

11281
41

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS

**CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS NEUROTÓXICOS DEL PLOMO
Y ARSÉNICO SOBRE LOS GANGLIOS BASALES DE LA RATA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta:

M. en C. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARIA MAGDALENA GIORDANO NOYOLA



2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial a mi directora de tesis, la Dra. María Magdalena Giordano Noyola, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su asesoría académica, su confianza, ayuda, acertados consejos y sincera amistad.

A los Drs. Alfonso Cárabez, Roberto Prado y María Esther Jiménez que como miembros del Comité Tutoral, aportaron valiosos comentarios y sugerencias para el desarrollo de este trabajo de tesis.

A la Q.F.B. Leticia Carrizales, Q.F.B. Leticia Dufour y Biol. Soledad Mendoza T. por su asesoría técnica en el procesamiento de muestras para absorción atómica, cromatografía de líquidos y tareas de aprendizaje.

Al M. C. Fernando Alonso O. y a Víctor Hugo Pérez R. Por su incondicional ayuda técnica en el desarrollo de mi proyecto de tesis.

I also want to acknowledge with sincere gratitude to Dr. Debbie Cory-Slechta for gave me the chance to make a doctoral stay in her lab.

Al M.V.Z. José Martín García, encargado del bioterio del CNB, por las facilidades otorgadas.

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Plasticidad Neuronal del Centro de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. María Magdalena Giordano Noyola. Durante la realización de este trabajo la alumna contó con una beca para estudios de doctorado otorgada por el CONACYT, una beca complementaria otorgada por la dirección general de estudios de posgrado de la UNAM y la beca Fulbrigh-García Robles otorgada por la Comisión México-Estados Unidos para la realización de una estancia de investigación doctoral en la Universidad de Rochester, N.Y.

El jurado de examen estuvo integrado por los investigadores:

Dra. Alfonso Cárbab Trejo

Dra. María Magdalena Giordano Noyola

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dr. Fernando Díaz-Barriga Martínez

Dra. Luz María del Razo

Dra. María Esther Jiménez Cataño

Dr. Abel Santamaría

Dr. Raul G. Paredes Guerrero

Quienes con sus comentarios y sugerencias mejoraron la calidad de esta tesis.

DEDICATORIA

A mis Padres: **Pedro Rodríguez y Leonor Córdova**

Por su incondicional ayuda, cariño, respeto y tanto amor que en mi han depositado.

A mis hermanos: **Pedro Santiago, Norma Elizabeth, Marco Polo y José Juan**

Gracias muchachos por su apoyo, cariño pero sobre todo por su amistad

A mis sobrinos: **Elizabeth, Armando, Mónica, Mariana, Pedro Julián, Ronaldo, Cristina y Carmen Yulinia**

Por sus risas, bromas y locuras

A mis grandes amigos: **Claudia Padrón, Nora González, Lorena Loredó, Lynette Guerra, Adán Contreras, Fermín Cruz, Dra. Carrizales, Claudia Castillo, Paula Delia García, Adriana López, Claudia Pesina, Mona Thiruchelvam y a mis queridas chamucas Norma Sánchez, Ivett Medina y Lulú Lara.**

Por brindarme su amistad, apoyo, críticas y momentos inolvidables

A mis compañeros de laboratorio: **Juan, Claudia, Talina, Soledad, Fernando y Andrea**

Por su generosa amistad y por que siempre fue un placer trabajar con ustedes.

La ciencia tiene una característica maravillosa, y es que aprende de sus errores, que utiliza sus equivocaciones para reexaminar los problemas y volver a intentar resolverlos, cada vez por nuevos caminos.

Ruy Pérez Tamayo

Hay hombres que luchan un día y son buenos
Hay otros que luchan un año y son mejores
Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos
Pero hay los que luchan toda la vida
Esos son los imprescindibles

Bertolt Brecht

Abreviaturas

Ach	-	Acetilcolina
AchE	-	Acetilcolinesterasa
Ac Pb	-	Acetato de plomo
ACPD	-	Ácido trans-1-aminociclopentano-1-3-dicarboxílico
ADN	-	Ácido desoxirribonucleico
AK	-	Ácido kainico
AMPA	-	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-ioxizol-4 propiónico
AP4	-	1-2-amino-4-fosfonobutirato
As	-	Arsénico
A3-NP	-	Ácido 3-nitropropiónico
COMT	-	Catecol orto metil transferasa
C-Pu	-	Caudado-Putamen
DA	-	Dopamina
DCAA	-	Descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos
DE 15	-	Día de desarrollo embrionario 15
DP 1	-	Día posnatal 1
DOPA	-	2,3-dihidroxifenilamina
DOPAC	-	Ácido 3,4 dihidroxifenilacético
E	-	Epinefrina
GABA	-	Ácido Gama amino butírico
GB	-	Ganglios basales
Gpe	-	Globo pálido externo
HVA	-	Ácido homovanílico
MAO	-	Monoamino oxidasa
MHPG	-	3- metoxi-4- hidroxifenilglicol
MK-801	-	Maleato de dizocilpina
MPTP	-	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropidirin
NAcc	-	Núcleo accumbens
NAD	-	Difosfato de adenina
NE	-	Norepinefrina
NMDA	-	N-metil-D-aspartato
NST	-	Núcleo subtalámico
PARS	-	PoliADPRibosa sintetasa
Pb	-	Plomo
SAM	-	S-adenosil metionina
SNC	-	Sistema nervioso central
SNc	-	Sustancia nigra pars compacta
SNP	-	Sistema nervioso periférico
SNr	-	Sustancia nigra pars reticulata
VMA	-	Ácido 3-metoxi-4-hidroxi-mandélico
VTA	-	Área ventral tegmental
5-HIAA	-	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	-	Serotonina

Índice

ÍNDICE	1
RESUMEN	4
SUMMARY	5
I. INTRODUCCIÓN	6
II. ANTECEDENTES.....	7
A. ARSÉNICO.....	9
B. PLOMO	11
C. INTRODUCCIÓN AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	13
1. Generalidades.....	13
2. Ganglios basales (GB)	14
a. Estriado.....	14
b. Núcleo accumbens.....	16
c. Globo pálido.....	18
d. Sustancia nigra	19
e. Núcleo subtalámico.....	20
f. Neurotransmisores y neuromoduladores de los ganglios basales.....	20
g. Funciones de los ganglios basales.....	28
3. Efectos de la exposición a As y Pb en el sistema nervioso.....	32
a. Efectos del As en el sistema nervioso.....	32
b. Efectos del Pb en el sistema nervioso.....	33
c. Efectos del arsénico y plomo en los ganglios basales	34
III. JUSTIFICACIÓN.....	36
IV. HIPÓTESIS	37
V. OBJETIVOS	39
OBJETIVO GENERAL.....	39
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	41
SUJETOS.....	41
MATERIALES	41
MÉTODOS ESTADÍSTICOS	41
A. INTOXICACIÓN CON ARSENITO DE SODIO.....	43
1. EXPERIMENTO I.....	43
EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA NEUROTÓXICA DEBIDO A LA EXPOSICIÓN CON TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ARSENITO DE SODIO DURANTE DOS SEMANAS EN RATAS.	43

a. Método general	43
b. Resultados	46
c. Discusión de resultados	52
2. EXPERIMENTO II	54
EVALUACIÓN CONDUCTUAL DE LA RATA ALBINA Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MONOAMINAS DURANTE LA INTOXICACIÓN CON ARSENITO DE SODIO DURANTE CUATRO SEMANAS	54
a. Método general	54
b. Resultados	56
c. Discusión de resultados	60
3. EXPERIMENTO III	63
EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA INTOXICACIÓN CON ARSENITO DE SODIO EN LA RATA EN DESARROLLO Y EN LA EDAD ADULTA.	63
a. Método general	63
b. Resultados	65
c. Discusión de resultados	68
4. CONCLUSIONES GENERALES DE LA INTOXICACIÓN CON ARSENITO DE SODIO	70
B. INTOXICACIÓN CON ACETATO DE PLOMO	71
1. EXPERIMENTO I	71
EFECTOS DE LA INTOXICACIÓN CON ACETATO DE PLOMO SOBRE TAREAS CONDUCTUALES Y CONTENIDO DE MONOAMINAS EN LA RATA ALBINA.	71
a. Método general	71
b. Resultados	73
c. Discusión de resultados	81
2. EXPERIMENTO II	83
EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AL ACETATO DE PLOMO (AC Pb) SOBRE LA LIBERACIÓN DE DOPAMINA EN EL NÚCLEO ACCUMBENS DE LA RATA.	83
a. Método general	83
b. Resultados	83
c. Discusión de resultados	85
3. CONCLUSIONES GENERALES DE LA EXPOSICIÓN A ACETATO DE PLOMO	87
VII. CONCLUSIONES GENERALES DEL ESTUDIO	88
VIII. REFERENCIAS	90
APÉNDICES	103
APÉNDICE 1	103
ACTIVIDAD LOCOMOTORA ESPONTÁNEA	103
APÉNDICE 2	104
EVALUACIÓN NEUROLÓGICA	104
Evaluación sensorial	105
Evaluación Motora	105
APÉNDICE 3	107
CONDUCTA ALIMENTICIA	107
APÉNDICE 4	107

LABERINTO DE OCHO BRAZOS	107
APÉNDICE 5.....	111
LABERINTO EN T	111
Alternancia espontánea.....	112
Alternancia retardada.....	112
APÉNDICE 6.....	113
ANÁLISIS DE MONOAMINAS Y SUS METABOLITOS.....	113
APÉNDICE 7.....	113
BATERÍA DEL DESARROLLO Y CONDUCTA MATERNA.....	113
Apertura de oídos y párpados.....	114
Reflejo de enderezamiento.....	114
Giro en su propio eje.....	114
Reflejo de enderezamiento en la caída.....	114
Fuerza en las extremidades.....	114
Geotaxis negativa.....	115
Conducta materna.....	115
APÉNDICE 8.....	115
REGISTRO ELECTROQUÍMICO.....	115
Preparación de electrodos de trabajo.....	115
CALIBRACIÓN DEL ELECTRODO DE TRABAJO.....	116
Preparación de la micropipeta.....	117
APÉNDICE 9.....	118
DETERMINACIÓN DE PLOMO Y ARSÉNICO.....	118
Determinación plomo.....	118
Determinación de arsénico.....	119

Resumen

El arsénico (As) y el plomo (Pb) se encuentran ubicuamente en el medio ambiente o son liberados a él mediante actividades relacionadas con la minería, el uso de pesticidas, gasolinás u otras fuentes antropogénicas. Se ha reportado la disminución de la liberación de dopamina y sus metabolitos en estriado de ratas expuestas a un residuo minero con alto contenido de As y Pb. Alteraciones similares se han encontrado en el contenido de monoaminas del estriado, mientras que estudios del comportamiento muestran alteraciones en la actividad locomotora y deficiencias en una tareas de tipo operante de ratas y ratones expuestos a As o Pb.

Para caracterizar las alteraciones del comportamiento inducidas por la exposición a As o Pb, se hicieron cinco experimentos. Probamos el efecto de la concentración, tiempo de exposición y edad de la exposición a As y Pb, en una serie de baterías de comportamiento, contenido de monoaminas y metales en cerebro o sangre. Las ratas expuestas a As o Pb muestran disminuida o aumentada la actividad locomotora, respectivamente. Las ratas expuestas durante más de 15 días a As, muestran mayor número de errores en la tarea de alternancia retardada. El contenido de monoaminas y sus metabolitos en el estriado, mesencéfalo y corteza de animales expuestos a As o Pb. Las alteraciones en la tarea de alternancia retardada, actividad locomotora y contenido de monoaminas en estriado indican que los ganglios basales son estructuras sensibles a la exposición de As o Pb.

Summary

Arsenic (As) and lead (Pb) are found ubiquitous in environment or released to it from mining activities, uses of pesticides, gasoline, among other anthropogenic sources. It has been reported that dopamine release and its metabolites decrease in the striatum of rats after ingestion of a mining waste with high content of both As and Pb. Similarly, alterations in the content and release of catecholamines in striatum, and other cerebral regions in mice and rats exposed to As or Pb have been reported. Studies about behavioral alterations after intoxication with As or Pb, have reported alterations in locomotor activity and learning deficits.

To further characterize the behavioral alterations induced by As or Pb exposure, five experiments were done. We tested the effect of dose, time and age of exposure to As or Pb in a series of behavioral batteries, monoamines, arsenic or lead content in brain or blood. Rats exposed to arsenic or lead showed decreased or increased locomotor activity, respectively. Rats exposed to As during more than 15 days showed significantly more errors during a delayed alternation task. Monoamines or its metabolites content in striatum, midbrain and cortex were altered in animals exposed to As or Pb.

We found that As and Pb exposure results in behavioral alterations which are related to dose, time of exposure, age, and the experimental conditions of the animals during exposure. These changes in the delayed alternation task, locomotor activity and monoamines content in striatum, support the idea of basal ganglia as a target of metals exposure.

I. Introducción

Los compuestos de plomo (Pb) y arsénico (As) se encuentran en el medio ambiente o bien son liberados por actividades industriales relacionadas principalmente con la minería, fundidoras, gasolinas, entre otras. Estos compuestos son de importancia por sus efectos tóxicos a nivel cerebral (Bahiga *et al.*, 1978).

En el cerebro, los ganglios basales son estructuras relacionadas con diversas actividades como son el control del movimiento, la memoria y el aprendizaje que parecen ser particularmente vulnerables a la acción de As y Pb. Pocos estudios se han hecho para evaluar los efectos neuroconductuales de la exposición al As, entre los que se ha encontrado alteraciones en la actividad locomotora como son el aumento con una dosis baja (3 mg/kg de peso) y disminución por una dosis alta (10 mg/kg de peso) de trióxido de arsénico (Itoh *et al.*, 1990). También se han descrito alteraciones en aprendizaje de tareas operantes (Itoh *et al.*, 1990; Nagaraja and Desiraju, 1994). Una amplia variedad de estudios han mostrado cambios conductuales después de la exposición a acetato de plomo en tareas de condicionamiento operante (Cohn *et al.*, 1993; Cory-Slechta *et al.*, 1985). Se ha reportado que en ratas tratadas con Pb o As se altera el metabolismo de monoaminas y sus metabolitos en diferentes regiones cerebrales, el estriado entre ellas (Kala and Jadhav, 1995a; Mejía *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1998; Tripathi *et al.*, 1997; Zuch *et al.*, 1998).

Para una caracterización más específica de las alteraciones neuroconductuales inducidas por la exposición a As, se evaluaron diferentes grupos de ratas macho Sprague-Dawley (7-8 ratas por grupo), tratadas con vehículo (agua desionizada), 5, 10 ó 20 mg As/kg como arsenito de sodio durante 15 días y 30 días y un grupo expuesto a una ingestión aproximada 36.70 mg As/L de agua desde el destete hasta la edad adulta. Se encontró que las alteraciones en tareas conductuales y de contenido de monoaminas producidas por la exposición a As dependen de la concentración, del tiempo de exposición y de las condiciones experimentales a las que se encuentra sometido el animal durante la exposición a este metaloide.

Después de la evaluación en tareas semejantes a las descritas para la intoxicación con As, en los animales intoxicados con acetato de plomo se encontró un aumento en la

actividad locomotora espontánea lo cual se correlacionó con los niveles aumentados de dopamina en estriado y en mesencéfalo en los grupos de ratas tratadas con 50 ó 150 mg Ac Pb/L de agua de bebida durante 4 meses. También se observó una tendencia a aumentar el tiempo de recambio de dopamina en el núcleo accumbens de ratas expuestas a 150 mg Ac Pb/L de agua de bebida durante 17 meses.

Como antecedentes de este estudio describiremos inicialmente a los metales y los efectos tóxicos generales de la exposición a As y a Pb. Posteriormente se relata brevemente al sistema nervioso, estructuras, neuroquímica y funciones de los ganglios basales. Finalmente mostramos los efectos de la exposición a As y Pb en los ganglios basales.

II. Antecedentes

Los metales difieren de otras sustancias tóxicas en que no pueden ser creados ni destruidos. Aunado a esto, la amplia utilización de metales por los seres humanos aumentan los efectos en salud de dos maneras: primero, por el transporte al medio ambiente, es decir por la contribución antropogénica al aire, agua, suelo y alimentos y segundo, por la alteración de la especiación y la forma bioquímica del metal (Citado en Goyer, 1991).

Ruta de transporte de metales

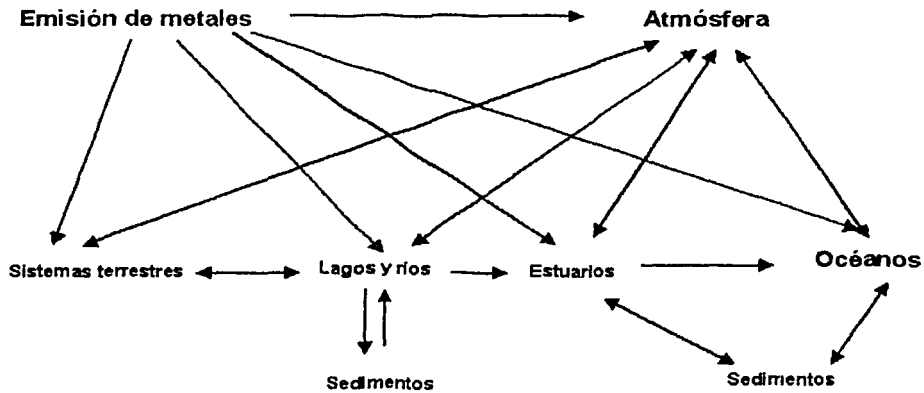


Figura I. Ciclo geológico de los metales

Los metales son redistribuidos naturalmente en el medio ambiente por ciclos biológicos y geológicos. El transporte de metales se ven relacionado con el agua de lluvia, la cual disuelve las rocas y minerales, y físicamente transporta el material hacia riachuelos y ríos, adicionándole o quitándole sustancias al suelo adyacente, las cuales eventualmente llegarán al océano para ser precipitados como sedimentos o evaporados para posteriormente relocalizarse en cualquier parte de la tierra mediante el agua de lluvia. Los ciclos biológicos incluyen la bioconcentración por las plantas y los animales, con la consecuente incorporación en los ciclos alimenticios. Los ciclos naturales pueden exceder a los ciclos antropogénicos, como es el caso del mercurio, ya que este metal se incorpora en el ciclo alimenticio en donde es metilado por algunos organismos aumentando considerablemente su toxicidad. La actividad industrial humana puede disminuir el tiempo de estancia de los metales en su estado natural ya que con su extracción y formación de nuevos compuestos se aumenta su distribución ambiental a nivel mundial. Un ejemplo de la actividad humana en la redistribución de los metales es demostrado por el incremento en el contenido de Pb en el hielo de Groelandia, iniciando con un nivel bajo (cerca del 800 a.C.), continuando con un incremento gradual en el contenido de Pb en el hielo a través de la evolución de la edad industrial, seguido de un aumento precipitado en el periodo en que se adiciono Pb a las gasolinas (aproximadamente 200 veces) (Ng and Patterson, 1981). De esta manera, la contaminación en el medio ambiente refleja tanto el aporte por fuentes naturales, así como también la contribución debida a la actividad industrial.

Cerca del 80 % de los elementos de la tabla periódica son metales o metaloides, algunos de estos son de importancia biológica como el sodio (Na), el potasio (K), el calcio (Ca), fierro (Fe), entre otros. Algunos elementos como el cadmio (Cd), mercurio (Hg), talio (Ta), arsénico (As) y plomo (Pb) son tóxicos, siendo estos dos últimos elementos de especial interés por su amplia distribución en el medio ambiente y por sus múltiples efectos tóxicos. A Hipócrates en el año 370 a.C. se le da el crédito de la primer descripción de cólico abdominal en un hombre que extraía metales. En cuanto al uso del Pb, probablemente se inicio antes del año 2000 a.C. cuando importantes cantidades de este metal se obtenían de rocas con alto contenido en minerales o como productos secundarios al fundido de la plata (Ag); entre los siglos XIV y XVII el acetato de plomo se

utilizó como endulzante de vinos. El metaloide As fue citado por primera vez por Teofrasto de Erebos (387-372 a.C.) y Plinio el Viejo (23-79 d.C.). Se obtenía durante el fundido del cobre y el estaño, siendo usado por los antiguos egipcios para la decorar sus tumbas. Mientras que en la Europa de la edad media y el renacimiento se utilizó como veneno con fines homicidas (Goyer, 1991; Schäfer *et al.*, 1999).

En los humanos la exposición a compuestos del As afectan a los sistemas cardiovascular y nervioso; tracto gastrointestinal, piel, sangre, hígado además de causar cáncer y poseer efectos teratogénicos. Mientras que la exposición a compuestos del Pb muestran alteraciones gastrointestinales, renales, hematológicas, neuromusculares y alteraciones en el sistema nervioso (Klaassen, 1996).

Dentro de los efectos encontrados en el sistema nervioso debido a la exposición a compuestos de Pb o As, se encuentran: Encefalopatía, hemiplejía, disminución del coeficiente intelectual, cambios mentales (intoxicación con Pb), polineuropatía periférica y neuritis óptica (intoxicación con As) (Bahiga *et al.*, 1978; Bolla-Wilson and Bleecker, 1987a; Press, 1985; Sundstrom *et al.*, 1985; Winder *et al.*, 1983).

En el cerebro, los ganglios basales parecen ser particularmente vulnerables a la acción de As y Pb, como lo muestran varios estudios en los cuales se observa alterada la conducta, el contenido y la liberación de neurotransmisores de roedores expuestos a estos metales (Cory-Slechta, 1997; Govoni *et al.*, 1979; Goyer, 1991; Itoh *et al.*, 1990; Luthman *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1999; Mejía *et al.*, 1997; Nagaraja and Desiraju, 1994; Rodríguez *et al.*, 1998; Shailesh Kumar and Desiraju, 1990; Zuch *et al.*, 1998).

A. Arsénico

El As es un elemento que se encuentra presente en la naturaleza formando compuestos orgánicos o inorgánicos, también es liberado al medio ambiente de fuentes como la fundición de metales, residuos de la industria minera, manufactura de vidrio, chips de computadora, semiconductores y en la producción de pesticidas, herbicidas y otros productos agroquímicos (Goyer, 1991; Klaassen, 1996). Algunos arsenicales son usados como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades como la tripanosomiasis (Harrison *et al.*, 1997) y la leucemia promielocítica aguda

(Look, 1998). También existen algunos reportes en los cuales se ha considerado al As como un micronutriente. Se ha reportado que este metaloide juega un papel importante en la conversión de la metionina a sus metabolitos taurina, metilos lábiles y poliaminas (Nielsen, 1991; Uthus, 1990), además que puede ser necesario en el metabolismo y eficiente utilización del zinc (Nielsen *et al.*, 1980). Se ha reportado de 25 a 50 ng As/g de alimento como los requerimientos diarios para el crecimiento de ratas, pollos, hámsteres y cabras (Levine *et al.*, 1988).

La exposición oral a As se presenta principalmente a través del consumo de alimentos contaminados como los productos marinos en los cuales se encuentran presentes las especies orgánicas del As como: la arsenocolina y la arsenobetaina las cuales dan lugar a concentraciones aumentadas de As en sangre (Edmonds and Francesconi, 1987; Foa *et al.*, 1984; Schäfer *et al.*, 1999; Yamauchi *et al.*, 1992). Ya que el As se puede encontrar tanto en agua, como en suelos en diversas regiones del mundo, la exposición por vía oral a este metaloide puede deberse a estas fuentes. La exposición por vía respiratoria se presenta como resultado de la exposición ocupacional en el manejo de pesticidas en la agricultura como también en actividades de la industria minera (Goering *et al.*, 1999; Goyer, 1991; Schäfer *et al.*, 1999).

La exposición a As por vía oral se ha relacionado principalmente con cáncer de riñón, hígado y piel, mientras que la exposición por vía respiratoria se ha ligado a cáncer de pulmón. La neuropatía periférica y los desordenes vasculares como la enfermedad del pie negro (Blackfoot disease), la cual produce gangrena de las extremidades inferiores se han asociado a la exposición oral a As (Chen and Wang, 1990; EPA, 1984; Yu, 1999). Recientemente se han reportado alteraciones en el sistema nervioso central (SNC) como consecuencia a la exposición a As (Bolla-Wilson and Bleecker, 1987b; Frank, 1976; Morton and Caron, 1989), aunque han recibido menos atención que la participación en cáncer, genotoxicidad o los desordenes celulares.

El As puede encontrarse en dos estados de oxidación, trivalente y pentavalente y de éstos dependen su reactividad y sus efectos tóxicos, ya que el arsenato (As V) es un agente desacoplante de la fosforilación oxidativa y el arsenito (As III) inactiva los grupos sulfhidrilo de enzimas, además de ser la forma más reactiva. El mecanismo de acción de los arsenatos se relaciona con la sustitución competitiva del arsenato por un fosfato

inorgánico en la formación del trifosfato de adenosina, con la consecuente formación de un éster inestable arsenato, el cual es rápidamente hidrolizado (proceso conocido como arsenólisis). Por otro lado, los arsenitos inhiben muchas enzimas ya que reaccionan con ligandos biológicos que contienen grupos sulfhidrilo disponibles, por lo tanto son más tóxicos que los arsenatos. El arsenito inhibe la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, la piruvato deshidrogenasa, entre otras enzimas, lo que afecta el metabolismo de los carbohidratos.

El As puede incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, los cuales dañan al ácido desoxirribonucleico (ADN), y estimula la actividad de la enzima PoliADPribosa sintetasa (PARS), implicada en la reparación del ADN, señales de transducción y apoptosis. La PARS es una enzima nuclear que utiliza difosfato de adenina (NAD) como sustrato para unir subunidades de ribosa a las proteínas nucleares y enzimas relacionadas con el metabolismo del ADN. La activación de la PARS agota el NAD y el adenosin trifosfato (ATP) de la célula, ya que se consumen cuatro moléculas de ATP en la regeneración de NAD, resultando en disminución de energía y la consecuente muerte celular (Lynn *et al.*, 1998).

Por otro lado, en estudios *in vitro* de cultivo de neuronas de la raíz del ganglio dorsal y estudios de crecimiento de neuritas y mielinización, se demostró que el As produce inhibición del crecimiento de las neuritas en un 50 % cuando se usa una concentración de 9.6×10^{-6} M (Windebank, 1986).

B. Plomo

El Pb es un metal pesado, de color grisáceo, que presenta un aspecto brillante al corte, pero se oxida rápidamente tomando un aspecto mate. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo el sulfuro de Pb su forma de presentación más frecuente (Villanueva Cañadas, 1992).

Ahora bien, sus usos han sido muy variados ya que desde la antigüedad, los griegos describieron los efectos de la intoxicación por Pb y algunos investigadores atribuyen la caída del imperio romano a la intoxicación plúmbica, por la utilización de utensilios de cocina fabricados con Pb, en donde almacenaban alimentos y bebidas. En la Edad

Media, se usó el acetato de plomo (azúcar de plomo o sal de Saturno) como endulzante de vinos. En épocas recientes, otros compuestos del Pb se han usado como colorantes de pinturas de interiores y exteriores de viviendas, hospitales y edificios públicos, lápices de colores, cerámica vidriada y en tintes del cabello de uso diario, agente antidetonante en gasolinas, insecticidas, adornos metálicos, baterías (plomo-ácido) usadas en camiones, autos, botes, soldadura de plomo en latas de alimentos y tuberías de agua, en la medicina popular (azarcón), entre muchos otros (Goyer, 1991; Mielke, 1999).

Las vías de exposición al Pb son principalmente respiratoria y gastrointestinal (comida y bebida contaminadas en el proceso de producción o almacenamiento), ya que la vía percutánea es relativamente insignificante.

En el ámbito mundial se ha calculado la ingestión de Pb en 200 - 300 ug/L aproximadamente por individuo por día, la cual varía entre regiones. Los procesos de absorción varían dependiendo de la edad del individuo, siendo muy susceptibles los niños en edades tempranas (2-5 años), lo cual se ha relacionado con la ingestión de tierra y material contaminado con polvo (conducta mano-boca) y mayor absorción intestinal en niños (Schäfer *et al.*, 1999).

Entre los mecanismos celulares que se consideran responsables de la toxicidad del Pb están: la competencia con el calcio por sitios en proteínas de unión de calcio y en la recaptura por mitocondrias (Goyer, 1995). En consecuencia, el Pb inhibe la liberación de neurotransmisores e interfiere con la regulación del metabolismo celular al unirse a canales, bombas Na/Ca ATP e inhibe la formación del grupo hemo, lo que resulta en disminución de la concentración de citocromos pertenecientes a la cadena mitocondrial y anemia (Clarkson, 1987; Kaminsky *et al.*, 1993). Entre las manifestaciones neurotóxicas de niños expuestos a Pb se han reportado las siguientes: alteraciones en el procesamiento del lenguaje, de la atención, del desarrollo motor, hiperactividad y disminución del coeficiente intelectual. Se ha descrito una relación inversa entre los niveles de Pb en dentina y el coeficiente intelectual (Bellinger *et al.*, 1987; Needleman *et al.*, 1979).

C. Introducción al sistema nervioso central

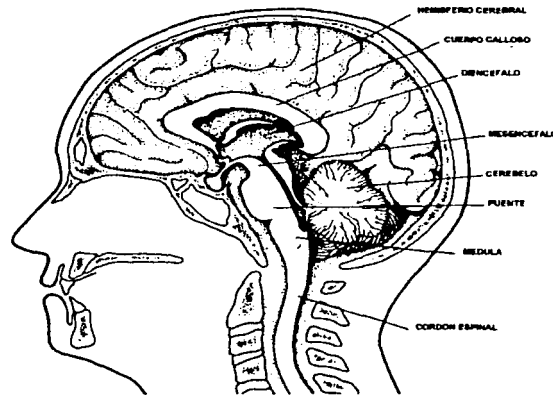


Figura II. Sistema nervioso central

1. Generalidades

El sistema nervioso está dividido en dos partes: el sistema nervioso central (SNC) formado por el cerebro y el cordón espinal, y el sistema nervioso periférico (SNP) compuesto de los nervios craneales y los nervios espinales que entran (fibras aferentes) o que salen (fibras eferentes) del cerebro y el cordón espinal. El SNC integra y procesa la información que recibe de los nervios periféricos y de los sistemas endócrino e inmune. Las emociones, pensamientos, control del movimiento, la regulación del sistema neuroendocrino, el sistema inmune y el sistema circulatorio están regulados por el sistema nervioso central (Mailman *et al.*, 1994).

Dentro del sistema nervioso central se encuentran diversas estructuras como la corteza, tálamo, tallo cerebral, cerebelo y los ganglios basales, los cuales desempeñan un papel clave en la planeación, inicio y ejecución de los movimientos (Marin *et al.*, 1998). Los ganglios basales se han relacionado con la memoria que implica

procesamiento automático (memoria de procedimiento), entre otras funciones (Squire and Knowlton, 1995).

2. Ganglios basales (GB)

Los principales componentes de los ganglios basales son: el cuerpo estriado (núcleos caudado-putamen C-Pu), el globo pálido, la sustancia nigra y el núcleo subtalámico (Albin *et al.*, 1989; Parent and Hazrati, 1995). Se han realizado diversos estudios enfocados a analizar la función del estriado en cuanto al procesamiento de la información. Debido a que dicha estructura recibe inervación de todas las áreas de la corteza y a que sus eferencias son menores en número, se ha postulado que el estriado, con esa convergencia, sea un sistema integrador de la información.

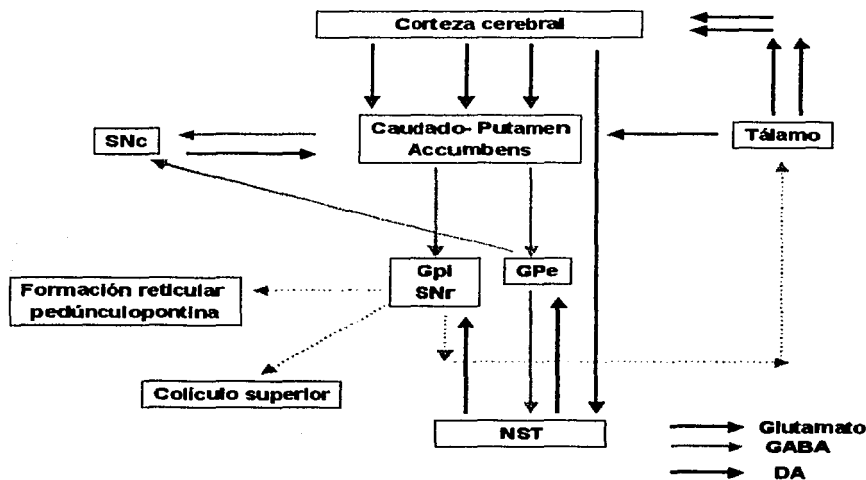


Figura III. Sistemas de conexión de los ganglios basales

a. Estriado

El cuerpo estriado o estriado se divide en estriado dorsal y estriado ventral, el primero incluye una gran porción dorsal del estriado (caudado-putamen) mientras que el

segundo se compone del accumbens, el tubérculo olfatorio y la porción ventral del estriado dorsal (Heimer *et al.*, 1995).

El estriado dorsal es la parte principal del caudado-putamen (C-Pu). Recibe entradas de la neocorteza y está limitado medialmente por el ventrículo lateral, el núcleo de la cama de la estría terminal y el globo pálido. La parte ventral y la parte medial del estriado reciben aferencias de la allocorteza (hipocampo), del área ventral tegmental y de la amígdala, del tubérculo olfatorio y del accumbens (Groenewegen *et al.*, 1987; McGeorge and Faull, 1989).

El estriado está organizado en dos compartimientos celulares, los estriosomas y la matriz: los primeros se tiñen débilmente con acetilcolinesterasa (AChE) y se encuentran inmersos en la matriz la cual se tiñe fuertemente con AChE (Gerfen, 1984; Graybiel, 1983; Graybiel and Moratalla, 1989). Las neuronas del estriosoma y de la matriz pueden diferenciarse con base en sus aferencias y eferencias, ya que los estriosomas reciben aferencias desde la capa profunda 5 y de la capa 6 de la corteza, proyectando hacia la sustancia nigra pars compacta (la fuente del sistema nigroestriatal dopaminérgico). Mientras que las neuronas de la matriz reciben aferencias desde las capas superficial y supragranular de las áreas corticales sensorio-motoras, y proyectan hacia la sustancia nigra pars reticulata (la aferente nigrotalámica no dopaminérgica) (Gerfen, 1989). La organización parche-matriz es más evidente en el caudado-putamen, extendiéndose a los sectores dorsomediales y dorsolaterales, no incluyendo al estriado ventral.

