

EFFECTOS DE LA ATRAZINA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CORTEZA CEREBELOSA DE RATÓN UTILIZANDO EL MÉTODO DE GOLGI MODIFICADO

Zulma Peña-Contreras*, Delsy Dávila-Vera, Emilítza Labarca-Villasmil, Leticia Miranda-Contreras, Rosa Virginia Mendoza-Briceño.

Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Ernesto Palacios-Prü",
Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

*Autor de Correspondencia, e-mail: zulmap@ula.ve, Fax: 0274-2403156.

Recibido: Julio 2011. Aprobado: Octubre 2011.

Publicado: Noviembre 2011.

RESUMEN

Se estudiaron los efectos de la atrazina durante el desarrollo *in vitro* de células de Purkinje del cerebelo de ratón, desde el día de nacimiento hasta el día 9 postnatal, utilizando impregnación cromoargéntica de Golgi, para tratar de determinar los cambios fenotípicos que ocurren durante la diferenciación de las células de Purkinje. Se realizaron cultivos primarios de explantes de corteza cerebelosa de cada edad, tanto control como expuestos durante 6 días a dosis crónica de atrazina (15 µg/g-peso), incorporada al medio de incubación cada 48 horas. Las células de Purkinje de cultivos con atrazina de ratones recién nacidos presentaron acentuadas características morfológicas de inmadurez, con cuerpos celulares irregulares cubiertos por numerosas prolongaciones lamelares, que disminuyen cuantitativamente a partir del día P3, cuando se observa el inicio de una incipiente polarización de las prolongaciones neuronales, experimentando un lento crecimiento hasta el día P9 cuando se observaron células de Purkinje con gruesas y cortas prolongaciones dendríticas y escasas espinas, lo cual contrasta con los cultivos control que al día P7 mostraron células de Purkinje con todas sus características fenotípicas. Estos resultados permiten concluir que la administración de atrazina durante el período de maduración del sistema nervioso, retrasa el desarrollo de las células de Purkinje, impidiendo la adquisición de las características fenotípicas de estas células, demostrando el efecto tóxico de la atrazina sobre el desarrollo del sistema nervioso.

Palabras claves: Atrazina, método de Golgi, *in vitro*, célula de Purkinje.

EFFECTS OF ATRAZINE IN PRIMARY CULTURES OF MOUSE CEREBELLAR CORTEX USING A MODIFIED GOLGI METHOD

SUMMARY

The effects of atrazine during the development of mouse cerebellar Purkinje cells *in vitro* were studied, from the day of birth until postnatal day 9 (P9) by using golgi chrome-silver impregnation. The aim of this study was to determine the phenotypic changes during Purkinje cell differentiation induced by atrazine. Cerebellar cortex explants from each age were taken, both controlled and exposed for 6 days at chronic doses of atrazine (15 µg/g-weight), incorporated into the incubation medium every 48 hours. Newborn-mice Purkinje cells in cultures with atrazine showed marked morphological features of immaturity, with cell bodies covered by numerous irregular lamellar extensions; which quantitatively decrease from the P3 day. Then, the beginning of an incipient polarization of the neural extensions is observed, as well as a slow growth until the P9 day, when Purkinje cells with thick, short and few dendritic spines were observed. In contrast, control cultures showed Purkinje cells with mature phenotype at P7 day. These findings indicate that administration of atrazine during the maturation of the nervous system slows the development of Purkinje cells, preventing the acquisition of the phenotypic characteristics of these cells, and demonstrating the toxic effect of atrazine on the development of the nervous system.

Keywords: Atrazine, Golgi method, *in vitro*, Purkinje cell.

INTRODUCCIÓN

El envenenamiento agudo por la exposición a herbicidas y plaguicidas es común entre los agricultores, especialmente en países en vías de desarrollo y en regiones dedicadas a los cultivos intensivos, lo que ha traído como

consecuencia un aumento de la morbilidad y la mortalidad entre los usuarios de estos productos tóxicos. La mayoría de estas intoxicaciones son debidas al inadecuado uso de esas sustancias y a la falta de protección por parte de los usuarios de productos agroquímicos.

