesticide poisoning. A resource tool. World Health Organization, pp. 14. Update: 29/01/2009. Disponible en: http://www.who.int/whopes/recommendations/IPCS/Pesticide_ok.pdf
7. **Syngenta Crop Protection AG.** Centro de información del Paraquat. Update: 29/01/2009. Disponible en: <http://www.paraquat.com/Default.aspx?alias=www.paraquat.com/spanish>.
8. **McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA.** Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis* 2002; 10:119-127.
9. **Liu B, Gao HM, Hong JS.** Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Env Health Perspect* 2003; 111:1065-1073.
10. **Thiruchelvam M, McCormack A, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Di Monte DA, Cory-Slechta DA.** Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. *Eur J Neurosci* 2003; 18:589-600.
11. **Thiruchelvam M, Richfield EK, Goodman BM, Baggs RB, Cory-Slechta DA.** Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the parkinson's disease phenotype. *Neurotoxicology* 2002; 23:621-633.
12. **Cory-Slechta DA, Thiruchelvam M, Barlow BK, Richfield EK.** Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype. *Environ Health Perspect* 2005; 113(9):1263-1270.
13. **Brooks AI, Chadwick CA, Gelbard HA, Cory-Slechta DA, Federoff HJ.** Paraquat

- elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res* 1999; 823:1-10.
14. Jenner P. Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* 2001; 24:245-247.
 15. Suntres ZE. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* 2002; 180: 65-77.
 16. Bonne-Barkay D, Reaney SH, Langston WJ, Di Monte DA. Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Mol Brain Res* 2005; 134:52-56.
 17. Corasaniti MT, Strongoli MC, Rotiroti D, Bagetta G, Nistico G. Paraquat: A useful tool for the *in vivo* study of mechanisms of neuronal cell death. *Pharmacol Toxicol* 1998; 83(1):1-7.
 18. Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, Suno M, Ogawa K, Hayase N, Kimura K, Shiono H. Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res* 2001; 906:135-142.
 19. Corasaniti MT, Bagetta G, Rodinò P, Gratteri S, Nisticò G. Neurotoxic effects induced by intracerebral and systemic injection of paraquat in rats. *Hum Exp Toxicol* 1992; 11(6):535-539.
 20. Corasaniti MT, Strongoli MC, Pisanelli A, Bruno P, Rotiroti D, Nappi G, Nisticò G. Distribution of paraquat into the brain after its systemic injection in rats. *Funct Neurol* 1992; 7(1):51-56.
 21. Schmuck G, Ahr HJ, Schlüter G. Rat cortical neuron cultures: an *in vitro* model for differentiating mechanisms of chemically induced neurotoxicity. *In vitro Mol Toxicol* 2000; 13(1):37-50.
 22. Schmuck G, Röhrdanz E, Tran-Thi QH, Kahl R, Schlüter G. Oxidative stress in rat cortical neurons and astrocytes induced by paraquat *in vitro*. *Neurotox Res* 2002; 4(1):1-13.
 23. Kim SJ, Kim JE, Moon IS. Paraquat induces apoptosis of cultured rat cortical cells. *Mol Cells* 2004; 17(1):102-107.
 24. Rizzolatti G, Fogassi L, Gallese V. Parietal cortex: from sight to action. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7(4):562-567.
 25. Culham JC, Kanwisher NG. Neuroimaging of cognitive functions in human parietal cortex. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11(2): 157-163.
 26. Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogester B, Leprince P, Moonen G. Neurotransmitters as early signals for nervous system development. *Cell Tissue Res* 2001; 305:187-202.
 27. Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceño RV, Palacios-Prü EL. Levels of monoamine and amino acid neurotransmitters in the developing male mouse hypothalamus and in histotypic hypothalamic cultures. *Int J Dev Neurosci* 1998; 16: 403-412.
 28. Miranda-Contreras L, Benítez-Díaz PR, Mendoza-Briceño RV, Delgado-Sáez MC, Palacios-Prü EL. Levels of amino acid neurotransmitters during mouse cerebellar neurogenesis and in histotypic cerebellar cultures. *Dev Neurosci* 1999; 21:147-158.
 29. Miranda-Contreras L, Ramírez-Martens LM, Benítez-Díaz PR, Peña-Contreras ZC, Mendoza-Briceño RV, Palacios-Prü EL. Levels of amino acid neurotransmitters during mouse olfactory bulb neurogenesis and in histotypic olfactory bulb cultures. *Int J Dev Neurosci* 2000; 18:83-91.
 30. Miranda-Contreras L, Benítez-Díaz PR, Peña-Contreras Z, Mendoza-Briceño RV, Palacios-Prü EL. Levels of amino acid neurotransmitters during neurogenesis and in histotypic cultures of mouse spinal cord. *Dev Neurosci* 2002; 24:59-70.
 31. Benítez-Díaz PR, Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceño RV, Peña-Contreras ZC, Palacios-Prü EL. Prenatal and postnatal contents of amino acid neurotransmitters in mouse parietal cortex. *Dev Neurosci* 2003; 25:366-374.
 32. Benítez-Díaz P, Miranda-Contreras L, Peña-Contreras Z, Dávila-Vera D, Mendoza-Briceño RV, Palacios-Prü E. Histotypic mouse parietal cortex cultures: excitation /inhibition ratio and ultrastructural analysis. *J Neurosci Methods* 2006; 156(1-2): 64-70.
 33. Miranda-Contreras L, Dávila-Ovalles R, Benítez-Díaz P, Peña-Contreras Z, Palacios-Prü E. Effects of prenatal paraquat and mancozeb exposure on amino acid synaptic transmission in developing mouse