Organización intrínseca del estriado

El estriado, como la mayoría de los núcleos cerebrales, está compuesto de neuronas de proyección (células Golgi tipo I) e interneuronas locales (células Golgi tipo II). La proporción de neuronas-interneuronas en el estriado de rata es 9:1 y en el de los primates es de 3:1 (Graveland and DiFiglia, 1985). Las neuronas de proyección del estriado también llamadas neuronas espinosas medianas tienen un cuerpo de tamaño medio (12-20 μm de diámetro) del cual nacen 4 a 5 dendritas primarias, casi todas poseen ácido gamma amino butírico (GABA) como neurotransmisor, pero también coexpresan diferentes péptidos neuroactivos (sustancia P, encefalina, dinorfina y neurotensina). La neurona espinosa mediana es el principal elemento integrador del

estriado ya que procesa la información de aferentes locales y extrínsecas y la proyecta fuera del estriado (Parent and Hazrati, 1995).

Según Kawaguchi et al., (1995), se han identificado cuatro clases de interneuronas usando métodos citoquímicos, fisiológicos y morfológicos:

- 1) Interneuronas colinérgicas grandes, poseen un diámetro de 20 a 50 μm , reciben entradas del núcleo parafascicular del tálamo, tienen colaterales axónicas diseminadas principalmente en la matriz, poseen sinapsis simétricas, muestran un disparo tónico irregular *in vivo*.
- 2) Interneuronas GABAérgicas que contienen parvalbúmina y una proteína unidora de calcio, tienen diámetro mediano (10-25 μm), reciben entradas de la corteza, sus colaterales axónicas son densas y concentradas cerca del campo dendrítico, tienen sinapsis simétricas y uniones en hendidura entre sí, muestran disparos abruptos repetitivos y espigas de corta duración.
- 3) Interneuronas GABAérgicas que contienen calretinina, tienen diámetro mediano (7-20 μm) y posiblemente tengan sinapsis simétricas.
- 4) Interneuronas que contienen somatostatina, NADPH-diaforasa, NOS y quizás también usen GABA. Su diámetro es mediano (12-35 μm), reciben entradas de la corteza, sus colaterales axónicas están diseminadas y se encuentran principalmente en la matriz, sus sinapsis son simétricas, generan espigas de bajo umbral y su depolarización es persistente.

b. Núcleo accumbens

Es una estructura subcortical que forma parte de los ganglios basales, se localiza en el cerebro de la rata por debajo del caudado-putamen rostral y comparte con el estriado su patrón de aferentes (corteza cerebral, núcleos talámicos intralaminares y células dopaminérgicas mesencefálicas) y su anatomía neuroquímica (Heimer *et al.*, 1995; Meeker *et al.*, 1998).

El núcleo accumbens recibe aferentes del área ventral tegmental, amígdala basolateral, hipocampo (subíulum ventral) y corteza prefrontal (principalmente región prelímbica) y proyecta a estructuras palidales y nigrales, y a otras estructuras

subcorticales, incluyendo el núcleo de la cama de la estría terminal, séptum, región preóptica y el hipotálamo lateral (Nauta *et al.*, 1978).

Záborszky *et al.*, (1985) reconocieron en el accumbens un cuerpo central, el cual envuelve el extremo anterior de la comisura anterior y una cubierta, la cual rodea el cuerpo central en sus lados medial, ventral y lateral. Otros autores también han reportado esta dicotomía cuerpo-cubierta con base en la distribución de sustancias neuroactivas, receptores, citoarquitectura, organización sináptica, metabolismo de DA, respuestas electrofisiológicas, así como también con base en la vulnerabilidad a retos neurotóxicos con 6-hidroxidopamina y ácido iboténico (Revisado en Heimer, 1995). Es importante notar que el cuerpo y la cubierta son sólo aparentes en las tres cuartas partes caudales del núcleo accumbens. En el cuarto rostral (llamado polo rostral) el patrón de conexiones aferentes y eferentes reflejan una mezcla del cuerpo y la cubierta.

El accumbens posee una infraestructura compartamental de parche y matriz distinta en el cuerpo, cubierta y el polo rostral. Los parches, están presentes en la cubierta y el polo rostral y se encuentran alineados en la periferia del cuerpo del núcleo accumbens (Heimer *et al.*, 1995).

El núcleo accumbens recibe una extensa entrada glutamatérgica de la corteza prefrontal, amígdala basolateral e hipocampo; estas entradas son excitadoras y terminan principalmente en las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas de proyección (Schmidt and Kretschmer, 1997). Las cortezas ventral prelímbica, peduncular dorsal, infralímbica y piriforme posterior proyectan predominantemente a la cubierta medial, mientras que la corteza dorsal prelímbica, agranular, insular dorsal, del cíngulo anterior y perirrinal envían proyecciones abundantes al cuerpo del accumbens (Brog *et al.*, 1993).

El sistema dopaminérgico mesolímbico consiste de cuerpos celulares en el área ventral tegmental (VTA) y tiene proyecciones axonales ascendentes al núcleo accumbens, las cuales juegan un papel importante en la generación de comportamientos motivados. La proyección dopaminérgica ascendente de la VTA al accumbens no sólo se encuentra en estrecha oposición a la entrada glutamatérgica, sino que también forma contactos sinápticos en las mismas células intrínsecas, sugiriendo una posible

interacción entre la dopamina (DA) y el glutamato a nivel de las neuronas del accumbens, modulando su actividad (Brudzynski and Gibson, 1997).

Estructuras de salida de los ganglios basales

Los ganglios basales influyen sobre otros sistemas neuronales a través de dos de sus principales estructuras de salida, el globo pálido interno (Gpi) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr). Ambas estructuras proyectan masivamente a relevos talámicos específicos, el núcleo ventral anterior (VA) y el núcleo ventral lateral (VL), los cuales proyectan de regreso a la corteza cerebral. Otras vías eferentes del Gpi incluyen proyecciones del núcleo parafascicular ventromedial y de la habénula a nivel diencefálico, así como también del núcleo tegmental pedúnculo pontino a nivel del tallo cerebral (Parent and Hazrati, 1995).

c. Globo pálido

El globo pálido en los primates constituye la parte más pequeña del núcleo lenticular. En toda su extensión, el globo pálido se encuentra situado medial al putamen y lateral a la cápsula interna. Una lámina interna subdivide al pálido en los segmentos interno y externo. Una lámina medular medial divide al globo pálido en segmentos medial, lateral y un segmento accesorio. La lámina medular accesorio, menos definida, divide el segmento medial del pálido en porciones externa e interna, las cuales dan origen a distintas fibras eferentes (Carpenter, 1994). En los roedores y otros no primates el segmento interno no existe, sino más bien un grupo de células llamado grupo nuclear entopeduncular, el cual se encuentra encajado entre las fibras de la cápsula interna (Heimer *et al.*, 1995).

Globo pálido ventral

El pálido ventral ocupa una área debajo de la comisura anterior, definida anteriormente como sustancia innominata. La extensión del pálido ventral en la parte profunda del tubérculo olfatorio es notoria en cortes horizontales en las cuales se

aprecian extensiones similares a dedos en la capa multiforme del tubérculo olfatorio (Heimer *et al.*, 1995).

La mayoría de las neuronas en el globo pálido dorsal son largas y fusiformes o triangulares con ramas dendríticas separadas, largas, gruesas y lisas que cubren distancias de 1 milímetro (DiFiglia and Arorin, 1982). Las neuronas pequeñas son raras (ya que se tiñen difícilmente). Típicamente, las neuronas palidales están encapsuladas por terminaciones sinápticas, por lo que una terminación está contigua a la siguiente. Algunos de estos botones parecen ser botones *en passage*, por lo que una sola entrada axonal puede envolver a una dendrita con múltiples contactos sinápticos, en un arreglo axodendrítico longitudinal (Heimer *et al.*, 1995).

Globo pálido externo (Gpe)

Se encuentra formando parte de un relevo indirecto del estriado a las estructuras de salida de los núcleos subcorticales. El efecto inhibitorio mediado por GABA, se considera esencial en el control del núcleo subtalámico. Por lo tanto, se considera al globo pálido externo como un elemento de control interno de los ganglios basales. Las células del globo pálido externo comparten las mismas características morfológicas y fenotípicas que las del globo pálido interno (Parent and Hazrati, 1995).

d. Sustancia nigra

Se localiza en la base del pedúnculo del mesencéfalo, se divide en una región dorsal rica en células dopaminérgicas, la sustancia nigra pars compacta (SNc) y una parte más ventral, sustancia nigra pars reticulata (SNr), la cual característicamente tiene menor densidad de cuerpos celulares (Heimer *et al.*, 1991).

Sustancia nigra pars reticulata

La SNr es muy similar en sus características histológicas al segmento interno del globo pálido, y así ambos representan la salida de los ganglios basales además de ser consideradas ambas como una sola entidad. La SNr contiene, como el globo pálido, neuronas largas con dendritas lisas (Heimer *et al.*, 1991).

Sustancia nigra pars compacta y área ventral tegmental

Las células dopaminérgicas en el mesencéfalo forman una continuidad que incluye a la SNC (grupo A9), una agregación celular (A10) medialmente localizada primariamente referida como área ventral tegmental y un grupo celular A8 en el área retrorubral (Heimer *et al.*, 1991).

e. Núcleo subtalámico

EL núcleo subtalámico (NST) ejerce una poderosa acción excitatoria sobre los núcleos de salida de los ganglios basales (el segmento interno del globo pálido, y la sustancia nigra pars reticulata). La lesión de este núcleo produce balismo, que se caracteriza por movimientos violentos, involuntarios, que se limitan al lado contralateral de la lesión (hemibalismo). El NST está unido al Gpe, en una de las asas que caracterizan la circuitería de los ganglios basales (Heimer, 1995; López Antúnez, 1995).

Con la tinción de Golgi, se han caracterizado las neuronas del núcleo subtalámico como una colección homogénea de neuronas poligonales o fusiformes con relación a sus delicadas dendritas, las cuales contienen pocas espinas (Heimer *et al.*, 1995).

f. Neurotransmisores y neuromoduladores de los ganglios basales

Los ganglios basales colectan señales neuroquímicas de la neocorteza y del sistema límbico, las integran y redistribuyen a la corteza frontal y el tallo cerebral. Estudios neuroquímicos han identificado neurotransmisores y neuromoduladores presentes en estos núcleos cerebrales, reportando la presencia de enzimas relacionadas con la biosíntesis, degradación, presencia de receptores y sitios de inactivación de estos compuestos, los cuales reflejan el papel dinámico de estos núcleos en la modulación del comportamiento y la memoria. Además, las alteraciones en los niveles de estos compuestos, se han relacionado con las enfermedades involucradas con los ganglios basales como son la corea de Huntington y la enfermedad de Parkinson (Graybiel, 1990).

Las principales aferentes a los ganglios basales vienen de la corteza y algunas del tálamo; estas aferentes son excitatorias y se cree que son de naturaleza glutamatérgica (o posiblemente aspartérgica). Dentro de los ganglios basales, el neurotransmisor predominante es el aminoácido inhibitorio GABA. Muchas de las neuronas del estriado, pálido y de la sustancia nigra pars reticulata son GABAérgicas. Las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas forman dos vías paralelas, la vía directa y la indirecta, las cuales van del estriado a los núcleos de salida de los ganglios basales, el segmento interno del globo pálido y la sustancia nigra pars reticulata. La vía directa consiste de las neuronas estriatales GABAérgicas, las cuales proyectan directamente a las neuronas eferentes GABAérgicas de la capa interna del globo pálido y la sustancia nigra pars reticulata. De esta manera esta vía posee dos sinapsis inhibitorias (del estriado al segmento interno del globo pálido y la sustancia nigra pars reticulata). Se postula que esta vía es la responsable de la desinhibición de la entrada talámica glutamatérgica a las áreas sensoriales, motoras y de asociación de la corteza. La vía indirecta incluye la proyección GABAérgica del estriado a la capa externa del globo pálido. El segmento externo del globo pálido contiene neuronas GABAérgicas que inervan el núcleo subtalámico. Las neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico proyectan al segmento interno del globo pálido. De esta manera la vía indirecta posee tres sinapsis inhibitorias (del estriado a globo pálido; del segmento externo del globo pálido al núcleo subtalámico; de la capa interna del globo pálido al tálamo), las cuales resultan en una inhibición neta de las conexiones excitatorias tálamo-corticales. Las neuronas en el tálamo completan el asa de retroalimentación, ya que envían sus fibras a la corteza. Además, las neuronas colinérgicas intraestriatales y la inervación dopaminérgica por la sustancia nigra pars compacta al estriado se encuentran entre los moduladores más importantes del circuito de los ganglios basales (Graybiel, 1990; Kopin, 1994).

Las neuronas de los ganglios basales, además de poseer un neurotransmisor principal coexisten con neuropéptidos en diferentes combinaciones, lo que permite diferenciar distintas vías estriatales de salida. Se ha reportado que el globo pálido externo, es rico en encefalina y neurotensina, el globo pálido interno es rico en sustancia P y dinorfina y el pálido ventral posee una mezcla de estas fibras peptidérgicas (Graybiel, 1990).

Aminoácidos neurotransmisores

Los aminoácidos neurotransmisores se han dividido en dos principales clases: los aminoácidos excitadores (ácido glutámico, ácido aspártico, ácido cistéico y ácido homocistéico) los cuales despolarizan las neuronas, y los aminoácidos inhibidores (ácido γ-aminobutírico, glicina, y β-alanina) que las hiperpolarizan.

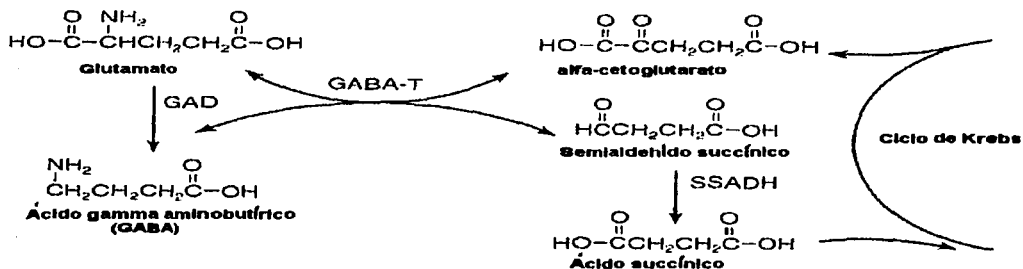


Figura IV. Metabolismo del ácido glutámico (glutamato) y del ácido γ aminobutírico (GABA)

Aminoácidos excitadores

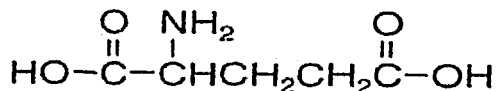


Figura V. Glutamato

Dentro de los aminoácidos excitadores, el ácido glutámico o glutamato y el ácido aspártico o aspartato se encuentran en altas concentraciones en el cerebro y ejercen un potencial estimulador muy importante de la actividad neuronal. El glutamato desempeña un papel muy importante en la desintoxicación del amoníaco en el cerebro, en la síntesis de proteínas y péptidos, incluyendo el glutatión, y es el precursor del GABA. El glutamato es sintetizado en las terminales nerviosas a partir de dos fuentes: ácido pirúvico el cual proviene de la glucosa utilizada en el ciclo de Krebs y de la transaminación del α-oxoglutarato con la consecuente producción de glutamato y de la glutamina, la cual es sintetizada en las células gliales, transportada a las terminales

semialdehído succínico, por lo que no puede ser reutilizado, ya que la glia no posee la enzima descarboxilasa del ácido glutámico. El GABA liberado se une a los receptores de este aminoácido presentes en la membrana pre y postsináptica, lo cual produce un cambio en la permeabilidad membranal, permitiendo la entrada de iones, principalmente cloro, en el receptor GABA_A. Este cambio en la permeabilidad al cloro conduce a la hiperpolarización de la neurona en caso de una neurona postsináptica o depolarización en caso de una neurona de inhibición presináptica (Cooper *et al.*, 1996; DeLorey and Olsen, 1994). Mientras que en el receptor GABA_B se encuentra acoplado a canales de Ca²⁺ o K⁺ vía sistemas de segundos mensajeros. La acción inhibitoria del receptor GABA_B parece estar mediada por el incremento en la conductancia a potasio o la disminución en la conductancia a calcio (Cooper *et al.*, 1996). Muchas de las neuronas GABAérgicas de los ganglios basales contienen neuropéptidos como la neurotensina, sustancia P o K y/o dinorfina (Kopin, 1994).

Monoaminas y sus metabolitos

Catecolaminas

Las monoaminas comprenden a las catecolaminas y a las aminas biogénicas entre las cuales la serotonina es de las más importantes. Las catecolaminas son compuestos orgánicos que contienen un núcleo catecol (un anillo de benceno con dos sustituyentes hidroxilo) y un grupo amino; dentro de este grupo se encuentran la DA, la adrenalina y la noradrenalina. Las catecolaminas son producidas en el cerebro, en células cromafines y en nervios simpáticos a partir de su aminoácido precursor, la tirosina. La tirosina se encuentra presente en la circulación sanguínea, de donde es capturada por la neurona. Dentro de la neurona, la tirosina hidroxilasa, enzima que requiere de tetrahidropteridina, oxígeno y hierro como cofactores, cataliza la conversión de tirosina a 2,3-dihidroxifenilalanina (DOPA). La hidroxilación de la tirosina es el paso limitante en la biosíntesis de las catecolaminas. La segunda enzima relacionada con la biosíntesis de catecolaminas es la dihidroxifenilalanina descarboxilasa, también llamada descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (DCAA), la cual requiere fosfato de piridoxal (vitamina B6) como cofactor y remueve el grupo carboxilo del DOPA con la

consecuente producción de DA. La DA, bajo la acción de la enzima dopamina β-hidroxilasa, produce la noradrenalina, utilizando oxígeno molecular y ácido ascórbico como cofactores. Finalmente, en la médula adrenal, bajo la acción de la feniletanolamina-N- metil transferasa y del donador de grupos metilos, la S-adenosilmetionina (SAM), la noradrenalina es metilada y convertida en adrenalina (Cooper *et al.*, 1996).

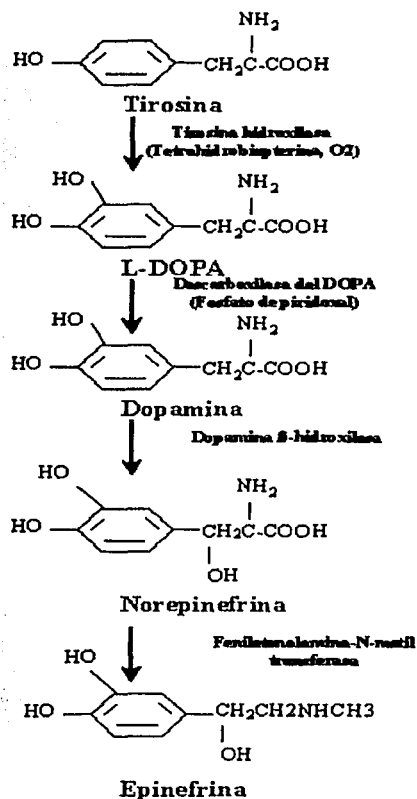


Figura VII: Metabolismo de las catecolaminas

Los receptores a DA son de dos tipos los de tipo D1 (D1 y D5), ligados a la estimulación de la adenilato ciclasa y los de tipo D2 (D2, D3 y D4), los cuales inhiben la activación de la adenilato ciclasa (Weiner and Molinoff, 1994).

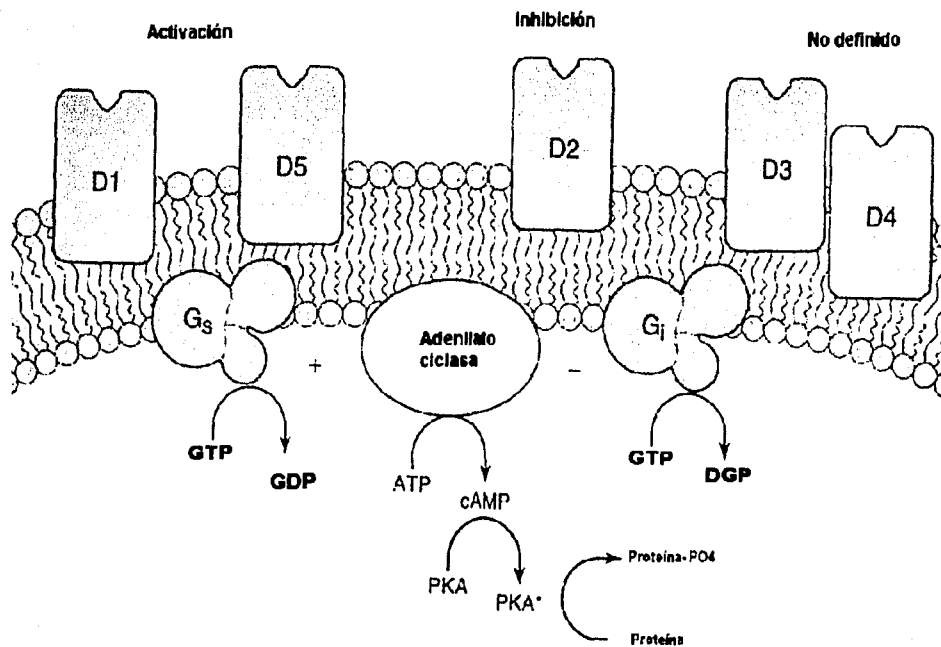


Figura VIII. Receptores dopaminérgicos

En el cerebro, las principales vías dopaminérgicas por su relevancia en la clínica son: la nigroestriatal (que proyecta de la sustancia nigra pars compacta al núcleo caudado y putamen); la mesolímbica (que proyecta del área ventral tegmental a la corteza cerebral) y la vía tuberoinfundibular (que proyecta del núcleo arcuato a la eminencia media) (Kopin, 1994).

La DA liberada en el estriado puede actuar en cualquiera de los receptores a DA presentes en este núcleo, modulando la acción de las neuronas GABAérgicas que proyectan al globo pálido o la sustancia nigra. Hay receptores tipo D2 en las terminales de las proyecciones corticoestriatales, en las neuronas medianas espinosas que contienen encefalina y en las interneuronas colinérgicas, así como autoreceptores en las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra compacta. Los receptores tipo D1 están presentes en neuronas espinosas medianas que poseen sustancia P y dinorfina y ambos receptores están presentes en una subpoblación de neuronas estriatales (Kopin, 1994).

Serotonina

La serotonina es sintetizada a partir del aminoácido triptófano, el cual es captado de la circulación sanguínea, posteriormente el triptófano es hidroxilado por la triptófano hidroxilasa para formar el 5-hidroxitriptófano (5-HTP). La hidroxilación del triptófano es el paso limitante en la biosíntesis de la serotonina. Una vez formado el 5-HTP es inmediatamente descarboxilado y convertido en serotonina (5-HT) por la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (Cooper *et al.*, 1996).

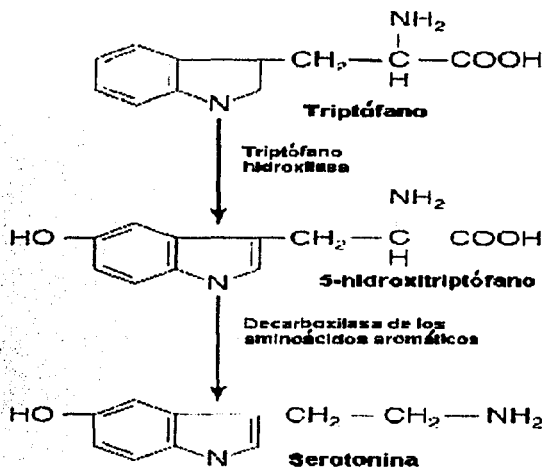


Figura IX. Metabolismo de la serotonina

Las monoaminas son metabolizadas por las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y la catecol-orto-metiltransferasa (COMT). La MAO convierte a las monoaminas a sus aldehídos correspondiente, los cuales son rápidamente metabolizados por la aldehído deshidrogenasa a sus respectivos ácidos: ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC) para la DA y norepinefrina (NE) y el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) para la serotonina. La COMT es una enzima no específica, la cual requiere SAM y Mg^{+2} para ser activa. Esta enzima cataliza la transferencia de grupos metilos de la SAM a los grupos m-hidroxilos de las catecolaminas con la consecuente formación de ácido homovanílico

(HVA) para la DA y ácido 3-metoxi-4-hidroxi-mandélico (VMA) para la noradrenalina (Cooper *et al.*, 1996). Es importante notar que en el SNC hay muy poco VMA, ya que el principal metabolito de NE es el 3- metoxi-4- hidroxifenilglicol (MHPG).

Acetilcolina

La acetilcolina (ACh) es formada a partir de la acetil coenzima A y la colina, reacción catalizada por la enzima colina acetiltransferasa. La síntesis de la acetil coenzima A es generada en el ciclo de Krebs a partir del metabolismo energético. La colina es sintetizada de novo en el cerebro por metilaciones sucesivas de la etanolamina. Después de ser metabolizada, la ACh por la acetilcolinesterasa, poco más del 35 % de la colina es transportada de regreso a la terminal presináptica por un mecanismo dependiente de sodio, para su reutilización (Cooper *et al.*, 1996).

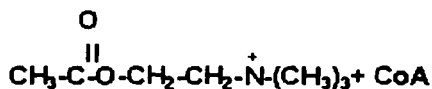


Figura X. Estructura de la acetilcolina

Existen dos principales tipos de receptores a acetilcolina, los receptores de tipo nicotínico y los de tipo muscarínico. Dentro del estriado, las interneuronas colinérgicas poseen ambos tipos de receptores, se postula que los receptores muscarínicos presentes en las terminales glutamatérgicas inhiben la liberación de los aminoácidos excitadores, actuando como moduladores de la estimulación glutamatérgica, mientras que la activación de los receptores nicotínicos aumenta la liberación de aminoácidos excitadores (Kopin, 1994).

g. Funciones de los ganglios basales

En la actualidad se han realizado diversos estudios dirigidos a analizar la función del estriado en cuanto al procesamiento de la información. Debido a que dicha estructura recibe inervación de todas las áreas de la corteza y a que sus eferencias son menores

en número, se ha postulado que el estriado sea un sistema integrador de la información. En la actualidad existen dos teorías en cuanto al procesamiento de la información, una es la de teoría del "embudo" que postula que debido a la relación del estriado con sus núcleos de salida, y a la alta convergencia de información, es imposible dilucidar circuitos más o menos independientes; la otra teoría es la de "procesamiento en paralelo" y propone que existen circuitos en paralelo que se mantiene relativamente independientes, dicha teoría es apoyada por los trabajos de Alexander (1986), quien identificó cinco circuitos en el cerebro de mono *rhesus* que constituyen asas de retroalimentación en paralelo. Dichos circuitos están involucrados en el procesamiento de información sensoriomotora (circuito motor), cognoscitiva (circuito de asociación) y límbica (circuito límbico) (DeLong *et al.*, 1992).

Los ganglios basales se han relacionado con funciones diversas que van desde el control del movimiento, atención, percepción sensorial y aprendizaje. Esta amplia gama de funciones están de acuerdo con los hallazgos anatómicos de las aferentes corticales de casi toda la neocorteza a los ganglios basales y las aferentes estriatales a regiones corticales (Brown *et al.*, 1997).

Funciones sensoriales

Estímulos somatosensoriales

Estudios de actividad electrofisiológica en el estriado (Schneider and Lidsky, 1981) y el globo pálido de gatos (Schneider *et al.*, 1982), muestran que la localización de la entrada orofacial sensorial se codifica de una manera que podría ser relevante para guiar los movimientos de la posición de la cabeza durante la alimentación, en lugar de usarla en la localización de estímulos. Estas observaciones están de acuerdo con las deficiencias del comportamiento observadas después de lesiones estriatopalidales en ratas, las cuales muestran alterada la posición de la cabeza solamente cuando estos movimientos son dependientes de la retroalimentación somatosensorial orofacial (Labuszewski *et al.*, 1981).

Estímulos visuales

Desde los años 70's se describió la relación entre la corteza visual y el estriado (Pimbran, 1977). Estudios en rata reportan que las cortezas sensorial y visual primaria proyectan hacia el estriado, mientras que en el mono, las áreas visuales de alto nivel proyectan al caudado/putamen (Baizer *et al.*, 1993; Saint-Cyr *et al.*, 1990). En otro estudio en que se usaron métodos neuroanatómicos, se reportó un área visual de alto nivel del lóbulo temporal como un blanco de la acción del estriado (Middleton and Strick, 1996), lo cual hace pensar que el estriado juega un papel importante en funciones como la discriminación visual y percepción visual.

Estímulos auditivos

Se han estudiado la acción de la estimulación auditiva en el estriado, no encontrándose efectos concluyentes en este núcleo (Arnauld *et al.*, 1996), postulándose que diferentes regiones estriatales tienen acceso a varias entradas sensoriales bajo diferentes contextos cognitivos, las cuales son necesarias para la toma de decisiones y los cambios en el movimiento del sujeto y que éstas se encuentran basadas en el medio ambiente y a las claves internas del sujeto (Brown *et al.*, 1997).

Funciones cognitivas

Los organismos del reino animal se han podido adaptar al medio en el que viven gracias al desarrollo de la función llamada aprendizaje. El aprendizaje se ha definido como un cambio en la conducta, relativamente permanente, que resulta de la experiencia, y que necesita del almacenamiento de información llamado memoria.

El aprendizaje puede dividirse en: aprendizaje declarativo y aprendizaje no declarativo. El aprendizaje declarativo involucra asociaciones estímulo-estímulo y es accesible a la conciencia (en humanos); en este tipo de aprendizaje intervienen principalmente estructuras límbicas del lóbulo temporal y la amígdala, también se le ha llamado aprendizaje explícito o declarativo, un ejemplo de este tipo de aprendizaje es el reconocimiento de palabras en una tarea de tipo verbal

El aprendizaje no declarativo también llamado aprendizaje implícito o de hábitos es considerado como una colección de diferentes actividades mnemónicas, es decir

actividades relacionadas con la memoria, las cuales pueden ser expresadas a través del desempeño, es inaccesible a la conciencia y es mediado por otras estructuras cerebrales entre las que se encuentran los ganglios basales (Squire, 1995). En los humanos, el aprendizaje implícito o de hábitos se caracteriza por falta de conciencia y la lenta adquisición de lo aprendido. Los pacientes con la enfermedad de Huntington, que afecta directamente las células GABAérgicas estriatales, muestran un deterioro en este tipo de aprendizaje.

En animales experimentales, la característica esencial de este tipo de aprendizaje es que se adquiere lentamente como resultado del apareamiento repetido entre estímulo y la respuesta (Graybiel, 1998). Dentro de las estructuras relacionadas con este tipo de aprendizaje se han reportado que lesiones en diferentes partes del núcleo caudado de monos, ratas y gatos causan deficiencias en el desempeño de diferentes tareas mnemónicas (Divac, 1968; Divac *et al.*, 1967). Otros autores han mostrado que la estimulación eléctrica en el núcleo caudado de la rata causa alteraciones en la retención de la memoria, cuando la estimulación eléctrica se aplica inmediatamente después del entrenamiento (Gold and King, 1972; Wyers *et al.*, 1968). Otro estudio reporta que ratas lesionadas en el estriado dorsal muestran alteraciones en el aprendizaje en un laberinto en el cual el reforzador (alimento) se encuentra siempre en el mismo lugar. Esta función, llamada "aprendizaje egocéntrico" utiliza las claves espaciales en relación a la posición del cuerpo (Cook and Kesner, 1988; Kesner *et al.*, 1993; White, 1997).

En cuanto a las funciones cognitivas asociadas con el núcleo accumbens, se ha relacionado con procesos como aprendizaje, memoria, actividad locomotora, reforzamiento, adicción y motivación (Setlow, 1997). Estudios de lesiones electrolíticas e inactivación con lidocaina en el núcleo accumbens de ratas entrenadas en el laberinto de Morris (Sutherland and Rodríguez, 1989) o en el laberinto radial (Seamans and Phillips, 1994), muestran el aprendizaje aloecéntrico alterado, pero no así la versión egocéntrica de cada laberinto. Ahora bien el aumento en la transmisión dopaminérgica en este núcleo incrementa la actividad locomotora, mientras que la reducción en el contenido de DA bloquean este efecto (Kelly and Iversen, 1975; Le Moal and Simon, 1991; Pijnenburg and van Rossum, 1973). Además efectos similares se obtienen al

bloquear los receptores glutamatérgicos en esta región (Burns *et al.*, 1996; Mele *et al.*, 1998; Mogenson *et al.*, 1980). Estos estudios nos muestran la estrecha relación entre la conducta y la regulación entre el sistema dopaminérgico y el glutamatérgico en el núcleo accumbens.

3. Efectos de la exposición a As y Pb en el sistema nervioso

a. Efectos del As en el sistema nervioso

Los primeros reportes de los daños neurológicos causados después de la inhalación o ingestión de compuestos del As fue la producción de neuropatías. Varios autores describen la neuropatía causada por la exposición a As como neuropatía periférica simétrica caracterizada por la aumentada sensibilidad de los nervios sensoriales en comparación con los nervios motores, además de que las neuronas que poseen nervios largos se ven más afectadas que las neuronas con axones cortos (Chhuttani and Chopra, 1979; Heymann *et al.*, 1956; Schoolmeester and White, 1980). Los síntomas clínicos son sensoriales y simétricos como insensibilidad, parestesia (Triebig and Büttner, 1983), siendo las piernas más afectadas que los brazos. Blom *et al.* (1985) demostró que los trabajadores de una fundidora muestran una correlación significativa entre la disminución en la velocidad de conducción nerviosa en dos o más nervios periféricos y la exposición a $50 \mu\text{g}$ de As / m^3 en el aire del área de trabajo.

Las neuropatía periférica con pérdida sensorial de tipo motor personas que se han expuesto de manera accidental a altas concentraciones de compuestos de arsénico, comparte características con el síndrome de Guillan Barré (Donofrio *et al.*, 1987). Un estudio en niños de una zona minera muestran alteraciones auditivas, sugiriendo que la exposición a As produce polineuritis de estructuras como la cóclea (Bencko and Symon, 1977).

Los efectos descritos en el sistema nervioso central por la exposición ocupacional al As son: Encefalopatía, alteraciones en funciones neurológicas superiores como aprendizaje, memoria reciente y concentración. El grado de daño presente en los

pacientes se a relacionado con el tiempo de exposición y desaparece una vez terminada la exposición (Bolla-Wilson and Bleecker, 1987a; Frank, 1976; Morton and Caron, 1989). Un estudio en niños crónicamente expuestos a As por vivir cerca de una fundidora muestran $62.9 \pm 0.03 \mu\text{g As/g creatinina}$. Estas concentraciones de As en orina correlacionan inversamente con los valores de coeficiente intelectual verbal, en el cual se evalúan funciones cerebrales superiores como el lenguaje, la comprensión verbal y la memoria a largo plazo (Calderón *et al.*, 2001). Otro estudio en niños del distrito de Ronpiboon (Tailandia), reportó una correlación significativa entre los altos niveles de As en cabello y la percepción visual alterada además de la disminución en la estatura promedio (Siripitayakunkit *et al.*, 2000a; Siripitayakunkit *et al.*, 2000b).

b. Efectos del Pb en el sistema nervioso

El Pb produce daño periférico en presencia de altas y prolongadas exposiciones, mostrándose los efectos tóxicos preponderantemente en los grandes nervios mielinizados. Estudios experimentales en animales indican cambios en los nervios periféricos que pueden incluir desmielinización segmental y degeneración axonal, seguida por degeneración en las células de Schwann, aunque las lesiones difieren dependiendo las especies de animales utilizadas. Los cambios en la mielinización se han relacionado con el daño que produce este metal en la barrera sangre-nervio (Cory-Slechta and Pounds, 1995; Goyer, 1991).