De los herbicidas, la atrazina es uno de los más ampliamente utilizados para controlar o evitar el crecimiento de malezas en cultivos de maíz, sorgo, caña de azúcar, entre otros. Es un herbicida orgánico nitrogenado derivado de la triazina, que es fácilmente liberado al ambiente, habiendo sido demostrado que tiene una alta persistencia en el mismo y su degradación química o biológica es muy lenta [1, 2].

La atrazina ha sido identificada como un disruptor endocrino, como lo confirman estudios realizados en anfibios, a través de los cuales se demuestra que bajas concentraciones de este compuesto causan feminización [3, 4]. También se ha reportado que tiene efectos nocivos en mamíferos afectando los órganos reproductivos [5, 6], favoreciendo la aparición de tumores en glándulas mamarias [7] y suprimiendo la secreción de las hormonas de la pituitaria y de neurotransmisores hipotalámicos [8, 9], lo cual trae como consecuencia alteraciones en el desarrollo reproductivo en ratas.

Por otra parte, se ha evaluado el potencial genotóxico de la atrazina en diferentes sistemas *in vivo* e *in vitro*, así se ha llegado a determinar cambios en la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) que pueden producir mutaciones y aberraciones cromosómicas [10, 11, 12]. En el sistema nervioso y en el inmunológico también se han adelantado estudios sobre los distintos mecanismos de acción de esta sustancia sobre tales sistemas [13, 14, 15, 16].

Para la detección de cambios celulares morfológicos y funcionales en diversas patologías del sistema nervioso, fundamentalmente del tipo degenerativo y neurotóxico, ha sido ampliamente utilizado el método de Golgi [17, 18, 19, 20, 21, 22]. En el presente estudio, cuyo objetivo es conocer las alteraciones de la célula de Purkinje de la corteza cerebelosa expuesta a intoxicación con atrazina, tratamos de establecer en condiciones *in vitro*, una

correlación entre el desarrollo de la célula de Purkinje expuesta a dosis de atrazina con las mismas células no expuestas a este herbicida.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en ratones NMRI suministrados por el Bioterio Central de la Universidad de Los Andes. El manejo de los animales [23, 24] fue hecho de acuerdo a lo establecido por el Comité de Bioética de la Universidad de Los Andes para el uso de animales experimentales, según exigencias establecidas para la utilización de animales en investigación en el Código de Bioética y Seguridad del Fondo Nacional de Ciencia e Innovación Tecnológica (FONACIT-Caracas, Venezuela) y en conformidad con lo propuesto por el NIH (National Institute of Health-USA) para el tratamiento ético de los animales.

Se utilizaron cerebelos de ratones de 0, 3, 5, 7 y 9 días de edad postnatal (P0, P3, P5, P7 y P9, respectivamente), cultivados durante seis días (P0-6, P3-6, P5-6, P7-6 y P9-6), tiempo óptimo para la maduración y desarrollo de las neuronas [25], utilizando el método desarrollado por Garber y Moscona [26] y modificado por Palacios-Prü y colaboradores [25]. A los ratones anestesiados con Ketamina[®] (0,24 mg/g-peso), se les extrajo el cerebelo, el cual inmediatamente fue colocado en solución Tyrode estéril. El tejido fue seccionado en fragmentos de aproximadamente 3 mm³ y fueron transferidos al medio de incubación. Por cada edad analizada se utilizaron 10 ratones, 5 cultivados como control y 5 sometidos a intoxicación con atrazina a una dosis controlada de 15 µg/g-peso.

El medio de cultivo se oxigenó cada 24 horas y se cambió cada 48 horas, adicionando en cada cambio 0,3 µg/ml de atrazina, dosis que permite la cronicidad de la exposición del herbicida, durante el tiempo (6 días) de incubación *in vitro* que garantiza que las células se expresen

morfológicamente, como ha sido demostrado previamente [25]. Una vez obtenidos los cultivos se les aplicó el método de Golgi, modificado por Palacios Prü [27]. La observación del tejido fue realizado con un microscopio fotónico de alta resolución Polyvar Reichert Jung y las imágenes fueron digitalizados con una cámara Infinite.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las células de Purkinje P0 muestran un alto grado de inmadurez, tanto en el tejido control (Fig. 1a) como las cultivadas con atrazina (Fig. 1b). Son células que presentan un cuerpo irregular con gran cantidad de prolongaciones de aspecto lamelar, de dimensiones variables y dispuestas en la totalidad de la superficie somática.