- cerebellar cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 160(1):19-27.
34. **Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB, Cory-Slechta DA.** Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease?. *Brain Res* 2000; 873:225-234.
35. **Oray B, Lu HS, Gracy RW.** High-performance liquid chromatographic separation of Dns-amino acid derivatives and applications to peptide and protein structural studies. *J Chromatogr* 1983; 270:253-266.
36. **Stoscheck CM.** Quantitation of protein. En: M. P. Deutscher (Ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. 182, Academic Press, New York 1990, pp. 50-68.
37. **Caviness VS Jr, Takahashi T, Nowakowski RS.** Numbers, time and neocortical neurogenesis: a general development and evolutionary model. *Trends Neurosci* 1995; 18: 379-383.
38. **Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS Jr.** The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neurogenesis. *J Neurosci* 1996; 16:6183-6196.
39. **Takahashi T, Nowakowski R.S., Caviness V.S. Jr.** Interkinetic and migratory behavior of a cohort of neocortical neurons arising in the early embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* 1996; 16:5762-5776.
40. **Aboitiz F, Morales D, Montiel J.** The inverted neurogenetic gradient of the mammalian isocortex: development and evolution. *Brain Res Rev* 2001; 38:129-139.
41. **Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Fujimaru S, Saito O, Shiono H.** Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. *Brain Res* 2003; 976:243-252.
42. **Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, Duarte JA, Navarro AS, Bastos ML, Carvalho F.** Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 2006; 27(6):1110-1122.
43. **Matute C, Alberdi E, Domercq M, Sánchez-Gómez MV, Pérez-Samartín A, Rodríguez-Antigüedad A, Pérez-Cerdá F.** Excitotoxic damage to white matter. *J Anat* 2007; 210(6):693-702.
44. **Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaiee A.** Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit* 2004; 10:RA141-147.
45. **Drechsel DA, Patel M.** Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 2008; 44(11): 1873-1886.
46. **Benali A, Weiler E, Benali Y, Dinse HR, Eysel UT.** Excitation and inhibition jointly regulate cortical reorganization in adult rats. *J Neurosci* 2008; 28(47):12284-12293.
47. **Madsen KK, Larsson OM, Schousboe A.** Regulation of excitation by GABA neurotransmission: focus on metabolism and transport. *Results Probl Cell Differ* 2008; 44:201-221.
48. **Valverde F.** Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Rev Neurol* 2002; 34(8):758-780.
49. **Bandrowski AE, Huguenard JR, Prince DA.** Baseline glutamate levels affect group I and II mGluRs in layer V pyramidal neurons of rat sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* 2003; 89(3):1308-1316.
50. **Becker C, Betz H, Schröder H.** Expression of inhibitory glycine receptors in postnatal rat cerebral cortex. *Brain Res* 1993; 606: 220-226.
51. **Flint AC, Liu X, Kriegstein AR.** Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* 1998; 20:43-53.
52. **Legendre P.** The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:760-793.
53. **Young-Pearse TL, Ivic L, Kriegstein AR, Cepko CL.** Characterization of mice with targeted deletion of glycine receptor alpha 2. *Mol Cell Biol* 2006; 26(15):5728-5734.
54. **Ye JH.** Regulation of excitation by glycine receptors. *Results Probl Cell Differ* 2008; 44:123-143.
55. **Brackmann M, Zhao C, Schmieden V, Braunewell KH.** Cellular and subcellular

- localization of the inhibitory glycine receptor in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(3):1137-1142.
56. **Kenny AV, Cousins SL, Pinho L, Stephenson FA.** The integrity of the glycine co-agonist binding site of N-methyl-D-aspartate receptors is a functional quality control checkpoint for cell surface delivery. *J Biol Chem* 2009; 284(1):324-333.
 57. **Del Olmo N, Bustamante J, del Rio RM, Solis JM.** Taurine activates GABA A but not GABA B receptors in rat hippocampal CA1 area. *Brain Res* 2000; 864:298-307.
 58. **Franco R, Quesada O, Pasantes-Morales H.** Efflux of osmolyte amino acids during isovolumetric regulation in hippocampal slices. *J Neurosci Res* 2000; 61:701-711.
 59. **Saransaari P, Oja SS.** Taurine release in the developing and adult mouse hippocampus: involvement of cyclic guanosine monophosphate. *Neurochem Res* 2002; 27:15-20.
 60. **Rodríguez-Martínez E, Rugerio-Vargas C, Rodríguez AI, Borgonio-Pérez G, Rivas-Arancibia S.** Antioxidant effects of taurine, vitamin C, and vitamin E on oxidative damage in hippocampus caused by the administration of 3-nitropropionic acid in rats. *Int J Neurosci* 2004; 114(9):1133-1145.
 61. **Mori M, Gähwiler BH, Gerber U.** β -Alanine and taurine as endogenous agonists at glycine receptors in rat hippocampus *in vitro*. *J Physiol* 2002; 539(1): 191-200.
 62. **Wu H, Jin Y, Wei J, Jin H, Sha D, Wu JY.** Mode of action, of taurine as a neuro-protector. *Brain Res* 2005; 1038:123-131.
 63. **Rubenstein JL, Merzenich MM.** Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* 2003; 2:255-267.
 64. **García-Alloza M, Tsang SW, Gil-Bea FJ, Francis PT, Lai MK, Marcos B, Chen CP, Ramirez MJ.** Involvement of the GABA-ergic system in depressive symptoms of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2006; 27:1110-1117.
 65. **Cabo-de la Vega C, Villanueva-Hernández P, Prieto-Martín A.** Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. *Rev Neurol* 2006; 42:159-168.