Estudios en niños muestran que concentraciones en sangre iguales o mayores a $80 \mu\text{g Pb/dl}$ producen encefalopatía. Los síntomas de la encefalopatía por la intoxicación con Pb inician con letargia, vómitos, irritabilidad, pérdida del apetito, mareos y progresa a ataxia y disminuido nivel de conciencia, el cual puede progresar hacia el coma y muerte. La recuperación es algunas veces acompañada por secuelas como la epilepsia, retardo mental neuropatía y óptica en algunos casos (Goyer, 1991). Estudios epidemiológicos realizados en las décadas de 1970 y 1980, reportan que niños expuestos a bajos niveles de Pb y con concentraciones de 10 a $30 \mu\text{g Pb/dl}$ muestran alteraciones en el sistema nervioso. Las deficiencias presentes se encuentran principalmente en funciones cognitivas (disminución del coeficiente intelectual),

desarrollo motor, procesamiento del lenguaje, de la atención e hiperactividad. También se ha encontrado una relación inversa entre los niveles de Pb en dentina y el coeficiente intelectual (Bellinger *et al.*, 1987; Needleman, 1979; Needleman and Leviton, 1979). Ahora bien, estas alteraciones pueden reflejar deficiencias en procesos de memoria y aprendizaje, aunque todavía no están bien establecidas las bases cognitivas para los cambios en el coeficiente intelectual (Cory-Slechta and Pounds, 1995).

c. Efectos del arsénico y plomo en los ganglios basales

Diversos reportes muestran a los ganglios basales como estructuras sensibles a diversas toxinas entre las cuales encontramos la 6-hidroxidopamina (Marshall *et al.*, 1983) y el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP), el cual a través de la monoamino oxidasa B (MAO-B), es convertido en el ion piridinio (MPP⁺), que es un tóxico selectivo de las neuronas dopaminérgicas (Kopin, 1988).

En cuanto al As, Mejía *et al.*, (1997) reportaron un aumento en el contenido de DA, del ácido dihidroxifenil acético (DOPAC) y del metabolito de la serotonina, el ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) en el cuerpo estriado de ratones expuestos a arsenito de sodio; Itoh *et al.*, (1990) refieren una disminución en el contenido de DOPAC y ácido homovanílico (HVA) en el cuerpo estriado de ratones expuestos a trióxido de arsénico; Nagaraja *et al.*, (1993) encontraron un aumento en serotonina y una disminución de DA en ratas tratadas con arsenato de sodio; Rodríguez *et al.*, (1998) hallaron una disminución en la liberación de dopamina y sus metabolitos DOPAC y HVA evocada por potasio en el cuerpo estriado en ratas tratadas con un residuo minero con alto contenido de As.

La exposición crónica a Pb afecta entre otros al sistema catecolaminérgico. Dentro de este, la función dopaminérgica aumenta, correlacionándose con la hipermotilidad observada en animales experimentales (Memo *et al.*, 1981) y con la supersensibilidad de los receptores D1 y D2 (Cory-Slechta and Widzowski, 1991). Ahora bien, ratas expuestas a acetato de plomo muestran alterados los contenidos de DA y sus metabolitos en diferentes regiones del cerebro (Kala and Jadhav, 1995b). Además, los efectos del Pb son dependientes del área, como lo muestra el tratamiento crónico con

Pb, el cual disminuye el recambio de DA en el estriado, lo aumenta en el núcleo accumbens y la corteza prefrontal y no lo altera en la sustancia nigra (Govoni *et al.*, 1979). Otros estudios también muestran que en el núcleo accumbens de ratas tratadas con acetato de plomo se altera la liberación de DA, disminuye la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa y se acumula preferencialmente Pb (Ramesh and Jadhav, 1998), lo anterior es apoyado por un estudio en el que se expusieron ratas a 0, 25, 50 ó 500 mg de Pb/L de agua de bebida durante 90 días y se observa disminuida la concentración de DA en el núcleo accumbens (Kala and Jadhav, 1995b).

Una teoría reciente postula una vulnerabilidad preferente del sistema dopaminérgico mesolímbico a los efectos del Pb, el cual parece actuar a nivel de los autoreceptores o transportadores de DA (DAT), en las terminales nerviosas de las áreas de proyección dopaminérgicas (Cory-Slechta, 1997). Apoyando esta teoría, se encuentra la disminución de receptores tipo D2 y la disminución de la unión de DA al DAT en el núcleo accumbens de ratas expuestas a Pb durante dos semanas, estos resultados se mantienen por un periodo mayor a 12 meses (Pokora *et al.*, 1996). Un estudio electroquímico muestra aumento en la liberación de DA inducida por alto potasio en el núcleo accumbens de ratas expuestas a 50 ppm de acetato de plomo en el agua de bebida durante 11 semanas, pero no observan ningún cambio en la liberación inducida en estriado o en la recaptura de DA (Zuch *et al.*, 1998). Otro estudio muestra que en ratas tratadas con 1 y 8 mg Ac Pb/kg de peso por vía intraperitoneal durante 20 días disminuye la liberación de DA en el estriado ventral y dorsal comparado contra los controles, pero no se reporta cambio alguno en el tiempo de recaptura de la DA (Luthman *et al.*, 1994).

III. Justificación

Los estudios descritos anteriormente sugieren que el As y el Pb producen alteraciones del funcionamiento celular y de los sistemas de neurotransmisión en los ganglios basales en particular en el cuerpo estriado. Dada la relevancia de los ganglios basales en funciones como aprendizaje, memoria y movimiento, es importante determinar si la exposición a arsenito de sodio o a acetato de plomo producen alteraciones en estas funciones complejas, y si estas alteraciones se correlacionan con el contenido o liberación de monoaminas en diferentes estructuras cerebrales como el estriado, la corteza cerebral y el mesencéfalo.

IV. Hipótesis

Los grupos de ratas expuestos a As o Pb expresan cambios en relación a las ratas control en pruebas cognitivas, locomotrices y en el contenido de monoaminas en el estriado, la corteza cerebral y el mesencéfalo.

Experimento 1

- Las ratas expuestas a 5, 10 ó 20 mg As/kg como arsenito de sodio mostrarán alteraciones con respecto a las ratas control en los múltiples parámetros de la evaluación neurológica, pruebas cognitivas, locomotrices y de manipulación alimenticia.
- El contenido de monoaminas y As serán diferentes en los grupos control y los expuestos a 5, 10 ó 20 mg As /kg como arsenito de sodio durante 15 días.

Experimento 2

- Las ratas expuestas a 10 mg As/kg como arsenito de sodio durante 30 días serán diferentes de las del grupo control en las pruebas cognitivas y locomotrices bajo las condiciones experimentales dadas.
- El contenido de monoaminas y As serán diferentes al grupo control y los expuestos a 10 mg As /kg como arsenito de sodio durante 14, 21 ó 30 días.

Experimento 3

- Las ratas expuestas a 36.70 mg As/L de agua (día de desarrollo embrionario 15 o día postnatal 1) mostrarán alteraciones con respecto a las ratas control en una batería de desarrollo, las pruebas cognitivas y locomotrices.

Experimento 4

- Las ratas expuestas a acetato de plomo mostrarán alteraciones con respecto a las ratas control en la actividad locomotora espontánea y se desempeñarían de manera diferente en las tareas de aprendizaje espacial.
- El contenido de monoaminas en la corteza, mesencéfalo y estriado de ratas tratadas con 50 ó 150 mg de acetato de plomo serán diferentes del grupo control.

Experimento 5

- La intoxicación con Pb causará un aumento en la liberación y recaptura de DA inducida por alto potasio en el núcleo accumbens.
- La inyección de un antagonista glutamatérgico en la corteza prefrontal de animales expuestos a Pb aumentará la liberación de DA en el núcleo accumbens.

V. Objetivos

Objetivo general

Evaluar si la exposición a As o Pb produce alteraciones conductuales y en el contenido de monoaminas y observar si estos cambios están relacionados con las funciones descritas de los ganglios basales.

Objetivos específicos

Objetivo específico 1.

Evaluar la aparición de alteraciones funcionales en ratas expuestas a tres diferentes concentraciones de arsenito de sodio durante 15 días, mediante el uso de las siguientes herramientas: evaluación neurológica, pruebas cognitivas, registro de la actividad locomotora espontánea, una prueba de conducta alimenticia y contenido de monoaminas.

Objetivo específico 2.

Probar si la ejecución en las tareas de aprendizaje, la actividad locomotora espontánea y el contenido de monoaminas de las ratas expuestas a arsenito de sodio se altera durante la exposición a este metaloide.

Objetivo específico 3.

Evaluar si la exposición a arsenito de sodio en ratas desde el desarrollo hasta la edad adulta tiene algún efecto en la maduración, la actividad locomotora espontánea y el desempeño de tareas de aprendizaje.

Objetivo específico 4.

Evaluar los efectos en ratas de la exposición a 50 ó 150 mg de acetato de plomo /L de agua de bebida en la actividad locomotora espontánea, una tarea de aprendizaje de tipo espacial la cual involucra selectivamente al núcleo accumbens y el contenido de monoaminas en corteza, mesencéfalo y estriado .

Objetivo específico 5.

Medir la liberación y recaptura de DA inducida por alto potasio, en el núcleo accumbens de ratas tratadas durante 17 meses con 0, 50 ó 150 mg de acetato de plomo /L de agua de bebida. Además, probar el efecto de la inyección de un antagonista no competitivo del receptor glutamatérgico NMDA (MK-801) en la corteza prefrontal y observar el efecto que ejerce esta región sobre el núcleo accumbens de la rata en la regulación de la liberación de DA inducida por alto potasio.

VI. Material y métodos

Sujetos

Para los experimentos de exposición a As o Pb se usaron aproximadamente 250 ratas macho Sprague-Dawley (250- 300 g) obtenidas del bioterio del Centro de Neurobiología, UNAM.

Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo siguieron las regulaciones establecidas por "El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud" de la Secretaría de Salud (publicada en enero de 1987) y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999 "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio".

Materiales

Los compuestos arsenito de sodio, acetato de plomo y los reactivos para cromatografía de líquidos y espectroscopia de absorción atómica se obtuvieron de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

Métodos estadísticos

Los datos que se obtuvieron de los sujetos intoxicados con arsénico o plomo se analizaron con el paquete estadístico STATISTICA, versión 4.5.

La comparación de los valores correspondientes al peso, consumo de alimento, consumo de agua, conducta alimenticia, actividad locomotora espontánea, concentración de metales, concentración de monoaminas y pruebas de aprendizaje se realizaron con el análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, según fuera el caso, usando como prueba post hoc la prueba de Tukey.

Para las comparaciones del experimento III en el que se evaluaron los efectos de la intoxicación con arsenito de sodio en la rata en desarrollo y en la edad adulta, se utilizó la prueba de Chi cuadrada para evaluar las pruebas de maduración y la conducta

materna. Para evaluar las diferencias de la actividad locomotora y las tareas de aprendizaje se utilizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, usando como prueba post hoc se utilizó la U de Mann-Whitney.

En todas las comparaciones que se llevaron a cabo el nivel mínimo de significancia establecido fue del 5 %.

A. Intoxicación con arsenito de sodio

1. Experimento I

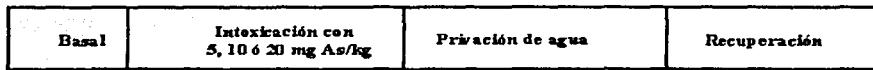
Evaluación de la respuesta neurotóxica debido a la exposición con tres diferentes concentraciones de arsenito de sodio durante dos semanas en ratas.

a. Método general

Cuatro grupos de ratas macho Sprague-Dawley (16 ratas por grupo) de 250-300 g de peso fueron habituadas durante una semana a un ciclo invertido de luz/oscuridad (10:00/22:00 hrs oscuridad) antes de iniciar el periodo experimental. Las ratas se intoxicaron 5, 10 ó 20 mg As/kg como arsenito de sodio disuelto en agua desionizada por vía intragástrica (5 ml) a las 15:00 hrs diariamente durante 2 semanas; teniendo libre acceso a agua y alimento durante los periodos de intoxicación y habituación. El grupo control se sometió a las mismas condiciones que a los grupos tratados con As, pero no se añadió As al vehículo (agua desionizada). En el curso del experimento se registró el consumo de agua y alimento diariamente en los cuatro grupos experimentales.

Al finalizar las dos semanas de tratamiento con As se sacrificaron ocho ratas por grupo para determinar la concentración de As en el cerebro entero y la concentración de monoaminas en tres regiones cerebrales. En las ratas restantes de cada grupo (n=8), se llevaron a cabo las pruebas conductuales descritas a continuación. Durante las pruebas de aprendizaje el experimentador permaneció ciego al tratamiento recibido por cada animal.

Determinación de monoaminas
y As total en cerebro



• Evaluación Neurológica
• Actividad locomotora espontánea
• Conducta alimenticia

• Evaluación neurológica
• Actividad locomotora espontánea

• Evaluación neurológica
• Actividad locomotora espontánea
• Conducta alimenticia

• Alternancia espontánea
• Alternancia retardada
• Laberinto radial

• Evaluación neurológica
• Actividad locomotora espontánea

1. Métodos particulares

1.1. Actividad locomotora espontánea

La actividad locomotora espontánea se registró usando un sistema de monitoreo automatizado (Digiscan Locomotor Activity System) que contabiliza los movimientos que realiza el animal en un intervalo dado. La evaluación de la actividad locomotora espontánea se basó en el protocolo descrito en el apéndice 1.

La actividad locomotora espontánea se midió cuatro veces en el curso de los experimentos: Evaluación basal (sin tratamiento con arsenito de sodio), primera y segunda semana de tratamiento con arsenito de sodio y la evaluación final (después de terminar todas las pruebas a las que sometieron las ratas y sin intoxicación con arsenito de sodio).

1.2. Evaluación neurológica.

Se evaluó la apariencia general del animal y su capacidad sensorial y motora, según el protocolo descrito en el apéndice 2. Esta prueba se realizó cuatro veces durante el curso del experimento: Evaluación basal (sin intoxicación), primera y segunda semana de intoxicación y la evaluación final (después de terminar todas las pruebas a las que sometieron las ratas y sin intoxicación).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3. Conducta alimenticia

Se evaluó el tiempo y la manera en que el animal se alimenta según el protocolo descrito en el apéndice 3. Esta prueba se realizó en dos ocasiones: un día antes de iniciar la intoxicación con arsenito de sodio y dos días posteriores al término de la intoxicación.

1.4. Pruebas de aprendizaje

1.4.1. Laberinto de ocho brazos (variante gana-cambia)

En esta prueba se evaluó la capacidad del animal para resolver una tarea usando claves espaciales, según el protocolo descrito en el apéndice 4. Esta prueba se inicia al finalizar el periodo de intoxicación con arsenito de sodio. Se probaron a las ratas con dos ensayos diarios durante 6 días.

1.4.2. Laberinto en T

En esta prueba se evaluó la capacidad de los animales de resolver una tarea usando claves egocéntricas, después de haber finalizado el periodo de prueba en el laberinto radial. El entrenamiento se llevó a cabo según el protocolo descrito en el apéndice 5. En esta tarea se probaron a las ratas mediante 10 ensayos diarios durante 10 días.

1.5. Determinación de arsénico

Al finalizar el periodo de intoxicación con arsenito de sodio, los animales se sacrificaron por decapitación y se les extrajo el cerebro para determinar el contenido de As mediante espectrofotometría de absorción atómica, según el protocolo descrito por Ebdon et al., (1982).

1.6. Análisis de monoaminas y sus metabolitos en mesencéfalo, corteza y estriado.

Al finalizar el periodo de tratamiento con arsenito de sodio, los animales se sacrificaron por decapitación y se les extrajo el mesencéfalo, el estriado y la corteza. La determinación de monoaminas en estas tres regiones se hizo por cromatografía de líquidos acoplada a un detector electroquímico, según el protocolo descrito en el apéndice 6.

b. Resultados

Los promedios del peso corporal de los grupos control, 5, 10 y 20 mg As/kg de ratas expuestas a arsenito de sodio por vía intragástrica durante dos semanas, en los periodos basal, exposición, privación de agua y recuperación, fueron diferentes en los periodos de exposición [$F(3,27)= 21.26, p<0.05$] y de privación de agua [$F(3,27)= 22.56, p<0.05$], teniendo el grupo de 20 mg de As un peso promedio menor a los grupos control, 5, y 10 mg As/kg (Tukey HSD $p<0.05$).

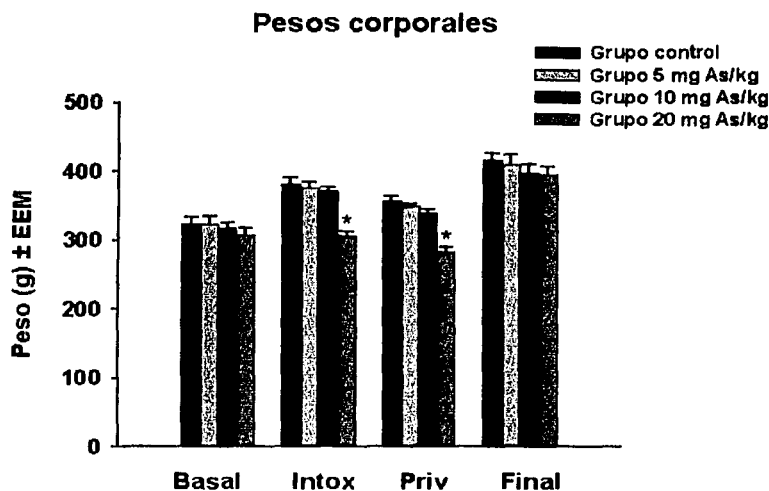


Figura 1. Peso corporal de los grupos intoxicados con 5, 10 ó 20 mg As/kg como arsenito de sodio por vía intragástrica durante 15 días. Cada barra representa el promedio del grupo \pm EEM. * $p<0.05$ diferente del grupo control según la prueba Tukey HSD para muestras desiguales.

No hubo un efecto significativo del tratamiento sobre el consumo de alimento y agua ni sobre los resultados de la evaluación neurológica en ninguno de los periodos en que se efectuaron las evaluaciones. Sin embargo, es importante notar que algunas ratas del grupo tratado con 20 mg As/kg mostraron importantes cambios en su apariencia general como fueron pelaje sucio, exagerada caída de pelo y nariz sangrante, entre otras.

En cuanto a la actividad locomotora espontánea, hubo un efecto significativo de los tratamientos en múltiples parámetros durante la primera semana [intervalo de valores para $F(3,28)=4.43-14.99$, $p<0.05$] y segunda semana de exposición [intervalo de valores para $F(3,27)=5.26-27.02$, $p<0.05$]. En el grupo tratado con 20 mg As/kg observó una disminución significativa de los parámetros de la actividad locomotora espontánea con respecto al control (ver figuras 2 y 3) en la primera y segunda semana de exposición. En contraste, los tiempos de reposo y el tiempo en periferia de la caja, se encontraron significativamente aumentados con respecto al control. El patrón de disminución de la actividad locomotora espontánea se revierte en la evaluación final, es decir al fin de la intoxicación, cuando los animales habían estado sin intoxicación durante 20 días. El grupo intoxicado con 10 mg As/kg mostró una disminución significativa en el tiempo vertical en comparación con el control en la primera semana de exposición; esta diferencia desapareció en la segunda semana de exposición y en la evaluación final. Las pruebas post hoc no mostraron ninguna diferencia entre el grupo intoxicado con 5 mg As/kg y el control.

Actividad locomotora espontánea primera semana de intoxicación

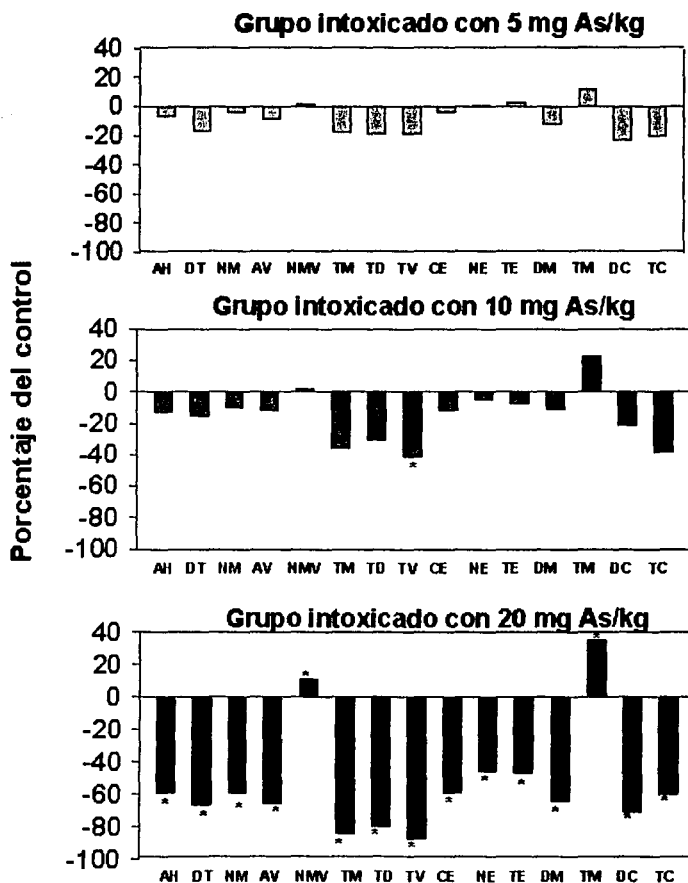


Figura 2. Actividad locomotora espontánea registrada en la primera semana de intoxicación durante dos horas de la fase oscura del ciclo/luz oscuridad. Las barras representan la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control de los diferentes parámetros registrados de los grupos de ratas intoxicados con 5, 10 ó 20 mg As/kg como arsenito de sodio por vía intragástrica, durante 15 días.

* $p < 0.05$ diferente del grupo control según la prueba de Tukey.

El significado de las abreviaciones se describe en el apéndice 1.

Actividad locomotora espontánea segunda semana de intoxicación

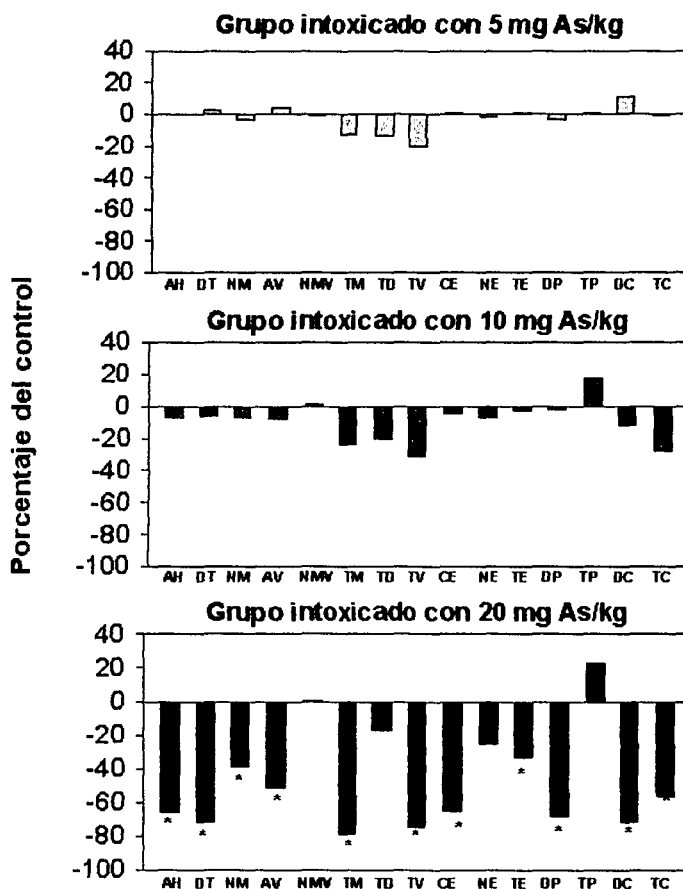


Figura 3. Actividad locomotora espontánea registrada en la segunda semana de intoxicación durante dos horas de la fase oscura del ciclo luz/oscuridad. Las barras representan la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control de los diferentes parámetros registrados de los grupos de ratas intoxicados con 5, 10 ó 20 mg As/kg como arsenito de sodio por vía intragástrica, durante 15 días.

* $p < 0.05$ diferente del grupo control según la prueba de Tukey para n desiguales. El significado de las abreviaciones se describe en el apéndice 1.

Con respecto a la evaluación de la conducta alimenticia, se observó un efecto significativo del tratamiento en el tiempo que la rata se alimenta [$F(3,27)= 6.99, p<0.05$] y en el tiempo que los animales mantienen la croqueta contra el piso [$F(3,27)= 16.83, p<0.05$], encontrándose incrementos significativos en el grupo tratado con 20 mg As/kg al compararlo con los grupos control, 5 y 10 mg As/kg en el ensayo realizado al terminar el periodo de exposición; es decir, después de 15 días de administrar As (prueba post hoc de Tukey $p<0.05$).

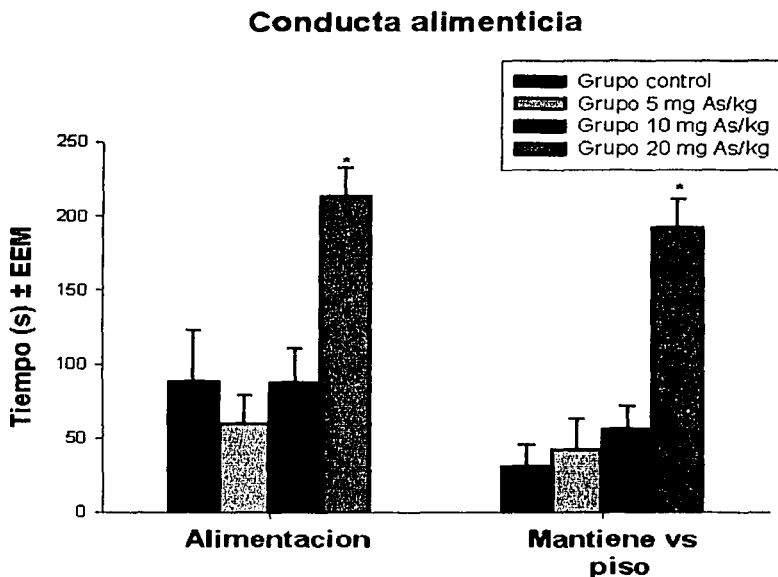


Figura 4. Conducta alimenticia (tiempo en que se alimenta y tiempo que la rata mantiene la croqueta contra el piso). Las barras representan el promedio de tiempo en segundos \pm EEM de los grupos de ratas intoxicadas con 5, 10 y 20 mg/kg como arsénico como arsenito de sodio por vía intragástrica. * $p< 0.05$ diferente de grupo control según la prueba de Tukey HSD para muestras desiguales.

En cuanto a las tareas de aprendizaje, tanto en las tareas realizadas en el laberinto radial como en el laberinto en T, no se encontró un efecto significativo del tratamiento, es decir, todos los grupos mostraron un promedio de errores similares. Solamente se encontró un efecto significativo de los días de entrenamiento para la alternancia

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

espontánea realizada en el laberinto en T [$F(4, 108) = 42.92, p < 0.05$], para la alternancia retardada realizada en el laberinto en T [$F(4, 108) = 6.56, p < 0.05$] y para el primer y segundo ensayo de la tarea realizada en el laberinto radial [$F(5, 135) = 5.60$ y $F(5, 135) = 5.69, p < 0.05$ respectivamente], (datos no mostrados).

En cuanto al contenido de monoaminas y sus metabolitos, se encontró aumentado el contenido de DA [$F(3, 26) = 2.81, p < 0.05$] en el mesencéfalo, en cuanto a estriado sólo se encontró aumentado el contenido de HVA en esta estructura en el grupo expuesto a 20 mg As/kg [$F(3, 24) = 3.16, p < 0.05$].

Tabla I. Contenido de monoaminas y sus metabolitos (ng/g de tejido) en mesencéfalo y estriado de ratas intoxicadas con 5, 10 ó 20 mg As/kg como arsenito de sodio durante 15 días

Mesencéfalo	DA	HVA	NE	DA/HVA
Control	86.60 ± 15.33	61.71 ± 14.03	302.77 ± 114.44	2.29 ± 0.73
5 mg As/kg	90.64 ± 12.57	59.63 ± 16.59	271.06 ± 95.84	2.35 ± 0.58
10 mg As/kg	111.33 ± 17.58	57.33 ± 13.68	285.92 ± 101.10	2.85 ± 0.86
20 mg As/kg	184.31 ± 52.91 *	74.15 ± 29.65	466.60 ± 176.35	3.53 ± 0.75

Estriado	DA	HVA	NE	DA/HVA
Control	1081.32 ± 153.76	104.40 ± 11.62	545.85 ± 168.22	3.88 ± 1.58
5 mg As/kg	1842.45 ± 254.30	149.42 ± 18.98	318.15 ± 73.70	3.19 ± 1.30
10 mg As/kg	1757.59 ± 299.96	134.73 ± 14.78	354.30 ± 25.21	2.42 ± 0.92
20 mg As/kg	2005.13 ± 394.69	182.62 ± 25.56 *	531.10 ± 145.70	2.61 ± 0.98

Los valores de los grupos representan la media ± EEM (n = 5 -7).

*p < 0.05 diferente del grupo control según la prueba de Tukey para n diferentes.

La concentración de As en los cerebros de ratas expuestas durante 2 semanas a 5, 10 ó 20 mg As/kg como arsenito de sodio por vía intragástrica se muestran en la Tabla I. Las concentraciones de As en los grupos intoxicados con 5, 10 ó 20 mg As/kg fueron significativamente diferentes del grupo control [$F(3, 27) = 12.87, p < 0.05$] pero no fueron diferentes entre sí.

TABLA II.
Concentración de As ($\mu\text{g/g}$) en cerebro de las ratas
expuestas a arsénico.

Grupo	$\mu\text{g As/ g cerebro} \pm \text{EEM}$
Control	0.25 ± 0.05 (8)
5 mg As/kg	6.02 ± 0.90 (8) *
10 mg As/kg	6.35 ± 1.04 (8) *
20 mg As/kg	6.41 ± 0.96 (7) *

() = n del grupo;

* $p < 0.05$ diferente del grupo control (prueba de Tukey, para n diferentes)

c. Discusión de resultados

El arsenito de sodio administrado por vía intragástrica en ratas produjo alteraciones en el estado general de los animales y en la conducta locomotora en el grupo expuesto a 20 mg As/kg de peso como arsenito de sodio. Estas alteraciones fueron transitorias y desaparecieron una vez que se suspendió la administración de arsenito de sodio. En las pruebas de aprendizaje, llevadas a cabo después de finalizada la intoxicación, no se encontraron deficiencias en la ejecución de los animales tratados con arsenito de sodio, lo que sugiere que bajo estas condiciones de intoxicación, el arsenito de sodio no produce efectos a largo plazo sobre las estructuras involucradas en la adquisición de estas tareas espaciales.

En el grupo que recibió 20 mg As/kg por vía intragástrica se encontró disminución en el peso corporal en el periodo de intoxicación y en el de privación de agua. Así mismo, la evaluación general del estado de los animales expuestos a 20 mg As/kg mostró el pelaje sucio, la exagerada caída del pelo, la nariz sangrante, diarrea y abdomen abultado al finalizar la exposición. Aunque no se detectaron alteraciones sensorio-motoras gruesas, la observación de la conducta alimenticia hizo evidente deficiencias en el manejo del alimento, que junto con las alteraciones en la apariencia de los animales, sugieren que la intoxicación con 20 mg As/kg produjo un malestar generalizado. Habiendo hecho estas consideraciones, es necesario apuntar que los cambios en la actividad locomotora espontánea de los animales tratados con As, se presentaron también en el tiempo vertical del grupo con 10 mg As/kg, el cual no mostró alteraciones en ningún otro

parámetro. Esto sugiere que al menos ciertas alteraciones producidas por As en los animales que recibieron 20 mg As/kg pudieran deberse a efectos sobre el sistema nervioso central. Estos resultados van de acuerdo con dos estudios que describen disminuciones en la actividad locomotora de ratas y ratones intoxicados con trióxido de arsénico (Itoh *et al.*, 1990; Pryor *et al.*, 1983).

El aumento en el contenido de DA en el mesencéfalo y el aumento de HVA en el estriado después de la intoxicación con 20 mg As/kg durante 15 días refleja la vulnerabilidad de estas estructuras al As como ya se ha reportado previamente (Mejía *et al.*, 1997; Nagaraja and Desiraju, 1994).

En cuanto al contenido de As en cerebro, es interesante notar que la concentración de As en cerebro de ratas intoxicadas con diferentes concentraciones de As como arsenito de sodio (5, 10 ó 20 mg/kg) no son diferentes entre sí, lo que puede deberse a que los mecanismos transportadores del As hacia el cerebro se hayan saturado o bien a una reducida depuración del arsénico del organismo.

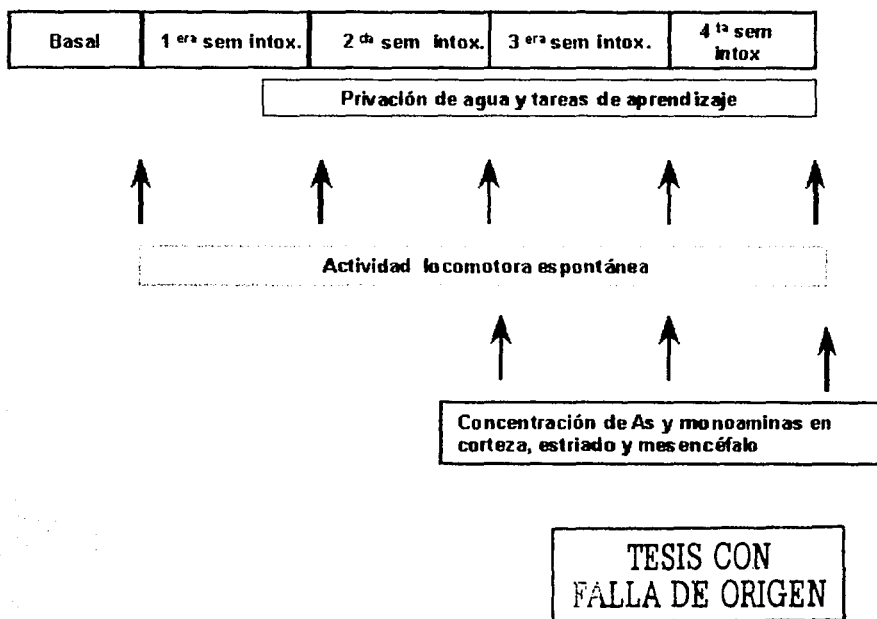
Los resultados de este experimento permitieron elegir una concentración de As que no tuviera efectos inespecíficos sobre el animal pero que resultara en algún cambio en la conducta del mismo. Además, estos resultados indican que los cambios conductuales se presentan durante la intoxicación con arsenito de sodio. En consecuencia, en el siguiente experimento se usó una concentración de 10 mg As/kg, se incrementó el periodo de intoxicación (de 2 a 4 semanas) y se evaluó la conducta locomotora y las tareas de aprendizaje durante la intoxicación con el metaloide.