En los cultivos control de corteza cerebelosa de ratones P3 se aprecian indicios de polarización de las prolongaciones somáticas, distinguiéndose en algunas ocasiones largas prolongaciones opositopolares que podrían corresponder al origen del árbol dendrítico y del axón. Sin embargo, el cuerpo aunque tiende a hacerse alargado continua siendo irregular por la presencia de prolongaciones lamelares (Fig. 2a). Las células de Purkinje cultivadas con atrazina (Fig. 2b) muestran características de inmadurez en su morfotipo, comparándolas con los cultivos control. Son células muy irregulares y emerge de su cuerpo un elevado número de prolongaciones lamelares, tanto cortas como largas, distribuidas en toda la superficie celular, sin presentar signos de polarización.

Las células de Purkinje P5 cultivadas sin la presencia del herbicida aun cuando no han alcanzado la madurez citotípica *in vitro*, muestran un desarrollo morfológico más cercano al fenotipo de esta neurona; es decir, se observa un cuerpo menos irregular y con escasas prolongaciones lamelares emergiendo de él, lo cual puede ser interpretado como un signo de mayor grado de madurez celular. Son células con prolongaciones

polarizadas, donde se distingue claramente la región dendrítica de la región axónica (Fig. 3a), pudiendo ya hablarse de un tronco dendrítico primario, bifurcado en ramificaciones dendríticas secundarias. Mientras que, las células de Purkinje de la misma edad (P5) cultivadas con atrazina continúan presentando un alto grado de inmadurez; sus cuerpos son irregulares manteniendo un número importante de formaciones lamelares somáticas a predominio de las de mayor longitud (Fig. 3b), teniendo algunas de estas prolongaciones características de una fibra axónica, como se observa en la figura 3b. Es de destacar que en estos cultivos las fibras de aspecto axónico siempre están acompañadas de un grupo de prolongaciones neuronales de aspecto dendrítico, que no es lo común, lo cual puede ser un indicio más de la inmadurez citológica a consecuencia de la presencia de la atrazina en el medio de cultivo.

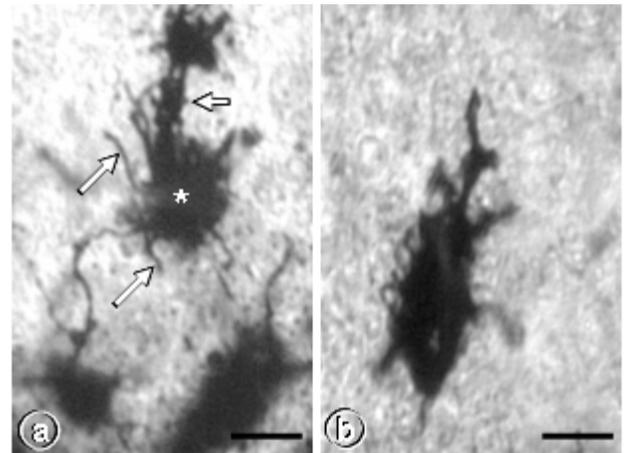


Fig. 1. Célula de Purkinje P0-6 (a), con cuerpo irregular (asterisco) y prolongaciones lamelares (flechas largas). Destaca el inicio del árbol dendrítico (flecha corta). Barra: 4,5 μm . Célula de Purkinje P0-6 cultivada con atrazina (b), caracterizada por presentar múltiples prolongaciones celulares emergiendo de forma irregular del cuerpo. Barra: 4,5 μm .

En los cultivos cerebelosos de ratón P7 se evidencia el desarrollo citotípico de las células de Purkinje, al observarse el cuerpo celular de contornos lisos y con la forma piriforme característica de estas neuronas, así como el desarrollo del árbol dendrítico propio de estas

células, presentando un patrón de arborización dendrítica (Fig. 4a); sin embargo, todavía no están bien formadas las espinas dendríticas. Cuando la corteza cerebelosa de ratón P7 es cultivada con atrazina, se observan células de Purkinje citotípicamente más desarrolladas en comparación con las células de edades anteriores cultivadas con el herbicida (Fig. 4b). A pesar del desarrollo alcanzado, aún muestran signos de inmadurez con respecto a la célula control de la misma edad, ya que se observan prolongaciones lamelares cortas y largas emergiendo del cuerpo celular, sin mostrar una polarización definida.

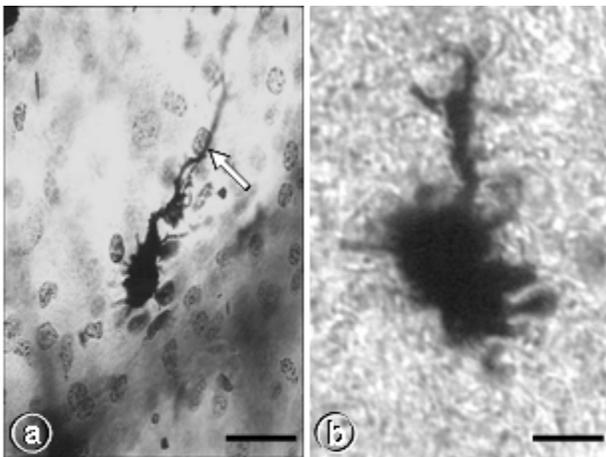


Fig. 2. La célula de Purkinje P3-6 (a), muestra un cuerpo alargado con bordes más regulares y prolongaciones cortas y alargadas (flecha). Barra 11,5. Al cultivar con atrazina la corteza cerebelosa P3-6 (b), la célula de Purkinje presenta signos de inmadurez, con un cuerpo de forma redondeada y múltiples emergencias celulares irregulares. Barra: 4,3 μ m.

Las células de Purkinje en los cultivos control de P9 conservan sus características fenotípicas, es decir un cuerpo piriforme con contornos lisos y la arborización dendrítica con ramificaciones secundarias y terciarias (Fig. 5a). Ante la presencia de atrazina, las células de Purkinje P9 muestran signos de inmadurez presentando cuerpos irregulares con formaciones lamelares; aun cuando en algunos casos se observan algunas prolongaciones dendríticas bien definidas en formación e iniciando el proceso de arborización (Fig. 5b).

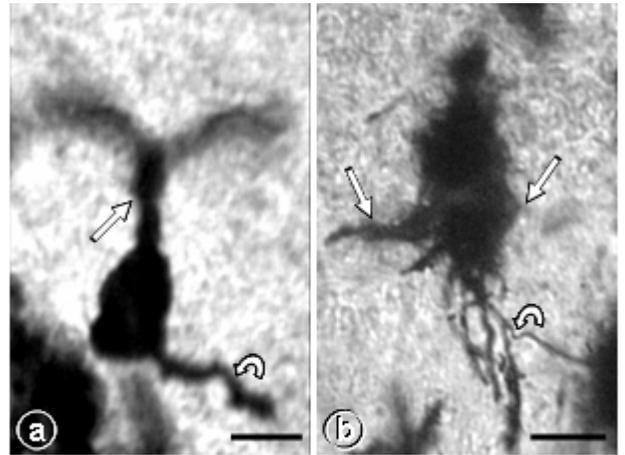


Fig. 3. El cuerpo de la célula de Purkinje P5-6 (a) es de contornos regulares y con prolongaciones dendríticas bifurcadas (flecha recta) y axónica (flecha curva). Barra: 2,9 μ m. En b se observa el alto grado de inmadurez que presenta la célula de Purkinje P5-6 cultivada con atrazina. Del cuerpo celular irregular emergen procesos lamelares (flechas rectas) de diferente longitud, observándose una prolongación con características axónicas (flecha curva). Barra: 4,5 μ m.

La dosis de atrazina utilizada más el tiempo de cultivo (6 días) garantizan la cronicidad de la exposición a la misma y la supervivencia celular, lo cual permite observar los efectos neurotóxicos de este herbicida sobre el sistema nervioso central, demostrándose experimentalmente que las células cerebelosas expuestas a esta dosis de atrazina en condiciones *in vitro* retrasan su desarrollo citotípico y morfológico normal. Se conoce que durante el desarrollo [26], el sistema nervioso no alcanza la madurez de manera generalizada en un momento determinado, sino que por el contrario, existe un lapso variable para cada una de las diferentes regiones encefálicas y para cada especie animal, denominado Período Crítico, durante el cual las células logran alcanzar características básicas de madurez, que les permite desarrollar la fenotipia celular. En el caso del cerebelo de ratón el Período Crítico corresponde al día 7 de desarrollo postnatal (P7).