2. Experimento II

Evaluación conductual de la rata albina y determinación del contenido de monoaminas durante la intoxicación con arsenito de sodio durante cuatro semanas.

a. Método general

Se utilizaron dos grupos de ratas macho Sprague-Dawley (14-16 ratas por grupo) de 250-300 g de peso, mantenidas en condiciones semejantes a las descritas en el experimento I. Las ratas se intoxicaron diariamente con 10 mg As/kg como arsenito de sodio disuelto en agua desionizada por vía intragástrica (3 ml) durante cuatro semanas; teniendo libre acceso a agua y alimento durante el periodo basal (habitación al laboratorio). En el periodo de intoxicación y de prueba, los animales estuvieron privados de agua y sólo se les permitió tener acceso al agua durante 5 minutos diarios. En el curso del experimento se registró el peso del animal semanalmente. El control se sometió a las mismas condiciones pero no se le añadió arsenito de sodio al agua desionizada. Durante las pruebas de aprendizaje, el experimentador permaneció ciego al tratamiento recibido por cada animal.



1. Métodos particulares

1.1. Actividad locomotora espontánea

La actividad locomotora espontánea se registró usando un sistema de monitoreo automatizado (Digiscan Locomotor Activity System), como se describió anteriormente. La actividad locomotora espontánea se evaluó cinco veces en el curso del experimento: Evaluación basal (sin intoxicación y sin privación de agua), una, dos, tres y cuatro semanas de tratamiento con 10 mg de As y mantenidas bajo el régimen de privación de agua.

1.2. Pruebas de aprendizaje

1.2.1. Prueba de aprendizaje de lugar en el laberinto radial de ocho brazos (variante gana-permanece).

En esta prueba se evaluó la capacidad del animal para resolver una tarea usando claves espaciales según el protocolo descrito en el apéndice 4. Los animales se entrenan en esta prueba desde el día 6 hasta el día 18 de intoxicación con arsenito de sodio bajo el régimen de privación de agua.

1.2.2. Laberinto en T

Las tareas realizadas en este laberinto se basaron en el mismo protocolo descrito para el experimento I y presentado en el apéndice 5. Los animales fueron entrenados en este paradigma desde el día 19 hasta el día 29 de intoxicación con As bajo el régimen de privación de agua.

1.3. Análisis de monoaminas y sus metabolitos en mesencéfalo, corteza y estriado.

La determinación de monoaminas en estas tres regiones se hizo por cromatografía de líquidos acoplada a un detector electroquímico, según el protocolo descrito en el apéndice 6. Se evaluó el contenido de monoaminas a las 2, 3 y 4 semanas de intoxicación con arsenito de sodio.

1.4. Determinación de metales

La determinación de As se hizo como se menciona en el experimento I, en las 2, 3 y 4 semanas de intoxicación con As.

b. Resultados

Los promedios del peso corporal de ratas control y las expuestas a 10 mg As/kg durante cuatro semanas por vía intragástrica no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos a lo largo del experimento (datos no mostrados).

En cuanto a la actividad locomotora espontánea se observó en los animales intoxicados, una disminución en la distancia total recorrida, número de movimientos totales, la actividad vertical y el número de movimientos verticales durante la segunda y tercera semanas de intoxicación, la actividad vertical y el número de movimientos mostraron una disminución significativa también durante la cuarta semana [intervalo de valores para $F's(1, 14) 5.49-47.23, p < 0.05$]. Véase Figura 5.

Actividad locomotora espontánea Experimento II

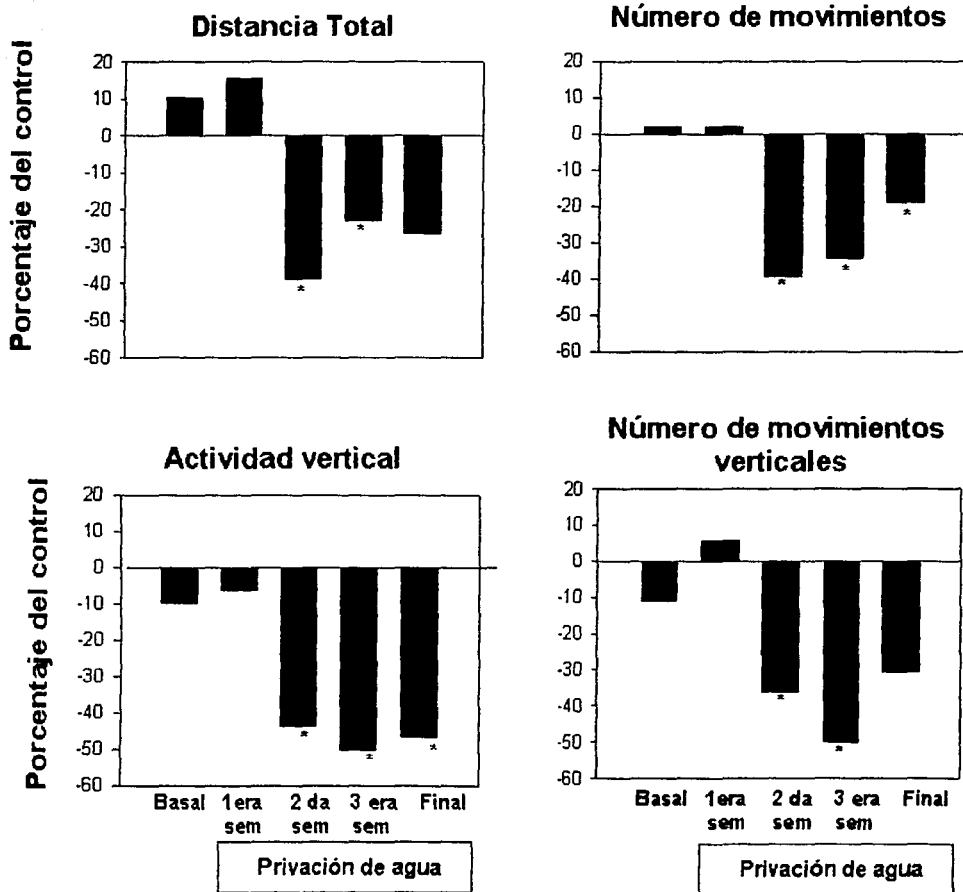


Figura 5. Distancia total, número de movimientos, actividad vertical y número de movimientos verticales registrados durante dos horas de la fase oscura del ciclo luz/obscuridad. Las barras representan la diferencia en porcentaje del grupo de ratas intoxicadas con 10 mg As/kg como arsenito de sodio por vía intragástrica, durante 30 días con respecto del grupo control.

* $p < 0.05$ diferente del grupo control según la prueba de Tukey.

En la tarea de alternancia espontánea encontramos un efecto de los días de entrenamiento [$F(4,56) = 9.29, p < 0.05$], pero no se encontró un efecto significativo del tratamiento; es decir, el grupo control y el grupo intoxicado con arsenito de sodio mostraron un promedio de tiempo similar para obtener el reforzador. En la tarea de alternancia retardada también se encontró un efecto significativo de día de entrenamiento [$F(4,56) = 7.38, p < 0.05$] y además se encontró un efecto significativo de tratamiento [$F(1,14) = 5.02, p < 0.05$]. El grupo intoxicado con 10 mg As/kg comete un mayor número de errores durante la prueba (Véase Figura 6). En la tarea realizada en el laberinto de ocho brazos hubo un efecto significativo solamente de día de entrenamiento [$F(11,154) = 5.144, p < 0.05$] (datos no mostrados).

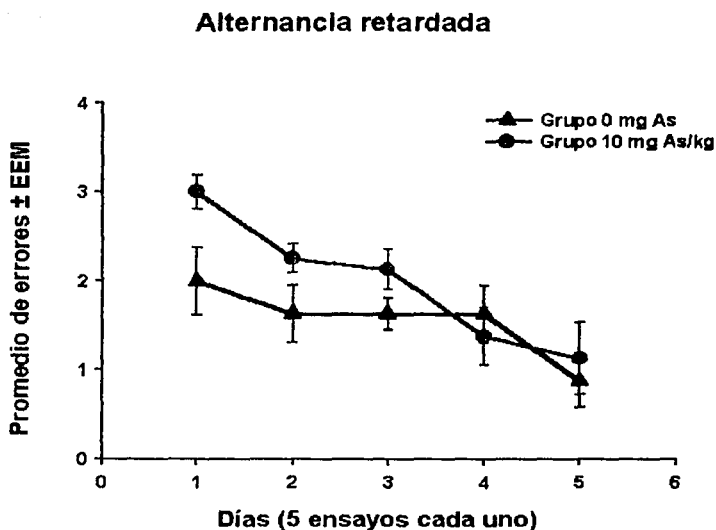


Figura 6. Número de errores cometidos en la tarea de alternancia retardada, llevada a cabo en el laberinto en T. Cada símbolo representa el promedio de errores \pm EEM de los grupos de ratas control e intoxicadas con 10 mg As/kg como arsenito de sodio por vía intragástrica. Los grupos difieren significativamente en el número de errores cometidos ($F(1,14)=5.02, p < 0.05$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La concentración de monoaminas y sus metabolitos en el cuerpo estriado de ratas tratadas con 10 mg As/kg durante dos, tres o cuatro semanas fue semejante en todos los grupos. En la corteza del grupo de ratas intoxicadas con 10 mg As/kg durante dos semanas, encontramos aumentado el contenido de DA [F(3,19) = 4.91, p<0.05] y el del 5-HIAA [F(3,19) =9.75, p<0.05]. En cuanto al mesencéfalo encontramos disminuido el recambio de DA/HVA del grupo tratado durante tres semanas [F(3,19)=9.16, p<0.05].

Tabla III. Contenido de monoaminas y sus metabolitos (ng/g de tejido) en corteza , estriado y mesencéfalo de los grupos control e intoxicados con 10 mg As/kg durante 2, 3 ó 4 semanas de tratamiento

Corteza

Duración	DA	HVA	5-HT	5-HIAA	DA/HVA
Control	69.14 ± 13.06	19.03 ± 6.21	255.04 ± 31.05	82.97 ± 8.51	5.18 ± 1.26
2 semanas	386.70 ± 149.39 *	26.70 ± 2.86	295.34 ± 30.59	110.87 ± 19.54	14.88 ± 6.57
3 semanas	103.32 ± 39.88	32.27 ± 8.14	296.44 ± 70.27	190.68 ± 20.85 *	4.23 ± 1.53
4 semanas	86.72 ± 18.24	26.38 ± 7.92	335.9 ± 16.28	87.14 ± 8.40	4.84 ± 1.73

Estriado

Duración	DA	HVA	5-HT	5-HIAA	DA/HVA
Control	2813.16 ± 232.45	261.42 ± 45.14	228.08 ± 49.48	130.86 ± 29.69	11.96 ± 1.18
2 semanas	2982.6 ± 159.45	265.83 ± 18.47	342.06 ± 20.7	157.31 ± 18.70	11.31 ± 0.50
3 semanas	2754.08 ± 524.40	247.37 ± 29.65	302.63 ± 63.61	180.56 ± 47.88	10.81 ± 1.01
4 semanas	3352.924 ± 729.10	297.65 ± 56.39	212.78 ± 52.2	69.89 ± 19.74	11.03 ± 0.84

Mesencéfalo

Duración	DA	HVA	5-HT	5-HIAA	DA/HVA
Control	50.04 ± 12.29	10.75 ± 2.50	105.95 ± 37.37	126.16 ± 37.06	5.02 ± 0.60
2 semanas	56.04 ± 5.76	10.53 ± 1.35	126.47 ± 14.39	114.03 ± 13.18	5.40 ± 0.18
3 semanas	50.58 ± 4.70	19.59 ± 1.10	72.66 ± 2.06	151.55 ± 8.78	2.59 ± 0.20 *
4 semanas	62.86 ± 20.69	10.33 ± 3.23	143.33 ± 43.93	169.79 ± 56.09	6.09 ± 0.38

Los valores de los grupos representan la media ± EEM (n = 5-7).

* p<0.05 diferente del grupo control según la prueba de Tukey para n diferentes.

La concentración de As en los cerebros de ratas expuestas a arsenito de sodio durante dos, tres o cuatro semanas fueron significativamente mayores en comparación con el grupo control [$F(3,29) = 12.48, p < 0.05$]. Véase tabla IV.

TABLA IV.
Concentración de As ($\mu\text{g/g}$) en cerebro de las ratas
tratadas con 10 mg As/kg como arsenito de sodio.

Grupo	$\mu\text{g As/ g cerebro} \pm \text{EEM}$
Control	0.21 ± 0.02 (9)
14 días	6.63 ± 0.26 (5) *
21 días	7.09 ± 0.67 (4) *
28 días	10.71 ± 0.18 (13) *

() = n del grupo

* $p < 0.05$ diferente del grupo control (prueba de Tukey, para n diferentes)

c. Discusión de resultados

Este experimento demostró que el tiempo de intoxicación con As y la privación de agua son determinantes para producir cambios conductuales y que el contenido de As en cerebro aumenta conforme aumenta el tiempo de intoxicación.

La concentración que se usó en este experimento no produjo cambios en el peso corporal en el transcurso del experimento, lo cual apoya la ausencia de efectos sistémicos de la concentración de 10 mg As/kg, tal como se encontró en el experimento I.

Los cuatro parámetros evaluados de la actividad locomotora espontánea (distancia total recorrida, número de movimientos totales, actividad vertical y número de movimientos verticales) disminuyeron en el grupo intoxicado a partir de la segunda semana de tratamiento con arsenito de sodio, lo cual podría deberse a que el As ejerce un efecto acumulativo es decir, hasta alcanzar cierta concentración sistémica se observa

la hipoactividad. La disminución en la actividad vertical y número de movimientos, continuó en la evaluación final del grupo expuesto a arsenito de sodio.

A diferencia del experimento I, los animales intoxicados con 10 mg As/kg durante el entrenamiento en una tarea egocéntrica que requiere el uso de información sensorial con respecto a la posición del cuerpo en el espacio, mostraron un incremento significativo en el número de errores cometidos, en tanto que no mostraron alteraciones en el desempeño de una tarea allocéntrica que requiere el uso de información espacial. Los ganglios basales parecen ser particularmente importantes para la realización de tareas de tipo egocéntrico, por lo que los resultados sugieren que estas estructuras pueden ser un blanco de la exposición a As.

En contra de lo que se hubiese esperado dados los resultados conductuales, el contenido de monoaminas en el estriado de los animales intoxicados con 10 mg As/kg no fue diferente de los animales control. Algunas alteraciones transitorias se detectaron más bien en corteza y mesencéfalo. En mesencéfalo encontramos disminuido el recambio DA/HVA, lo cual puede deberse a un aumento en la recaptura de esta monoamina o bien a una disminución en su metabolismo. En cuanto al contenido de monoaminas en corteza, en esta región encontramos un aumento en el contenido de DA a la segunda semana de intoxicación, el cual puede ser debido a que se encuentre aumentada la liberación y la producción de esta monoamina. Este aumento parece ser transitorio ya que desaparece en los días posteriores. También se encontró aumentado el contenido del ácido 5-hidroxiindolacético en corteza, que puede ser debido a un aumento en el catabolismo de la serotonina. Estos resultados sugieren que en el estriado existe una estricta regulación del contenido de monoaminas. Precisamente por la variedad de interacciones entre sistemas de neurotransmisores que coexisten esta estructura, es posible que existan mecanismos compensatorios que se activen inmediatamente cuando hay alguna alteración. Por otra parte, la determinación del contenido de neurotransmisores, no es el mejor indicador de actividad sináptica. La otra alternativa es que sean otras estructuras las que muestren alteraciones neuroquímicas debido a la intoxicación con arsenito de sodio.

Los estudios que muestran alteraciones del contenido de monoaminas en ganglios basales después de la intoxicación con arsenito de sodio, no son comparables con este

estudio ya que en estos estudios se usó un compuesto diferente como tóxico (Itoh *et al.*, 1990), ratones como unidad experimental (Itoh *et al.*, 1990; Mejía *et al.*, 1997) y un tiempo de intoxicación mayor al nuestro, además que en uno de estos estudios determinaron el contenido de monoaminas en cerebro entero y una dosis mayor de As (Tripathi *et al.*, 1997).

El contenido de As en los grupos expuestos a este metaloide fue diferente del control; cabe resaltar que en este estudio la dosis de As no varió entre los grupos, lo que cambió fueron los tiempos de intoxicación y encontramos que la concentración de As en cerebro aumenta de manera dependiente al tiempo de intoxicación en estas condiciones experimentales, es decir bajo privación de agua.

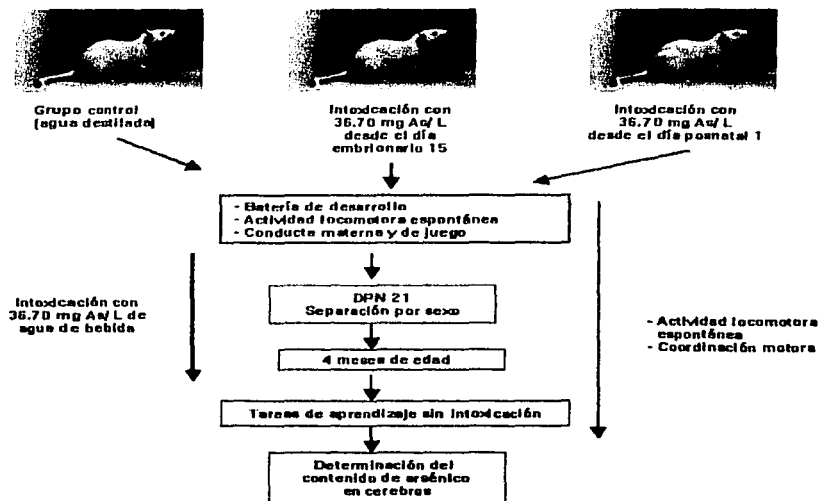
3. Experimento III

Evaluación de los efectos de la intoxicación con arsenito de sodio en la rata en desarrollo y en la edad adulta.

a. Método general

Ratas hembra Sprague-Dawley preñadas fueron habituadas durante una semana a un ciclo de luz/oscuridad invertido (10:00/22:00 hrs oscuridad). Cuatro ratas se expusieron diariamente a 36.70 mg As/L en el agua de bebida (~ 4 mg As/kg/día), para dos de ellas la exposición se inició en el día de desarrollo embrionario 15 (DE 15) y las dos restantes en el día postnatal 1 (PN1), a las ratas control se les proporcionó agua normal (destilada) como bebida. En todo el experimento las ratas tuvieron libre acceso a esta solución de bebida y alimento. Una vez destetadas las crías, se descartaron las hembras y los machos restantes tuvieron libre acceso a la solución de arsenito de sodio y comida hasta los tres y medio meses de vida

En el curso del experimento se registró el peso del animal. Durante las pruebas de aprendizaje, el animal sólo tuvo acceso a agua destilada durante 5 minutos diarios y el experimentador permaneció ciego al tratamiento recibido por cada animal.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Métodos particulares

1.1. Actividad locomotora espontánea

La evaluación de la actividad locomotora espontánea se basó en el protocolo descrito en el apéndice 1. Se evaluó esta actividad a las semanas 1, 2, 3, 9, 11 ó 17; en el último registro los animales estuvieron libres de intoxicación con arsénico.

1.2. Bateria de desarrollo y conducta materna

Para la evaluación de la batería de desarrollo a diferentes edades posnatales (4-15 días posnatales), se registraron apertura de oídos y párpados, la aparición de algunos reflejos y la conducta materna según el protocolo descrito en el apéndice 7.

1.3. Coordinación motora

Los animales se entrenaron y se probaron usando un Rotorod (Omni-Rotor Treadmill, Omnitech Electronics, Columbus, OH). Este aparato consiste de un cilindro giratorio controlado por un motor que permite la selección de velocidad y aceleración. Después de una prueba de ensayo inicial, y un periodo de entrenamiento, se evaluó la coordinación motora usando dos velocidades de aceleración. El tiempo en el cilindro, así como la velocidad a la cual el animal cae es registrada (Giordano *et al.*, 1990). La coordinación motora se evaluó en el 1º, 2º y 3º mes de vida de las ratas.

1.4. Pruebas de aprendizaje

1.4.1. Laberinto en T

Las tareas realizadas en este laberinto se basaron en el protocolo descrito en el apéndice 5. En esta tarea se entrenaron a las ratas a los 4 meses de edad, con 5 ensayos diarios durante 11 días, sin tratamiento con arsenito de sodio.

1.5. Determinación de arsénico

Al finalizar el periodo de prueba de las tareas de aprendizaje (aproximadamente 4 meses de vida), se sacrificaron algunas ratas tanto del grupo control y de los DE15 y PN1 mediante decapitación y otras fueron perfundidas con solución salina. Posteriormente se les extrajo el cerebro y se determinó la concentración de arsénico como se menciona en el experimento I.

b. Resultados

En cuanto a la actividad locomotora espontánea encontramos efectos significativos de tratamiento [Kruskal-Wallis (2, N= 32-64)= 6.18 – 10.09 $p < 0.05$]. Los grupos intoxicados fueron significativamente diferentes del control [U= 11.50-103.0 $p < 0.05$] en varios parámetros como son la actividad horizontal, número de movimientos verticales y tiempo en la periferia. Los grupos intoxicados mostraron alteraciones particularmente la primera, undécimo y decimoséptima semana de exposición al arsenito de sodio, como lo muestra la figura 7.

Actividad locomotora espontánea

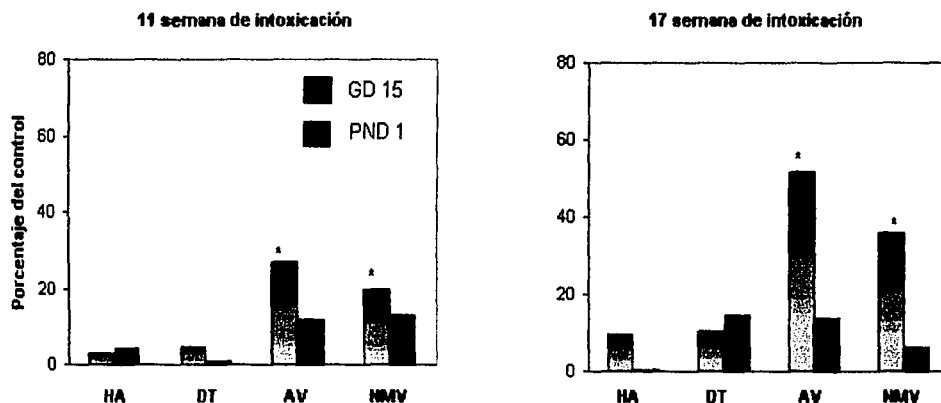


Figura 7. Actividad locomotora espontánea registrada en dos diferentes tiempos de intoxicación durante 15 minutos de la fase oscura del ciclo luzobscuridad. Las barras representan el porcentaje diferente del control de los diferentes parámetros registrados de los grupos intoxicados con 36.70 mg As/L de agua de bebida.

* $p < 0.05$ diferente del grupo control según la prueba U de Mann-Whitney.
El significado de las abreviaciones se describe en el apéndice 1.

El estado general de las crías, incluyendo el peso corporal y la aparición de diferentes reflejos (el reflejo de enderezamiento, el giro en su propio eje, el reflejo de enderezamiento en la caída, fuerza en las extremidades, geotaxis negativa), así como la conducta materna de las madres intoxicadas con arsénico fue similar en los grupos tratados y el grupo control. Se encontraron diferencias solamente en cuanto a la

apertura de oídos en el día postnatal 12 entre el control y el grupo DE15 [χ^2 (df=1)= 29.22 p<0.05]; en el grupo DE15 la apertura de oídos se presenta antes que en el grupo control (tabla V). En la apertura de párpados encontramos diferencias significativas en el día 14 de la prueba entre el grupo control y DE15 [χ^2 (df=1)= 15.63 p<0.05]; es decir que el grupo DE15 tardó más en abrir los párpados (tabla V).

Los animales tratados con arsenito de sodio no mostraron deficiencias en la prueba de coordinación motora. Todos los grupos mostraron un patrón de alternancia espontánea similar en el laberinto en T. Para la alternancia retardada realizada en el laberinto en T durante 6 días encontramos un efecto significativo del tratamiento [Kruskal-Wallis H(2,N= 27)= 7.45 p<0.05]. Tanto el grupo DE15 como el grupo PN1 cometieron más errores que el grupo control (U= 9.50, 12.00, p<0.05 respectivamente).

Tabla V. Batería de desarrollo

Prueba	Grupo	
	DE 15	DPN 1
Apertura de oídos	↑ DPN 11 *	↓ DPN 12 *
Apertura de párpados	↓ DPN 14-15 *	↓ DPN 15 *
Reflejo de enderezamiento	DPN 5	DPN 5
Geotaxis negativa	DPN 11	DPN 11
Giro en su propio eje	DPN 7	DPN 7
Reflejo de enderezamiento en la caída	DPN 13	DPN 13
Fuerza en las extremidades	DPN 13	DPN 13

* Diferente del grupo control según la prueba de χ^2 (df=1)= 4.30 - 15.63 p < 0.05

Alternancia retardada

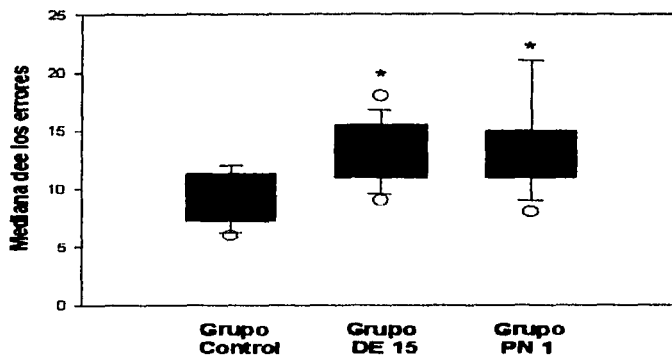


Figura 7. Número de errores cometidos en la tarea de alternancia retardada, ensayada en el laberinto en T. Cada símbolo representa la mediana y los cuartiles de cada grupo de ratas expuestas a 36.70 mg As/L de agua de bebida.

* Los grupos difieren significativamente en el número de errores cometidos según la prueba de U de Mann-Whitney, $p < 0.05$.

La concentración de arsénico en los cerebros de los dos grupos de ratas expuestas a arsenito de sodio desde el día de DE15 y el PN1 no fueron diferentes entre sí, pero sí lo fueron del control. También encontramos que la concentración de arsénico en los cerebros perfundidos con solución salina disminuyó casi 10 veces en todos los grupos.

TABLA VI.

Concentración de As ($\mu\text{g/g}$) en cerebro de las ratas intoxicadas con 36.70 mg As/L desde los días DE 15 y DP 1.

Grupos sin perfusión	Mediana
Control	0.6 (3)
DE 15	4.14 (7)*
DP 1	4.40 (7)*
Grupos perfundidos	Mediana
Control	0.04 (4)
DE 15	0.54 (4) *
DP 1	1.30 (3) *

() = n del grupo

** $p < 0.05$ diferente del grupo control según la prueba U de Mann-Whitney.

c. Discusión de resultados

Existen reportes de que el arsénico atraviesa la placenta y se excreta en la leche materna en pequeñas cantidades (Klaassen, 1996), por lo que se estudio el efecto de la intoxicación con una concentración de 36.70 mg As/L de agua de bebida en hembras preñadas y hembras lactantes: las crías fueron destetadas el día posnatal 21 y continuó la intoxicación con arsenito de sodio en agua de bebida a la misma concentración (36.70 mg As/L). Los resultados mostraron que este tratamiento no produjo cambios significativos en el peso corporal de las crías registrado a lo largo del experimento.

En cuanto a las pruebas registradas con la batería de desarrollo, estas no mostraron cambios en la mayoría de las pruebas, sólo hubo diferencias significativas en la apertura de párpados y de oídos entre el grupo control y los grupos intoxicados con arsenito de sodio. La apertura de oídos se presentó en una proporción mayor de animales del grupo DE 15 en el día 11, mientras que el grupo expuesto a arsenito mostró disminuida la proporción de animales con los oídos abiertos en el día posnatal 12. En cuanto a la apertura de párpados, una mayor proporción del grupo control presentó la apertura antes que los grupos expuestos a arsenito de sodio. Lo anterior sugiere una desincronización en los procesos de maduración, producida por la exposición a arsenito de sodio en ambos grupos expuestos a este metaloide, estos resultados deben ser interpretados con cautela ya que no concuerdan con la evaluación en las otras pruebas de maduración.

En este experimento, al igual que en los dos anteriores, se encontraron incrementos en parámetros de la actividad locomotora espontánea desde la primera semana de nacimiento, siendo el grupo expuesto en el día de desarrollo embrionario 15 el más sensible a la exposición. Dado que la etapa del desarrollo catecolaminérgico inicia en el día embrionario 8 y termina en el 16 (Miller *et al.*, 1994), es posible que el sistema catecolaminérgico sea un blanco sensible a la acción del As, como ya ha sido reportado por otros estudios en los cuales se muestran alteraciones en el contenido de monoaminas y sus metabolitos en distintas áreas cerebrales después de la exposición a As (Itoh *et al.*, 1990; Mejía *et al.*, 1997).

Al igual que en los experimentos I y II, todos los grupos se comportaron de manera semejante durante la tarea de alternancia espontánea. En tanto que hubo una diferencia

significativa en la tarea de alternancia retardada en el laberinto en T entre el grupo control y los grupos DE 15 y PN1, lo cual concuerda con el estudio anterior en el cual también se encontró alterada la misma tarea de aprendizaje, al aumentar el tiempo de exposición As. Estos resultados sugieren que la exposición a arsénico modifica la habilidad de los animales expuestos para resolver una tarea que requiere del uso de información sensorial respecto a su posición en el espacio.

A diferencia del estudio anterior, las ratas fueron entrenadas y probadas en las tareas de aprendizaje registradas en el laberinto en T, después de finalizado el periodo de exposición y sin embargo, también mostraron alteraciones semejantes en el desempeño de la tarea de alternancia retardada. Estos resultados indican que la exposición a As desde el desarrollo hasta la edad adulta, induce cambios que no se recuperan hasta un mes después del fin de la exposición.

La concentración de As tanto en los cerebros perfundidos con solución salina y los no perfundidos en los dos grupos de ratas tratadas con As, es significativamente mayor que la concentración de As en los cerebros del grupo control. Los resultados de los cerebros perfundidos con solución salina nos muestran que gran parte de este metaloide se encuentra unido a componentes de la sangre (Vahter, 1981).

4. Conclusiones generales de la intoxicación con arsenito de sodio

1. Las alteraciones conductuales producidas por la exposición a arsenito de sodio dependen de la concentración, del tiempo de exposición y las condiciones experimentales a las que se encuentra sometido el animal durante la exposición a este metaloide.
2. Las alteraciones conductuales observadas en la fase de aprendizaje son semejantes en ratas expuestas a arsenito de sodio desde la edad adulta y las ratas expuestas desde el periodo embrionario o desde la lactancia. En contraste, las alteraciones en la conducta locomotora son opuestas dependiendo de cuando se inicia el periodo de exposición.
3. La concentración efectiva que no induce cambios generalizados, pero sí cambios en el comportamiento en el animal adulto, es de 10 mg de As/Kg de peso.
4. La ausencia de cambios gruesos en el contenido de monoaminas en los ganglios basales puede ser debida a mecanismos compensatorios en estas estructuras, por otros sistemas de neurotransmisores. Además, debido a que las monoaminas son neuromoduladores del flujo de información en los sistemas de neurotransmisión GABAérgicos y glutamatérgicos de los ganglios basales, sería importante evaluar los efectos de la exposición a As en otros sistemas de neurotransmisores. Aunque cabe mencionar que el contenido de neurotransmisores o neuromoduladores en una región cerebral no es el mejor indicador de la actividad sináptica.
5. La concentración de As en cerebro incrementa en función del tiempo de exposición, pero no de la dosis de exposición. En cerebros sin perfundir, la concentración de As es mayor que en los cerebros perfundidos.

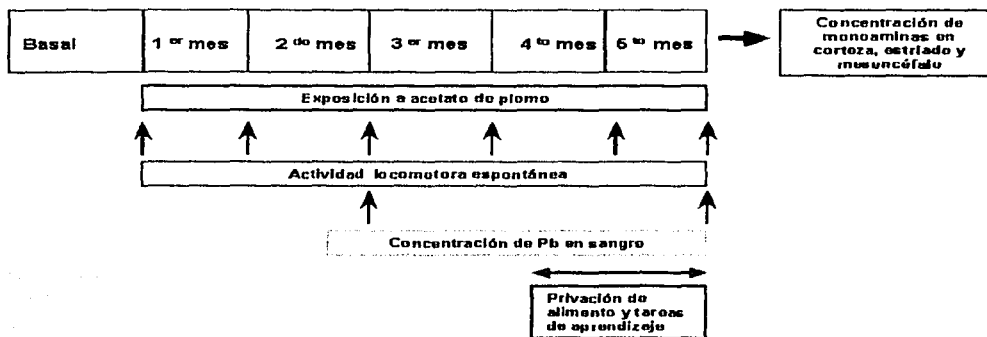
B. Intoxicación con acetato de plomo

1. Experimento I

Efectos de la intoxicación con acetato de plomo sobre tareas conductuales y contenido de monoaminas en la rata albina.

a. Método general

Cuatro grupos de ratas macho Sprague-Dawley (n= 7- 10) se trataron con dos diferentes concentraciones de acetato de plomo (50 ó 150 mg Ac Pb/L) disuelto en el agua de bebida y al grupo control se le administró agua destilada como solución de bebida desde el 21 día de edad postnatal hasta el fin del experimento (aproximadamente 5 meses de edad). También se usaron dos grupos lesionados con ácido 3-nitropropiónico o ácido kaínico en el núcleo accumbens como controles positivos en la tarea de aprendizaje gana y cambia con retardo probada en el laberinto radial. Las ratas tuvieron acceso a la solución de agua con Ac Pb y al alimento. Tres días antes del periodo de prueba de aprendizaje en el laberinto radial, a los animales se les disminuyó el consumo de alimento con el propósito de disminuir el peso corporal a un 85%, lo anterior con el fin de mantener un estado motivacional aumentado, ya que se usó alimento como reforzador. En el curso del experimento se registró la actividad locomotora espontánea. Durante las pruebas de aprendizaje el experimentador permaneció ciego al tratamiento recibido por cada animal.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. Métodos particulares

1.1. Lesión en núcleo accumbens

1.1.1. Cirugía

Las ratas se anestesiaron con una mezcla de xilacina (60 mg/ml) y ketamina (70 mg/ml). Se lesionaron bilateralmente con ácido 3-nitropropiónico (A3-NP) o ácido kaínico (AK) en la región ventromedial del núcleo accumbens. Las coordenadas esterotáxicas fueron AP= +1.6 mm, ML= \pm 1.6 de acuerdo a Bregma y DV= -7.6 del cráneo (Paxinos and Watson, 1986). A las ratas se les inyectó 250 nM de A3-NP ó 2.5 nM de AK disueltos en un volumen de 0.5 μ L de PBS 0.1 M pH= 7.4 en cada núcleo accumbens. Los animales permanecieron en reposo durante 10 días después de la cirugía.