Las células de Purkinje en condiciones *in vitro* durante el Período Crítico alcanzan altos grados de desarrollo citotípico [26, 28]; mientras que las cortezas cerebelosas provenientes de ratones de edades P0 a P5 y cultivadas

sin atrazina, como no han alcanzado el Período Crítico, muestran características de inmadurez representadas por la presencia de cuerpos de contornos irregulares, con prolongaciones lamelares emergiendo de él y en algunos casos, cierto grado de polarización pero con un deficiente desarrollo dendrítico. Es a partir del día P7 que se evidencian completamente las características fenotípicas de estas neuronas. En contraste, todos los cultivos realizados con atrazina (P0 a P9) presentan altos grados de inmadurez comparándolas con las células control, lo que nos permite afirmar que la atrazina retrasa el desarrollo citotípico e histotípico del tejido expuesto a su acción.

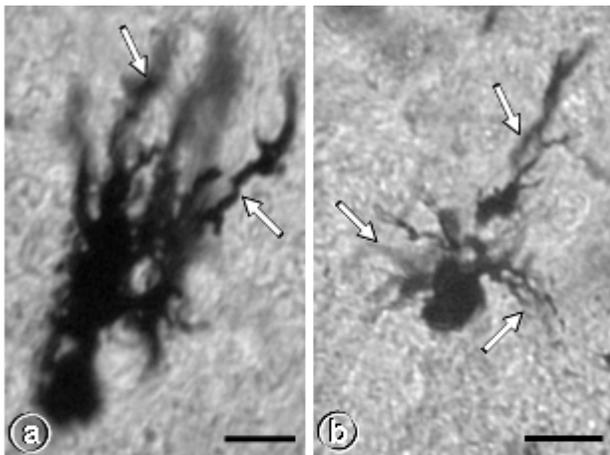


Fig. 4. En el cerebelo control P7 cultivado durante 6 días, las células de Purkinje (a) alcanzan su desarrollo fenotípico, con un cuerpo piriforme y el árbol dendrítico bien desarrollado y ramificado (flechas). Barra: 4,5 μm . En la corteza cerebelosa P7 cultivada en presencia de atrazina (b) se observa que las células de Purkinje no han alcanzado el morfotipo neuronal, aunque presentan un cuerpo menos irregular y cierto grado de desarrollo dendrítico (flechas). Barra 11,5 μm .

El mecanismo de acción de la atrazina no se conoce con certeza pero algunos autores han propuesto dos posibles mecanismos de acción: uno donde la atrazina causa efectos directos sobre las células inmunológicas vía mecanismos epigenéticos y el otro mecanismo podría ser que este herbicida actúa como un disruptor endocrino afectando los niveles de producción hormonales alterando la expresión genética y fenotípica de las células somáticas y neuronales [29].

Se puede inferir que este herbicida al igual que lo hace con la célula de Purkinje puede también tener efectos sobre las otras células neuronales del circuito cerebeloso local, afectando el normal desarrollo de la maduración citoarquitectónica cerebelar y en consecuencia alterando la funcionalidad sináptica; demostrándose así el efecto neurotóxico del herbicida atrazina sobre el sistema nervioso, lo cual en este caso fue posible visualizar gracias a la utilización de un modelo experimental *in vitro*, el cual permite el seguimiento de la dinámica fenotípica neuronal, así como conocer las diferencias morfológicas entre dos modelos de cultivo, el control y los cultivos con atrazina.