1.2. Actividad locomotora espontánea

La evaluación de la actividad locomotora espontánea se basó en el protocolo descrito en el apéndice 1 y se realizarán los registros el 1, 2, 3 y 4 mes de tratamiento con Ac Pb.

1.3. Pruebas de aprendizaje

1.3.1. Prueba de aprendizaje de lugar en el laberinto radial de ocho brazos (variante gana-cambia con retardo).

Con esta prueba se evaluó la capacidad de los animales para resolver una tarea usando claves espaciales, según el protocolo descrito en el apéndice 4. . Esta prueba se inició al completar cuatro meses de intoxicación. Durante todo el entrenamiento, los animales continuaron intoxicados con acetato de plomo en el agua de bebida. Se probaron a las ratas con dos ensayos diarios durante aproximadamente 10 días.

1.3.2. Laberinto en T

Las tareas realizadas en este laberinto se basaron en el mismo protocolo descrito para el experimento I (arsénico), el cual es presentado en el apéndice 5. Al finalizar el periodo de prueba en el laberinto radial, se continuó registrando a las ratas en el laberinto en T. En esta tarea se probaron las ratas mediante 10 ensayos diarios durante 10 días. En esta tarea también se continuó con la exposición a Pb.

1.4. Análisis de monoaminas y sus metabolitos en mesencéfalo, corteza y estriado ventral.

Al finalizar las tareas de aprendizaje, se sacrificaron a los animales por dislocación cervical y se les extrajo el mesencéfalo, el estriado y la corteza. La determinación de monoaminas se hizo por cromatografía de líquidos acoplada a un detector electroquímico, según el protocolo descrito en el apéndice 6.

1.5. Determinación de plomo

Para la determinación de Pb se sangró al animal de la cola y se colectó 100 uL de sangre en un vial con EDTA para evitar la coagulación, la determinación en cerebro se hizo tal como se menciona en el protocolo descrito por Vather et al., (1991). La determinación de Pb en sangre se realizó antes de iniciar las tareas de aprendizaje mientras que la determinación de Pb en cerebro se hizo al finalizar las tareas de aprendizaje.

b. Resultados

Las ratas expuestas a acetato de plomo (50 ó 150 mg Ac Pb/L) en el agua de bebida no mostraron cambios en su apariencia ni en el peso corporal con respecto a las ratas control (datos no mostrados).

La concentración de Pb en sangre fue mas alta en las ratas expuestas durante 4 meses a 50 ó 150 mg Ac Pb/L de agua de bebida, que en el grupo control [$F(2,18)=101.77$, seguido de una prueba de Tukey $p<0.05$] (tabla VII).

Tabla VII. Concentración de plomo en sangre de ratas intoxicadas con 50 ó 150 mg Ac Pb/L de agua de bebida.

Grupo	$\mu\text{g/dL}$
Control	2.8 ± 1.06
50 mg Ac Pb/L	$26.5 \pm 10.02^*$
150 mg Ac Pb/L	$43.429 \pm 16.41^*$

Los valores de los grupos representan la media \pm EEM

* $p < 0.05$ diferente del grupo control según la prueba de Tukey, para n iguales

En cuanto a la actividad locomotora espontánea, se observó un incremento significativo durante la exposición a acetato de plomo en varios de los parámetros registrados [intervalo de valores de $F(2,18) = 4.62 - 12.34$, $p < 0.05$]. Las pruebas post hoc mostraron diferencias significativas entre los grupos expuestos a 50 ó 150 mg Ac Pb/L de agua y el grupo control en la actividad horizontal, el número de movimientos, el tiempo en movimiento, tiempo en reposo, la actividad vertical y el número de movimientos verticales en el tercer y cuarto mes de tratamiento con acetato de plomo (figura 10, Tabla VIII).

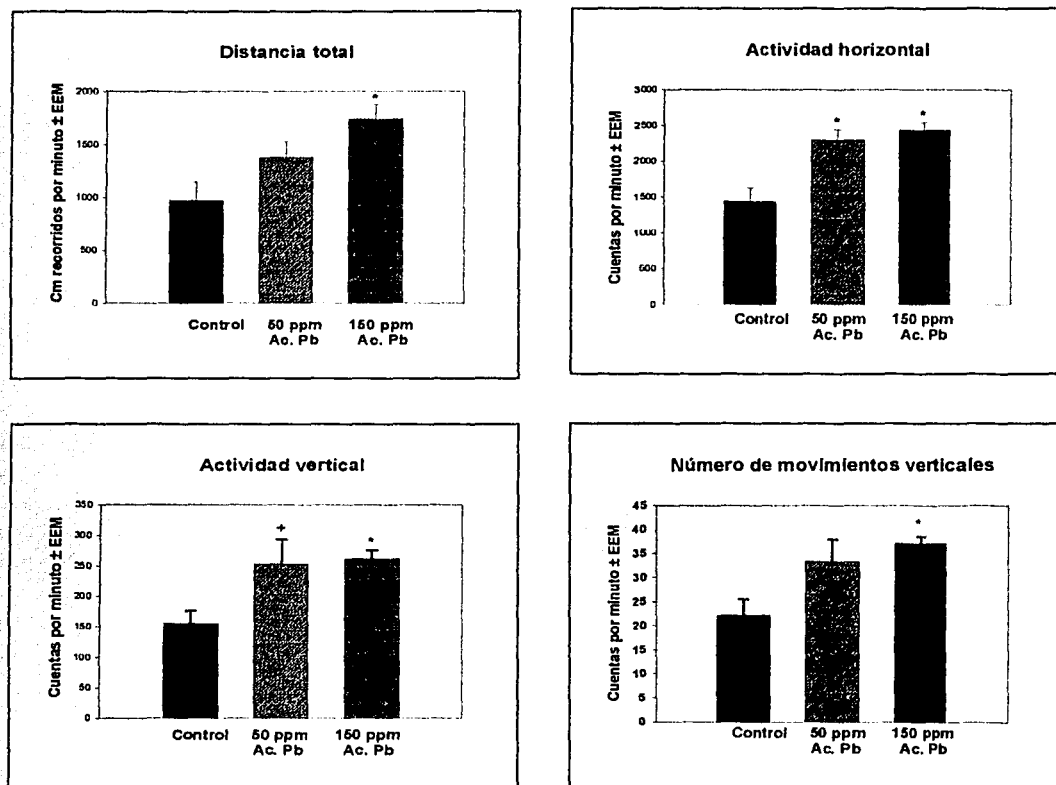


Figura 10. Actividad horizontal, distancia total, actividad vertical y número de movimientos verticales, registrados durante 15 minutos de la fase oscura del ciclo luz/obscuridad, de los grupos de ratas intoxicados con 50 ó 150 mg Ac Pb/ L de agua de bebida durante 4 meses.

* $p < 0.05$ diferente del grupo control según la prueba de Tukey.

Con respecto a la tarea de aprendizaje gana-cambia con retardo en la cual se probaron animales lesionados en el núcleo accumbens con AK o A3-NP, se encontró efecto de tratamiento [$F(2, 21) = 5.4, p < 0.05$] en el número de errores entre los ensayos, encontrándose un mayor número de errores en grupo lesionado con AK según la prueba de Tukey para n diferentes (figura 11). Las figuras de las lesiones en el núcleo accumbens debido a la inyección de neurotóxicas se muestran en la figura 12.

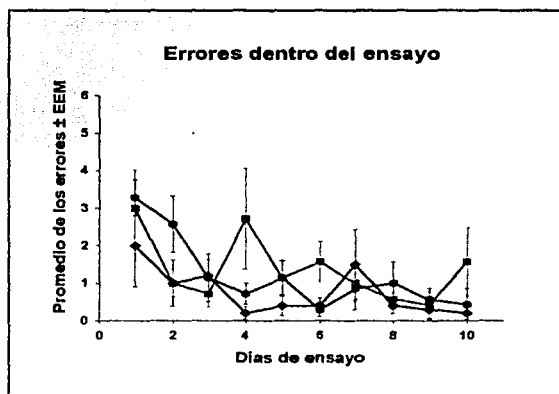
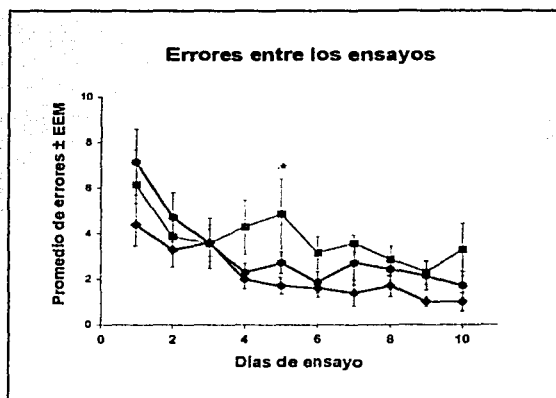
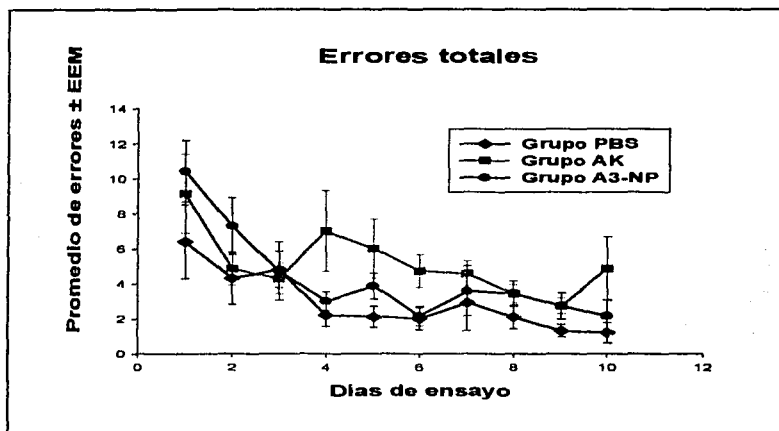
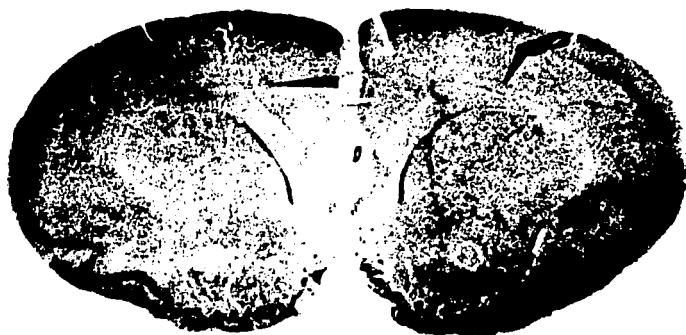


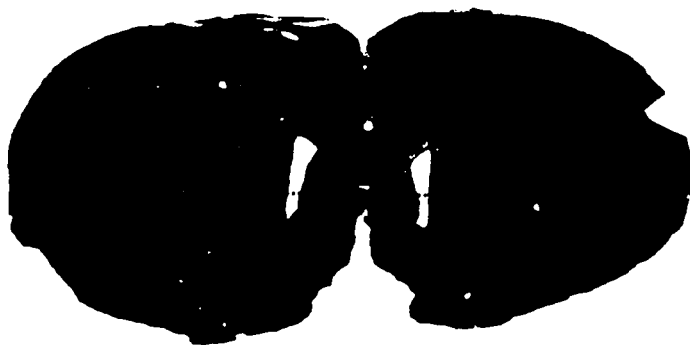
Figura 11. Efectos de la lesión en el núcleo accumbens con las excitotoxinas ácido kaínico o ácido 3-nitropropiónico sobre la tarea de aprendizaje espacial
* $p < 0.05$ según la prueba de Tukey para n diferentes.



A



B



C

— 1 mm

Figura 12. Cortes representativos del grupo control (A), grupo lesionado con ácido 3-nitropropiónico (B) grupo lesionado con ácido kainico (C), teñidos mediante la reacción de violeta de cresilo y observados a 3.2 x.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con respecto a las tareas de aprendizaje realizadas en el laberinto radial y en el laberinto en T, no se encontró un efecto significativo del tratamiento con Ac Pb, es decir todos los grupos mostraron un promedio de errores similar. Solamente se encontró un efecto significativo de días de entrenamiento para los errores totales en la tarea de aprendizaje probada en el laberinto radial de ocho brazos (variante gana y cambia con retardo) [F (9, 270)= 11.61, $p < 0.05$] (figura 13), para la alternancia retardada realizada en el laberinto en T [F(4, 68)= 5.55, $p < 0.05$] (figura 14) y para la tarea de gana y cambia probada en el laberinto radial [F (4, 72)= 4.07, $p < 0.05$] (figura 15).

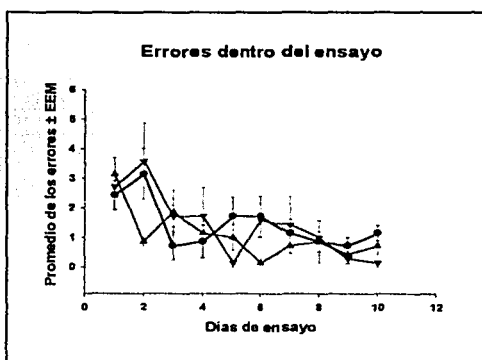
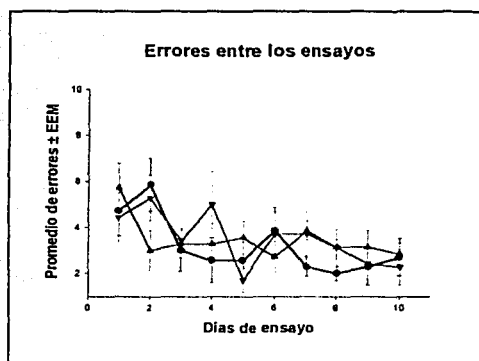
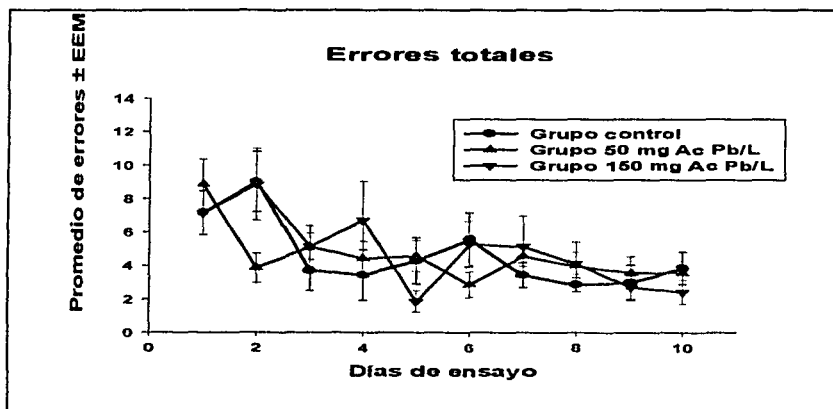
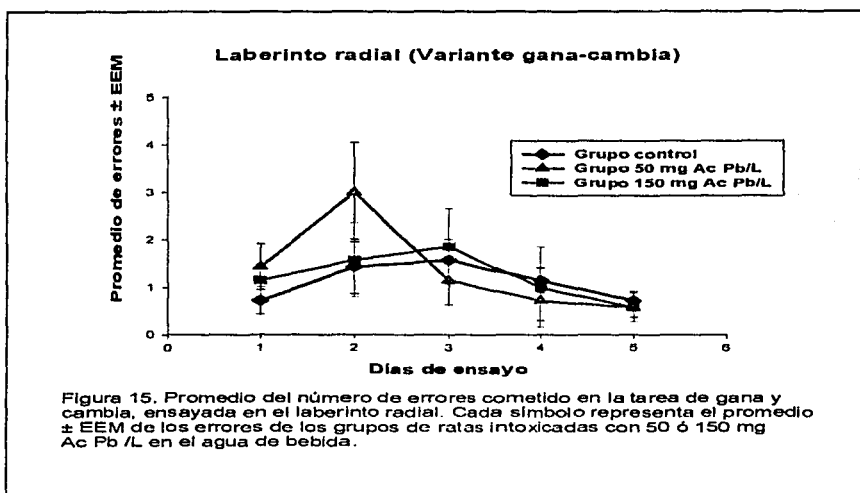
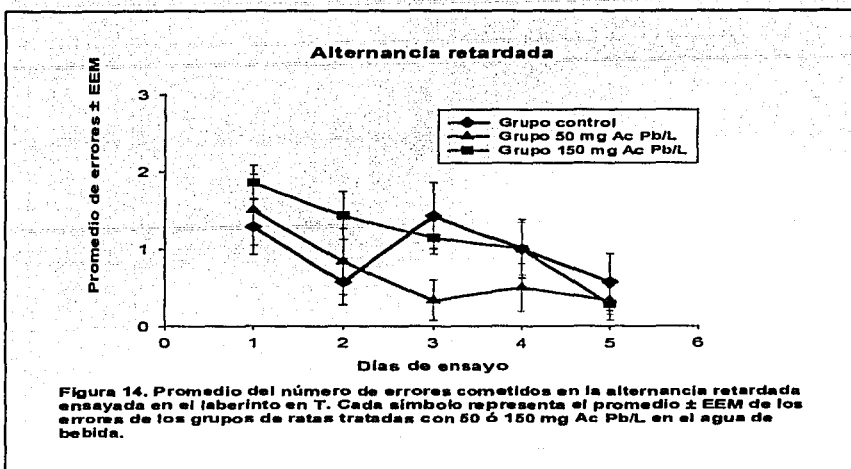


Figura 13. Efectos de la intoxicación con 50 ó 150 mg Ac Pb/L de agua de bebida sobre la tarea de aprendizaje espacial variante gana y cambia con retardo.



Las determinaciones del contenido de catecolaminas y sus metabolitos en corteza mostraron una disminución en el contenido de DOPAC [$F(2, 18) = 11.12, p < 0.05$] en los grupos intoxicados a Ac Pb con respecto al grupo control y un aumento en el contenido de serotonina [$F(2, 18) = 4.95, p < 0.05$] en el grupo 150 mg Ac Pb/L. En estriado se encontró aumentado el contenido de DA [$F(2, 17) = 8.01, p < 0.05$] en el grupo tratado con

50 mg Ac Pb/L y el recambio de DA/HVA [F (2, 17)= 6.43, p<0.05] en los dos grupos expuestos a Ac Pb. En mesencéfalo se observó una disminución en el contenido de DOPAC en el grupo expuesto a 50 mg Ac Pb/L y de HVA en el grupo expuesto a 150 mg Ac Pb/L, mientras que el contenido de dopamina y cociente de DA/HVA se observó aumentado en el grupo expuesto a 50 mg/L de acetato de plomo [intervalo de valores de F para DOPAC, HVA, DA y DA/HVA: F(2, 18)= 4.48-11.12, p<0.05] (Tabla IX), los resultados de DA y DOPAC en corteza, mesencéfalo y estriado se muestran figura 16.

Contenido de dopamina y DOPAC en corteza, mesencéfalo y estriado de rata

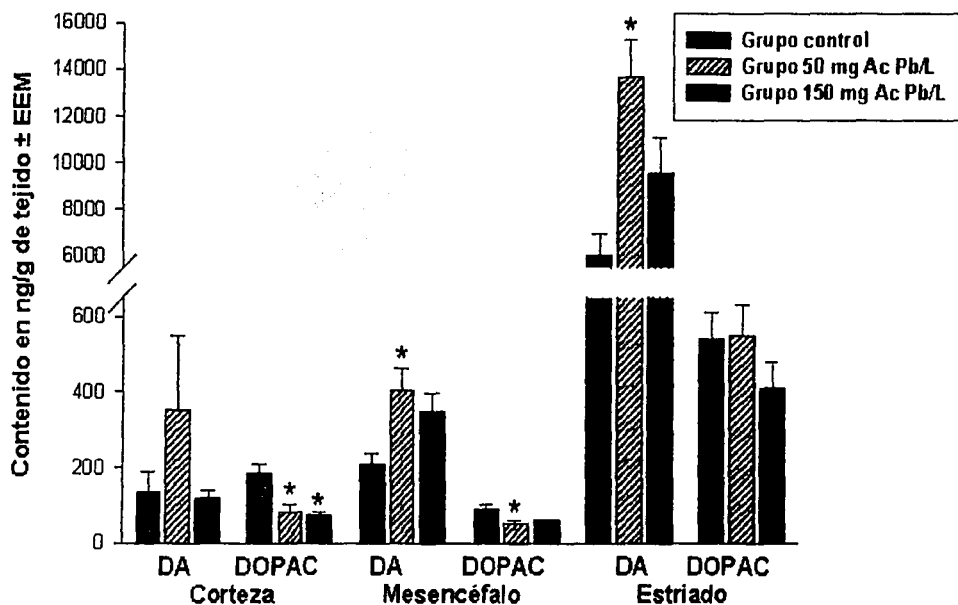


Figura 16. Contenido de dopamina (DA) y ácido dihidroxifenil acético (DOPAC) en corteza, mesencéfalo y estriado de ratas expuestas durante 4 meses a 50 y 150 ppm de acetato de plomo en el agua de bebida. Se encontraron efectos de grupo F(2,18)=4.48-11.12. * p < 0.05 según la prueba de Tukey para n diferentes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Tabla IX. Concentración de monoaminas y sus metabolitos (ng/g de tejido) en corteza, mesencéfalo y estriado de ratas tratadas con 50 ó 150 mg /L. de acetato de plomo en el agua de bebida durante 4 meses.

Corteza

	DOPAC	NE	HIAA	DA	5-HT
Control	183.71 ± 24.67	488.04 ± 49.53	142.32 ± 23.65	134.29 ± 52.20	474.50 ± 83.55
Pb 50	83.47 ± 17.67 *	549.28 ± 26.85	178.47 ± 19.85	352.73 ± 195.00	518.89 ± 45.08
Pb 150	71.84 ± 10.00 *	619.62 ± 40.91	214.76 ± 19.85	117.98 ± 20.05	725.65 ± 43.50 *

Mesencéfalo

	DOPAC	NE	5-HIAA	HVA	DA	5-HT	DA/HVA
Control	89.35 ± 13.09	523.92 ± 47.88	435.38 ± 32.86	39.32 ± 4.61	207.34 ± 30.51	821.05 ± 72.70	5.90 ± 1.60
Pb 50	53.87 ± 7.52 *	612.54 ± 54.00	592.51 ± 35.91 *	29.48 ± 4.03	405.84 ± 56.74 *	1042.92 ± 106.79	14.52 ± 2.05 *
Pb 150	59.30 ± 4.05	566.40 ± 30.67	588.37 ± 52.97 *	16.44 ± 6.13 *	347.82 ± 48.64	1020.32 ± 144.66	12.12 ± 1.25

Estriado

	DOPAC	NE	HIAA	HVA	DA	HT	DA/HVA
Control	540.78 ± 71.74	462.60 ± 120.01	289.23 ± 54.06	378.15 ± 36.47	6010.18 ± 939.33	564.96 ± 129.08	17.149 ± 3.763
Pb 50	548.21 ± 81.01	347.61 ± 23.44	284.76 ± 45.69	476.82 ± 68.91	13693.13 ± 1557.27 *	415.54 ± 106.57	29.859 ± 2.246 *
Pb 150	408.60 ± 69.30	582.58 ± 86.27	423.29 ± 34.64	354.67 ± 55.37	9582.26 ± 1484.63	675.24 ± 54.08	27.295 ± 1.134 *

c. Discusión de resultados

La exposición a acetato de plomo en el agua de bebida no causó cambios en el peso corporal, ni en la apariencia general de las ratas lo que nos indica que las concentraciones usadas no causaron efectos periféricos que pudieran ser evidentes en el cambio de peso o por la simple observación del animal.

En cuanto a la actividad locomotora espontánea se observó un incremento en algunos parámetros en ambos grupos expuestos al acetato de plomo con respecto al grupo control. Dado que no se encontró evidencia de efectos periféricos, los cambios podrían ser debido a efectos del Pb en el sistema nervioso central descritos en la literatura (Adhami *et al.*, 2000; Gupta and Gill, 2000). Estos resultados coinciden con otros estudios, en los cuales se reporta un aumento en la actividad locomotora en ratas y monos expuestos a acetato de plomo desde el desarrollo (Allen *et al.*, 1974; Kostas *et al.*, 1976; Ma *et al.*, 1999; Silbergeld and Goldberg, 1974).

Con respecto al contenido de monoaminas, el aumento en el contenido de DA y en el cociente DA/HVA indican una mayor disponibilidad de la DA en mesencéfalo y en el estriado de los grupo expuesto a 50 mg de acetato de plomo/L de agua de bebida. Esta mayor cantidad de DA en estas estructuras relacionadas con la actividad locomotora (estriado ventral o núcleo accumbens), concuerda con la hiperactividad observada en los grupos expuestos a acetato de plomo. Estudios previos han mostrado que la inyección de DA en el núcleo accumbens causa hipermotilidad; además, ratas expuestas durante 17 meses a acetato de plomo muestran aumentada de liberación de DA en el núcleo accumbens (Pijnenburg and van Rossum, 1973) y que la exposición a acetato de plomo disminuye el contenido de los metabolitos de DA en el núcleo accumbens (Kala and Jadhav, 1995a). Aunque en este estudio no se diseccionó el núcleo accumbens, éste se encontraba incluido en el estriado. En cuanto al contenido de serotonina aumentado en la corteza, este puede ser debido a un aumento en la liberación de esta monoamina.

En las tareas de aprendizaje llevadas a cabo en el laberinto radial y en el laberinto en T, no se encontraron deficiencias en el desempeño de los animales, lo que sugiere que el Pb no produce efectos sobre las estructuras involucradas en la adquisición de estas tareas espaciales. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Ferguson *et al.*, (1998)

y Ma et al., (1999), donde ellos no encontraron ninguna alteración en el desempeño de una tarea de tipo espacial en ratas expuestas a 350 ó 1000 mg/L de acetato de plomo. Lo anterior contrasta con los resultados de otros autores que reportan deficiencias en el desempeño de tareas de tipo espacial (Rice and Gilbert, 1985). En cuanto a los grupos lesionados con A3-NP o con AK en el núcleo accumbens, no encontramos deficiencias en el desempeño de los animales lesionados con A3-NP y el grupo control, lo cual puede ser debido a que el tamaño de la lesión no fue lo suficientemente grande para producir un efecto evidente en el desempeño de esta tarea (Véase figura 16). Mientras que los animales lesionados con AK cometieron un mayor número de errores en los errores entre los ensayos de la tarea de gana y cambia con retardo ensayada en el laberinto radial (ver figura 11), lo cual esta de acuerdo con el reporte de que la inactivación con lidocaina de esta región altera el desempeño de esta tarea (Floresco *et al.*, 1997).

La exposición a acetato de plomo durante cuatro meses desde el destete, produce alteraciones en la actividad locomotora y en el contenido de monoaminas, pero no produce ninguna alteración en las diferentes tareas de aprendizaje.

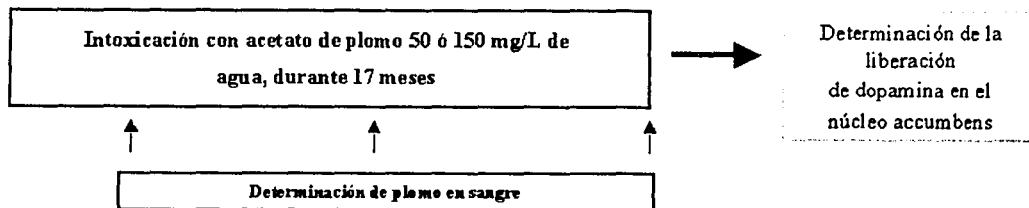
2. Experimento II

Efectos de la exposición al acetato de plomo (Ac Pb) sobre la liberación de dopamina en el núcleo accumbens de la rata.

a. Método general

Tres grupos de ratas macho Long-Evans ($n= 8-10$) fueron expuestas a diferentes concentraciones de acetato de plomo (50 ó 150 mg/L) disuelto en el agua de bebida desde los 21 días de edad hasta el día de la cirugía (aproximadamente 17 meses). Las ratas tuvieron libre acceso a la solución de agua con Pb y al alimento, que es una dieta semipurificada (Purina chow 5755C), la cual mantiene los niveles de metales esenciales para permitir la absorción oral del Pb. Una vez que alcanzaron los 300 g de peso, se redujo la ingestión de alimento para mantener a los animales en este peso. Lo anterior fue para tener las condiciones idénticas a las usadas en estudios anteriores, en los cuales el Pb produjo cambios en el desempeño de tareas de aprendizaje en los que se usó alimento como reforzador y se requirió la restricción de la ingestión de comida para mantener el estado motivacional (Cohn *et al.*, 1993).

La metodología para el registro electroquímico de la liberación de DA en el núcleo accumbens de la rata expuesta a Pb ha sido descrita anteriormente y se desarrolla en el apéndice 8.



b. Resultados

La figura 17 muestra que no hubo cambios significativos en la liberación de DA inducida por la inyección de alto potasio (70 mM KCl, 79 mM NaCl, y 2.5 mM CaCl₂) en

el núcleo accumbens de ratas tratadas con 50 ó 150 ppm de acetato de plomo en el agua de bebida con respecto al grupo control. También se puede observar que la inyección de aCSF y de MK-801 (0.8 y 1.6 μM en 0.4 μL de PBS) en la corteza prefrontal (región prelímbica) tampoco tuvieron un efecto significativo sobre la liberación de DA en el núcleo accumbens en ningún grupo.

Liberación de dopamina en el núcleo accumbens de ratas expuestas a acetato de plomo

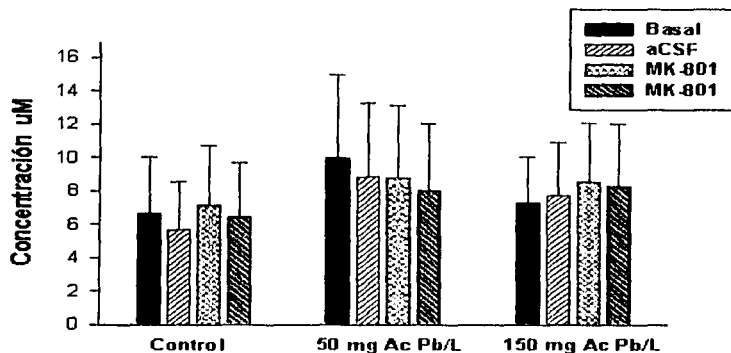


Figura 17. Promedio de la liberación de dopamina (μM) \pm EEM inducida por la inyección de alto Potasio en el núcleo accumbens de ratas expuestas a 0, 50 y 150 mg Ac Pb/L de agua de bebida, a las cuales se les inyectó aCSF y MK-801 en la corteza prefrontal (región prelímbica).

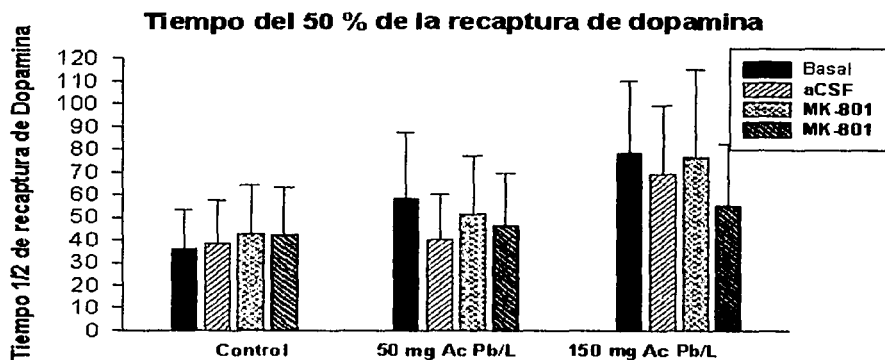


Figura 18. Promedio del tiempo (seg) \pm EEM de recaptura de 50 % de dopamina liberada, por la inyección de alto potasio en el núcleo accumbens de ratas expuestas a 0, 50 y 150 mg Ac Pb/L de agua de bebida, a las cuales se les inyectó aCSF y MK-801 en la corteza prefrontal (región prelímbica).

La figura 18, muestra que en el tiempo promedio de recaptura del 50 % de DA liberada por la inyección de alto potasio en el núcleo accumbens fue similar en ratas expuestas a 50 ó 150 ppm de acetato de plomo en el agua de bebida y en el grupo control. También se puede observar que la inyección de aCSF y de MK-801 (0.8 y 1.6 μM en 0.4 μL) en la corteza prefrontal (región prelímbica) tampoco tienen un efecto sobre la recaptura de DA.

c. Discusión de resultados

La ausencia de diferencias en la liberación de DA basal (sin inyección en la corteza prelímbica) inducida por alto potasio, entre los grupos intoxicados con 50 ó 150 mg Ac Pb/ y el grupo control de nuestro experimento (figura 17), están de acuerdo con un estudio reportado por Zuch et al., (1998). En dicho estudio, ellos no reportan cambios en la liberación de DA inducida por alto potasio registrada por detección electroquímica *in vivo*, en el núcleo accumbens de ratas expuestas a 50 ó 150 mg Ac Pb/L durante 11 meses, aunque observaron aumentada la liberación en el grupo expuesto a 50 mg Ac Pb/L durante 11 semanas. Tampoco encontraron cambios en la liberación ni en la recaptura de DA en el cuerpo del núcleo accumbens en ninguno de los grupos tratados en los dos periodos de exposición. El aumento de DA en el núcleo accumbens de ratas expuestas a 50 mg Ac Pb/L, durante 11 semanas del experimento de Zuch et al., (1998) podría reflejar que inicialmente hay un aumento de producción de DA, pero al aumentar el periodo de exposición, la producción de DA disminuye. Esta reducción puede ser resultado de cambios en la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa que es regulada por DA (mecanismos de inhibición por producto) o bien porque se activen los mecanismos compensatorios en el sistema dopaminérgico (aumento en la recaptura, aumento del catabolismo de DA, entre otros) los cuales impiden que se mantenga incrementada la concentración de DA.

Tampoco se observó algún efecto por la inyección del antagonista glutamatérgico MK-801 en la corteza prelímbica sobre la liberación de DA evocada por alto potasio en el cuerpo del núcleo accumbens, tanto en los grupos control como en los expuestos a Pb. Esto podría deberse a: 1) que la región en la corteza prelímbica en donde se inyectó el MK-801 no fue lo suficientemente grande para bloquear las aferencias glutamatérgicas

y producir un efecto en la liberación de DA, 2) un efecto de amortiguación por inervación glutamatérgica proveniente del subículo o de la corteza prefrontal contralateral al cuerpo del núcleo accumbens, lo cual tampoco cambiaría la liberación de DA, o 3) que la región en donde se insertó el electrodo de registro no haya coincidido con la fuente glutamatérgica proveniente de la corteza prefrontal.