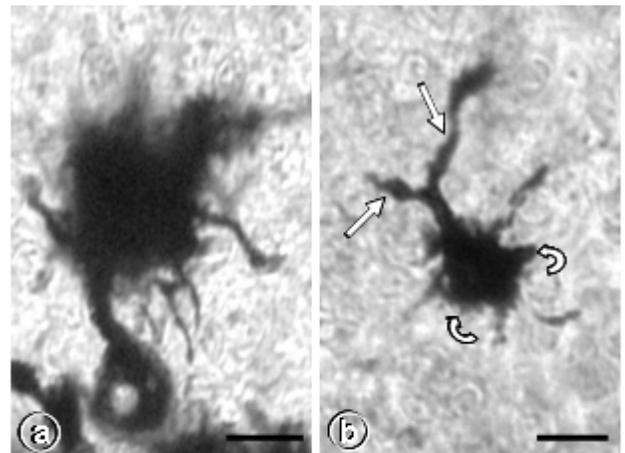


Fig. 5. En cultivos P9-6 (a) la célula de Purkinje expresa todo su desarrollo citotípico. Barra: 2,9 μm . Cuando la célula de Purkinje P9-6 es cultivada con atrazina (b), persisten características de inmadurez como es un cuerpo irregular con abundantes prolongaciones lamelares (flechas curvas), aun cuando muestra algún grado de polarización dendrítica (flechas largas). Barra: 4,5 μm .

CONCLUSIONES

En condiciones *in vitro* las células de Purkinje alcanzan su desarrollo fenotípico después de 6 días de incubación solamente cuando proceden de cerebelos de 7 días de edad postnatal (P7), después de experimentar un lógico desarrollo morfológico a partir de P0 y alcanzando su máxima expresión fenotípica al día P9, lo cual permite confirmar que el Período Crítico corresponde al día P7. Ante la presencia de atrazina el desarrollo de la célula de Purkinje presenta un evidente retardo, aun cuando los

cultivos sean de corteza cerebelosa proveniente de ratones P7, lo cual demuestra que en presencia de atrazina no se obtienen cultivos histotípicos.

En los cultivos con atrazina se observa siempre un desarrollo morfológico enlentecido de las células de Purkinje, mostrando la mayoría de ellas un alto grado de inmadurez, poniendo en evidencia el efecto de toxicidad que puede ejercer la atrazina sobre el desarrollo de las células neuronales, lo cual puede ser la causa o contribuir no solo al desarrollo de enfermedades neurológicas en personas expuestas crónicamente a este herbicida sino también a malformaciones congénitas del sistema nervioso [30].

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo fue posible gracias a la colaboración de los técnicos José Ramírez-Márquez, José Sánchez-Gil y Aldeni Viloria-Ortega por su valiosa participación, tanto en la preparación de las muestras como en el procesamiento y manejo fotográfico de las mismas.

La divulgación y presentación final de este trabajo fue parcialmente financiado por el CDCHTA de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

REFERENCIAS

[1] Graymore M., Stagnitti F., Allinson G. (2001) "Impacts of atrazine in aquatic ecosystems" *Environm Internat* 26:483-495.

[2] Solomon K.R., Baker D.B., Richards R.P., Dixon K.R., Klaine S.J., La Point T.W. (1996) "Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters" *Environm Toxicol and Chemis* 15:31-76.

[3] Hayes T.B., Collins S., Lee M., Mendoza M., Noriega N., Stuart A., Vonk A. (2002) "Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide

atrazine at low ecologically relevant doses" *Proceeding of the National Academy of Scienc of the United State of America* 99:5476-5480.

- [4] Hayes T.B., Hasten K., Tsui M., Hoang A., Haeffele C., Vonk A. (2003) "Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs" *Environm Health Persp* 111:568-575.
- [5] Eldridge J.C., Wetzel L.T., Tyrey L. (1999) "Estrous cycle patterns of Sprague-Dawley rats during acute and chtonic atrazine administration" *Reproduc Toxicol* 13:491-499.
- [6] Stocker T.E., Guidici D.L., Laws S.C., Cooper R.L. (2002) "The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male Wistar rat" *Toxicol Scien* 67:198-206.
- [7] Rayner J.L., Enoch R.R., Fenton S.E. (2005) "Adverse effects of prenatal exposure to atrazine during a Critical Period of mammary gland growth" *Toxicol Sci* 87:255-266.
- [8] Cooper R.L., Stoker T.E., McElroy W.K., Hein J.F. (1998) "Atrazine disrupts hypothalamic catecholamines and pituitary function" *Toxicol* 42: 160.
- [9] Ottinger M.A., Lavoie E., Thompson N., Whitehouse K., Barton M., Abdelnabi M., McKernan M., Pollack S., Quinn M. (2006) "Comparative effects of estrogenic, androgenic endocrine disruptors, and atrazine on behavior and neuroendocrine systems in quail" *Frontiers Neuroendocrinol* 27:23-26.
- [10] Murnick M.R., Nash C.L. (1997) "Mutagenicity of the triazine herbicides atrazine, cyanazine and simazine in *Drosophila melanogaster*" *J Toxicol and Environm Health* 3:691-697.
- [11] Pino A., Maura A., Grillo P. (1988) "DNA damage in stomach, kidney, liver and lung of rats treated with atrazina" *Mutation Res* 209:145-147.
- [12] Meisner L.F., Roloff B.D., Beluck D.A. (1993) "*In vitro* effects of n-nitroso atrazine on chromosome