Ahora bien, la figura 18 muestra que el tiempo de recaptura del 50 % de DA fue similar en todos los grupos, aunque se observa una tendencia a aumento en el grupo tratado con 50 mg Ac Pb/L, lo cual sugiere que la recaptura (transportadores) de DA podría encontrarse disminuida. Este aumento en el tiempo de recaptura podría producir efectos neurotóxicos, ya que la DA al auto-oxidarse en presencia de hierro, puede llegar a producir reacciones de Fenton, generando radicales libres con la consecuente muerte neuronal (Bondy, 1997).

En conclusión, estos experimentos indican sólo una tendencia a aumentar el tiempo de recaptura de DA en el núcleo accumbens de ratas tratadas con 150 mg Ac Pb/L durante 17 meses. También es importante aclarar que es necesario sumar estos datos con resultados preliminares (primera parte del proyecto, Cory-Slechta, comunicación personal) para analizarlos estadísticamente y observar si esta tendencia resulta significativa. Finalmente, se debe hacer notar que las concentraciones de Pb usadas en este experimento, a una solución de 50 ó 150 mg Ac Pb/L, no causaron efectos inespecíficos en los animales expuestos a ellas.

3. Conclusiones generales de la exposición a acetato de plomo

1. La exposición a 50 ó 150 mg/L de acetato de plomo durante cuatro meses produjo hiperactividad en las ratas, la cual correlaciona con los niveles aumentados de DA y sus metabolitos en el estriado y mesencéfalo.
2. Las tareas de aprendizaje egocéntrico (involucra al estriado dorsal) e allocéntrico (involucran al núcleo accumbens y formación hipocampal) no se vieron afectadas por la exposición a este metal. Lo anterior puede deberse a que las tareas utilizadas para evaluar estos tipos de aprendizaje no sean lo suficientemente sensibles para detectar alteraciones debidas a la exposición al Pb.
3. La ausencia de alteraciones en la liberación de DA de ratas tratadas con 50 ó 150 mg/L de acetato de plomo durante 17 meses puede ser debida a una estrecha regulación de la liberación de esta monoaminas en esta estructura cerebral. Además, la tendencia a aumentar la recaptura de DA, puede deberse a una disminución en el número de transportadores de DA.

VII. Conclusiones generales del estudio

El As y Pb se encuentran en el medio ambiente, ya sea en forma natural o provenientes de diversas fuentes derivadas de la actividad humana. La exposición a estos metales causa diversos desórdenes en la función molecular y celular, las cuales conducen a la aparición de diversas enfermedades que van desde la anemia, cáncer, hasta desordenes neurológicos, entre otros. Estos metales pueden almacenarse en cerebro y ahí ejercer acciones tóxicas como alteraciones en el metabolismo de neurotransmisores y neuromoduladores, lo cual conduce a alteraciones en la conducta. Estudios previos han reportado cambios en el metabolismo de los sistemas de neurotransmisión en los ganglios basales de roedores expuestos tanto a As como a Pb. Estas estructuras cerebrales se han relacionado con funciones tan diversas que van desde el movimiento, el aprendizaje, la memoria y conductas de reforzamiento.

En este estudio se probó el efecto de la exposición a arsenito de sodio o acetato de plomo en el sistema dopaminérgico, además de diferentes tareas conductuales relacionadas con la función de los ganglios basales como son: actividad locomotora espontánea, manipulación alimenticia, tareas de aprendizaje egocéntricas y aloécnicas.

Para los experimentos con arsenito de sodio, evaluamos tanto ratas adultas como en desarrollo a diferentes tiempos de exposición de 2, 4 ó 17 semanas. Los cambios en la conducta encontrados fueron dependientes de la concentración de As, tiempo de exposición y de condiciones experimentales, como vía de administración, la privación de alimento o agua y el periodo en que se ensayaron a los animales en las tareas de aprendizaje. Además, las alteraciones conductuales debidas a la exposición a arsenito de sodio parecen no estar correlacionadas con cambios en el sistema dopaminérgico. Los resultados encontrados en la actividad locomotora están de acuerdo con lo reportado en la literatura en que la exposición a arsenito de sodio a una dosis baja y una dosis alta, produce hiperactividad e hipoactividad, respectivamente. Estos resultados sugieren que la exposición a As modifica la habilidad de los animales para desempeñar una tarea que requiere el procesamiento de información por los ganglios basales.

En relación con los estudios con acetato de plomo, podemos concluir que la liberación de DA en el núcleo accumbens no se vio afectada por la exposición a 50 ó 150 mg Ac

Pb/L en el agua de bebida durante 17 meses, lo cual puede deberse a la existencia de mecanismos compensatorios que regulan la liberación de esta monoamina. Un estudio previo reportó un aumento de la liberación de DA y ningún cambio en la recaptura de DA en el núcleo accumbens, cuando la exposición a 50 mg/L de acetato de plomo duraba 11 semanas, pero no 11 meses. La tendencia a aumentar el tiempo de recaptura de DA puede deberse a la disminución de la unión de la DA a su transportador, ya que ratas expuestas a acetato de plomo durante dos semanas y hasta doce meses muestran disminuida esta unión. En cuanto a la ausencia de alteraciones en tareas de aprendizaje involucradas con el núcleo accumbens en las ratas expuestas a acetato de plomo, pudo deberse a que la exposición a este metal causa cambios muy finos que no pudieron ser evidenciados con las tareas de aprendizaje usadas. Ahora bien, para la actividad locomotora, se encontró que la exposición a acetato de plomo produjo hiperactividad, la cual correlaciona con los niveles de aumentados de DA y sus metabolitos en el estriado y mesencéfalo.

Nuestros resultados muestran que los ganglios basales se encuentran entre los posibles blancos de la acción del arsenito y el Pb en el sistema nervioso central de la rata, en donde pueden alterar funciones tan diversas como son el aprendizaje, la memoria, movimiento y conductas de reforzamiento, entre otras funciones.

Debido a las pocas referencias en la literatura en donde se estudian los efectos neurotóxicos de la exposición a As, sería interesante evaluar varias tareas conductuales, metabolismo de neurotransmisores, neuromoduladores y pruebas inmunohistoquímicas en cerebro de roedores, para tratar de determinar regiones cerebrales sensibles a la exposición de este metaloide. En cuanto a la exposición a Pb, sería interesante evaluar el papel de la exposición a este metal y su efecto en regiones cerebrales relacionadas con el sistema límbico y tratar de correlacionar estos resultados con los reportes en humanos, los cuales indican que la exposición a Pb se relaciona con agresividad, deficiencias cognitivas y un incremento en el índice de delincuencia.

VIII. Referencias

- Adhami VM, Husain R, Agarwal AK, Seth PK. Intrahippocampal cholinergic-rich transplants restore lead-induced deficits: a preliminary study in rats. *Neurotoxicol Teratol* 2000; 22: 41-53.
- Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989; 12: 366-75.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 1986; 9: 357-81.
- Allen JR, McWey PJ, Suomi SJ. Pathobiological and behavioral effects of lead intoxication in the infant rhesus monkey. *Environ Health Perspect* 1974; 7: 239-46.
- Arnauld E, Jeantet Y, Arsault J, Demotes-Mainard J. Involvement of the caudal striatum in auditory processing: c-fos response to cortical application of picrotoxin and to auditory stimulation. *Mol Brain Res* 1996; 41: 27-35.
- Bahiga LM, Kotb NA, El-Dessoukey EA. Neurological syndromes produced by some toxic metals encountered industrially or environmentally. *Z Ernährungswiss* 1978; 17: 84-8.
- Baizer JS, Desimone R, Ungerleider LG. Comparison of subcortical connections of inferior temporal and posterior parietal cortex in monkeys. *Vis Neurosci* 1993; 10: 59-72.
- Bellinger D, Leviton A, Wateraux C, Needleman H, Rabinowitz M. Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *N Engl J Med* 1987; 316: 1037-43.
- Bencko V, Symon K. Test of environmental exposure to arsenic and hearing changes in exposed children. *Environ Health Perspect* 1977; 19: 95-101.
- Blom S, Lagerkvist B, Linderholm H. Arsenic exposure to smelter workers. Clinical and neurophysiological studies. *Scand J Work Environ Health* 1985; 11: 265-9.
- Bolla-Wilson K, Bleecker ML. Neuropsychological impairment following inorganic arsenic exposure. *J Occup Med* 1987a; 29: 500-3.
- Bolla-Wilson K, Bleecker ML. Neuropsychological impairment following inorganic exposure. *J Occup Med* 1987b; 29: 500-3.

- Bondy SC. Free-radical-mediated toxic injury to the nervous system. In: Wallace KB, editor. Free radical toxicology. USA: Taylor & Francis, 1997: 221-248.
- Borg JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol* 1993; 338: 255-78.
- Brown LL, Schneider JS, Lidsky TI. Sensory and cognitive functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 157-63.
- Brudzynski SM, Gibson CJ. Release of dopamine in the nucleus accumbens caused by stimulation of the subiculum in freely moving rats. *Brain Res Bull* 1997; 42: 303-8.
- Burns LH, Annett L, Kelley AE, Everitt BJ, Robbins TW. Effects of lesions to amygdala, ventral subiculum, medial prefrontal cortex, and nucleus accumbens on the reaction to novelty: implication for limbic-striatal interactions. *Behav Neurosci* 1996; 110: 60-73.
- Calderon J, Navarro ME, Jimenez-Capdeville ME, Santos-Diaz MA, Golden A, Rodriguez-Leyva I, et al. Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ Res* 2001; 85: 69-76.
- Carpenter MB. *Neuroanatomía*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, S. A., 1994.
- Chen CJ, Wang CJ. Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms. *Cancer Res* 1990; 50: 5470-4.
- Chhuttani PN, Chopra JS. Arsenic poisoning. In: P.J. V and G.W. B, editors. *Handbook of Clinical Neurology*. Vol 36, Intoxications of the Nervous system, Part I, chapter 7. Amsterdam, Elsevier/North Holland: Biomedical Press, 1979: 199- 216.
- Clarkson TW. Metal toxicity in the central nervous system. *Environ Health Perspect* 1987; 75: 59-64.
- Cohn J, Cox C, Cory-Slechta DA. The effects of lead exposure on learning in a multiple repeated acquisition and performance schedule. *Neurotoxicology* 1993; 14: 329-46.

- Coleman CN, Mason T, Hooker EP, Robinson SE. Developmental effects of intermittent prenatal exposure to 1,1,1-trichloroethane in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 1999; 21: 699-708.
- Cook D, Kesner RP. Caudate nucleus and memory for egocentric localization. *Behav Neural Biol* 1988; 49: 332-43.
- Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. *The biochemical basis of neuropharmacology*. New York: Oxford University Press, 1996.
- Cory-Slechta DA. Relationships between Pb-induced changes in neurotransmitter system function and behavioral toxicity. *Neurotoxicology* 1997; 18: 673-88.
- Cory-Slechta DA, Pounds JG. Lead neurotoxicity. In: Chang LW and Dyer R, editors. *Handbook of toxicology*. New York: Marcel-Dekker, 1995: 61-89.
- Cory-Slechta DA, Weiss B, Cox C. Performance and exposure indices of rats exposed to low concentrations of lead. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985; 78: 291-9.
- Cory-Slechta DA, Widzowski DV. Low level lead exposure increases sensitivity to the stimulus properties of dopamine D1 and D2 agonists. *Brain Res* 1991; 553: 65-74.
- Deckel AW, Moran TH, Coyle JT, Sanberg PR, Robinson RG. Anatomical predictors of behavioral recovery following fetal striatal transplants. *Brain Res* 1986; 365: 249-58.
- DeLong M, Alexander G, Miller W, Crutcher M. Anatomical and functional aspects of basal ganglia-thalamocortical circuits. In: Franks AJ, Ironside JW, Mindham RHS, Smith RJ, Spokes EGS and Winlow W, editors. *Functional and dysfunction in the basal ganglia*. England: Pergamon Press LTD., 1992: 2-32.
- DeLorey TM, Olsen RW. GABA and glycine. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW and Molinoff PB, editors. *Basic neurochemistry*. New York: Raven Press, 1994: 389-400.
- DiFiglia M, Aronin M. Ultrastructure of Golgi-impregnated and gold-toned spiny and aspiny neurons in the monkey neostriatum. *J Neurocytol* 1982; 9.
- Divac I. Functions of the caudate nucleus. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 1968; 28.
- Divac I, Rosvold HE, Szwarcbart MK. Behavioral effects of selective ablation of the caudate nucleus. *J Comp Physiol Psychol* 1967; 63: 183-190.

- Donofrio PD, Wilbourn AJ, Albers JW, Rogers L, Salanga V, Greenberg HS. Acute arsenic intoxication presenting as Guillain-Barre-like syndrome. *Muscle Nerve* 1987; 10: 114-20.
- Dunnett SB, Whishaw IQ, Jones GH, Bunch ST. Behavioural, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acids injected into nucleus basalis magnocellularis of rats. *Neuroscience* 1987; 20: 653-69.
- Edmonds JS, Francesconi KA. Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia* 1987; 43: 553-7.
- EPA. Health assessment document for inorganic arsenic (Final report). Washington, DC: Environmental Protection Agency, 1984.
- Ferguson SA, Holson RR, Gazzara RA, Siitonen PH. Minimal behavioral effects from moderate postnatal lead treatment in rats. *Neurotoxicol Teratol* 1998; 20: 637-43.
- Floresco SB, Seamans JK, Phillips AG. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J Neurosci* 1997; 17: 1880-90.
- Foa V, Colombi A, Maroni M, Buratti M, Calzaferri G. The speciation of the chemical forms of arsenic in the biological monitoring of exposure to inorganic arsenic. *Sci Total Environ* 1984; 34: 241-59.
- Frank G. [Neurological and psychiatric disorders following acute arsine poisoning (author's transl)]. *J Neurol* 1976; 213: 59-70.
- Gerfen CR. The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 1984; 311: 461-4.
- Gerfen CR. The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science* 1989; 246: 385-8.
- Giordano M, Ford LM, Shipley MT, Sanberg PR. Neural grafts and pharmacological intervention in a model of Huntington's disease. *Brain Res Bull* 1990; 25: 453-65.
- Glowinski J, Iversen LL. 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* 1966; 13: 655-69.
- Goering PL, Aposhian HV, Mass MJ, Cebrian M, Beck BD, Waalkes MP. The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicol Sci* 1999; 49: 5-14.

- Gold PE, King RA. Caudate stimulation and retrograde amnesia: amnesia threshold and gradient. *Behav Biol* 1972; 7: 709-715.
- Govoni S, Memo M, Spano PF, Trabucchi M. Chronic lead treatment differentially affects dopamine synthesis in various rat brain areas. *Toxicology* 1979; 12: 343-9.
- Goyer RA. Toxic effects of metals. In: Doull J, Klaassen CD and Amdur MO, editors. *Toxicology*. New York: Pergamon Press, 1991: 623-679.
- Goyer RA. Nutrition and metal toxicity. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 646S-650S.
- Graveland GA, DiFiglia M. The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res* 1985; 327.
- Graybiel AM. Compartmental organization of the mammalian striatum. *Prog Brain Res* 1983; 58: 247-56.
- Graybiel AM. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 1990; 13: 244-54.
- Graybiel AM. The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiol Learn Mem* 1998; 70: 119-136.
- Graybiel AM, Moratalla R. Dopamine uptake sites in the striatum are distributed differentially in striosome and matrix compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 9020-4.
- Groenewegen HJ, Vermeulen-Van der Zee E, te Kortschot A, Witter MP. Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 1987; 23: 103-20.
- Gupta V, Gill KD. Lead and ethanol coexposure: implications on the dopaminergic system and associated behavioral functions. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 66: 465-74.
- Harrison SM, Harris RW, Bales JD, Jr. Attempt to correlate urine arsenic excretion with clinical course during melarsoprol therapy of patients with Rhodesian trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 632-6.
- Heimer L, Zahm DS, Alheid GF. Basal ganglia. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. San Diego, USA: Academic Press, 1995: 579- 628.

- Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C. Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 1991; 41: 89-125.
- Heymann A, Pfeiffer JB, Willet RW, Taylor HM. Peripheral neuropathy caused by arsenical intoxication: A study of 41 cases with observations on the effects of BAL (2,3 dimercapto-propanol). *New Engl J Med* 1956; 254: 401- 409.
- Itoh T, Zhang YF, Murai S, Saito H, Nagahama H, Miyate H, et al. The effect of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice. *Toxicol Lett* 1990; 54: 345-53.
- Iversen SD, Dunnett SB. Functional organization of striatum as studied with neural grafts. *Neuropsychologia* 1990; 28: 601-26.
- Kala SV, Jadhav AL. Low level lead exposure decreases in vivo release of dopamine in the rat nucleus accumbens: a microdialysis study. *J Neurochem* 1995a; 65: 1631-5.
- Kala SV, Jadhav AL. Region-specific alterations in dopamine and serotonin metabolism in brains of rats exposed to low levels of lead. *Neurotoxicology* 1995b; 16: 297-308.
- Kaminsky P, Klein M, Duc M. [Physiopathology of inorganic lead poisoning]. *Rev Med Interne* 1993; 14: 163-70.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 1995; 18: 527-35.
- Kelly PH, Iversen S. Selective 6-OHDA-induced destruction of mesocorticolimbic dopamine neurons: abolition of psychostimulant induced locomotor activity in rats. *Eur J Pharmac* 1975; 40: 45-56.
- Kesner RP, Bolland BL, Dakis M. Memory for spatial locations, motor responses and objects: triple dissociation among the hippocampus, caudate nucleus and estrastriate visual cortex. *Exp Brain Res* 1993; 93: 462-470.
- Kitamura M, Koshikawa N, Yoneshige N, Cools AR. Behavioural and neurochemical effects of cholinergic and dopaminergic agonists administered into the accumbal core and shell in rats. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1397-407.

- Klaassen CD. Heavy metals and heavy-metal antagonist. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS and Taylor P, editors. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 1996: 1592-1614.
- Kopin IJ. MPTP effects on dopamine neurons. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 537: 451-61.
- Kopin IJ. Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Alberts RW and Molinoff PB, editors. *Basic Neurochemistry*. New York: Raven Press, 1994: 899-918.
- Kostas J, McFarland DJ, Drew WG. Lead-inducing hyperactivity. Chronic exposure during the neonatal period in the rat. *Pharmacology* 1976; 14: 435-42.
- Labuszewski T, Lockwood R, McManus FE, Edelstein LR, Lidsky TI. Role of postural deficits in oro-ingestive problems caused by globus pallidus lesions. *Exp Neurol* 1981; 74: 93-110.
- Le Moal M, Simon H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev* 1991; 71: 155-234.
- Levine T, Rispin A, Scott CS, Marcus W, Chen C, Gibb H. Special report on ingested inorganic arsenic: skin cancer; nutritional essentiality. Washington, USA: Environmental Protection Agency, 1988.
- Look AT. Arsenic and apoptosis in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 86-8.
- Luthman J, Lindqvist E, Gerhardt GA, Olson L, Hoffer BH. Alterations in central monoamine systems after postnatal lead acetate treatment in rats. *Environ Res* 1994; 65: 100-18.
- Lynn S, Shiung JN, Gurr JR, Jan KY. Arsenite stimulates poly(ADP-ribosylation) by generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 442-9.
- Ma T, Chen HH, Ho IK. Effects of chronic lead (Pb) exposure on neurobehavioral function and dopaminergic neurotransmitter receptors in rats. *Toxicol Lett* 1999; 105: 111-21.
- Mailman R, Lawler CP, Martin P. Biochemical toxicology of the central nervous system. In: Hodgson E and Levi PE, editors. *Introduction to biochemical toxicology*. Connecticut, USA: Appleton & Lange, 1994: 431-457.

- Marin O, Smeets WJ, Gonzalez A. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *Trends Neurosci* 1998; 21: 487-94.
- Marshall JF, Drew MC, Neve KA. Recovery of function after mesotelencephalic dopaminergic injury in senescence. *Brain Res* 1983; 259: 249-60.
- McDonald RJ, White NM. A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav Neurosci* 1993; 107: 3-22.
- McGeorge AJ, Faull RL. The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 1989; 29: 503-37.
- Meeker D, Kim JH, Vezina P. Depletion of dopamine in the nucleus accumbens prevents the generation of locomotion by metabotropic glutamate receptor activation. *Brain Res* 1998; 812: 260-4.
- Mejia JJ, Diaz-Barriga F, Calderon J, Rios C, Jimenez-Capdeville ME. Effects of lead-arsenic combined exposure on central monoaminergic systems. *Neurotoxicol Teratol* 1997; 19: 489-97.
- Mele A, Thomas ND, Pert A. Differential mechanisms underlie MK-801 and dopamine agonists induced locomotor activity. *Neuroscience* 1998; 82: 43-58.
- Memo M, Lucchi L, Spano PF, Trabucchi M. Dose-dependent and reversible effects of lead on rat dopaminergic system. *Life Sci* 1981; 28: 795-9.
- Middleton FA, Strick PL. The temporal lobe is a target area of output of basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8683-8687.
- Mielke HW. Lead in the inner cities. *American Scientist* 1999; 87: 62- 73.
- Miller RK, Kellog CK, Saltzman RA. Reproductive and perinatal toxicology. In: Halley TJ and Berndt WO, editors. *Handbook of toxicology*. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 1994.
- Mogenson G, Jones D, Yim CY. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 1980; 14: 69-97.
- Morton WE, Caron GA. Encephalopathy: an uncommon manifestation of workplace arsenic poisoning? *Am J Ind Med* 1989; 15: 1-5.

- Nagaraja TN, Desiraju T. Regional alterations in the levels of brain biogenic amines, glutamate, GABA, and GAD activity due to chronic consumption of inorganic arsenic in developing and adult rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 1993; 50: 100-7.
- Nagaraja TN, Desiraju T. Effects on operant learning and brain acetylcholine esterase activity in rats following chronic inorganic arsenic intake. *Hum Exp Toxicol* 1994; 13: 353-6.
- Nauta WJ, Smith GP, Faull RL, Domesick VB. Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience* 1978; 3: 385-401.
- Needleman HL. Lead levels and children's psychological performance. *N Engl J Med* 1979; 301: 163.
- Needleman HL, Gunnoe C, Leviton A, Reed R, Peresie H, Maher C, et al. Deficits in psychological and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *N Engl J Med* 1979; 300: 689-95.
- Needleman HL, Leviton A. Lead and neurobehavioural deficit in children. *Lancet* 1979; 2: 104.
- Nelson CJ, Meter KE, Walker CH, Ayers AA, Johns JM. A dose-response study of chronic cocaine on maternal behavior in rats. *Neurotoxicol Teratol* 1998; 20: 657-60.
- Ng A, Patterson C. Natural concentrations of lead in ancient arctic and antarctic ice. *Geochim Cosmochim Acta* 1981; 45: 2109-2121.
- Nielsen FH. Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel, and arsenic: current knowledge and speculation. *Faseb J* 1991; 5: 2661-7.
- Nielsen FH, Hunt CD, Uthus EO. Interactions between essential trace and ultratrace elements. *Ann N Y Acad Sci* 1980; 355: 152-64.
- Packard MG, White NM. Lesions of the caudate nucleus selectively impair "reference memory" acquisition in the radial maze. *Behav Neural Biol* 1990; 53: 39-50.
- Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 1995; 20: 91-127.
- Paxinos G, Watson C, editors. *The brain stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press, 1986.

- Pijnenburg AJ, van Rossum JM. Letter: Stimulation of locomotor activity following injection of dopamine into the nucleus accumbens. *J Pharm Pharmacol* 1973; 25: 1003-5.
- Pimbran K. New dimensions in the functions of the basal ganglia. In: Shagass C, Gershon S and Friedhoff I, editors. *Psychopathology and brain dysfunctions*. New York: Raven Press, 1977: 77-94.
- Pisa M. Motor somatotopy in the striatum of rat: manipulation, biting and gait. *Behav Brain Res* 1988; 27: 21-35.
- Pokora MJ, Richfield EK, Cory-Slechta DA. Preferential vulnerability of nucleus accumbens dopamine binding sites to low-level lead exposure: time course of effects and interactions with chronic dopamine agonist treatments. *J Neurochem* 1996; 67: 1540-50.
- Press MF. Lead-induced permeability changes in immature vessels of the developing cerebellar microcirculation. *Acta Neuropathol* 1985; 67: 86-95.
- Pryor GT, Uyeno ET, Tilson HA, Mitchell CL. Assessment of chemicals using a battery of neurobehavioral tests: a comparative study. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1983; 5: 91-117.
- Ramesh GT, Jadhav AL. Region-specific alterations in tyrosine hydroxylase activity in rats exposed to lead. *Mol Cell Biochem* 1998; 189: 19-24.
- Rice DC, Gilbert SG. Low lead exposure from birth produces behavioral toxicity (DRL) in monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985; 80: 421-6.
- Rodriguez VM, Dufour L, Carrizales L, Diaz-Barriga F, Jimenez-Capdeville ME. Effects of oral exposure to mining waste on in vivo dopamine release from rat striatum. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 487-91.
- Saint-Cyr JA, Ungerleider LG, Desimone R. Organization of visual cortical inputs to the striatum and subsequent outputs to the pallido-nigral complex in the monkey. *J Comp Neurol* 1990; 298: 129-156.
- Sanberg PR, Hagenmeyer SH, Henault MA. Automated measurement of multivariate locomotor behavior in rodents. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1985; 7: 87-94.

- Schäfer SG, Dawes RLF, Elsenhan B, Forth W, Schümann K. Metals. In: Marquardt H, Schäfer SG and Mc Clellan RO, editors. Toxicology. San Diego: Academic Press, 1999: 755-790.
- Schmidt WJ, Kretschmer BD. Behavioural pharmacology of glutamate receptors in the basal ganglia. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; 21: 381-92.
- Schneider JS, Lidsky TI. Processing of somatosensory information in striatum of behaving cats. *J Neurophysiol* 1981; 45: 841-851.
- Schneider JS, Morse JR, Lidsky TI. Somatosensory properties of globus pallidus neurons in awake cats. *Exp Brain Res* 1982; 46: 311-314.
- Schoolmeester WL, White DR. Arsenic poisoning. *South Med J* 1980; 73: 198-208.
- Seamans JK, Phillips AG. Selective memory impairments produced by transient lidocaine-induced lesions of the nucleus accumbens in rats. *Behav Neurosci* 1994; 108: 456-68.
- Setlow B. The nucleus accumbens and learning and memory. *J Neurosci Res* 1997; 49: 515-21.
- Shailesh Kumar MV, Desiraju T. Regional alterations of brain biogenic amines and GABA/glutamate levels in rats following chronic lead exposure during neonatal development. *Arch Toxicol* 1990; 64: 305-14.
- Silbergeld EK, Goldberg AM. Hyperactivity: a lead-induced behavior disorder. *Environ Health Perspect* 1974; 7: 227-32.
- Siripitayakunkit U, Lue S, Choprapawan C. Possible effects of arsenic on visual perception and visual-motor integration of children in Thailand. San Diego, CA.: Fourth international conference on arsenic exposure and health effects, 2000a: 22.
- Siripitayakunkit U, Thonghong A, Pradipasen M, Vorapongsathron T. Growth of children with different arsenic accumulation, Thailand. Fourth international conference on arsenic exposure and health effects. San Diego, CA, USA, 2000b: 150.
- Squire LR. Biological foundations of accuracy and inaccuracy. In: Schacter DL, editor. *Memory distortion*. Cambridge: Harvard University Press, 1995: 197-225.
- Squire LR, Knowlton BJ. Learning about categories in the absence of memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 12470-4.

- Sundstrom R, Muntzing K, Kalimo H, Sourander P. Changes in the integrity of the blood-brain barrier in suckling rats with low dose lead encephalopathy. *Acta Neuropathol* 1985; 68: 1-9.
- Sutherland RJ, Rodriguez AJ. The role of the fornix/fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. *Behav Brain Res* 1989; 32.
- Triebig G, Buttner J. Neurotoxic occupational substances: I. Metals and their compounds. A literature review of the years 1970 to 1982. *Zentral Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1983; 177: 11-36.
- Tripathi N, Kannan GM, Pant BP, Jaiswal DK, Malhotra PR, Flora SJ. Arsenic-induced changes in certain neurotransmitter levels and their recoveries following chelation in rat whole brain. *Toxicol Lett* 1997; 92: 201-8.
- Uthus EO. Effects of arsenic deprivation in hamsters. *Magnes Trace Elem* 1990; 9: 227-32.
- Vahter M. Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats. *Environ Res* 1981; 25: 286-93.
- Vahter M, Berglund M, Slorach S, Friberg L, Saric M, Zheng XQ, et al. Methods for integrated exposure monitoring of lead and cadmium. *Environ Res* 1991; 56: 78-89.
- Villanueva Cañadas E. Plomo. In: Gisbert Calabuig JA, editor. *Medicina legal y toxicología*. Barcelona: Masson-Salvat, 1992.
- Vorhees CV, Acuff-Smith KD, Moran MS, Minck DR. A new method for evaluating air-righting reflex ontogeny in rats using prenatal exposure to phenytoin to demonstrate delayed development. *Neurotoxicol Teratol* 1994; 16: 563-73.
- Weiner N, Molinoff PB. Catecholamines. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW and Molinoff PB, editors. *Basic neurochemistry*. New York: Raven Press, 1994: 261-282.
- White NM. Mnemonic functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 164-9.
- Windebank AJ. Specific inhibition of myelination by lead in vitro; comparison with arsenic, thallium, and mercury. *Exp Neurol* 1986; 94: 203-12.
- Winder C, Garten LL, Lewis PD. The morphological effects of lead on the developing central nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1983; 9: 87-108.

- Wyers EJ, Peeke HV, Williston JS, Herz MJ. Retroactive impairment of passive avoidance learning by stimulation of the caudate nucleus. *Exp Neurol* 1968; 22: 350-366.
- Yamauchi H, Takahashi K, Mashiko M, Saitoh J, Yamamura Y. Intake of different chemical species of dietary arsenic by Japanese, and their blood and urinary arsenic levels. *Appl Organomet Chem* 1992; 6: 383-388.
- Yu D. A physiologically based pharmacokinetic model of inorganic arsenic. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999; 29: 128-41.
- Zaborszky L, Alheid GF, Beinfeld MC, Eiden LE, Heimer L, Palkovits M. Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience* 1985; 14: 427-53.
- Zuch CL, O'Mara DJ, Cory-Slechta DA. Low-level lead exposure selectively enhances dopamine overflow in nucleus accumbens: an in vivo electrochemistry time course assessment. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 150: 174-85.

Apéndices

Apéndice 1.

Actividad locomotora espontánea

La actividad locomotora espontánea se evalúa en la fase oscura del ciclo luz / oscuridad usando un sistema de monitoreo de la actividad animal ya estandarizado (Digiscan Animal Activity Monitors, Accuscan Inc., Columbus OH) (Sanberg *et al.*, 1985). Los animales se depositan durante un intervalo previamente determinado en una caja de acrílico transparente (40 x 40 x 30 cm) rodeada por dos niveles de sensores infrarrojos que detectan los movimientos del animal y envían la información a un sistema de cómputo.

Los tipos de movimientos que registra y califica el sistema son los siguientes :

Actividad horizontal (AH).- El número total de interrupciones en el sensor horizontal en un tiempo de muestreo determinado.

Distancia total recorrida (DT).- Indica la distancia recorrida (cm) por el animal en un tiempo de muestreo determinado.

Número de movimientos (NM).- Número de movimientos horizontales realizados por la rata en un tiempo de muestreo determinado. Los movimientos individuales están separados uno de otro por un periodo de reposo de al menos un segundo.

Actividad vertical (AV).- Número total de interrupciones en el sensor vertical registradas en un tiempo de muestreo determinado.

Número de movimientos verticales (NMV): Número de incorporaciones que el animal realiza en un tiempo de muestreo determinado. El animal debe de estar por lo menos un segundo debajo del sensor vertical antes de registrarse la siguiente incorporación.

Tiempo en movimiento (TM).- Es el tiempo (segundos) que el animal está en actividad ambulatoria durante un periodo de tiempo determinado.

Tiempo de descanso (TD).- Es la diferencia entre el tiempo de muestreo y

el tiempo que pasa la rata en movimiento.

Tiempo vertical (TV).- Es el tiempo (segundos) que el animal se encuentra obstruyendo el sensor vertical al incorporarse, de esta manera la variable empieza a incrementar y continua incrementando hasta que el animal está debajo del sensor vertical.

Cuentas estereotipadas (CE).- Número de veces que el animal interrumpe repetidamente el mismo sensor durante la actividad estereotipada.

Número de estereotipias (NE).- Número de veces que el sistema observa comportamiento estereotipado en el animal. Un espacio de 1 segundo o más se requiere para separar un episodio estereotipado del siguiente.

Tiempo de estereotipia (TE).- La cantidad total de tiempo (segundos) en el que se observa el comportamiento estereotipado.

Distancia del margen (DM).- La distancia en cm que el animal recorre en el margen o esquina de la caja.

Tiempo en el margen (TM).- El tiempo (segundos) que el animal pasa en la proximidad (1cm) de las paredes de la caja.

Distancia recorrida en el centro de la caja (DC).- Distancia (cm) que el animal recorre mientras está en el centro de la caja (no en los márgenes o esquinas).

Tiempo recorrido en el centro de la caja (TC).- El tiempo (segundos) que el animal pasa lejos de las paredes de la caja (centro de la caja).

Apéndice 2.

Evaluación neurológica

En esta evaluación se incluye la descripción general del animal que consiste en pesar a la rata y valorar cualitativamente la apariencia de los ojos, pelaje, cola, nariz y patas; la evaluación cuantitativa de diversos parámetros sensoriales y motores se realizó de acuerdo al protocolo de Deckel, Moran, Coyle, Sanberg, y Robinson, (1986); Dunnett, Whishaw, Jones y Bunch, (1987), el cual se describe a continuación.

Evaluación sensorial

Todas las respuestas que a continuación se describen son calificadas bajo el siguiente criterio: 0 respuesta débil, 1 respuesta moderada y 2 respuesta fuerte.

Orientación de las vibrisas.- Se tocan momentáneamente las vibrisas de la rata con un objeto de plástico y se registra la orientación de la rata hacia el objeto de plástico.

Olfato.- Se evalúa la respuesta del animal a un estímulo olfatorio irritante (xilol) y otro no irritante (agua). La prueba consiste en acercar a la rata un aplicador de madera con un extremo cubierto de algodón humedecido con agua o xilol a la nariz de la rata y se observa su respuesta de acercamiento o alejamiento ante estos estímulos.

Estímulo suave en el cuerpo de la rata.- Con una superficie suave de plástico (la parte de goma de un lápiz) se aplica un estímulo (presión) momentáneo en tres superficies de cada lado del cuerpo de la rata: costillas, articulaciones superiores de la patas traseras y delanteras, registrándose la orientación del animal a la presión.

Estímulo afilado en el cuerpo.- Con la punta afilada de un lápiz se estimula (pica) momentáneamente a la rata en cuatro superficies de cada lado su cuerpo (articulaciones superiores de la patas traseras y delanteras, costillas y abdomen) registrándose la orientación de la rata al estímulo.

Tono muscular.- A la rata se le manipulan individualmente las cuatro extremidades, para evaluar su resistencia a la flexión pasiva.