- breakage” *Arch Environm Contamin and Toxicol* 24:108-112.
- [13] Miranda-Contreras, L., Dávila-Ovalles, R., Benítez-Díaz, P., Peña-Contreras, Z., Palacios-Prü, E.L. (2005) “Effects of prenatal paraquat and mancozeb exposure on amino acids synaptic transmission in developing mouse cerebellar cortex” *Develop Brain Res* 160:19-27.
- [14] Cox C. (2001) “Atrazine: Toxicology” *J Pestic Reform* 21:12-20.
- [15] Fraites M.J.P., Cooper R.L., Buckalew A., Jayaraman S., Mills L., Laws S.C. (2009) “Characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to atrazine and metabolites in the female rat” *Toxicol Scienc* 112:88-99.
- [16] Rodríguez V.M., Thiruchelvam M., Cory-Slechta D.A. (2005) “Sustained exposure to the widely used herbicide atrazina; altered function and loss of neurons in brain monoamine systems” *Environ Health Perspect.* 113:708-715.
- [17] Marin-Padilla M., Tsai R.j., King M.A., Roper S.N. (2003) “Altered corticogenesis and neuronal morphology in irradiatio-induced cortical dysplasia: a Golgi-Cox study” *J Neuropathol and Experim Neurol* 62:1129-1143.
- [18] Black J.E., Kodish I.M., Grossman A.W., Klintsova A.Y., Orlovskaya D. (2004) “Pathology of layer V piramidal neurons in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia” *The American J Psych* 161:742.744.
- [19] Cook S.C., Wellman C.L. (2004) “Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex” *J Neurobiol* 60:236-248.
- [20] Baloyannis S.J. (2005) “Morphological and morphometric alterations of Cajal-Retzius cells in early cases of Alzheimer's disease: a Golgi and electron microscope study” *International J Neurosci* 115:965-980.
- [21] Fairen A. (2005) “Pioneering a goleen age of cerebral microcircuits: The births of the combined Golgi-electron microscope methods” *Neurosci* 136:607-614.
- [22] Martínez-Téllez R., Gómez-Villalobos M., Flores G. (2005) “Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by steptozotocin” *Brain Res* 1048:108-115.
- [23] Guide for the care and use of laboratory animals. (1996) National Academy Press. Washington, DC.
- [24] Código de bioética y bioseguridad. 2ª edición. (2002) Ministerio de Ciencia y Tecnología y Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología. Caracas.
- [25] Palacios-Prü E.L., Palacios L., Mendoza R.V. (1978) “Cultivos neuronales histotípicos: significación y perspectivas” *Acta Cient Venez* 29:295-308.
- [26] Garber B.B., Moscona A.A. (1972) “Reconstruction of brain tissue from cell suspensions. I. Aggregation patterns of cells dissociated from different regions of the developing brain” *Develop Biol* 27:217-234.
- [27] Palacios-Prü E.L. (1970) “Two useful variations of the Golgi silver chromate method” *Acta Cient Venez* 21:105-106.
- [28] Palacios-Prü E.L., Miranda-Contreras L., Zambrano E., Mendoza R.V. (1994) “Cerebral implants of histotypic hypothalamic cultures” *Develop Neurosci* 16:9-16.
- [29] Rowe A.M., Brundage K.M., Barnett J.B. (2008) “Developmental immunotoxicity of atrazine in rodents” *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:139-145.
- [30] Bardullas U, Giordano M, Rodríguez VM. (2011) “Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat” *Neurotoxicol Teratol* 33:263-272.