Comportamiento en campo abierto.- Se colocó a la rata en una mesa durante un minuto y se registran los movimientos de cabeza hacia los lados, hacia arriba y hacia abajo. Si el animal no presenta ninguno de ellos recibió un puntaje de 1.

Para obtener la calificación de esta evaluación, se suman los puntos obtenidos en los diferentes parámetros evaluados siendo la calificación máxima esperada para una rata normal de 10 puntos.

Evaluación Motora

En la valoración motora se prueban tres respuestas : postura general, orientación de las extremidades y colocación de las extremidades en una superficie plana.

Postura general. Se coloca a la rata en la superficie de una mesa y se observa la postura general durante un minuto, evaluándose de la siguiente manera:

0 postura normal,

1 mantiene la mandíbula sobre la superficie de la mesa

1 arco exagerado en la espalda

Orientación de las extremidades. En esta prueba se sujeta al animal por la cola durante cinco segundos y se califica la orientación de las extremidades de la siguiente manera.

Valoración de las patas anteriores:

0 si la rata estira sus patas anteriores hacia adelante (normal)

1 si las patas se desvían hacia atrás más de 45 grados

2 si se desvían más de 90 grados

3 si se desvían más de 135 grados

4 si las patas del animal quedan flexionadas al cuerpo

La respuesta de las patas posteriores se midió de la siguiente manera:

0 si las patas posteriores del animal se orientan hacia fuera (normal)

1 punto por cada 15 grados que las patas se desvíen de la postura normal con un puntaje máximo de 3.

4 si permanecieron flexionadas al cuerpo.

Colocación de las extremidades en una superficie plana. Se sujeta al animal de la cola y se acerca lentamente a la superficie plana de una mesa. Se califica la colocación de sus extremidades en la superficie de la mesa de la siguiente manera:

0 si la rata extiende las patas anteriores hacia la superficie de la mesa antes de tocarla.

1 si no extiende las patas, pero las extiende al acercarse a la superficie cuando sus vibrisas tocan la mesa.

2 no extiende sus patas hacia la mesa (Dunnett *et al.*, 1987).

La calificación de la valoración motora se obtiene sumando los puntos de las dos pruebas, siendo la calificación máxima esperada para una rata normal de 11 puntos.

Apéndice 3.

Conducta alimenticia

Las ratas se privan de alimento durante 1 día, posteriormente se depositan individualmente en una caja de acrílico durante cinco minutos con una cantidad determinada de alimento y se mide el tiempo que la rata toma para desarrollar las siguientes actividades:

Alimentación (contacto físico entre la rata y el alimento)

Levantamiento de croquetas con el hocico y mantenerlo en él, o arrojarlo al piso.

Empujar la croqueta con el hocico

Mantener la croqueta levantada, sosteniéndola con sus patas.

Mantener la croqueta contra el piso o en una esquina de la caja de acrílico con sus patas sobre la croqueta.

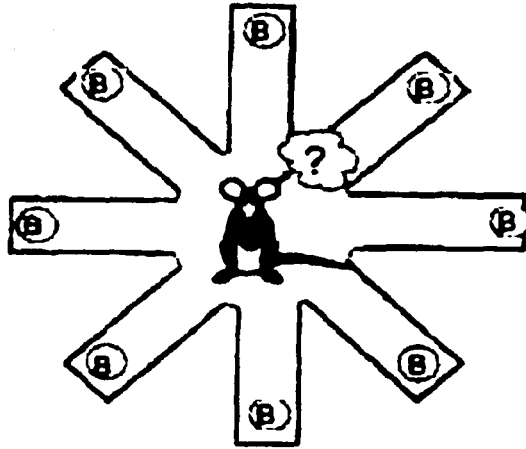
Al finalizar la prueba se saca a la rata de la caja en la que se realizó el ensayo y se regresa a su caja. Los residuos de alimento se pesan, para determinar la cantidad de alimento consumida. Adicionalmente se calcula la ingestión de comida en miligramos de alimento consumido/tiempo en minutos que la rata estuvo en contacto con el alimento en esta prueba (Pisa, 1988).

Apéndice 4.

Laberinto de ocho brazos

Variante gana y cambia

El laberinto radial es un aparato hecho de acrílico que consiste en una área central octagonal de 28 cm de diámetro a la cual se encuentran unidos ocho brazos de 58 cm de largo, 10.5 cm de ancho y 10.5 cm de alto. En la parte final de cada brazo se encuentra un pequeño recipiente cilíndrico de 2.4 cm de diámetro y 1 cm de alto, en el cual se deposita el reforzador. El laberinto se encuentra en una mesa a 62 cm de alto en un cuarto el cual posee diversas claves espaciales (objetos en el cuarto).



B= Brazo cebado

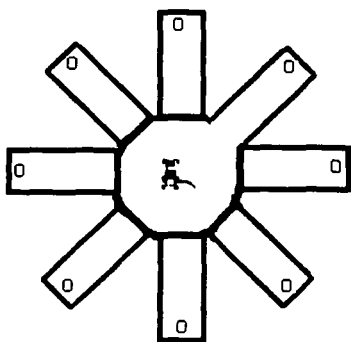
Tres días antes de iniciar los experimentos en el laberinto radial hay un periodo de habituación al laberinto que consiste en permitirle a la rata explorar libremente el laberinto durante cinco minutos diarios sin tener acceso al reforzador. Bajo el patrón de privación de agua (acceso al agua de bebida cinco minutos diariamente) se realizan dos ensayos diarios en el laberinto radial durante 6 días. Cada ensayo se inicia introduciendo a la rata al área central del laberinto radial registrándose sus visitas a los ocho diferentes brazos, cada uno de los cuales tienen 100 μ L de agua como reforzador. Una vez que la rata visita todos los brazos o transcurren 300 segundos, se saca a la rata del laberinto, se deja reposar un minuto durante el cual se coloca el reforzador en los brazos, se limpia el laberinto con un trapo húmedo y una vez transcurrido el tiempo de reposo, se vuelve a probar a la rata. Se considera como error si la rata entra a un brazo previamente visitado (Packard and White, 1990). Este protocolo se conoce como gana - cambia (win-shift) y ha sido ampliamente utilizado para observar el efecto de lesiones sobre el hipocampo (McDonald and White, 1993).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

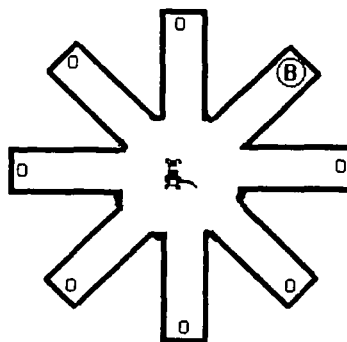
Prueba de aprendizaje de lugar en el laberinto radial de ocho brazos (variante gana y permanece).

Esta tarea es una variante de la tarea tipo gana y permanece (win-stay). La tarea consiste en que solamente en un brazo del laberinto se encuentra su reforzador (agua). En la fase de habituación al laberinto, se permite a la rata explorar el laberinto durante cinco minutos por tres días con un brazo abierto solamente y sin acceso al reforzador, este brazo se asigna aleatoriamente y se reforzará en la fase de prueba. Al inicio de la prueba se deposita a la rata en un brazo y se registra a que brazo entra. Posteriormente se retira a la rata del laberinto dejándola reposar durante 1 minuto, se limpia el laberinto con un trapo humedecido con una mezcla de agua y ácido acético (1%). Una vez transcurrido el tiempo de reposo, se vuelve a probar a la rata en dos ocasiones más. Si no entra al brazo correcto, se le califica como error (Cook and Kesner, 1988).

Fase de entrenamiento



Fase de prueba



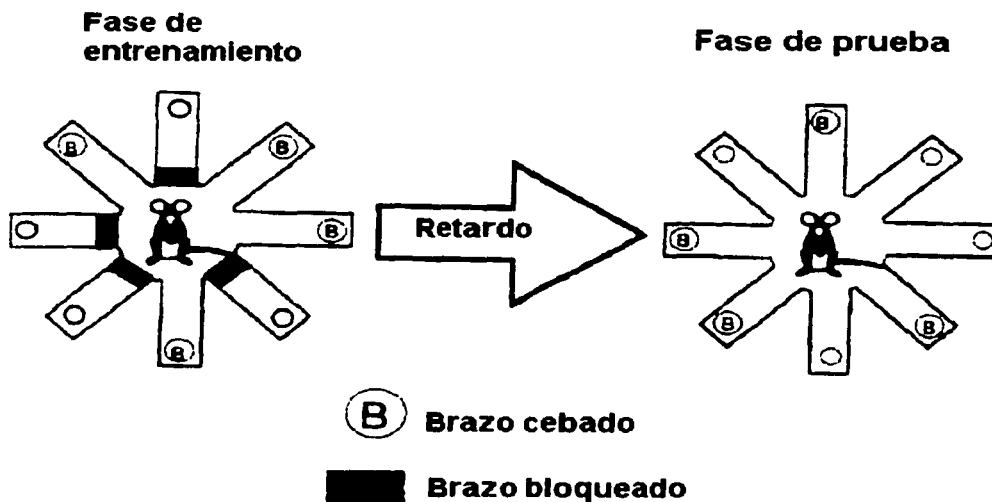
B Brazo cebado

■ Brazo bloqueado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Prueba de aprendizaje de lugar en el laberinto radial de ocho brazos (variante gana y cambia con retardo).

Esta tarea es una variante de la tarea tipo gana y cambia con retardo (delayed win-shift). Dos días antes de la prueba se someten las ratas a un periodo de reconocimiento del laberinto durante 5 minutos. Los ensayos de prueba posteriores consisten de una fase de entrenamiento y otra de prueba separados por un retardo de 5 minutos. Antes de la fase de entrenamiento, se seleccionan aleatoriamente 4 brazos de laberinto radial y en éstos se deposita media hojuela de cereal "froot loops" (en el recipiente de comida), los brazos restantes se cierran y se le permite al animal comer las hojuelas de los brazos abiertos (con un tiempo de corte de 300 segundos). Posteriormente, se retira a la rata del laberinto, dejándola reposar durante 5 minutos, se limpia el laberinto con un trapo humedecido con una mezcla de agua y ácido acético (1%). Una vez transcurrido el tiempo de reposo se refuerzan los brazos cerrados en la fase de entrenamiento, se abren todas las puertas a los brazos del laberinto. Se deposita al animal en el laberinto y se registran los brazos a los que entra la rata. Si no entra a los brazos reforzados se le califica como error (Floresco *et al.*, 1997).

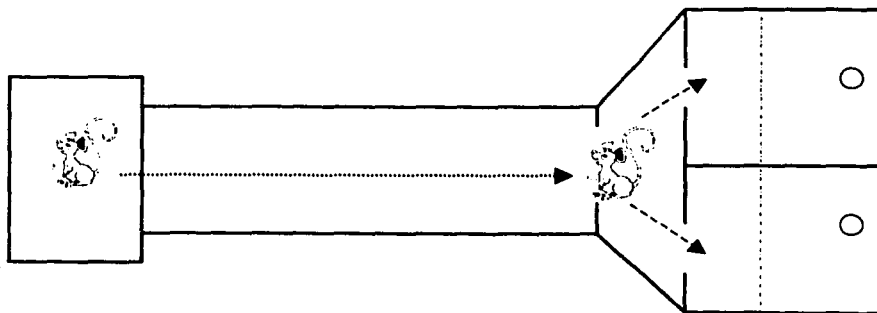


Apéndice 5.

Laberinto en T

Estas pruebas se realizan usando un laberinto en T modificado que tiene las siguientes características: posee un cámara de inicio con las siguientes dimensiones (34 x 34 x 25.5 cm), seguido de un brazo de inicio de 82 cm de largo x 10 cm de ancho y 10 cm de alto cubierto con una superficie de acrílico para evitar la salida de la rata durante la sesión experimental, éste termina en un área de elección (72 cm base mayor, 10 cm base menor y 10 cm de largo) desde la cual el animal puede tener acceso a dos compartimientos (35 x 35 x 35 cm), cada uno con un orificio de entrada (10 cm ancho x 9 cm alto). Al fondo de estos compartimientos se encuentra un pequeño recipiente (2.4 cm de diámetro y 1 cm de alto) en donde se coloca el reforzador. El experimentador controla el acceso al reforzador con una puerta de guillotina que se localiza a la mitad de cada compartimiento. Es importante especificar que antes de elegir el compartimiento al que va a entrar, el animal no tiene forma de saber qué puerta está cerrada.

Tres días antes de iniciar los experimentos en el laberinto en T y durante todo el experimento, se inicia un periodo de privación de agua en el cual se les permite a las ratas tener acceso al agua de bebida solamente durante 5 minutos diarios. Durante los tres primeros días de privación de agua, hay también un periodo de habituación al laberinto en T, permitiéndole a cada rata explorar libremente el laberinto durante 5 minutos diarios, lo anterior sin tener acceso al reforzador.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Alternancia espontánea

Durante esta fase el animal tiene libre acceso a ambos compartimientos del laberinto. Brevemente, se coloca a la rata en la cámara de inicio; En cuanto entra al brazo de inicio se comienza a registrar el tiempo que le toma a la rata consumir el reforzador del compartimento elegido (100 μ L de agua en cada recipiente de los dos compartimientos), con un tiempo de corte de 300 segundos. Cuando el reforzador fue consumido o ha transcurrido el tiempo de corte, se regresa a la rata a su caja durante un minuto, durante el cual se coloca el reforzador en el recipiente vacío, se limpia el laberinto con un trapo húmedo y una vez transcurrido el tiempo de reposo se vuelve a introducir a la rata al laberinto hasta completar determinados ensayos diarios durante 5 días.

En esta prueba se califica, el tiempo transcurrido entre la colocación del animal en el laberinto y su llegada hasta el reforzador. Este protocolo se basa en el descrito por Iversen y Dunnett (1990).

Alternancia retardada

Al día siguiente de terminar la alternancia espontánea se continua con la alternancia retardada, la cual se describe a continuación. Se coloca a la rata en la cámara de inicio, se registra el brazo al cual entró a consumir el reforzador (100 μ L de agua). Cuando ha consumido el reforzador, se saca a la rata del laberinto y se le permite reposar en su caja un minuto durante el cual se coloca el reforzador en el recipiente vacío y se limpia el laberinto con un trapo húmedo. En el siguiente ensayo se cierra la puerta de guillotina del compartimiento al que la rata entró previamente, dejando la entrada libre a un compartimiento solamente. Si la rata entró en el compartimiento abierto, éste se cierra en el siguiente ensayo y se refuerza el compartimiento contrario y así sucesivamente hasta completar determinados ensayos diarios. Si la rata trata de entrar al compartimiento cerrado, se registra como error y se saca a la rata depositándola en su caja para que repose un minuto antes del siguiente ensayo.

En esta prueba se califica el número de errores cometidos en los determinados ensayos diarios durante cinco días. Este protocolo se basó en el descrito por Iversen y Dunnett (1990).

Apéndice 6.

Análisis de monoaminas y sus metabolitos

Diversas áreas cerebrales (mesencéfalo, estriado y corteza) se disecan de acuerdo al procedimiento descrito por Glowinski e Iversen, (1966). Después de disecar los tejidos, se pesan e inmediatamente se homogenizan por sonicación en una solución que contiene ácido perclórico 0.05 M y 1% de metabisulfito de sodio. Los homogenados se centrifugan y se descartan los precipitados. El sobrenadante se utiliza para determinar el contenido de monoaminas.

Las monoaminas (DA, NE, 5-HT y sus metabolitos) se cuantifican por HPLC con detección electroquímica como la descrita por Mejía et al., (1997). Se usa una bomba Perkin Elmer (serie 200) acoplada a un detector electroquímico (Bionalytical system LC-4C) y una columna de Alltech Associates Inc. (Deerfield) empacada con un adsorbente de catecolaminas (3 mm tamaño de partícula, 100 x 4.8 mm). La fase móvil isocrática es un buffer de fosfatos (pH 3.2) que contiene 0.2 mM de octil sulfato de sodio, 0.1 mM de EDTA y 15% v/v de metanol, filtrada y desgasificada antes de usarse. El flujo se sitúa en 1.1 ml/min y las determinaciones se hacen a temperatura ambiente. En el detector electroquímico se usa a una sensibilidad de 10 nA. Las monoaminas se oxidan con un electrodo de carbono vidriado a un potencial de 850 mV relacionado a un electrodo de referencia Ag/AgCl. Los picos generados por los compuestos se analizan con el software Turbochrom 4 (Perkin Elmer, San José Cal. USA). Estándares externos se usan para construir una curva de calibración para cada una de las monoaminas.

Apéndice 7

Batería del desarrollo y conducta materna

A partir del nacimiento se pesa a las crías cada tercer día, hasta el 21; de esta fecha hasta el final del experimento se registra el peso corporal cada 15 días. En los días consecutivos al nacimiento se registra el reflejo de enderezamiento (días postnatales 4-6), apertura de oído (días postnatales 9-16), apertura de párpados (días postnatales 9-16), giro en su propio eje (días postnatales 7, 9 y 11), el reflejo de enderezamiento en la

caída (día postnatal 10), fuerza en las extremidades (día postnatal 13) y la geotaxis negativa (día postnatal 10).

Apertura de oídos y párpados

De la apertura de los oídos y párpados en las crías, se registra la ausencia, el inicio, el 50 % y la apertura total de los mismos, dando valores de 0, 1 y 2, respectivamente.

Reflejo de enderezamiento

Se coloca a cada cría dorsalmente en una superficie plana y se registra la habilidad a enderezarse, calificándose la presencia o ausencia del enderezamiento. Este protocolo se basó en el descrito por Coleman et al., (1999).

Giro en su propio eje

Se coloca a cada cría en una superficie plana y lisa, se registra si la rata gira en su propio eje, calificándose la presencia o ausencia del giro, según el protocolo descrito por Kitamura et al., (1999).

Reflejo de enderezamiento en la caída

Cada cría se deja caer dorsalmente de una altura aproximada de 20 centímetros sobre una caja de acrílico la cual se encuentra hasta la mitad con aserrín. Se registra la presencia o ausencia de enderezamiento al caer. Protocolo basado en Vorhees et al., (1994).

Fuerza en las extremidades

Para la realización de esta tarea se utiliza una malla de tela con una luz de aproximadamente 2 milímetros, la cual está fija a un cuadro de madera. Se coloca primero a la cría en la malla y posteriormente se gira. En esta prueba se registra el tiempo que la rata se sostiene de la malla. Cuando la cría se suelta de la malla, cae sobre una caja de acrílico la cual se encuentra hasta la mitad con aserrín. Protocolo basado en Coleman et al., (1999).

Geotaxis negativa

En esta tarea se usa una malla de tela con una luz de aproximadamente 2 milímetros, la cual esta fija a un cuadro de madera. Se coloca primero a la cría en la malla y posteriormente se inclina el cuadro de madera 45 ° con la cabeza de la rata inclinada hacia la superficie de una mesa. Se registra si la rata se voltea en un ángulo de 180°. Para la realización de esta tarea, nos basamos en el protocolo descrito por Coleman et al., (1999).

Conducta materna

En esta prueba se registra en los días postnatales 2, 6 y 10. Consiste en separar a las crías de la madre 30 minutos antes de iniciar la prueba. Una vez transcurrido este tiempo, se depositan las crías separadas entre sí en una caja de acrílico con aserrín limpio y posteriormente se introduce la madre a la caja. Se registra si la madre olfatea, acarrea, limpia y amamanta a las crías, también se registra si la madre hace nido, se limpia, se alimenta o toma agua. La duración del registro es de 30 minutos y este protocolo se basa en el descrito por Nelson et al., (1998).

Apéndice 8

Registro electroquímico

Preparación de electrodos de trabajo

Un tubo capilar de las siguientes dimensiones: 1.0 mm diámetro externo x 0.74 mm diámetro interno x 10 cm de longitud (A-M Systems, Everett, WA) , se estira en un estirador de pipetas (David Kopf Instruments, Tujunga, CA modelo 730). Se introduce en la pipeta una fibra de carbono (30 um, AVCO Speciality Materials, Lowell, MA) de 5-8 cm de longitud, la cual es más larga que la longitud de la pipeta; para que sus extremos permanezcan fuera de la pipeta, la fibra se fija a la pipeta con un poco de resina epóxica (EpoxyLite Corp., Irvine, CA), la cual se inyecta en la parte más estrecha de la pipeta con una aguja de 25 gauge. El paso siguiente es empacar la pipeta con pasta epóxica de grafito (PX grade Graphpoxy, Dylon Industries, Cleveland, OH) y se le adhiere un

alambre de cobre de 28 gauge (Newark Electronics, Pittsford, NY); este ensamble se hornea durante 12 - 16 horas a 125 °C. Posteriormente, se corta el extremo de la fibra de carbono a una longitud de 150-300 μm , se cubre con una solución de intercambio iónico, Nafion (solución al 5%, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) y se hornea durante 5 minutos a 125° C. Una vez cubierto con Nafion en tres ocasiones, se procede a calibrar el electrodo, cuando es necesario se adicionan más cubiertas de Nafion.

Calibración del electrodo de trabajo

La calibración tiene como finalidad determinar la sensibilidad y la linealidad de la respuesta del electrodo a un neurotransmisor que se desee medir en el sistema (DA, NA, 5-HT). Además, se prueba la respuesta del electrodo al ácido ascórbico (AA) para determinar si se necesitan más cubiertas con Nafion, ya que el AA esta presente en altas concentraciones en la sinapsis y es capaz de llevar a cabo reacciones cíclicas de óxido-reducción las cuales podrían causar interferencia con el registro del neurotransmisor.

El procedimiento que se usa se describe a continuación: Se conecta el electrodo a calibrar y un electrodo de referencia a una interfase del sistema IVEC-10 y se sumergen las puntas de los electrodos en 80 ml de una solución de 0.1 M de amortiguador de fosfatos con salina. Se inicia el registro y se construye una curva de calibración para el neurotransmisor a medir en el sistema (DA) adicionando inicialmente 1 ml de una solución de 20 mM AA (concentración final de 250 μM), la cual mimetiza la concentración extracelular de este compuesto en el cerebro y posteriormente se hacen 6 adiciones de 80 μL de una solución de 2 mM de DA a intervalos regulares de 25 segundos (concentración final de 10-12 μM de DA). Los electrodos en este experimento cumplieron con las características de linealidad a la respuesta a DA $r^2 >$ de 0.996, selectividad DA: AA $>$ 250:1, y tuvieron una relación reducción/ oxidación 0.4-0.8, la cual es característica de este neurotransmisor.

Preparación del electrodo de referencia (AgCl)

Se conectan dos alambres de plata cubiertos de teflón (A-M Systems, Everett, WA) a una fuente de poder, se sumergen en una solución 1 M de HCl saturada con NaCl. Se enciende la fuente de poder y se deja que uno de los alambres se cubra con iones de cloro durante 30 minutos.

Preparación de la micropipeta

Una micropipeta de vidrio (0.58 mm de diámetro interno, 1.0 mm de diámetro externo, A-M Systems) se estira en un estirador de pipetas (David Kopf Instruments, Tujunga, CA modelo 730) y se corta en el extremo afilado para evitar dañar el tejido cerebral a su paso.

Cirugía

Se anestesia a las ratas con uretano (1.5 g/kg i.p.). Una vez que la rata se encuentra arrefléxica se fija al animal en el aparato estereotáxico y se mantiene la temperatura corporal del animal (37° C) con una almohada térmica sobre la cual reposa el animal durante todo el experimento. Se abre la piel y se limpia la superficie del hueso con solución salina. Después, se ajusta el cráneo al plano horizontal, midiendo la altura de bregma y de lambda y haciendo ajustes en las barras de incisivos del aparato estereotáxico, para tener una diferencia no mayor de 0.25 mm entre la altura de los dos puntos. A continuación, se remueve una porción del cráneo para insertar el ensamble (electrodo y pipeta) en el núcleo accumbens (AP +1.2, ML \pm 1.9, DV -7.2) y una cánula en la corteza prefrontal (AP +3.0, ML \pm 0.5, DV -1.0) siguiendo las coordenadas con respecto a bregma según Paxinos y Watson (1986). También se hace un orificio pequeño en la parte posterior del cráneo para insertar un electrodo de referencia.

Inserción de los electrodos y registro de la liberación evocada de dopamina.

Una vez que se hacen los orificios en el cráneo, se vuelve a calibrar el electrodo de carbono, como se explica en la sección de calibración, en este punto verificamos que el electrodo cumpla con las especificaciones deseadas de linealidad y especificidad. Realizado lo anterior, se hace un ensamble con el electrodo y la micropipeta, uniéndolas

con cera dental y dejando una separación entre las puntas de 150 - 300 μm ; una vez unidas, se conecta la pipeta a un picoinyector y se llena con una solución de alto potasio (70 mM KCl, 79 mM NaCl, y 2.5 mM CaCl_2). Posteriormente se separa cuidadosamente la dura de la superficie del cráneo en donde se va a insertar tanto el ensamble electrodo-pipeta y la cánula. Primero se inserta la cánula y después el ensamble en las coordenadas ya especificadas anteriormente.

Cuando se ha insertado el ensamble, se deja alrededor de 30 minutos sin inducir liberación para que se ajuste a la región elegida. Posteriormente se inicia la adquisición de las liberaciones inducidas por la inyección de 492 μL de alto potasio. También se registra el efecto de la inyección de fluido cerebro espinal artificial (aCSF) y de 0.8 y 1.6 μM de MK-801 (maleato de dizocilpina) en la corteza prefrontal, región prelímbica. Una vez terminado el registro, se marca la localización del ensamble y de la cánula, se sangra al animal de la cola, recolectándosele 100 μL de sangre para la determinación de Pb. Después se decapita al animal, se extrae el cerebro, éste se deposita en una solución de paraformaldehído al 4% durante un día y después se pasa a una solución de sacarosa al 30 % en donde permanece hasta que se precipita. Posteriormente se secciona el cerebro, se monta y tiñe con violeta de cresilo y se observa al microscopio para checar la localización del ensamble y de la cánula.

Apéndice 9

Determinación de plomo y arsénico

Determinación plomo

Para la determinación de Pb en tejidos nos basamos en el protocolo descrito por Mejía et al., (1997). Brevemente, las muestras se pesan y disuelven con una mezcla de 2 ml de ácido nítrico y 0.5 ml de ácido perclórico y se calientan durante 6 horas a 70 °C. Después de la evaporación, el residuo se resuspende en ácido nítrico al 0.2% con fosfato de amonio. La cuantificación de Pb se hace en un espectrofotómetro de absorción atómica con horno

de grafito (Modelo 2380, Norwalk, CT). Los resultados se expresan en ng/mg de tejido húmedo.

Determinación de arsénico

Esta determinación se hizo de acuerdo al protocolo descrito por Mejía et al. (1997). Brevemente, las muestras cerebrales se pesan y disuelven en una mezcla de 2 ml de ácido nítrico y 0.5 ml de ácido perclórico. Esta solución se calienta hasta evaporación y el residuo se resuspende en 3 % de ácido clorhídrico. La cuantificación de As se hace con la técnica de absorción atómica con generación de hidruros en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer (modelo 2380, Norwalk, CT). Estándares de hígado de bovino (KODAK TEG-50B y NBS-SRM 1577) se usan como control de calidad, corriéndose a la par con las muestras experimentales. Los resultados se expresan en ng/g de tejido húmedo.

The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat

V. M. Rodríguez,^{1*} L. Carrizales,² M. E. Jiménez-Capdeville,³ L. Dufour³ and M. Giordano¹

¹Center for Neurobiology, Universidad Nacional Autónoma de México-Universidad Autónoma de Querétaro, Juriquilla, Querétaro, México; Departments of ²Environmental Toxicology; and ³Biochemistry, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

ABSTRACT: Arsenic is a metalloid widely present in the environment. It is found in well water, soil, and air, and is also released from mining residues and industrial debris, among other anthropogenic sources. It has been previously reported that the content of catecholamines in striatum, hippocampus, and other cerebral regions changes in mice and rats exposed to arsenic. Few studies have examined behavioral alterations after intoxication with arsenic, and both increased and decreased locomotor activity, as well as learning deficits, have been described. In order to characterize the behavioral alterations induced by arsenic exposure, we exposed adult male Sprague-Dawley rats to 5, 10, and 20 mg/kg of arsenic by intragastric route for 2 or 4 weeks. Exposed rats showed reduced locomotor activity, which returned to control levels at the end of the intoxication period. We also found an increase in the number of errors in an egocentric task, alterations in monoamine content in midbrain and cortex, and increases in arsenic brain concentration, which were related to time of the exposure but not dose. These results indicate that short-term arsenic exposure induces neural and behavioral changes that may reflect a neurotoxic effect, and that these alterations are correlated to dose, time of exposure, and experimental conditions. © 2001 Elsevier Science Inc.

KEY WORDS: Arsenic, Monoamines, Behavior, Learning, Locomotor activity.

INTRODUCTION

Arsenic is an element widely present in the environment, found in water, air, and soil. It is also released to the environment from such anthropogenic sources as mining wastes, metal smelting, glass manufacture, semiconductor manufacture, pesticides, and herbicide production [12]. In several zones around the world exposure to this metalloid is high, and has been associated with skin cancer, diabetes, and peripheral neuropathy, among other pathologies [17, 28,33].

Arsenic has four oxidation states (-3, 0, +3, +5): the trivalent (arsenite) and pentavalent (arsenate) species are the most important for their known toxic effects. Arsenites bind to the sulfhydryl group of many enzymes such as pyruvate dehydrogenase and succinate dehydrogenase, which are involved in carbohydrate metabolism, while arsenates uncouple the oxidative phosphorylation chain. All these effects of arsenic appear to target the cellular pathways involved in energy production [3,13,23].

Arsenic crosses the blood-brain barrier and accumulates in the brain where it can exert neurotoxic effects in several structures, such as the basal ganglia [10]. Although information on the effects of arsenic in the central nervous system is limited, the basal ganglia appear to be particularly sensitive to the effects of toxins that affect energy metabolism, such as 3-nitropropionic acid, an inhibitor of succinic dehydrogenase, MPTP, and 6-hydroxydopamine [18–20], as well as to metal exposure. For example, manganese causes selective neuronal loss in the globus pallidus, and iron accumulates abnormally in one form of parkinsonism [24]. Previous studies have focused on the effects of arsenic on monoamines in the basal ganglia and, although changes in content of monoamines have been observed, the results have been contradictory. Exposure to sodium arsenite in mice resulted in increased content of striatal dopamine, 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) [22]. Exposure to arsenic trioxide decreased DOPAC and homovanillic acid (HVA) in the striatum [15]. In rats exposed to sodium arsenate, striatal serotonin content increased and dopamine content decreased in the nucleus accumbens [26]. Decrements in the evoked release of dopamine and its metabolites (DOPAC and HVA) have been described in the striatum of rats exposed to a mining waste with high arsenic content [29].

Dopamine is involved in a variety of functions, including movement control, learning and memory, cognition, and emotion [30]. If arsenic exposure can modify monoamine content in the basal ganglia, it could also have a consequence on behavior. Studies on locomotor activity in mice reported deficits related to the dose of arsenic trioxide used [15]. Deficits in an operant learning task have also been reported [25]. The paucity of data and the fact that previous studies did not examine the effects of dosage and time of exposure make it difficult to reach any conclusion regarding arsenic effects in the nervous system in an *in vivo* model.

In order to study the possible neurotoxic effects of arsenic exposure, and given the relevance of the basal ganglia to functions such as learning, memory and movement, it would be important to evaluate if arsenic exposure produces alterations in these complex functions. In addition, behavior could be a sensitive indicator of damage to the central nervous system related to arsenic exposure. Therefore, the main purpose of the present study was to evaluate the neural and behavioral effects of arsenic exposure in the albino rat, using three different arsenic doses and two exposure periods. Behavioral tasks were selected on the basis of the ability to test

* Address for correspondence: V. M. Rodríguez, Center for Neurobiology, Campus Universidad Nacional Autónoma de México-Juriquilla, P.O. Box 1-1141, Querétaro 76001, Mexico. Fax: +524-2381038; E-mail: rodrigo@calli.cnb.unam.mx

functions that have been associated with the basal ganglia. Performance on these tasks was correlated with brain monoamine and arsenic content.

MATERIALS AND METHODS

Animals

A total of 100 male Sprague-Dawley rats (250–300 g) from the animal care facility of the Center for Neurobiology were used. Rats were kept on a 12-h inverted light/dark cycle (lights on at 2200 h) and were habituated to this condition for 1 week before arsenic exposure.

The experimental procedures were carried out following the "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication no. 85-23, revised 1985) and the "Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud" of the Mexican Health Ministry (published in January 1987).

Chemicals

Sodium arsenite, and reagents for high-performance liquid chromatography (HPLC) and atomic absorption spectrophotometry were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Experiment I

In order to test the neurobehavioral effects of arsenic during short-term exposure, rats were exposed to 5, 10, and 20 mg/kg of arsenic as sodium arsenite dissolved in 5 ml of deionized water by intragastric route daily for 15 days; the control group received the same volume of deionized water as the treatment groups. Animals had free access to water and food before and during exposure. Food and water consumption were recorded daily on all groups throughout the experiments.

At the end of the exposure period, eight rats per group were sacrificed by decapitation. For monoamine determination, the striatum, prefrontal cortex, and midbrain were obtained as described by others [11]; the remaining tissue was used to measure arsenic content. The remaining animals in each group ($n = 8$) were tested for spontaneous locomotor activity, food-pellet manipulation, and performance on two learning tasks, a delayed alternation task and a win-shift memory task. During testing the observer was blind to the treatment received by each animal.

Experiment II

To evaluate the behavioral effects of different durations of exposure, rats were exposed to 10 mg/kg of arsenic as sodium arsenite dissolved in deionized water by intragastric route daily for 2, 3, or 4 weeks; the control group received deionized water as treatment. Animals had free access to food and were water-deprived during part of the experiment. Eight animals per group were used to record spontaneous locomotor activity at five time points during the experiment and their performance in three learning tasks. The learning tasks included place learning, which lasted 12 days, and spontaneous and delayed alternation, during which each animal received five trials per session for 5 days for each task. The remaining animals in each group ($n = 5-7$) were sacrificed by decapitation at 2, 3, or 4 weeks for determination of monoamine and arsenic content. During the experiment, the observer was blind to the treatment received by each animal.

Spontaneous Locomotor Activity

Spontaneous locomotor activity was recorded during the dark phase of the light/dark cycle using the Digiscan Animal Activity Monitor (Omnitech Electronics, Columbus, OH, USA), which has

been described previously [31]. Animals were recorded for 2 h (1400–1600 h) in a chamber surrounded by infrared sensors, which detect animal movements and send this information to a computer system. Locomotor activity was recorded before exposure (baseline), during exposure, and after exposure (recovery).

Food-pellet Manipulation

Food-pellet manipulation was tested as described elsewhere [27]. Briefly, rats were food-deprived 1 day before the test. The behaviors tested were: feeding (physical contact between the rat and the pellet), picking up a pellet with the mouth and holding it or dropping it on the floor, pushing a pellet with the snout, holding a pellet off the floor with the paws supporting the pellet, and holding a pellet against the floor or a corner of the cage with the paws resting on the pellet. Feeding efficiency was measured as the ratio of total food eaten to time spent feeding. This test was done twice, first without arsenic exposure (baseline) and then 2 days after ending exposure.

Learning Tasks

Spontaneous alternation. For spontaneous alternation and delayed alternation tasks a modified T-maze was used. Rats were water-deprived; each animal had free access to water for 5 min and remained that way throughout the learning task. The maze was built of wood and painted red, with a start box ($34 \times 34 \times 25.5$ cm), followed by an alley ($82 \times 10 \times 10$ cm) covered with acrylic, at the end of which there was a goal box divided into two compartments ($35 \times 35 \times 35$ cm) where the reinforcer was placed (a drop of distilled water). The T-maze was cleaned between trials with a weak solution of acetic acid (1%). During habituation sessions (5 min for 3 days) animals were handled and allowed to explore the maze. After the habituation period, rats were tested for spontaneous alternation for 5 or 10 trials per session during 5 days. Time between entry into the start box and reaching the reinforcer was recorded.

Delayed alternation. After the spontaneous alternation test, rats were trained on a delayed alternation task as described by others [16]. Briefly, during the first trial of each day, water was present in both compartments. On the following trials, the compartment opposite to the one the rat had chosen in the previous trial was baited (the other compartment was unbaited), except when the animal had gone into the empty compartment on the last trial. There was a delay of 1 min between each trial. When the rat entered into an unbaited compartment an error was recorded. Five or ten trials per session were given during 5 days.

Eight arm radial maze (win-shift). The radial maze was made of acrylic with an octagonal central area (28 cm diameter) connected to eight arms ($58 \times 10.5 \times 10.5$ cm), with a cylindrical cup (2.4 cm in diameter) at the end of each arm. The maze was elevated 62 cm from the floor and there were many spatial cues in the testing room (doors, the experimenter, posters, etc.) which was illuminated with fluorescent lights (100 W).

During habituation sessions (5 min for 3 days) rats were allowed to explore the maze while water-deprived. After this habituation period, rats were trained on a win-shift task. Briefly, rats were allowed up to 5 min to drink from the cups at each arm end. All arms were opened, and when a rat re-entered a previously visited arm an error was recorded. Two trials per session were given during 6 days.

Place learning. This task was carried out according to a protocol previously described [4]. During the habituation period (5 min for 3 days), the rat was able to explore the maze, which had only one arm open but unbaited. During the training trials, the same arm was baited, all arms were open and the rat was placed

121

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

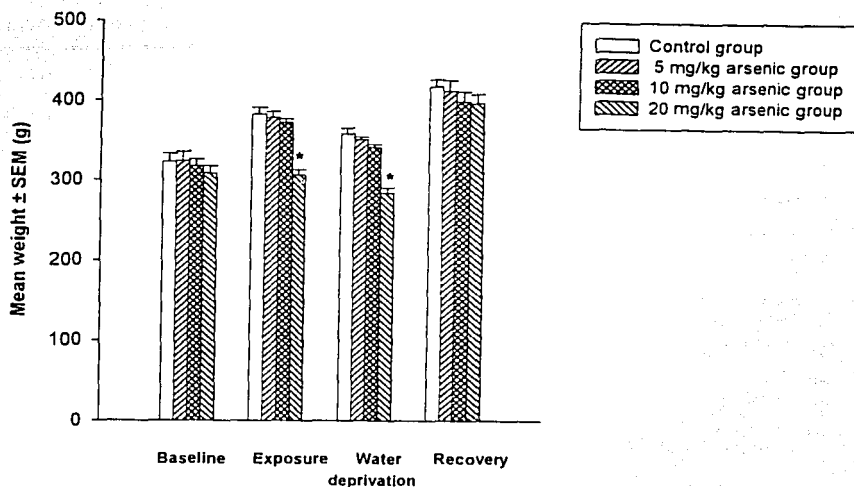


FIG. 1. Mean (\pm SEM) of body weight of groups exposed to 5, 10, and 20 mg/kg of arsenic, as sodium arsenite by intragastric route and control group. *Different from control group, $p < 0.05$ Tukey test for unequal samples.

into the maze and allowed to enter one arm, then the rat was retrieved and the trial ended. Three trials separated by 1 min were given per session; every time the rat entered an unbaited arm, an error was recorded.

Analysis of Monoamines and Their Metabolites

Striatum, prefrontal cortex, and midbrain were weighed and disrupted by sonication in a solution containing perchloric acid (0.05 M) and sodium metabisulphite (1%). Homogenates were centrifuged and precipitates were discarded. Supernatants were frozen at -20°C until monoamine quantification.

Monoamines (dopamine, norepinephrine, serotonin, and metabolites, HVA and 5-HIAA) were measured by HPLC with electrochemical detection as described elsewhere [29]. Briefly, a Perkin Elmer pump (series 200) was joined to a chromatographic column (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA) packed with a catecholamine adsorbosphere (3 μm particle size, 100×4.8 mm). An electrochemical detector (Bioanalytical system, LC-4C) was coupled to the system. The mobile phase was an isocratic phosphate buffer (pH 3.2) containing 0.2 mM sodium octyl sulphate, 0.1 mM EDTA, and 12–15% v/v methanol (Mallinckrodt, Mexico City, Mexico), filtered (0.45 mm pores) and degassed before use. The pump flow was set at 1.1 ml/min and the electrochemical detector used a sensitivity of 10 nA. Monoamines and their metabolites were oxidized with a glassy carbon electrode at a potential of 850 mV relative to the Ag/AgCl reference electrode. A calibration curve was constructed for each monoamine or metabolite using external standards (Sigma-Aldrich). Results generated by these determinations were analyzed with Turbochrom 4 software (Perkin Elmer, San José, CA, USA). Results are expressed as ng/g of wet tissue weight.

Brain Arsenic Content

This determination was done in accordance with Mejía et al. [22]. Briefly, brain samples were weighed and solubilized in 2 ml

of a mixture of nitric acid and 0.5 ml perchloric acid. This solution was heated until evaporation, and the residue was resuspended in 3% hydrochloric acid. Brain arsenic quantification was done by the hydride evolution-atomic absorption technique [7.8] in a Perkin-Elmer atomic absorption spectrophotometer (model 2380; Norwalk, CT, USA). Bovine liver standards (Kodak TEG-50B and NBS-SRM 1577) were tested as quality control in conjunction with experimental samples. Results were listed as ng/g of wet tissue weight.

Statistical Analysis

Data were analyzed with one and two-way analyses of variance with repeated measures on one factor, followed by tests for simple main effects and Tukey *post-hoc* tests for unequal size when required; the probability level selected was $p < 0.05$. All analyses were done with the Statistica program (StatSoft, Inc., 1984–2000).

RESULTS

Experiment 1

There were no differences in water and food intake between groups at any point during the study. Similarly, there were no differences in body weight between groups during baseline or 21 days after arsenic exposure (recovery period). In contrast, after 15 days of exposure, there was a significant group effect on body weight [$F(3,27) = 21.26, p < 0.05$], with the 20 mg/kg arsenic group showing a significant difference in comparison with the control group (Tukey test, $p < 0.05$). A significant group effect was also detected during water deprivation (after arsenic exposure) [$F(3,27) = 22.56, p < 0.05$], with the 20 mg/kg arsenic group still showing significant differences in comparison with the control group (Tukey test, $p < 0.05$) (Fig. 1). In addition to decreased body weight, the 20 mg/kg group showed changes in its general appearance, which included dirty coat, hair loss, bleeding nose, diarrhea, and bloated abdomen. These changes were observed

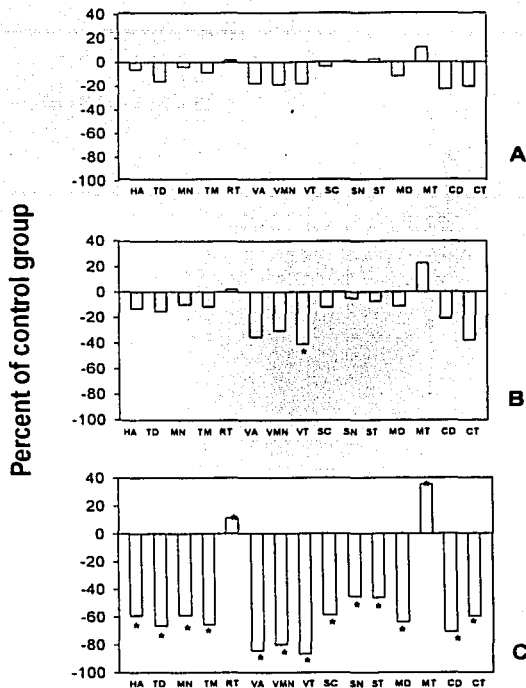


FIG. 2. Spontaneous locomotor activity evaluated for 2 h during the dark phase of the dark/light cycle. Vertical bars indicate the percent difference from the control group for locomotor activity of groups exposed to 5 (A), 10 (B), and 20 (C) mg/kg of arsenic as sodium arsenite by intragastric route during 1 week. *Different from control group, $p < 0.05$ Tukey test for unequal samples. Abbreviations: HA, horizontal activity; TD, total distance; MN, number of movements; MT, movement time; RT, rest time; VA, vertical activity; VMN, number of vertical movements; VT, vertical time; SC, stereotypy counts; SN, number of stereotypy; ST, stereotypy time; MD, margin distance; MT, margin time; CD, center distance; CT, center time.

mainly during arsenic exposure and to a lesser degree at the start of the water deprivation period, but were no longer present during the recovery period.

Significant group effects on spontaneous locomotor activity were detected during the first and second weeks of arsenic exposure [$F(3,27) = 4.43-27.02$, $p < 0.05$]. The 10 mg/kg arsenic group showed a significant decrement in vertical time only during the first week of arsenic exposure (Fig. 2). The 20 mg/kg arsenic group in contrast showed significant decrements (Tukey tests, $p < 0.05$) in almost all parameters of spontaneous locomotor activity during the first and second weeks of arsenic exposure in comparison to the control group, while rest time and marginal time were increased significantly during the first week of arsenic exposure (Tukey tests, $p < 0.05$). Some of these alterations were diminished during the second week of exposure and none of them were present during the recovery period (Figs. 2 and 3).

In the food pellet manipulation test, a significant group effect

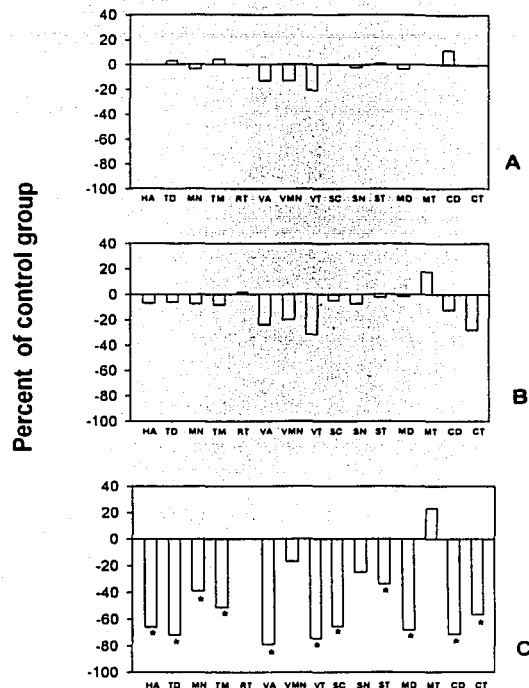


FIG. 3. Spontaneous locomotor activity evaluated for 2 h during the dark phase of the dark/light cycle. Vertical bars indicate the percent difference from the control group for locomotor activity of groups exposed to 5, 10, and 20 mg/kg of arsenic as sodium arsenite by intragastric route for two weeks. *Different from control group, $p < 0.05$ Tukey test for unequal samples. Abbreviations: HA, horizontal activity; TD, total distance; MN, number of movements; MT, movement time; RT, rest time; VA, vertical activity; VMN, number of vertical movements; VT, vertical time; SC, stereotypy counts; SN, number of stereotypy; ST, stereotypy time; MD, margin distance; MT, margin time; CD, center distance; CT, center time.

was detected at the end of the exposure period in the time the rat spent holding a pellet [$F(3,27) = 6.19$, $p < 0.05$] and in the time the rat spent holding a pellet against the floor cage [$F(3,27) = 16.83$, $p < 0.05$]. *Post-hoc* tests showed significant differences between only the groups exposed to 20 mg/kg of arsenic and the control group.

There was no significant group effect on tasks carried out in the T-maze. There was only a significant effect of days of training [$F(4,108) = 42.92$, $p < 0.05$ for spontaneous alternation; and $F(4,108) = 6.56$, $p < 0.05$ for delayed alternation].

Similarly, there were no group effects on the errors made on the win-shift task carried out on an eight-arm radial maze. There was only a significant effect of days of training [$F(5,135) = 5.60$, $p < 0.05$ and $F(5,135) = 5.69$, $p < 0.05$ for the first and second trials, respectively].

There was a significant group effect on brain arsenic content [$F(3,29) = 12.87$, $p < 0.05$]. Brain arsenic concentration in rats

TABLE 1
BRAIN ARSENIC CONTENT

	n	ng/Arsenic/g Wet Tissue
Experiment I		
Group		
Control	8	251.096 ± 52.75
5 mg/kg arsenic	8*	6022.12 ± 901.08
10 mg/kg arsenic	8*	6351.06 ± 1037.57
20 mg/kg arsenic	7*	6411.16 ± 959.70
Experiment II		
Duration of exposure		
Control	9	211.39 ± 20.79
2 weeks	5*	6626.71 ± 257.39
3 weeks	4*	7092.38 ± 667.78
4 weeks	13*	10708.5 ± 1787.24

Values are mean ± SEM.

* Different from control group, $p < 0.05$ Tukey test for unequal samples.

exposed to 5, 10, or 20 mg/kg for 15 days was increased versus control group, but there was no difference among the treatment groups (Table 1).

There were significant group effects on dopamine content in the midbrain of rats exposed to 5, 10, or 20 mg/kg of arsenic for 15 days and the control group (Table 2) [$F(3,26) = 2.81, p = 0.05$];

with the 20 mg/kg arsenic group showing a significant increase in comparison with the control group.

Experiment II

There were no differences in rats' body weight or food or water consumption between rats exposed to 10 mg/kg of arsenic and the control group.

Four activity parameters were selected for analysis: total distance, number of movements, vertical activity, and number of vertical movements. Spontaneous locomotor activity decreased in the 10 mg/kg arsenic group during the second and third weeks of arsenic exposure [$F(1, 14) = 5.49-47.23, p < 0.05$] (Fig. 4). During the fourth week, the 10 mg/kg arsenic group reduced its activity in only two out of four parameters analyzed.

There was no significant group effect on the place learning task carried out on a radial maze; there was only a significant effect for days of training [$F(11,154) = 5.144, p < 0.05$].

A significant effect for days of training was detected on the spontaneous alternation task tested in a T-maze [$F(4,56) = 9.2912, p < 0.05$]. On the delayed alternation task tested in the T-maze, there was a significant difference in number of errors between the 10 mg/kg arsenic group and control group [$F(4,14) = 5.02, p < 0.05$], and also a significant effect of days of training [$F(4,56) = 7.38, p < 0.05$] (Fig. 5).

There was a significant effect of duration of exposure on arsenic brain content between rats exposed to 10 mg/kg for 2, 3, or 4 weeks and the control group [$F(3,29) = 12.48, p < 0.05$] (Table 1).

There were no differences on monoamine content in striatum of rats exposed to 10 mg/kg for 2, 3, or 4 weeks and the control

TABLE 2
CONTENT OF MONOAMINES AND THEIR METABOLITES

Brain Region	Exposure Amount	Experiment I				
		DA	HVA	NE	DA/HVA	
Midbrain	Control	86.60 ± 15.33	61.71 ± 14.03	302.77 ± 114.44	2.29 ± 0.73	
	5 mg/kg arsenic	90.64 ± 12.57	59.63 ± 16.59	271.06 ± 95.84	2.35 ± 0.58	
	10 mg/kg arsenic	111.33 ± 17.58	57.33 ± 13.68	285.92 ± 101.10	2.85 ± 0.86	
	20 mg/kg arsenic	184.31 ± 52.91*	74.15 ± 29.65	466.60 ± 176.35	3.53 ± 0.75	
	Duration of Exposure	Experiment II				
		DA	HVA	5-HT	5-HIAA	DA/HVA
Cortex	Control	69.14 ± 13.06	19.03 ± 6.21	255.04 ± 31.05	82.97 ± 8.51	5.18 ± 1.26
	2 weeks	386.70 ± 149.39*	26.70 ± 2.86	295.34 ± 30.59	110.87 ± 19.54	14.88 ± 6.57
	3 weeks	103.32 ± 39.88	32.27 ± 8.14	296.44 ± 70.27	190.68 ± 20.85*	4.23 ± 1.53
	4 weeks	86.72 ± 18.24	26.38 ± 7.92	335.9 ± 16.28	87.14 ± 8.40	4.84 ± 1.73
Striatum	Control	2813.16 ± 232.45	261.42 ± 45.14	228.08 ± 49.48	130.86 ± 29.69	11.96 ± 1.18
	2 weeks	2982.6 ± 159.45	265.83 ± 8.47	342.06 ± 20.7	157.31 ± 18.7	11.31 ± 0.50
	3 weeks	2754.08 ± 524.4	247.37 ± 29.65	302.63 ± 63.61	180.56 ± 47.88	10.81 ± 1.01
	4 weeks	3352.924 ± 729.1	297.65 ± 56.39	212.78 ± 52.2	69.89 ± 19.74	11.03 ± 0.84
Midbrain	Control	50.04 ± 12.29	10.75 ± 2.5	105.95 ± 37.37	126.16 ± 37.06	5.02 ± 0.6
	2 weeks	56.04 ± 5.76	10.53 ± 1.35	126.47 ± 14.39	114.03 ± 13.18	5.40 ± 0.18
	3 weeks	50.58 ± 4.7	19.59 ± 1.10	72.66 ± 2.06	151.55 ± 8.78	2.59 ± 0.2*
	4 weeks	62.86 ± 20.69	10.33 ± 3.23	143.33 ± 43.93	169.79 ± 56.09	6.09 ± 0.38

Values are mean ± SEM ($n = 5-7$) as ng/g of tissue (wet weight). DA, dopamine; HVA, homovanillic acid; NE, norepinephrine; 5-HT, serotonin; 5-HIAA, 5-hydroxyindole acetic acid.

* Different from control group, $p < 0.05$ Tukey test for unequal samples.

124

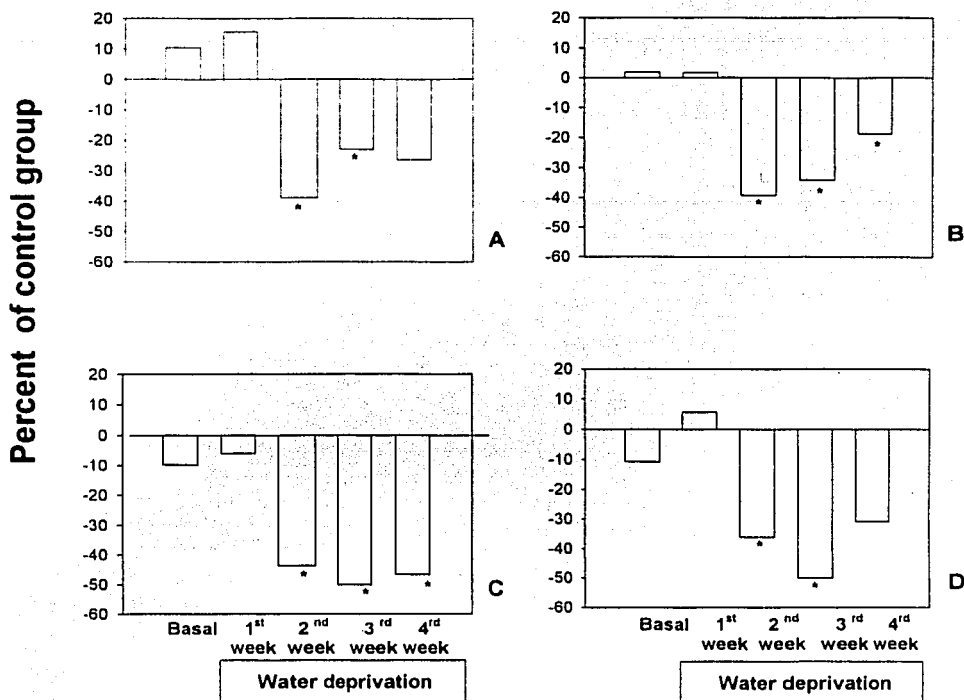


FIG. 4. Spontaneous locomotor activity evaluated for 2 h during the dark phase of the dark/light cycle. Vertical bars indicate the percent difference from the control group for locomotor activity of the group exposed to 10 mg/kg of arsenic as sodium arsenite by intragastric route during 4 weeks. Total distance (A); number of movements (B); vertical activity (C), and number of vertical movements (D). *Different from control group, $p < 0.05$ Tukey test for unequal samples.

group. After 2 weeks of arsenic exposure, dopamine [$F(3,19) = 4.91, p < 0.05$] and 5-HIAA [$F(3,19) = 9.75, p < 0.05$] content increased in the cortex, while dopamine/HVA turnover was decreased in midbrain after 3 weeks of arsenic exposure (Table 2).

DISCUSSION

The present results indicate that arsenic exposure can alter behavioral parameters, but several intervening variables affect the relation between exposure and behavioral changes. Among these variables are the dose and duration of exposure, as well as the experimental conditions under which animals are tested.

The first experiment, designed to find an adequate dose of exposure, showed that short-term exposure to 20 mg/kg arsenic resulted in decreased locomotor activity. However, this decrement was accompanied by significant weight loss, which was not related to a decrement in water or food intake. The weight loss observed was between 15 and 20% compared to control animals, which is similar to that reported in other studies evaluating the consequences of exposure to metals [1,5,25]. The decrement in body weight is comparable to that observed in behavioral studies using food as reinforcer, in which animals are maintained at 85% of their

free-feeding weight (e.g., [2,9]). These effects could be the result of arsenic damage to gastric mucous membranes [13], because gastrointestinal alterations such as diarrhea and bloated abdomen were observed in the group of animals exposed to 20 mg/kg arsenic. In addition, once exposure ended, the animals recovered behaviorally, weight returned to control levels, and gastrointestinal symptoms disappeared. Thus, the changes observed in locomotor behavior could be a result of the general malaise evident in these animals, or alternatively, it could reflect the deleterious effects of arsenic on metabolism, particularly in the central nervous system [3,23,13]. Other studies using high doses of arsenic trioxide have also found decrements in locomotor parameters in rodents [15].

After the exposure period, animals were tested on a food manipulation task and on two spatial learning tasks. Interestingly, the group exposed to the highest dose of arsenic showed deficits in food manipulation but no changes in learning. These animals spent more time holding the food pellet, suggesting that their fine motor coordination was not as good as that of control animals. No other group showed these deficits; thus, this result could be a carryover effect of the general malaise observed in these animals during exposure.

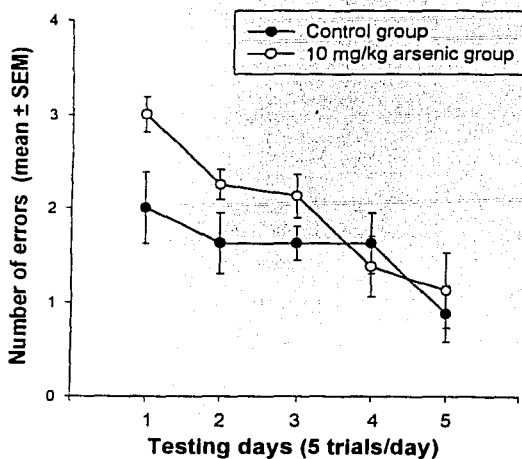


FIG. 5. Means of errors \pm SEM in the delayed alternation task for the control group and the group exposed to 10 mg/kg of arsenic as sodium arsenite by intragastric route during 4 weeks. Groups showed significant difference [$F(1,14) = 5.02, p < 0.05$].

All exposed groups showed significantly higher brain levels than controls, but there were no differences between experimental groups; it is possible that arsenic transport through the gastric mucous membrane was impaired in the 20 mg/kg group.

Dopamine content in midbrain increased significantly after 15 days of exposure to 20 mg/kg arsenic, which reflects the vulnerability of this region to arsenic effects as reported previously [22,25]. The increase in dopamine content was dose-related, with only the 20 mg/kg arsenic group being significantly different from control.

Based on the results of the first experiment, the second tested the effect of different periods of exposure using the 10 mg/kg dose, because no systemic effects were found with this dose. In addition to modifying the period of exposure, we tested animals on the learning paradigms while they were under exposure to arsenic. Body weight, food, and water intake in the experimental groups was the same as the control group throughout the experiment. In contrast to the previous experiment, after 2 weeks of exposure the experimental group showed a significant decrement in locomotor activity which lasted through the 4 weeks of exposure; although during the last test, two out of four behavioral parameters returned to control levels. The only difference between this experiment and the first one was the restricted access to water during all behavioral tests. Thus, by changing the experimental conditions of the animal, affecting entrance and perhaps clearance of arsenic from the body, the behavioral outcome was different. Without a detailed pharmacokinetic study, we cannot explain why water deprivation resulted in significant behavioral changes in the 10 mg/kg group in the second experiment. We can only suggest that the deprivation resulted in metabolic adjustments that were added to the effects of arsenic on energy production.

Furthermore, the experimental animals showed increased number of errors in the delayed alternation task, an egocentric task that requires the use of sensory information regarding the position of the body in space. The basal ganglia are especially relevant for this

kind of egocentric task [6]. In addition to the deficits in locomotor activity, this finding suggests that the basal ganglia may be sensitive to arsenic exposure. Further support to this notion comes from the lack of changes in performance on an allocentric task. The win-shift task used in these experiments as a control has traditionally been associated with hippocampal function [21] and requires the use of spatial cues. The present results suggest that arsenic exposure does not cause indiscriminate changes in learning functions, but appears to target specific types of learning tasks.

Whereas the previous experiment showed no dose-related changes in brain arsenic content, in the second experiment there was an increase in arsenic concentration related to the duration of the exposure period. Because during exposure animals had restricted access to water intake, the increased arsenic content could also be the result of reduced clearance of arsenic from the system. This result strengthens the notion that the experimental conditions of exposure determine not only the behavioral deficits, but also the content of arsenic in brain tissue. It should be noted that arsenic content in brain was measured in non-perfused brains. Hemoglobin has many sulfhydryl groups that strongly bind arsenic [13], thereby increasing the apparent arsenic content in brain tissue. Recent experiments in our laboratory, in which brains have been perfused prior to arsenic content determination, indicate that the levels of arsenic decrease markedly in all groups, while the differences between exposed and control groups are maintained (unpublished data).

Arsenic exposure did not affect monoamine content in mid-brain or striatum. A significant reduction in mesencephalic dopamine/HVA ratio, due to a non-significant increase in HVA content, was observed 3 weeks after exposure. These changes were not related to the duration of exposure, and did not correlate with behavioral changes. This result is in contrast with the results of the first experiment, in which mesencephalic dopamine increased according to arsenic dosage.

Previous studies described both increases and decreases in monoamine content in basal ganglia as a result of arsenic exposure [15,22,26,32]. The most consistent changes reported have been increases in the content of serotonin or its metabolite in striatum, which were not observed in the present study. The inconsistencies reflected in the aforementioned studies and the results of the present experiment suggest that monoamine content may not be the best indicator of arsenic effects on brain tissue, and that dynamic indicators of synaptic function, such as neurotransmitter release, could provide more information. Indeed, the changes produced by arsenic exposure on monoamines seem to be quite subtle. In rats treated with a mining residue containing high levels of arsenic, a decrease in potassium-evoked dopamine release has been detected in the striatum using microdialysis, but no changes in basal release were reported [29]. In addition to monoamines, other neurotransmitter systems such as the cholinergic and GABAergic systems could be affected by arsenic exposure (see [14,26]).

In conclusion, the results indicate that a dose of 10 mg/kg arsenic does not have systemic effects, but can induce behavioral deficits in locomotor behavior and in an egocentric learning task. The present findings also show that these changes are related to the experimental conditions and to the duration of exposure. Contrary to what was expected, behavioral changes did not correlate with arsenic content in brain, nor did they consistently correlate with monoamine content in the basal ganglia. Thus, other neurochemical markers of arsenic exposure should be considered in future studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the technical assistance of Víctor Pérez Romero, M. C. Fernando Alonso Onofre, and Dr. Michael C. Jeziorski for his comments on the manuscript. This work was supported by grants 25520-M from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). V.M. Rodríguez was supported by a fellowship from CONACyT (92291).

REFERENCES

- Adonayto, V. N.; Oteiza, P. I. Lead intoxication: Antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology* 135:77-85; 1999.
- Bowman, E. M.; Brown, V. J. Effects of excitotoxic lesions of the rat ventral striatum on the perception of reward cost. *Exp. Brain Res.* 123:439-448; 1998.
- Brown, M. M.; Rhyne, B. C.; Goyer, R. A.; Flower, B. A. Intracellular effects of chronic arsenic administration on renal proximal tubule cells. *J. Toxicol. Environ. Health* 1:505-514; 1976.
- Cook, D.; Kesner, R. P. Caudate nucleus and memory for egocentric localization. *Behav. Neural Biol.* 49:332-343; 1988.
- Delville, Y. Exposure to lead during development alters aggressive behavior in golden hamsters. *Neurotoxicol. Teratol.* 21:445-449; 1999.
- Dunnett, S. B.; Iversen, S. D. Learning impairments following selective kainic acid induced lesions within the striatum of rats. *Behav. Brain Res.* 2:189-209; 1981.
- Ebdon, L.; Wilkinson, J. R.; Jackson, K. W. A simple and sensitive continuous hydride generation system for determination of arsenic and selenium by atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Chem. Acta* 136:191-199; 1982.
- Edinger, D. R. Determination of arsenic and selenium in biological and botanical materials by atomic absorption. *Atomic Absorption Application Study N. 550*. Norwalk, CT: Perkin-Elmer Co.; 1973.
- Floresco, S. B.; Seamans, J. K.; Phillips, A. G. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J. Neurosci.* 17:1880-1890; 1997.
- Ghafgazi, T.; Ridlington, J. W.; Fowler, B. A. The effects of acute and subacute sodium arsenite administration on carbohydrate metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55:126-130; 1980.
- Glowinski, J.; Iversen, L. L. Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of ³H-Norepinephrine, ³H-Dopamine and ³H-DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13:655-669; 1966.
- Goyer, R. A. Toxic effects of metals. In: Amdur, M. O.; Doull, J.; Klaassen, C., eds. *Casarett and Doull's toxicology*. 4th ed. New York: Pergamon Press; 1991:623-680.
- Klaassen, C. D. Heavy metals and heavy-metal antagonists. In: Gilman, A. G.; Rall, T. W.; Nies, A. S.; Taylor, P., eds. *The pharmacological basis of therapeutics*, vol. 2, 8th ed. Singapore: McGraw-Hill; 1992:1592-1614.
- Kobayashi, H.; Yuyama, A.; Ishihara, M.; Matsusaka, N. Effects of arsenic on cholinergic parameters in brain *in vitro*. *Toxicology* 26:1707-1713; 1987.
- Itoh, T.; Zhang, Y. F.; Murai, S.; Saito, H.; Nagahama, H.; Miyate, H.; Saito, Y.; Abe, E. The effect of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice. *Toxicol. Lett.* 54:345-353; 1990.
- Iversen, S. D.; Dunnett, S. B. Functional organization of striatum studied with neural grafts. *Neuropsychologia* 28:601-626; 1990.
- Lai, M. S.; Hsueh, Y. M.; Chen, C. J.; Shyu, M. P.; Kuo, T. L.; Wu, M. M.; Tai, T. Y. Ingested inorganic arsenic and prevalence of diabetes mellitus. *Am. J. Epidemiol.* 139:484-492; 1992.
- Langston, J. W.; Irwin, I. MPTP: Current concepts and controversies. *Clin. Neuropharmacol.* 9:485-507; 1986.
- Ludolph, A. C.; He, F.; Spencer, P. S.; Hammerstad, J.; Sabri, M. 3-Nitropropionic acid—Exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can. J. Neurol.* 30:701-708; 1991.
- Marshall, J. F.; Drew, M. C.; Neve, K. A. Recovery of function after mesotelencephalic dopaminergic injury in senescence. *Brain Res.* 259:249-260; 1983.
- McDonald, R. J.; White, N. M. A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav. Neurosci.* 405:405-408; 1993.
- Mejía, J. J.; Díaz-Barriga, F.; Calderón, J.; Ríos, C.; Jiménez-Capdeville, M. E. Effects of lead-arsenic combined exposure on central monoaminergic systems. *Neurotoxicol. Teratol.* 19:489-497; 1997.
- Mitchell, R. A.; Change, B. F.; Huang, C. H.; De Master, E. G. Inhibition of mitochondrial energy-linked functions by arsenate. *Biochemistry* 10:2049-2054; 1971.
- Montgomery, E. W. Heavy metals and the etiology of Parkinson's disease and other movement disorders. *Toxicology* 97:3-9; 1995.
- Nagaraja, T. N.; Desiraju, T. Effects on operant learning and brain acetylcholine esterase activity in rats following chronic inorganic arsenic intake. *Hum. Exp. Toxicol.* 13:353-356; 1994.
- Nagaraja, T. N.; Desiraju, T. Regional alterations in the levels of brain biogenic amines, glutamate, GABA, and GAD activity due to chronic consumption of inorganic arsenic in developing and adult rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50:100-107; 1993.
- Pisa, M. Motor somatotomy in the striatum of rat: Manipulation, biting and gait. *Behav. Brain Res.* 27:21-35; 1988.
- Ramírez-Campos, J.; Ramos-Peé, J.; Martínez-Barro, M.; Zamora-Peralta, M.; Martínez-Cerrato, J. Neuropatía periférica por intoxicación aguda con arsénico. *Gac. Méd. Méx.* 134:241-246; 1998.
- Rodríguez, V. M.; Dufour, L.; Carrizales, L.; Díaz-Barriga, F.; Jiménez-Capdeville, M. E. Effects of oral exposure to a mining waste on *in vivo* striatal dopamine release. *Environ. Health Perspect.* 106:487-491; 1998.
- Salomone, J. D. Complex motor and sensorimotor functions of striatal and accumbens dopamine: Involvement in instrumental behavior processes. *Psychopharmacology* 107:160-174; 1991.
- Sanberg, P. R.; Hagenmeyer-Houser, S. H.; Henault, M. A. Automated measurement of multivariate locomotor behavior in rodents. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 7:87-94; 1985.
- Tripathi, N.; Kannan, G. M.; Pant, B. P.; Jaiswal D. K.; Malhorta, P. R.; Flora, S. J. S. Arsenic-induced changes in certain neurotransmitter levels and their recoveries following chelation in rat whole brain. *Toxicol. Lett.* 92:201-208; 1997.
- World Health Organization. *Environmental health criteria 18: Arsenic*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1981.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN