



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Campus Juriquilla, Querétaro

**PROTEÍNAS DE LAS UNIONES HERMÉTICAS DE LA MICROVASCULATURA
CEREBELAR DE RATAS TRATADAS CRÓNICAMENTE CON TÍNER:
LOCALIZACIÓN INMUNOCITOQUÍMICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestro en Ciencias (Neurobiología)

PRESENTA

LEÓN EDUARDO SÁNCHEZ-MEJORADA ZÚÑIGA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Alfonso Cárabez Trejo

Querétaro 2010



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.

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento del **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**, al Dr. Alfonso Cárabez Trejo (IN204407).

El trabajo experimental se realizó en el **Laboratorio de Neuromorfotoxicología** en el **Instituto de Neurobiología** de la **Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla** durante el periodo comprendido de Agosto de 2008 a Mayo de 2010.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del

Dr. Alfonso Cárabez Trejo

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, INB, UNAM Campus Juriquilla.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: León Eduardo Sánchez-Mejorada Zúñiga, cuyo título es: “PROTEÍNAS DE LAS UNIONES HERMÉTICAS DE LA MICROVASCULATURA CEREBELAR DE RATAS RATADAS CRÓNICAMENTE CON TÍNER: LOCALIZACIÓN INMUNOCITOQUÍMICA” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Edgar Heimer de la Cotera

Secretario (Tutor)

Dr. Alfonso Cárabez Trejo

Vocal

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

Suplente

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

Suplente

Dr. Manuel Salas Alvarado

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa

RESUMEN

La homeostasis del cerebro requiere de estrecha regulación del medio extracelular para un adecuado funcionamiento neuronal. La protección y el mantenimiento de un ambiente adecuado del sistema nervioso central (SNC) es posible gracias a la barrera hematoencefálica (BHE). Para asegurar la integridad estructural de la BHE las células endoteliales de la microvasculatura cerebral forman uniones herméticas (inter e intracelulares), las cuales son uno de los componentes de la BHE. La integridad de la BHE da lugar a una interfase dinámica entre la circulación periférica y el SNC. La inhalación voluntaria o involuntaria de solventes orgánicos volátiles (SOV) y sus efectos en el cerebro, constituyen un problema mayor de salud pública en México. Por estas razones, el interés del presente trabajo se centra en estudiar con técnicas inmunocitoquímicas, algunas de las proteínas de la unión hermética de la microvasculatura cerebelar de ratas macho adultas de la cepa Wistar, expuestas a la inhalación crónica de tiner, aplicando marcaje simple para la identificación de estas proteínas con anticuerpos secundarios marcados con oro coloidal de 10 y 20 nm. Los hallazgos obtenidos indican que la inhalación crónica de tiner induce un cambio en la localización de las proteínas de la unión hermética, así como daño a las células endoteliales de la microvasculatura cerebelar a lo largo de 14 semanas del tratamiento.

ABSTRACT

The homeostasis of the brain requires a precise regulation of the extracellular milieu for neurons to function properly. The protection and maintenance of an adequate environment of central nervous system (CNS) is due to the blood brain barrier (BBB). To ensure the structural integrity of the BBB endothelial cells of the cerebral microvasculature form inter and intracellular tight junctions, which are a component of the BBB. The integrity of the BBB leads to a dynamic interface between the peripheral circulation and the CNS. Voluntary or involuntary sniffing of organic volatile solvents and their effects on the brain, are a major public health problem in Mexico. Because of these reasons, the interest of this work focuses on studying by immunocytochemistry techniques, some of the proteins of cerebellar microvessels tight junction of Wistar male adult rats, exposed to thinner chronic sniffing, using simple marking to identify these proteins with secondary antibodies labeled with colloidal gold (10 or 20 nm). Current findings suggest that chronic thinner sniffing induces a change in tight junctions' proteins location, as well as endothelial cell damage in cerebellar microvessels through 14 weeks of treatment.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Becario No: 253065

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM
Becario No: 30086629-4

Bioterio
M.V.Z. Martín García Servín

Enseñanza
M en C Leonor Casanova Rico

Unidad de Microscopia
Facilitación del Microscopio Electrónico

PAPIIT
Proyecto IN218507

A mi familia

Por haberme dado la posibilidad de cursar esta Maestría, apoyándome en todo momento sin dudarlo. Se que fue difícil el estar lejos, pero al fin creo que valió la pena tanto para ustedes como para mí. Esta tesis es mi forma de agradecerles tanto esfuerzo y paciencia, y todo lo que han hecho por mi en todos estos años de conocernos. Gracias porque de verdad la vida no sería tan fácil ni divertida si no fuera por ustedes. Los amo.

A mis amig@s del INB

Fue muy bueno contar con su apoyo, consejos, regaños, etc. Realmente disfruté esta etapa de mi vida al lado de ustedes. Espero que haya más capítulos y más aventuras juntos muchach@s. En verdad los voy a extrañar. Gracias por permitirnos compartir dos años de nuestras vidas.

Al C-3

A pesar de ser tod@s tan diferentes, creo que en el fondo somos iguales, y es por eso que logramos tener tan buena convivencia. Nunca olvidaré esta experiencia en mi vida. Aunque nunca volvamos a coincidir en la vida, esto que hemos vivido se quedará por siempre. C-3 4 ever and ever together.

Al laboratorio A-02

Muchas gracias Dr. por permitirme conocerlo como realmente es, una persona alegre, simpática, siempre dispuesto a ayudar y compartir. También quiero agradecerle su paciencia, la confianza que depositó en mí, pero sobre todo el haberme aceptado como su alumno, y defenderme cuando fue necesario. En verdad aprendí mucho de usted, y espero que también yo le haya enseñado algo.

Dra. gracias por su inmensa dedicación y compromiso para conmigo.

Sergio gracias por ayudarme cada vez que lo necesité.

¿Quién necesita suerte cuando la ciencia está de tu lado?

ÍNDICE

RESUMEN	III
ABSTRACT	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INTRODUCCIÓN	1
1- El tñner para pintura	3
2- Biotransformación	7
3- Efectos de los SOV	11
4- Barrera hematoencefálica	13
5- Uniones herméticas	14
6- Proteínas de las uniones herméticas	15
7- Cerebelo	20
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
1- Toma de muestras	26
2- Microscopía Electrónica	27
3- Inmunolocalización	28
RESULTADOS	30
1- Aspectos físicos y conductuales	30
2- ZO-1	31
3- Ocludina	33
4- Caudina-1	34
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

INTRODUCCIÓN

La inhalación de solventes orgánicos volátiles (SOV) y sus consecuencias como es el experimentar sus efectos psicodislépticos, o los daños estructurales que producen en el Sistema Nervioso (por ejemplo la leucoencefalomalacia), constituyen un problema mayor de salud pública en México (Centros de Integración Juvenil, A.C. Farmacoterapia de los síndromes de intoxicación y abstinencia por psicotrópicos) y otras partes del mundo (National Institute of Health de Estados Unidos, reporte número 05-3818, 2001).

Los inhaladores de los SOV se pueden dividir en dos grandes grupos: el grupo de los inhaladores voluntarios y el grupo de los inhaladores involuntarios. El grupo de los inhaladores involuntarios se puede dividir a su vez en dos grupos, el primero son las personas que están en contacto con los SOV como materias primas o auxiliares en su trabajo, como son los empleados de fábricas de pinturas, gasolineras, ebanistas, carpinteros, etc. El segundo grupo está integrado por las personas que inhalan los vapores de los SOV de manera involuntaria haciéndolo de manera ocasional al utilizar compuestos en el hogar, escuela, etc. que contienen SOV. Ambos grupos pueden convertirse en inhaladores voluntarios, siendo más frecuente esta tendencia en el primer grupo mencionado.

El grupo de inhaladores voluntarios se integra principalmente por niños, pero también es importante el número de adolescentes y si bien en menor representación, también se encuentran adultos. Estos utilizan a los SOV como una droga, con el objeto de experimentar los efectos psicodislépticos inducidos por los solventes y de esta forma evadir su realidad bio-psico-social. Este grupo está constituido en su mayoría por individuos de sexo masculino con un rango de edad entre 15 a 24 años, con baja escolaridad, cuya edad de inicio más frecuente es de los 10 a los 14 años, y con una frecuencia de uso diaria en la mayoría de los casos, como se muestra en la Tabla 1.

Características demográficas de la primera droga de uso y su porcentaje en México de enero a junio de 2002

Característica	Total (N = 13488)	Marihuana (n = 3877)	Inhalantes (n = 1580)	Alcohol (n = 33985)	Cocaína (n = 831)	Heroína (n = 585)
Género						
Masculino	92.5	95.1	93.7	93.4	88.1	91.9
Femenino	7.5	4.9	6.3	6.6	11.9	8.1
Edad						
5 a 14	1.9	1.2	6.0	1.0	1.1	0.2
15 a 19	14.7	14.0	27.3	9.4	17.8	3.6
20 a 24	20.7	22.9	24.8	15.8	24.1	16.6
25 a 29	19.0	19.9	17.5	17.3	23.1	21.0
30 a 34	15.9	17.7	11.1	15.6	16.7	18.2
35 y más	27.8	24.3	13.3	40.8	17.2	40.4
Escolaridad						
Primaria	38.4	38.3	57.7	33.9	27.9	44.2
Secundaria	37.5	41.8	28.2	32.9	42.3	37.4
Preparatoria	16.3	15.0	5.7	20.7	23.0	12.8
Universidad	3.5	1.8	0.3	7.3	4.1	1.3
Sin educación formal	3.8	2.8	8.0	4.5	2.1	3.8
Otra	0.4	0.3	0.1	0.7	0.6	0.4
Estado Civil						
Soltero	53.0	55.2	70.0	44.4	50.9	48.4
Casado	22.1	18.4	12.1	29.7	28.5	24.5
Divorciado	4.3	3.9	2.2	6.2	3.1	6.0
Viudo	0.9	0.8	0.7	1.5	0.4	0.8
Unión Libre	12.8	14.3	10.3	10.6	11.7	13.8
Otra	6.9	7.4	4.7	7.6	5.4	6.4
Edad de inicio						
Menor de 10	5.5	4.8	10.3	4.5	0.6	1.0
10 a 14	43.5	49.5	55.5	38.0	20.7	12.4
15 a 19	37.8	37.3	30.6	45.5	40.2	35.1
20 a 24	7.0	5.2	2.3	7.7	18.1	21.0
25 a 29	3.3	2.3	0.7	2.5	10.4	15.9
30 a 34	1.4	0.5	0.2	0.8	5.7	7.6
35 y más	1.4	0.4	0.3	1.0	4.3	6.9
Frecuencia de uso						
Diario	73.2	80.9	86.1	48.2	63.2	94.7
Una vez a la semana	20.2	13.9	10.0	38.9	29.2	4.7
1 a 3 veces por semana	5.3	4.0	2.8	10.9	5.9	0.5
1 a 11 veces por año	1.3	1.2	1.1	2.0	1.6	0.1

Tabla 1. Características demográficas de la primera droga de uso y su porcentaje en México de enero a junio de 2002.
Fuente: Centros de tratamiento no gubernamentales. Tomada del National Institute on Drug Abuse.

El SOV inhalado voluntariamente por el mayor número de adictos es el tñner, seguido de los pegamentos con alto contenido de SOV (Tabla 2), en gran medida debido al fácil acceso y bajo costo de estos productos.

<i>Material</i>	<i>Número de adictos</i>	<i>Porcentaje</i>
Tñner	10 707	40.7
Pegamentos	10 630	40.4
Tolueno	3 748	14.3
Pinturas	885	3.4
Otros	321	1.2
Total	26 291	100.0

Tabla 2. Número de adictos a diferentes inhalantes. Ikeda, 1974.

Las razones por las que estos niños y adolescentes se vuelven adictos son, entre otros de manera principal el abuso físico y sexual en el hogar, que ocurre en las familias disfuncionales y al que muy frecuentemente se asocian problemas de adicciones por parte de los padres, por lo que se ven obligados a abandonar el hogar y viven en situación de calle, en donde están expuestos a muchos peligros, entre ellos el uso de este tipo de compuestos y de otras drogas.

Como toda droga de abuso, la intoxicación por la inhalación de los vapores de los solventes induce una primera fase caracterizada por hiperactividad, seguida de euforia, acompañada de alucinaciones. En fases más avanzadas de la intoxicación puede haber reducción en la respuesta a estímulos ambientales (Basu et al., 2004), disminución de la actividad motora (Ilgazli et al., 2004), catatonía y crisis convulsivas cuando hay sobredosis (Tang et al., 2005), llegando incluso a la muerte (Ilgazli et al., 2004) por paro cardio-respiratorio.

El tñner para pintura

Por su origen químico, el tñner no puede ser considerado ni manejado como un compuesto puro, ya que este solvente orgánico volátil (SOV) es una mezcla de alrededor de 200 compuestos tanto aromáticos como alifáticos de naturaleza orgánica. El análisis de los cromatogramas del tñner pone en evidencia la diferente composición de los tñneres comerciales, destacando claramente dos grandes

categorías con base al costo, pero que se nos explica por el tipo de solventes presentes. En general este tipo de compuestos están formulados por tres grandes grupos de componentes:

Solvente(s), “activo”

Co-solvente(s) metanol, etanol, etc. y,

Diluyente(s) tolueno, benceno, xileno.

Según los solventes, co-solventes y diluyentes que lo formulan el tiner se presenta en 2 categorías, el tiner corriente (Figura 1) y el tiner fino (Figura 2), que si bien no se refleja en su actividad como solventes industriales, si se refleja en su costo, siendo el primero mucho más barato que el segundo. El tiner fino, en razón de su costo se expende con menor amplitud comercial, y es objeto de mejor supervisión de su venta. El tiner corriente tiene una gran distribución y venta al menudeo, lo que implica mayor accesibilidad y menor grado de control o supervisión en su venta. Ello facilita al usuario, voluntario o involuntario el acceso a este compuesto.

Esta compleja mezcla de compuestos hace que la farmacocinética del tiner sea muy difícil de definir debido a los efectos competitivos y potenciadores que ocurren entre los componentes principales entre si y con los componentes secundarios (Figuras 1, 2, y 3).

Hasta antes de 1994 los principales componentes de la mezcla conocida como tiner eran tolueno, benceno, y/o metanol/etanol. Figura 1 y 2.

CROMATOGRAFÍA DE GASES DE TÍNER CORRIENTE

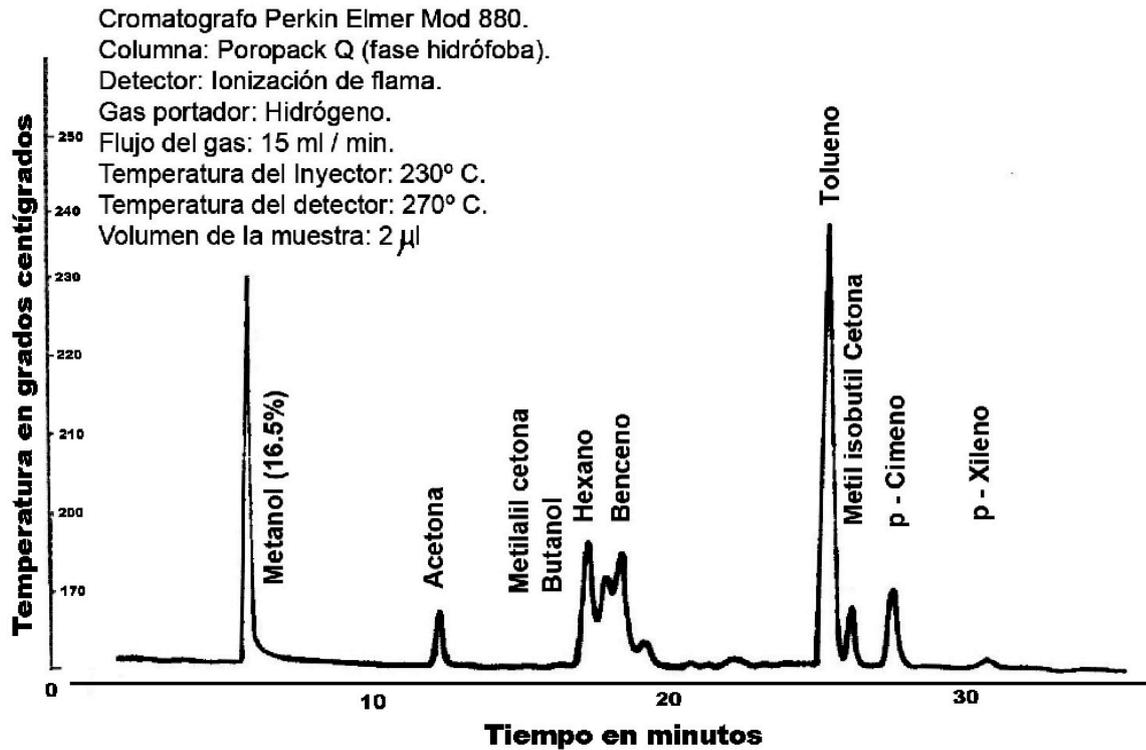


Figura 1. Cromatografía de gases de tiner corriente. Dr. Alfonso Cárbaz Trejo, comunicación personal.

CROMATOGRAFÍA DE GASES DE TÍNER FINO

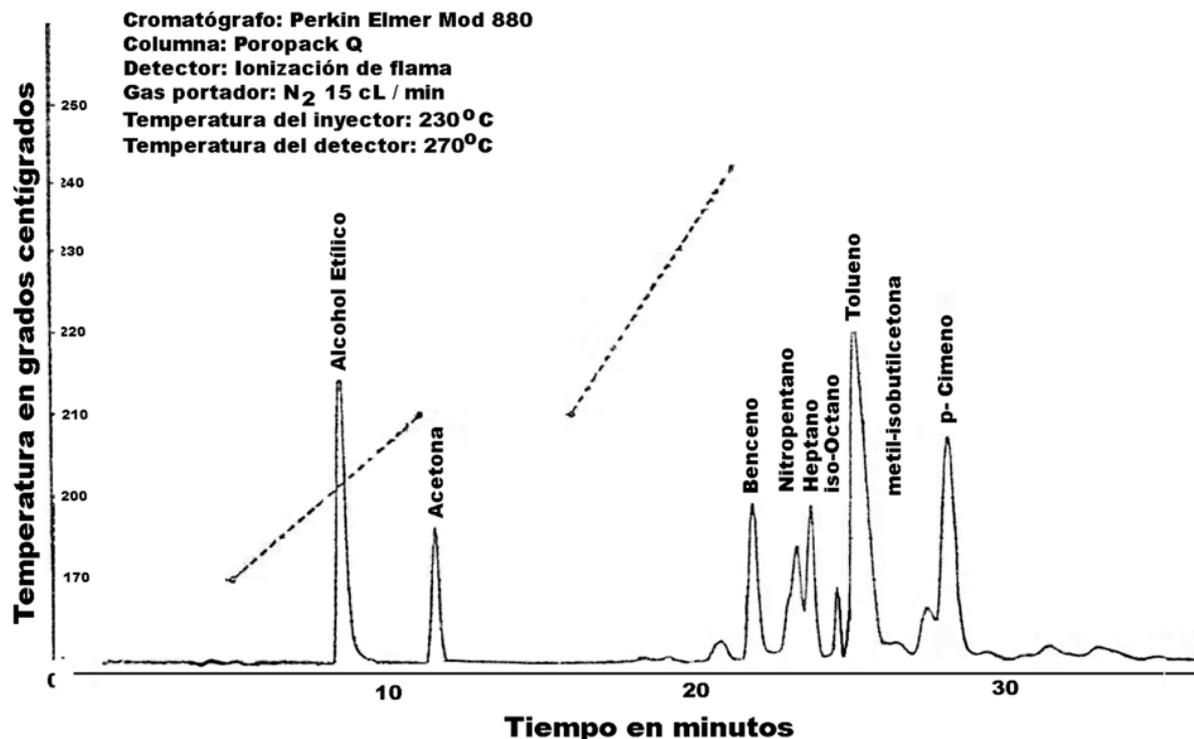


Figura 2. Cromatograma de gases de tiner fino. Dr. Alfonso Cárbaz Trejo, comunicación personal.

Después de 1994, y con base a la NOM-SSA-1994, se eliminó el benceno del tñer, además de que el metanol fue sustituido por etanol (Figura 3). Estos cambios obedecen a los efectos tóxicos tanto del benceno como del metanol. El benceno es un agente xenobiótico que potencia los efectos psicodislépticos del tolueno, mientras que el metanol ha sido asociado a cuadros de ceguera. Al eliminar el benceno, se aumentó la concentración del p-xilol (Figura 3), lo cual también es contraproducente, ya que este compuesto mantiene por más tiempo los efectos del tolueno.

CROMATOGRAMA DE IÓN TOTAL DE TÍNER

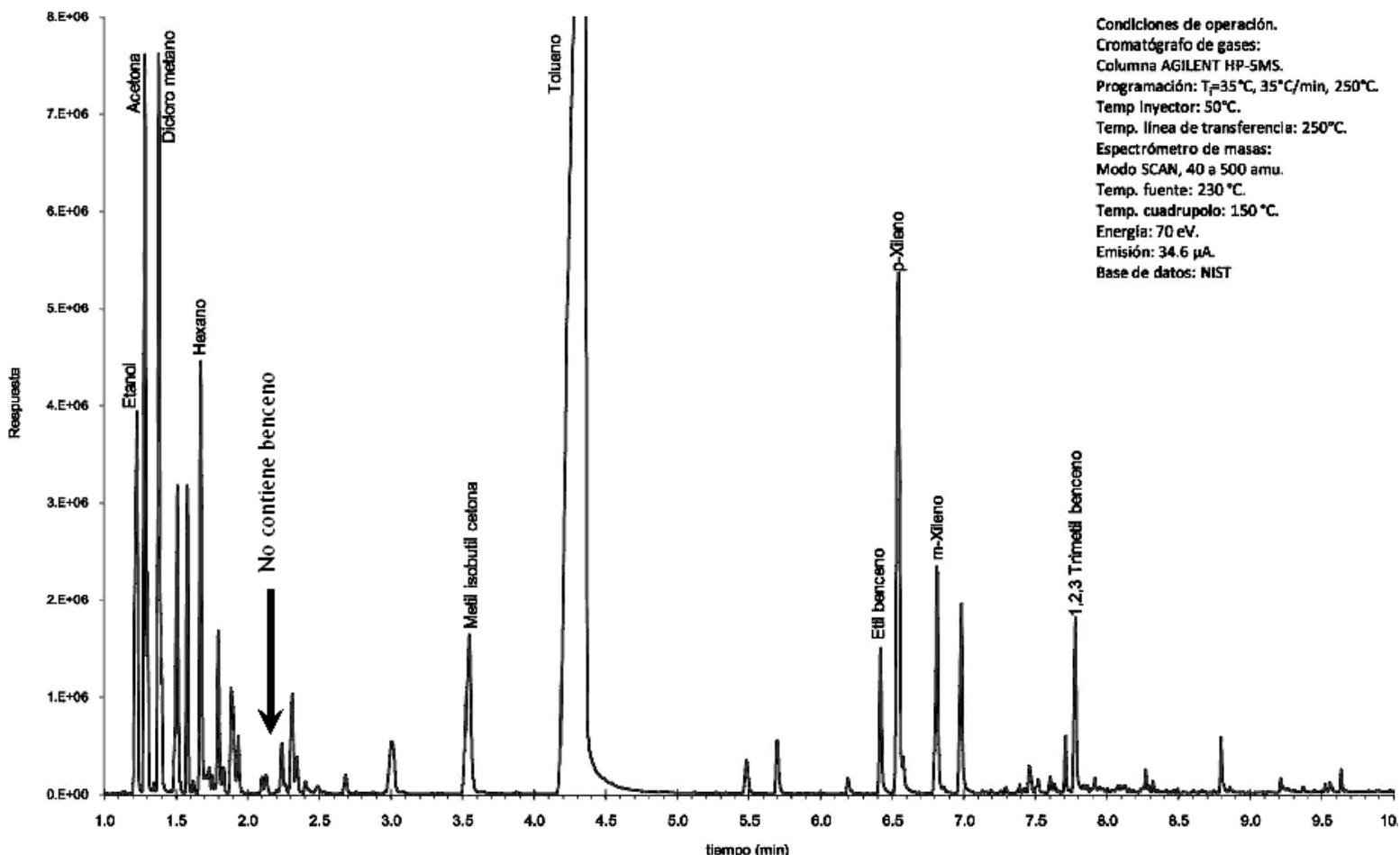


Figura 3. Cromatograma de ión total tñer para pintura. Tomado de Martínez-Alfaro M et al., 2009.

Biotransformación

Dependiendo de sus propiedades físicas y químicas los agentes tóxicos pueden ser absorbidos en el tracto gastrointestinal, los pulmones y/o la piel. El organismo posee los mecanismos enzimáticos y químicos para realizar la biotransformación de compuestos aromáticos y alifáticos, algunos de ellos presentes en el tñer, y excretar los productos de la biotransformación y/o metabolismo de estos compuestos por la orina, las heces y por la respiración. Cuando la absorción excede la capacidad del organismo, para metabolizar estos compuestos, los compuestos tóxicos pueden acumularse y desencadenar así un mayor grado de toxicidad (Figura 4), producto de la sobredosis a la que se expone el individuo.

DISPOSICIÓN Y EFECTOS DE COMPUESTOS QUÍMICOS

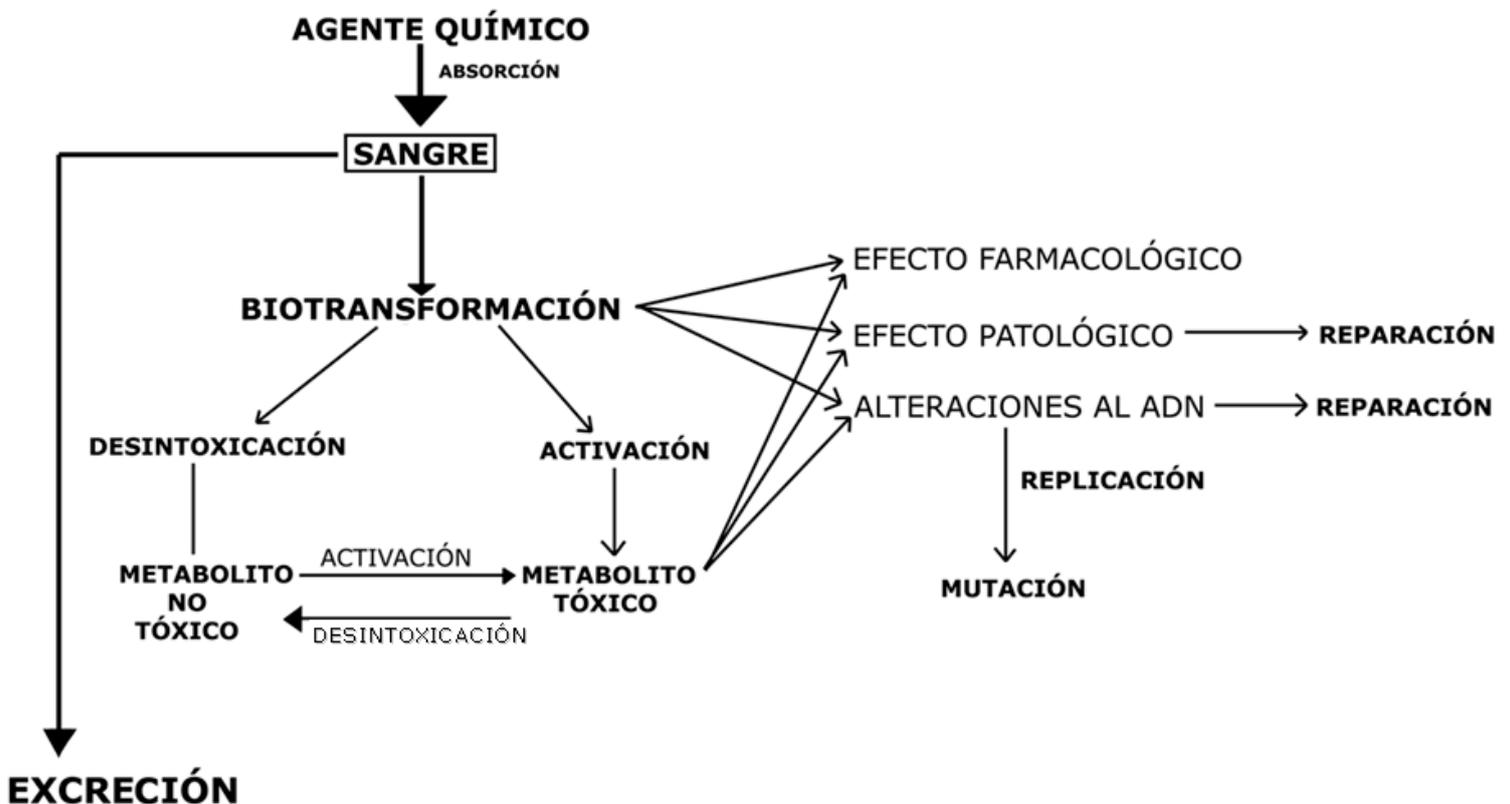


Figura 4. Metabolismo de compuestos químicos. Modificado de Casarett y Doull, 1991.

Muchos compuestos químicos tienen muy poca toxicidad por sí solos, pero pueden manifestar alto grado de toxicidad al ser activados por los mecanismos de su biotransformación, por lo que la respuesta del organismo depende de la cantidad de metabolitos activos que se produzcan. La respuesta a un compuesto tóxico producido por un agente químico es influenciada por el grado de absorción, distribución, biotransformación y excreción.

Biotransformación de los SOV

Los SOV que se absorben por inhalación en los pulmones, al ser metabolizados en los órganos internos como el hígado, riñón, músculo, etc. son biotransformados. Durante este proceso que implica la transformación química o enzimática de los componentes de los SOV puede ocurrir la conversión de un compuesto bioactivo a uno menos bioactivo o metabolitos inactivos que son eliminados o excretados (inactivación metabólica o desintoxicación), o bien la producción de metabolitos reactivos que son citotóxicos y/o mutagénicos (activación metabólica o bioactivación) (Figura 4).

Los metabolitos reactivos son llevados hacia los órgano(s) blanco(s) por la sangre. Estos metabolitos pueden ser removidos de la circulación sistémica por biotransformación, excreción y/o almacenamiento en varios tejidos del organismo.

El paso inicial de la biotransformación de los SOV es catalizada principalmente por las enzimas CYPs microsomales, las que forman parte de la super familia enzimática de la citocromo P450 (CYP), cuya función en general es la de catalizar la oxidación de xenobióticos de bajo peso molecular, como es el caso de los SOV.

Benceno

El metabolismo del benceno ocurre principalmente en el hígado, en donde se producen diferentes metabolitos (Figura 5), los cuales afectan distintos tejidos del organismo, como por ejemplo la médula ósea, en donde produce uno de sus efectos adversos más importantes, la toxicidad hematopoyética (Bruckner et al., 2008). El daño en la médula ósea es resultado de exposición crónica a la inhalación de SOV, es progresivo, y se manifiesta como anemia, seguida de leucopenia, trombocitopenia, o una combinación de éstas (Bruckner et al., 2008).

El paso metabólico inicial del benceno (Figura 5) es su oxidación que resulta en la formación de un epóxido. Esta reacción es catalizada vía la enzima hepática CYP2E1.

El epóxido, resultado de la oxidación del benceno está en equilibrio con su forma oxepina y es metabolizado por tres diferentes rutas:

- (1) conjugación con glutatión transferasa de s-epóxido para formar ácido premercaptúrico;
- (2) re-arreglo no enzimático para formar fenol; e
- (3) hidratación por epóxido hidratasa para formar benceno dihidrodiol, el cual puede ser oxidado por la dihidrodiol deshidrogenasa a catecol.

Si el fenol producto del metabolismo del benceno es hidrolizado en la posición *orto*, se formará un catecol, el cual puede ser convertido en *o*-benzoquinona. Por el contrario, si este fenol es hidrolizado en la posición *para*, se forma *p*-hidroquinona, la cual puede ser oxidada en *p*-benzoquinona. Se cree que las *o*- y *p*-benzoquinonas son los últimos metabolitos tóxicos del metabolismo del benceno, aunque debido a su alto grado de resonancia, gracias a sus dos dobles ligaduras en el anillo bencénico, estas quinonas tienen la función de ser antioxidantes al inactivar las especies reactivas de oxígeno, antes de que provoquen daño celular.

El muconaldehído es otro metabolito potencialmente tóxico, formado por la apertura del anillo del benceno, que sufre una serie de reacciones que llevan a la formación de ácido *t*, *t*-mucónico, un metabolito final encontrado en la orina (Bruckner et al., 2008).

METABOLISMO DEL BENCENO

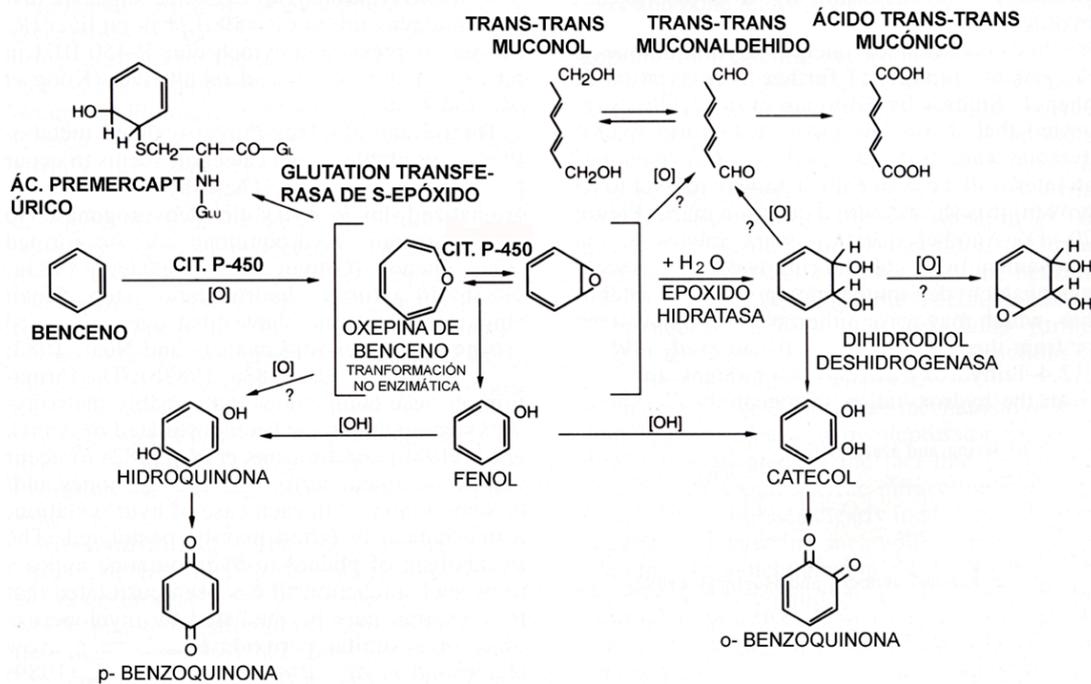


Figura 5. Metabolismo del benceno. Modificado de Rangan y Snyder, 1997.

Tolueno

El tolueno es absorbido en los pulmones y en el tracto gastrointestinal. Su principal blanco es el SNC, en donde se acumula rápidamente, en especial en las membranas neuronales (inhibiendo sus funciones), debido a su alto grado de irrigación sanguínea y alto contenido de lípidos. Subsecuentemente también se deposita en otros tejidos de acuerdo a su contenido lipídico.

El tolueno es casi totalmente metabolizado, aunque una porción es exhalada intacta. La P450s hepática es la enzima que cataliza el metabolismo del tolueno hacia alcohol bencílico principalmente (Figura 6), aunque también se producen cantidades menores de o-cresoles. El alcohol bencílico es convertido por las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ALDH) a ácido benzoico, el cual es principalmente conjugado con glicina y excretado por la orina como ácido hipúrico.

Metabolismo del tolueno

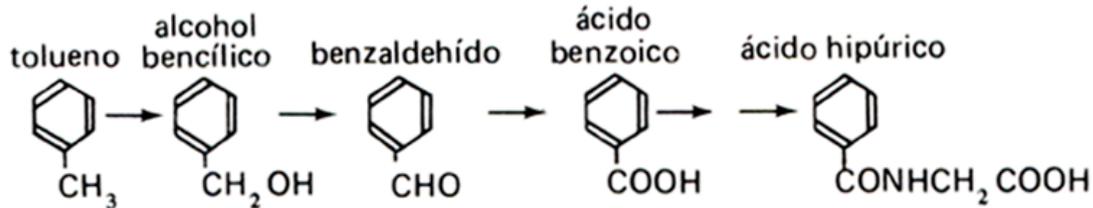


Figura 6. Metabolismo del tolueno. Tomado de Contreras, 1977.

Debido a que parte del tolueno inhalado es metabolizado por las enzimas CYPs, ADH, y ALDH, el tolueno puede interactuar con otros xenobióticos metabolizados por estas enzimas. Un ejemplo de esta interacción es la supresión de la biotransformación de benceno a compuestos fenólicos cuando hay co-exposición a tolueno, así como la biotransformación de tolueno hacia ácido hipúrico, la cual también se suprime por la co-exposición a benceno (Inoue et al., 1988).

Xileno

Su metabolismo es muy parecido al del tolueno, ya que en su mayoría es absorbido en los pulmones y en el tracto gastrointestinal, una fracción es exhalada intacta, además de que también es metabolizado por la enzima hepática P450s. Al igual que el tolueno se distribuye en los diferentes tejidos de acuerdo a su flujo sanguíneo y contenido lipídico, afectando también al SNC principalmente, aunque parece no tener efectos xenobióticos ni carcinogénicos, tal vez por ser ampliamente excretado como metabolitos urinarios, por ejemplo ácido metil hipúrico.

El xileno también interactúa con el tolueno, sólo que a diferencia de lo que ocurre en la interacción entre tolueno y benceno, parece no haber efectos en la biotransformación de estos dos compuestos cuando son inhalados a dosis bajas. Al ser inhalados a dosis altas hay una disminución en la cantidad de metabolitos excretados: ácido hipúrico en caso del tolueno, y ácido metil hipúrico en el caso del xileno (Tardif et al., 1991).

Efectos de los SOV

Dentro de los efectos de los SOV en el organismo se han reportado entre otros, aumento en el número de divisiones celulares en órganos de relevancia fisiológica como el hígado o el riñón (Askergren et al., 1981). Este aumento en el

número de divisiones celulares puede en algunos casos desencadenar la formación de tumores (Paci et al., 1989). La exposición crónica a los solventes puede resultar en disminución del coeficiente intelectual, cambios en la morfología del cerebelo, atrofia, pérdida de peso en la próstata y testículos, hipercinesia, problemas de fertilidad, malformaciones congénitas, alteraciones de la función pulmonar, disfunción renal y finalmente la muerte (Ilgazli et al). Otros de los efectos descritos son patología de la glándula adrenal, aumento en el contenido de fibras de colágena y la acumulación de glucógeno en el hígado (Cárabez et al., 1998). También se ha descrito degeneración de la mielina, especialmente en el nervio óptico, provocando deficiencias visuales (Basu et al., 2004) y ceguera (Shinya et al., 2003). Una de las manifestaciones a otro nivel (función superior del SNC) es la disminución del coeficiente intelectual (Ilgazli et al., 2004) característico de los inhaladores.

La neurotoxicidad del tiner puede explicarse por la generación de especies reactivas de oxígeno, producidas durante el metabolismo de sus componentes, ya sea por efectos de potenciación o de competencia metabólica y que resultan no solo en la producción sino en la permanencia de éstas moléculas que inducen daño oxidativo a los lípidos, las proteínas y ácidos nucleicos de las células blanco.

Estos efectos sobre el SNC causan neurodegeneración; por ejemplo en el hipocampo y en la corteza cerebral cerebral en general, cuyas consecuencias entre otras son déficit de aprendizaje y memoria, esto es mas orientado a hipocampo, mas que a la corteza cerebral en general (Baydas et al., 2005). Este déficit se debe a la disminución en la expresión de NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecules*, por sus siglas en inglés) 140 y 180, lo que inhibe la formación de nuevas sinapsis, las cuales son necesarias para el aprendizaje y la memoria (Baydas et al., 2005).

Ulakoğlu et al., 1998, determinó los niveles de MDA (Malondialdehído), SOD (Superóxido dismutasa) y GSH (Glutación oxidado) en ratas que habían inhalado una concentración alta de tiner (63% de tolueno, 13% de acetona, 10% de acetato de isobutilo, 7.5% de isobutanol, y 6.5% de butil glicol) por 5 semanas, encontrando que los niveles SOD y de GSH disminuyeron, estos resultados se interpretaron como que ocurría la activación de mecanismos antioxidantes; por otro lado detectaron que el nivel de MDA aumentó durante el período de inhalación. En un estudio similar Ilgazli et al. (2004) observaron después de la decimosegunda semana de inhalación de tiner (63% de tolueno, 13% de acetona, 10% de acetato de isobutilo, 7.5% de isobutanol, y 6.5% de butil glicol) una tendencia al aumento en los niveles de MDA,

así como en los de GSH e interpretó sus resultados como que eran debidos al estrés oxidativo que se induce por la inhalación crónica del tóxico. Por otro lado encontró que la SOD no sufrió cambios significativos.

En relación con los efectos conductuales detectados durante el estado de intoxicación, Saygý et al., (1997), observaron que había somnolencia, lentitud de movimiento, dificultad para la marcha, aumento de la frecuencia de defecación (debido al aumento de la motilidad intestinal) en ratas expuestas a la inhalación de tóxico durante 5 semanas.

Barrera Hematoencefálica

En el cerebro la homeostasis se mantiene mediante una estrecha regulación. Esta regulación asociada a la protección y el mantenimiento de un ambiente adecuado del SNC es posible por la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE) (Brooks et al., 2008) del endotelio de la vasculatura cerebral.

La integridad de la BHE se mantiene por la regulación que el astrocito ejerce sobre las células endoteliales de la microvasculatura cerebral (Yeung et al., 2008), confiriéndoles un fenotipo especial y único (Omidi et al., 2008). Las células endoteliales de la vasculatura cerebral se caracterizan por su escasa presencia de vesículas de fase líquida (pinocitosis) (Brooks et al., 2008; Weidenfeller et al., 2007), ausencia de fenestras (Brooks et al., 2008; Weidenfeller et al., 2007), y la presencia de sistemas de transporte especializados, como por ejemplo los transportadores de glucosa, (*Glucose transporters*, *GLUTs* por sus siglas en inglés) (Omidi et al., 2008), que regulan el paso de solutos hacia el interior del SNC (Brooks et al., 2008; Lesznér et al., 2007; Weidenfeller et al., 2007). Figura 7.

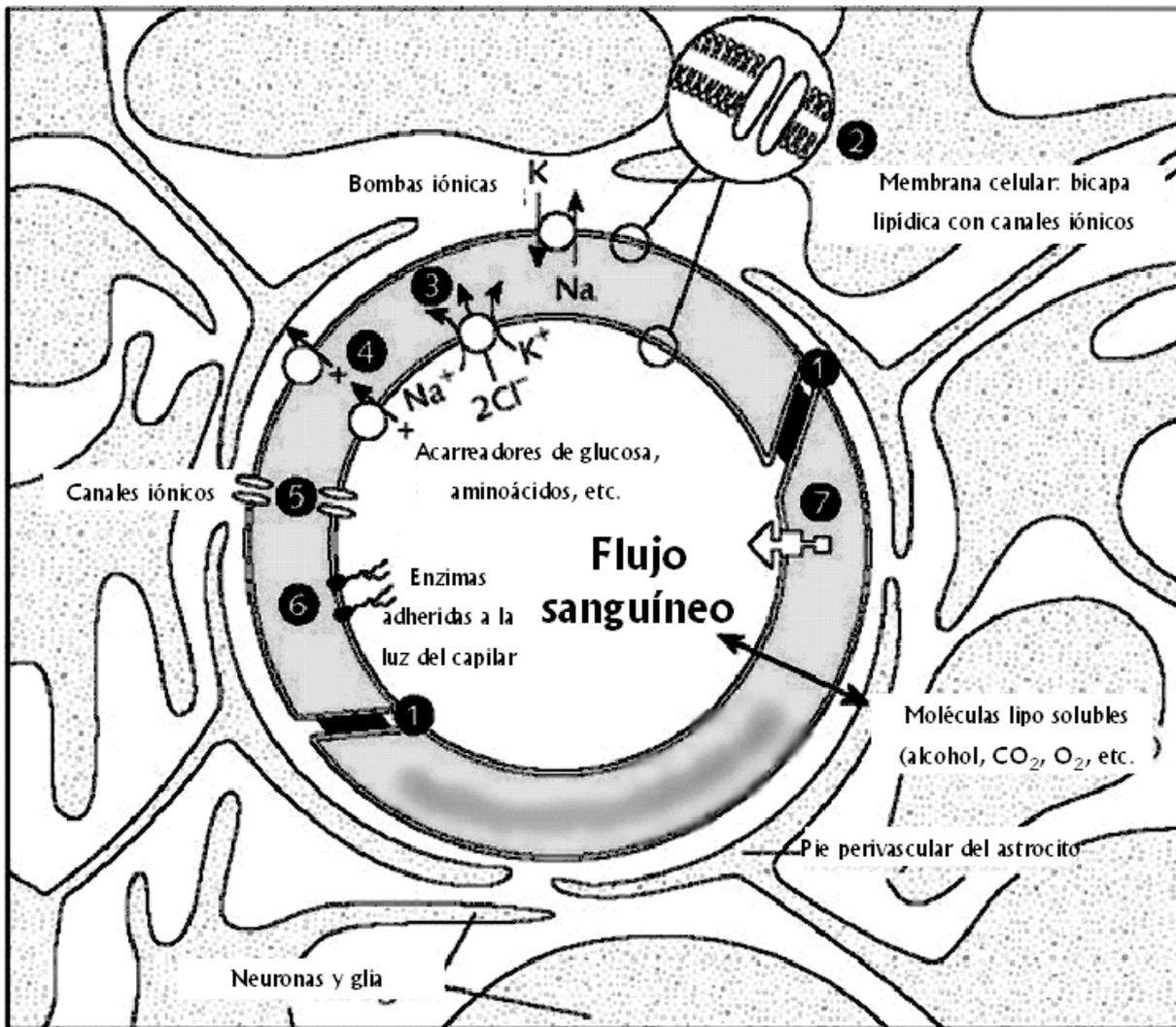


Figura 7. Diagrama de la regulación de un capilar cerebral a través de los pies perivascular del astrocito. Las características de la BHE están indicadas: (1) uniones herméticas; (2) la naturaleza lipídica de la membrana la hace una barrera para las moléculas hidrosolubles; (3), (4), y (5) representan algunos acarreadores, así como canales y bombas iónicas; (6) "barrera enzimática" la cual remueve moléculas de la sangre; (7) bombas para la extracción de moléculas lipo-solubles que han cruzado al interior de la célula. Modificado de Farral y Wardlaw 2009.

Uniones herméticas

Las asociaciones celulares en la microvasculatura cerebral se realizan a través de la formación de las uniones herméticas de la microvasculatura cerebral. Las uniones intercelulares se localizan entre las células del endotelio capilar. Estas uniones se establecen tanto en los dos extremos de la célula como entre los bordes, se unen y forman la unión hermética intra o intercelular, respectivamente (Figura 8).

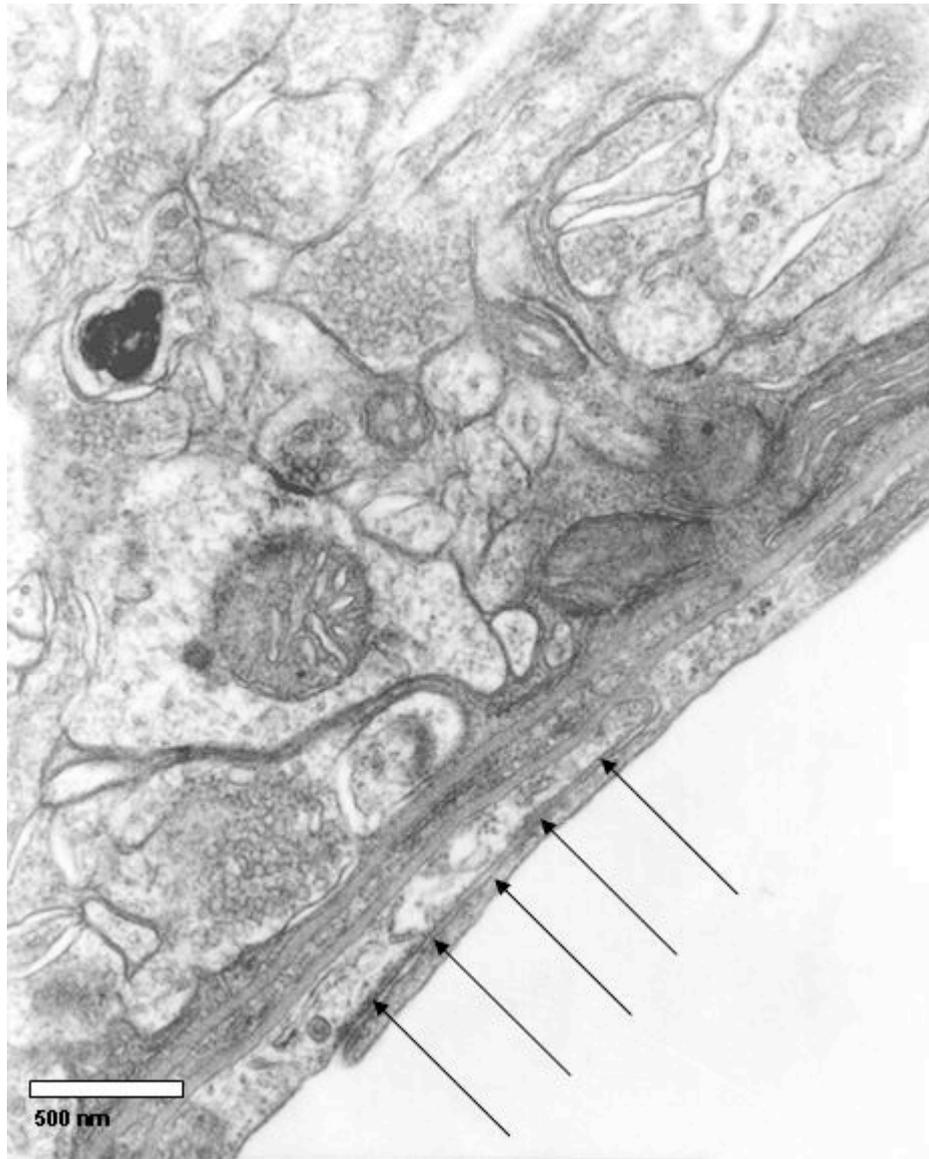


Figura 8. Unión hermética (flechas). Dr. Alfonso Cárabez Trejo, comunicación personal.

Proteínas de las Uniones herméticas

En las uniones herméticas de las células endoteliales de la microvasculatura cerebral están presentes proteínas altamente especializadas que interactúan entre sí. Algunas de estas proteínas son claudinas, ocludina, ZO (proteínas de la zonula occludens) y JAM (*Junctional Adhesion Molecules*, por su siglas en inglés). Figura 9.

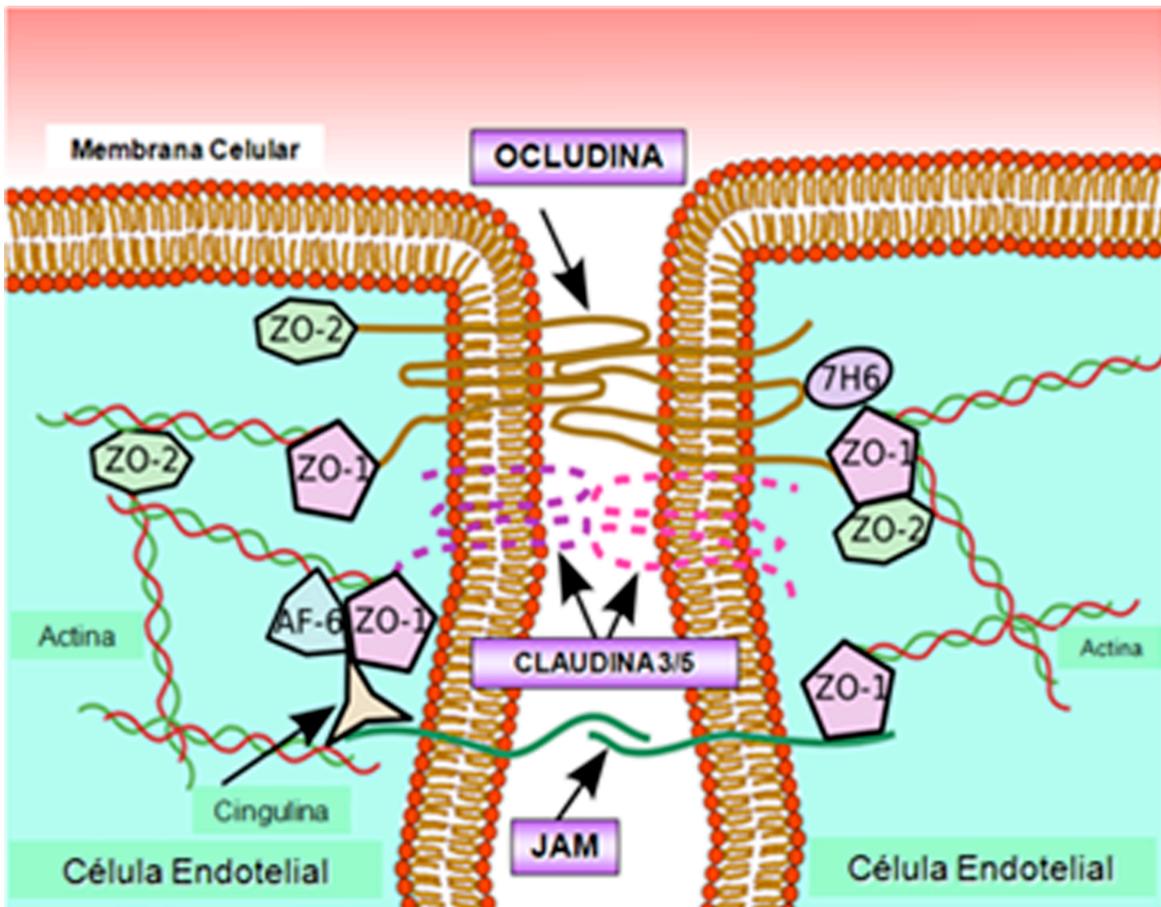


Figura 9. Unión hermética y las proteínas que la conforman. Modificado de Nag, 2003.

Claudinas

Las claudinas son proteínas de peso molecular de 23 kDa. Presentan cuatro dominios transmembranales, y dos asas extracelulares (Figura 10). Las claudinas son proteínas estructurales de las uniones herméticas, que en combinaciones y cantidades particulares modulan la permeabilidad de la ruta selectiva paracelular (Elkougny-Naor et al., 2008) al controlar la concentración iónica de los fluidos extracelulares (Van Itallie y Anderson, 2006). La ruta selectiva paracelular es la vía por la cual los solutos y el agua se mueven a través y entre las células endoteliales, y su regulación se da al formarse cordones pareados homotípicos y heterotípicos (Piontek et al., 2008) entre los diferentes tipos de claudinas. La formación de estos cordones pareados también permite el establecimiento de las uniones herméticas, ya que dan origen al sello primario (Furuse et al., 1999).

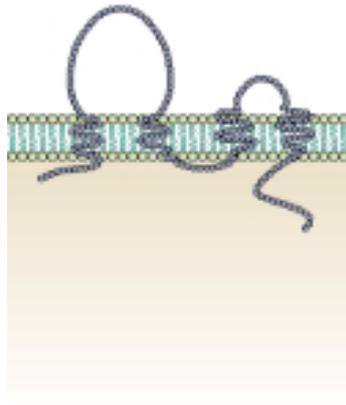


Figura 10. Representación esquemática de las claudinas. Tomado de Tsukita et al., 2001.

Ocludinas

Las ocludinas son proteínas de 65 kDa de peso molecular, que al igual que las claudinas constan de cuatro dominios transmembranales, y dos asas extracelulares (Figura 11). La expresión de ocludina en las células endoteliales de la microvasculatura cerebral es baja en los primeros días de vida (confiriendo a estas células un fenotipo que se asemeja al de células endoteliales de otros tejidos), pero va aumentando a medida que el organismo se desarrolla. Esta diferencia en la expresión indica que las ocludinas tienen una función diferente (Wolburg, 2006), la cual consiste que en células endoteliales inmaduras participan en el establecimiento del sello de la unión hermética, mientras que en células endoteliales maduras están relacionadas con el incremento de la resistencia eléctrica transmembranal a lo largo de la BHE y un decremento en la permeabilidad paracelular (Hirase et al., 1997).

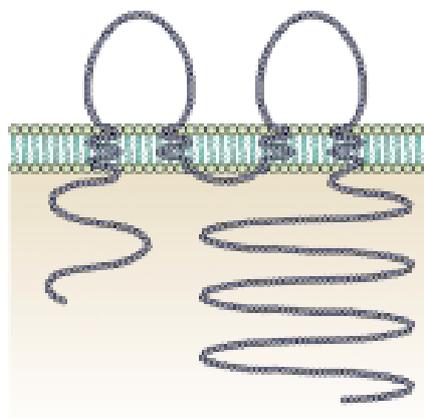


Figura 11. Representación esquemática de la ocludina. Tomado de Tsukita et al., 2001.

Moléculas de adhesión (*Junctional Adhesion Molecules*, *JAM*, por sus siglas en inglés)

Las *JAM* son proteínas de 40 kDa de peso molecular, que presentan un solo dominio transmembranal, y dos asas extracelulares (Figura 12). Estas proteínas son miembros de la super familia de las inmunoglobulinas. Martín-Padura et al., (1998) han implicado a las *JAM* en el control de la infiltración de los monocitos en condiciones inflamatorias, ya que al inhibir estas moléculas con un anticuerpo monoclonal no se da esta infiltración. También las han implicado en el control de la permeabilidad de las células endoteliales de la microvasculatura cerebral.

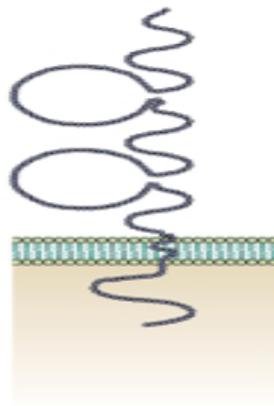


Figura 12. Representación esquemática de las moléculas de adhesión. Tomado de Tsukita et al., 2001.

Proteínas de la Zonula Occludens (ZO)

Las proteínas ZO son necesarias para el soporte de la estructura de las uniones herméticas. Pertenecen a una familia de proteínas asociadas a la membrana conocidas como guanilato cinasas. Esta familia está formada por moléculas con multidominios citoplasmáticos, involucradas en el ensamble de proteínas transmembranales al citoesqueleto (Nag, 2003). Por ejemplo los dominios PDZ (acrónimo de 3 proteínas, por sus siglas en inglés: *Post synaptic density protein*, *PSD95*; *Drosophila disc large tumor supresor protein*, *DlgA*; y *Zonula occludens*, *ZO-1*) constan de 80 a 90 aminoácidos, y tiene como función la interacción entre dos proteínas que contengan este dominio (Figura 13).

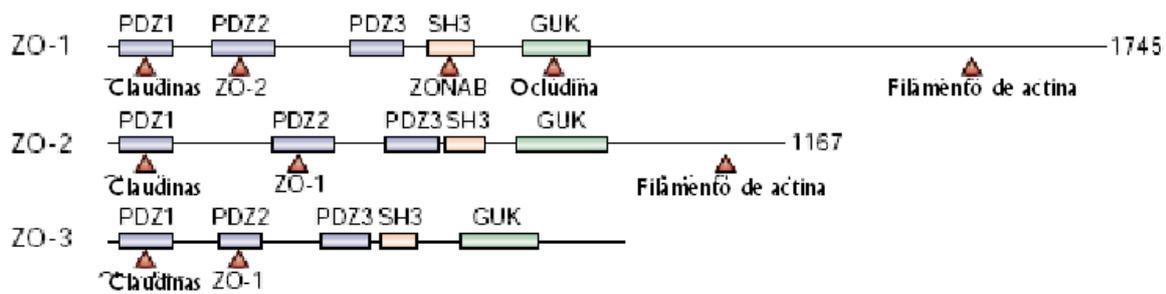


Figura 13. Los dominios PDZ están representados por rectángulos. Las regiones responsables de la asociación intermolecular están representadas por flechas. Los números indican la posición del aminoácido. (GUK, dominio de guanilato cinasa; SH3 región 3 homóloga de src). Modificado de Tsukita et al., 2001.

El mecanismo de interacción consiste en que PDZ se une directamente al carboxilo terminal de las claudinas, lo que provoca que la superficie citoplasmática de los cordones de las uniones herméticas funcione como un imán que atrae y recluta proteínas que contienen el dominio PDZ, para así permitir la formación de las uniones herméticas (Tsukita et al., 2001). Figura 14.

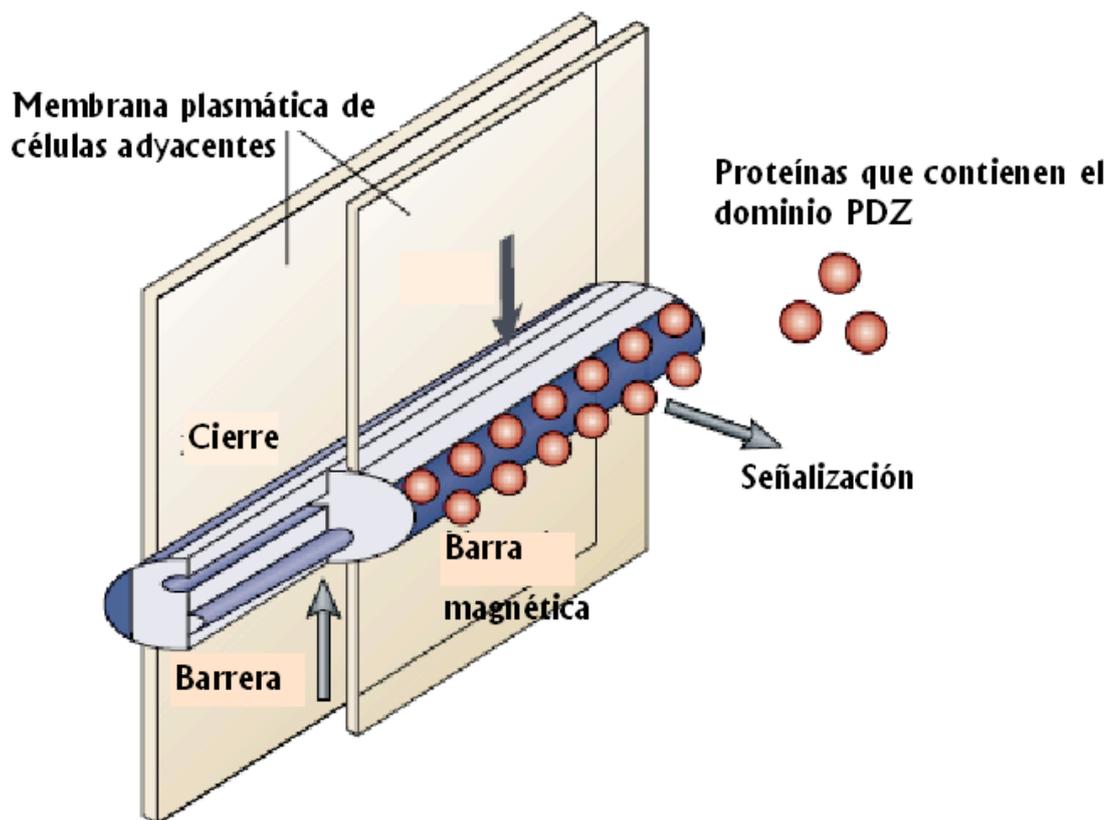


Figura 14. Funciones de los cordones de la Unión hermética. Los cordones de la unión hermética forman un sello (función de barrera), una barra magnética que atrae varias proteínas que contienen el dominio PDZ (función de señalización), y establecen los dominios membranales apicales y basolaterales. Modificado de Tsukita et al., 2001.

Las proteínas de la unión hermética ya mencionadas (claudinas, ocludinas y ZO), además de otras, son necesarias para mantener la integridad de la unión hermética, para así lograr la homeostasis cerebelar, la cual es de suma importancia, debido a las funciones que este desempeña, como por ejemplo la planificación lateral y motora, la regulación del movimiento, o el aprendizaje de tareas tanto motoras como cognitivas.

La exposición crónica a los SOV puede resultar en cambios en la homeostasis cerebelar a consecuencia de los efectos xenobióticos de los metabolitos tóxicos producto de la biotransformación de los SOV, ocasionando así un cambio en la morfología del cerebelo (Ilgazli et al., 2004). Estos cambios desencadenan errores, oscilaciones y temores en un gran número de músculos, por lo que es necesario encontrar posibles explicaciones sobre las consecuencias del deterioro cerebelar debido a la inhalación crónica del solvente tiner. Es por esta razón que el tejido que utilizamos para los experimentos realizados, con el fin de determinar el efecto del tiner inhalado de manera crónica sobre las uniones intercelulares del SNC es el cerebelo. Particularmente el lóbulo derecho, en el área del lóbulo del paravermis. La importancia del lóbulo del paravermis radica en la relación que tiene con la planificación lateral y motora, debido a las proyecciones que salen de este lóbulo hacia el núcleo dentado, que es la estructura encargada de esta planificación.

Cerebelo

El cerebelo está dividido en tres lóbulos: anterior, posterior (medio) y floculonodular, tiene tres regiones funcionalmente distintas, una exterior en la que se encuentra la sustancia gris (corteza cerebelar), una interna de sustancia blanca, y tres pares de núcleos profundos: el fastigial, el interpuesto (compuesto por dos núcleos, el globoso y el emboliforme) y el dentado. Figura 15.

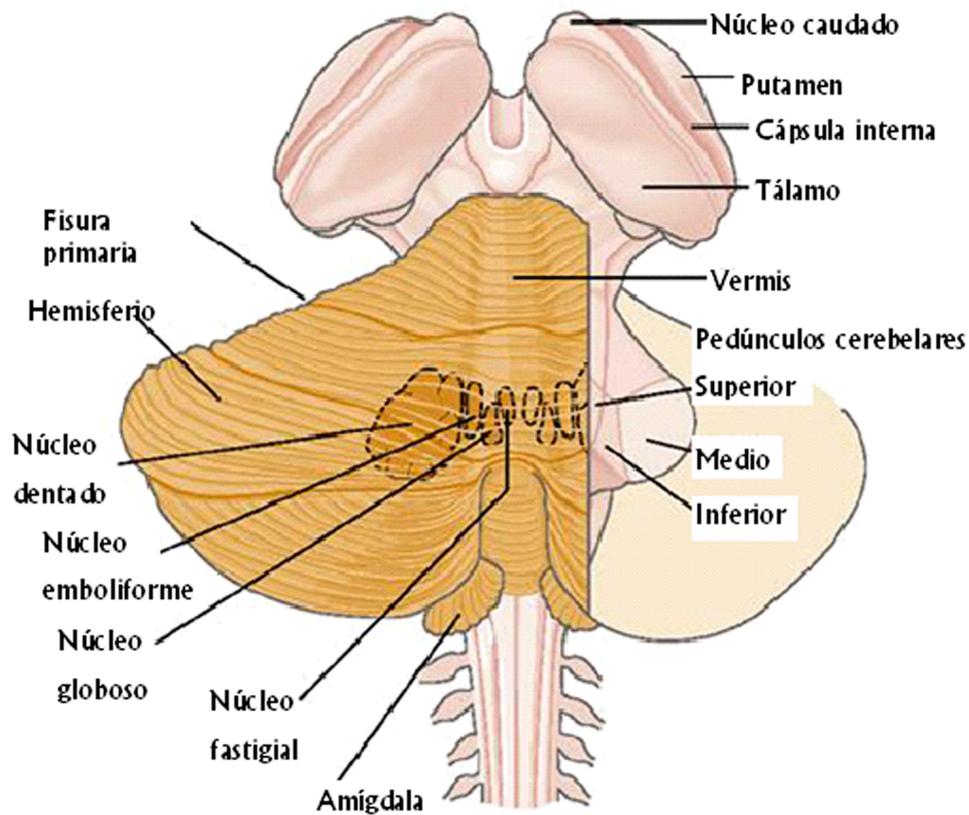


Figura 15. Anatomía del cerebelo. Tomado de Kandel et al., 2000.

Las bajas frecuencias de disparo de las fibras trepadoras les permiten detectar un error de movimiento y cambiar el programa motor para el siguiente movimiento, además de producir efectos de largo plazo en la eficiencia sináptica de las fibras paralelas.

Organización funcional del cerebelo

La vía vestibulo-cerebelosa, localizada en el lóbulo flóculonodular, recibe información de los canales semicirculares y los órganos otolíticos, los cuales censan el movimiento de la cabeza y su posición con respecto a la gravedad, regulando así el balance. Esta regulación se logra gracias a la proyección de esta vía hacia los núcleos vestibulares, de donde la información desciende medialmente hacia la médula espinal, y posteriormente a los músculos antigravitatorios. Figura 16.

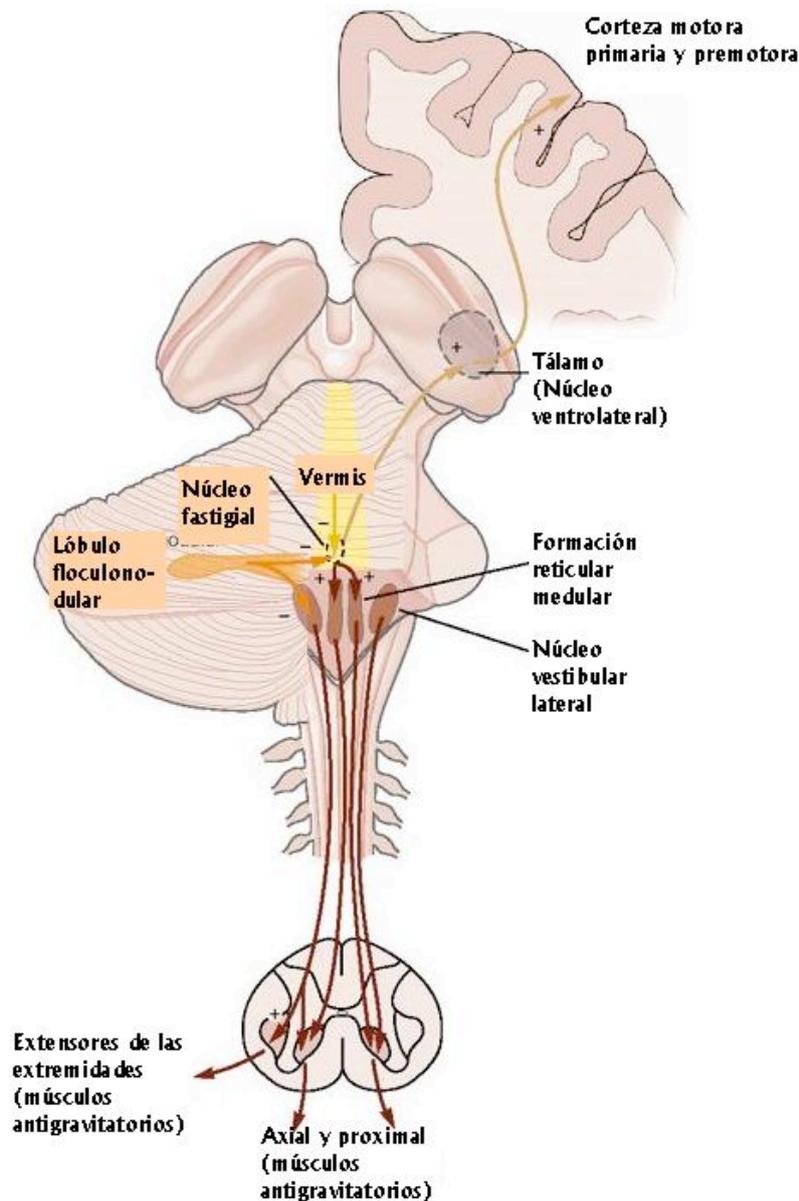


Figura 16. Vía vestibulo-cerebelosa. Tomado de Kandel et al., 2000.

La vía espino-cerebelosa tiene como entrada principal de información la médula espinal, estructura ampliamente asociada a estímulos somatosensoriales, por lo que la presencia de mapas sensoriales en esta vía no es de sorprender. Se ubica tanto en el hemisferio intermedio como en el vermis, de donde hay proyecciones hacia el núcleo del techo, mientras que del hemisferio intermedio las hay hacia los núcleos interpuestos, de donde la información desciende lateralmente, mientras que en el caso del núcleo del techo lo hace medialmente (Figura 17). La función de esta vía es regular los movimientos del cuerpo y de las extremidades modulando los sistemas motores descendentes en el tallo y la corteza cerebral

Patología cerebelosa

Mientras que las lesiones en centros de procesamiento motor producen parálisis o movimientos involuntarios, lesiones en el cerebelo resultan en errores en un gran número de músculos. La organización de las aferencias y las eferencias del cerebelo indican que el cerebelo compara las señales internas de retroalimentación que reportan el movimiento intencionado con señales de retroalimentación externas que reportan el movimiento real. Cuando el movimiento es repetido, el cerebelo es capaz de generar señales correctas y de esta forma gradualmente reducir errores. Las oscilaciones y el temblor que vienen después de una lesión cerebelar son debidos a la falla de mecanismos de retroalimentación anterógrada (señales correctivas) o acciones anticipatorias que operan en los sistemas descendentes motores de la corteza y el tallo cerebral.

En este trabajo el objetivo es analizar y determinar el efecto de la inhalación crónica de tiner sobre las uniones herméticas de las células endoteliales de la microvasculatura cerebelar.

El tiner afecta de manera progresiva (Figura 18) a la unión hermética y a las células endoteliales de la microvasculatura cerebelar. Este daño es consecuencia tanto de las exposiciones de tipo agudo como crónico. En el caso de las exposiciones de tipo agudo, el daño depende de la sensibilidad del sujeto.

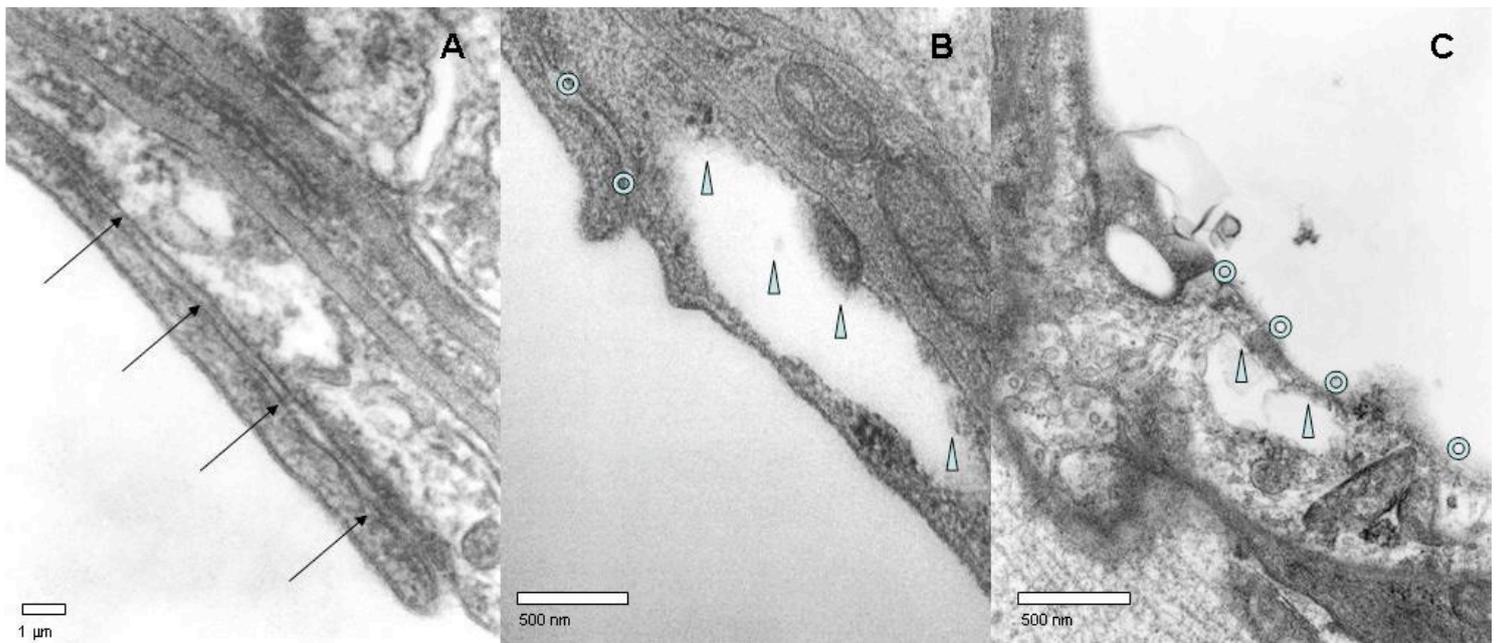


Figura 18. Daño progresivo tanto en la célula endotelial como en la unión hermética. A) Unión hermética de una célula endotelial de la microvasculatura cerebelar (flechas); B) Daño intermedio (4 a 10 semanas de inhalación) tanto en el citoplasma de la célula endotelial (triángulo) como en la unión hermética (círculo); C) Daño avanzado (mas de 12 semanas). El citoplasma de la célula endotelial está muy dañado (triángulos), y la unión hermética está abierta (círculo). Dr. Alfonso Cárbaz Trejo, comunicación personal.

JUSTIFICACIÓN

Como la homeostasis cerebelar depende de la integridad de la unión hermética, es necesario interpretar los hallazgos ultraestructurales del daño a estas uniones celulares, para encontrar posibles explicaciones sobre las consecuencias del deterioro de las uniones herméticas de los capilares del cerebelo de ratas expuestas a la inhalación crónica del solvente tiner.

HIPÓTESIS

El tiner altera la ultraestructura de las uniones herméticas; este daño se debe a:

- La deslocalización de las proteínas que conforman las uniones herméticas por un daño anatómico directo del solvente sobre la unión hermética;
- Alteración de los procesos de ubicación de las proteínas en la membrana

OBJETIVO

Localizar por técnicas de inmunocitoquímica algunas de las proteínas más características de la unión hermética presentes en la microvasculatura cerebelar de ratas adultas de la cepa Wistar, expuestas a la inhalación crónica de tiner, hasta por 14 semanas; aplicando doble marcaje para la identificación de estas proteínas empleando para ello anticuerpos secundarios marcados con oro coloidal de 10 ó 20 nm de tamaño de la partícula de oro.

MATERIALES Y METODOS

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla, y cumple con las reglamentaciones nacionales (NOM-062-ZOO-1999) e internacionales (National Research Council, 2003) sobre la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Para este estudio se utilizaron 40 ratas macho de la cepa Wistar de 80 a 100 gramos de peso al momento de iniciar la exposición al solvente tiner para pintura. Las ratas se mantuvieron en cajas independientes con 5 individuos. La dieta fue estándar para roedores (Rodent Diet 5001, Purina Milk Inc.), el acceso al agua purificada fue *ad libitum*. La temperatura fue constante ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), con una humedad entre 45 y 65%, y foto período invertido para roedores de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Estas condiciones se cumplieron tanto para el grupo experimental como para el grupo control.

Todas las ratas del grupo experimental se expusieron a la inhalación de tiner para pintura en lotes de 5 individuos, de acuerdo al modelo descrito en este laboratorio (Cárabez et al. 1998). La exposición al tiner para pintura se hizo a una concentración de 50 ppm dos veces al día, la primera a las 8:30 hrs, y la segunda a las 16:30 hrs. La exposición al solvente se detuvo cuando 3 de 5 ratas de la caja mostraron signos de intoxicación, que se manifiesta por la ausencia de respuesta a estímulos externos (aproximadamente después de 10 a 20 minutos de exposición). Este protocolo se realizó cinco días a la semana por un período total de 14 semanas, para así poder observar diferencias entre intoxicación aguda (un día a 4 semanas) y crónica (4 a 14 semanas). Se sacrificaron los animales expuestos y sus respectivos controles a las 2, 4, 8, 12 y 14 semanas post tratamiento.

Toma de muestras

Una vez que se cumplió el plazo de exposición establecido en el protocolo experimental, los animales fueron sometidos a anestesia profunda con una solución comercial de pentobarbital sódico (Cheminova) inyectado intraperitonealmente (1ml) a una concentración de 26/0.5 mg/kg (dosis letal). Bajo anestesia profunda se procede a exponer la cavidad abdominal, para acceder a la cavidad torácica (a partir de este momento el procedimiento no debe exceder los dos a tres minutos, con objeto de evitar la hipoxia cerebral) y exponer al corazón. Se hace una incisión en el

ventrículo izquierdo y se introduce la cánula de perfusión hasta la aorta. Se perfunden a una presión de 110 a 120 mm de Hg, con 30 ml de solución salina fisiológica (J.T. Baker) seguidos de 200 a 400 ml (dependiendo del peso de los animales) de solución fijadora de Karnovsky (parafolmaldehído al 4% (Polysciences Inc.) y glutaraldehído (Electron Microscopy Sciences) al 1%) en amortiguador de fosfato 0.1M, pH 7.4. Se disecaron los cerebros, se obtuvo el cerebelo y se seccionó el lóbulo derecho, en el área del lóbulo del paravemis. Se seleccionó esta área debido a sus funciones, como es la regulación del movimiento.

Microscopía Electrónica

Se continuó la fijación de las áreas obtenidas del SNC con una solución de glutaraldehído (Electron Microscopy Sciences) al 3% en amortiguador de fosfato 0.1M pH 7.4 a 4°C por 2 horas más. Después de la fijación, las muestras se lavaron con sacarosa (J.T. Baker) 0.25M en el mismo amortiguador (4 cambios de 1 hora, o 1 cambio de medio de lavado después de un lavado de 12 h). La postfijación se realiza con tetraóxido de osmio (OsO_4 , Electron Microscopy Sciences) al 1% en el mismo amortiguador. Después de 4 cambios con medio de lavado, las muestras se incubaron por 30 minutos, con ácido tánico (Mallinckrodt) (agente mordante) al 2%, a temperatura ambiente en el mismo amortiguador. Después de lavar las muestras éstas se incubaron 30 minutos con acetato de uranilo (Polysciences Inc.) al 1% en etanol (J.T. Baker) al 15%, y se enjuagaron con dos cambios de etanol al 15%. Se deshidrataron con solución acuosa de etanol al 30, 50, 70, 90% y con etanol absoluto (dos cambios de 30 minutos, el primero a 4° C y el segundo a temperatura ambiente). El alcohol absoluto se substituye con óxido de propileno (Aldrich) como solvente intermedio (2 cambios a temperatura ambiente). La infiltración se realizó con resina epóxica (Polysciences Inc.) (mezcla de Luft, Hayat MA, 1986) diluida 1:1 con óxido de propileno, en un desecador de vidrio sin vacío y con cristales de sílica gel con indicador de humedad, por 12 a 36 horas (según la saturación de la cámara) o hasta que la mezcla adquiere la consistencia de miel. La resina diluida se decantó y se substituyó por resina completa no diluida, Las muestras se colocaron en rotador por 8 horas, las piezas de tejido infiltrado se limpian de la resina de infiltración y se transfirieron a moldes planos de silicón para la inclusión y orientación e identificación de las muestras. La resina conteniendo las muestras se polimerizó a 60° C por 36 horas.

Para el corte de las muestras incluidas en la resina polimerizada se talló una pirámide con navaja. Se obtuvieron cortes semifinos (de 1 μ m de grosor) en el ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut con cuchilla de vidrio. Los cortes semifinos obtenidos fueron montados en portaobjetos, fijados, extendidos en parrilla caliente a 60° C y teñidos con azul de toluidina (Merck) en la parrilla a 60° C por un minuto, se lavan bajo chorro de agua, se checan al microscopio fotónico y si se sobretiñen se lavan con una solución de etanol acuoso al 70% hasta lograr el nivel adecuado de tinción, para definir tanto la calidad del proceso como el área adecuada para la obtención de cortes finos. Para la obtención de cortes finos de (60-70 nm de grosor, color de interferencia gris) se re-talló la pirámide en el área elegida. Los cortes finos para estudios al microscopio electrónico se colectaron en rejillas de cobre de 300 mallas, se contrastaron con 2% de acetato de uranilo por 30 minutos a 60° C, en cámara húmeda y por 15 minutos a temperatura ambiente, con una solución al 2% de citrato de plomo (J.T. Baker) en cámara libre de CO₂ con perlas de NaOH. Las muestras contrastadas se observaron al microscopio electrónico JEOL modelo 1010 a 80 KV.

Inmunolocalización

Las muestras de tejido de las áreas seleccionadas se lavaron en sacarosa 0.25 M en amortiguador de fosfato 0.1M pH 7.4. Se deshidrataron con una solución acuosa de etanol a concentraciones de 15, 30, 50, 70 y 90%. La infiltración de las muestras se hizo en resina acrílica LR White (Polysciences Inc.) a 4° C hasta por una semana. Transcurrido este período se decantó la resina y se sustituyó por resina fresca, en cápsulas de gelatina 00, ya que el oxígeno impide la polimerización de esta resina por temperatura, sin catalizador. Se polimerizó a 50° C durante 24 horas. Los cortes semifinos de 1 μ m de grosor obtenidos con cuchilla de vidrio en el ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut fueron montados en portaobjetos, fijados, extendidos y teñidos con azul de toluidina en parrilla a 60° C para definir tanto la calidad del proceso como el área adecuada. Para la obtención de los cortes finos se re-talló la pirámide en el área seleccionada, los cortes finos (1 μ m de grosor) se recogieron en rejilla hexagonal de níquel de 300 mallas, con soporte membrana de Formvar. Los cortes se hidrataron en agua por 10 minutos (3x), se lavaron con una solución de PBS durante 10 minutos (2x), después se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente con glicina 0.5M en PBS, para después incubarse en Tween

0.1% (J.T. Baker), BSA 1% (Sigma) y gelatina 0.1% (GIBCO) (solución A) 10 minutos. Las muestras se lavaron en PBS 10 minutos, después se lavaron en PBS-BSA 10 minutos (2x), se incubaron 30-60 minutos con suero pre-inmune (1:1 PBS). Después de la incubación se lavaron 10 minutos, después se lavaron una vez más con PBS-BSA 10 minutos (2x) para seguir con la incubación en cámara húmeda con el Ab primario (Anti ZO-1, Anti ocludina, o Anti claudina. Kit de proteínas de la unión hermética de Zymed) por 24 horas a 4° C. A las 24 horas se lavaron las muestras con 3 cambios de 10 minutos con PBS-BSA. Las muestras lavadas se incubaron en cámara húmeda por 2 horas a temperatura ambiente con el Ab secundario levantado contra las IGg de la especie en la que se levantó el anticuerpo primario, marcado con partículas de oro (10 ó 20 nm) densas a los electrones. Después de la incubación las muestras se lavaron (3x) con PBS-BSA por 10 minutos, con PBS 10 minutos y finalmente (3x) con agua destilada filtrada por 10 minutos. Por último las muestras se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo al 2% y se observaron al microscopio electrónico JEOL modelo JEM1010 a 80 kV.

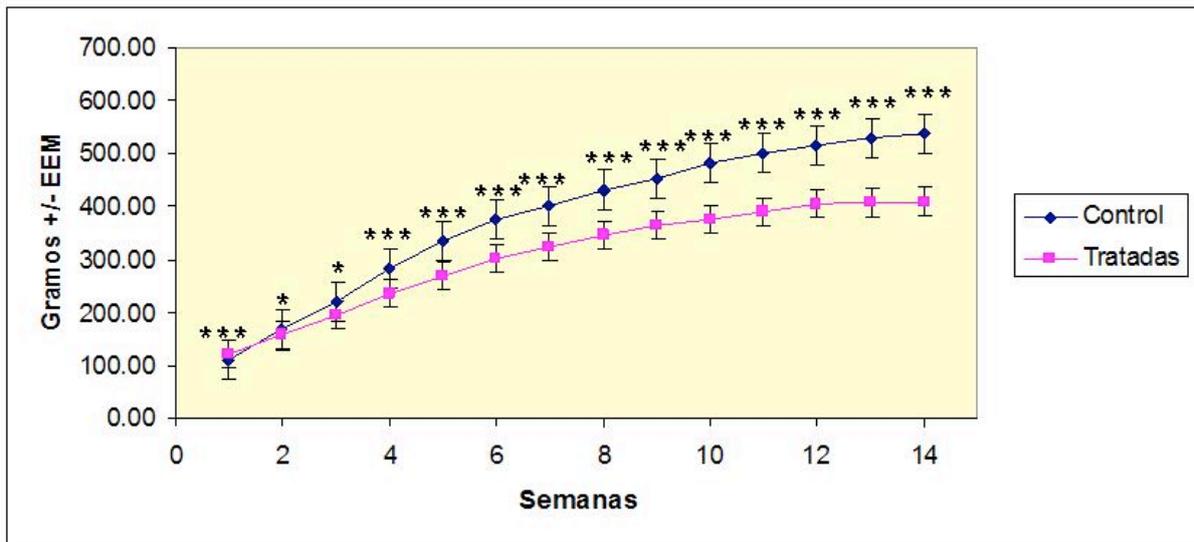
RESULTADOS

Una de las primeras preguntas que se plantearon fue si la localización de las proteínas de las uniones herméticas es alterada por un daño físico (anatómico) directo del tiner sobre la ultraestructura de la unión hermética. Otra duda que quedaba por definir era si la distribución de las proteínas ZO-1, claudina-1 y ocludina, era igual a las descritas para las uniones herméticas en células y tejidos control.

Con el fin de resolver estos cuestionamientos se localizaron por inmunocitoquímica las proteínas ZO-1, ocludina y claudina-1 de la unión hermética de la microvasculatura cerebelar de ratas macho adultas de la cepa Wistar, expuestas a la inhalación crónica de tiner.

Aspectos físicos y conductuales

Las signos físicos mas evidentes a simple vista del daño producido por la inhalación de tiner para pintura fue el tamaño y el peso de las ratas tratadas, las cuales eran mas pequeñas que los controles, y por lo tanto su peso era significativamente menor ($F [(13, 351) = 16.942, p < 0.0001]$ (Gráfica 1), además de que presentaron leucoencefalomalacia, lo cual se vio reflejado en un menor tamaño cerebral (datos no mostrados). Estas características fueron más evidentes a partir de la tercera semana hasta finalizar el tratamiento (14 semanas). En cuanto a otras características físicas como textura y apariencia del pelo, brillo de los ojos, etc. no se observaron cambios entre las ratas tratadas y sus controles. Conductualmente sólo se observaron diferencias mientras las ratas tratadas estaban intoxicadas, una vez que se recuperaron no presentaron conductas como rascado excesivo, correr en círculos, no responder a estímulos externos, hiperactividad, chocar violentamente, apilarse unas sobre otras, etc.



Gráfica 1. Peso corporal de las ratas a lo largo del tratamiento. * Indican diferentes niveles de significación.

Zonula Occludens (ZO)

La localización de la proteína ZO-1 no sufrió cambios hasta las 4 semanas de tratamiento, ya que se observaron marcas de oro coloidal en el citoplasma celular cercanas a la membrana, al igual que en el control (Figura 18 A y B), lo que corresponde a la localización reportada para esta proteína (Figura 9).

Para las 8, 12 y 14 semanas de tratamiento se observaron marcas de oro coloidal citoplasmáticas, alejadas de la membrana celular (Figura 18 C, D y E), indicando un cambio en la localización de esta proteína, en comparación con la encontrada en el control (Figura 18 A), y la reportada anteriormente (Figura 9).

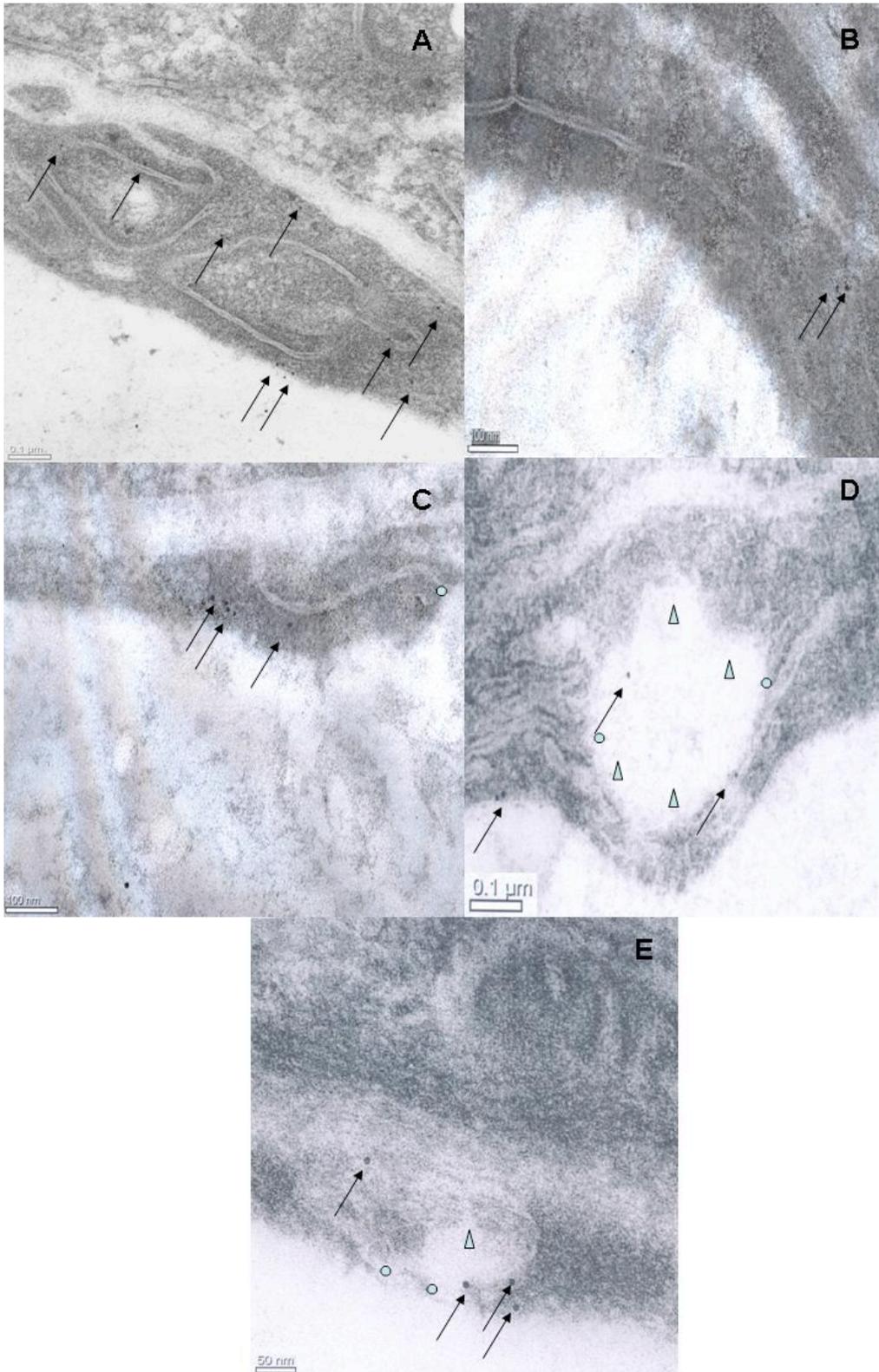


Figura 18. Immunolocalización de la proteína ZO-1; daño progresivo provocado por el solvente tiner. A y B) Immunolocalización de la proteína ZO-1 (flechas) en rata control, y a las 4 semanas de tratamiento; C) Daño a la unión hermética (círculo) e inmunolocalización a las 8 semanas de tratamiento; D y E) Daño al citoplasma de la célula endotelial (triángulo) y a la unión hermética (círculo) a las 12 y 14 semanas de tratamiento.

Ocludina

La localización de la ocludina se vio afectada, ya que se observaron partículas de oro coloidal en el citoplasma celular, y no embebidas en la membrana, a diferencia de lo que se observó en el control (Figura 19). La localización observada en el control corresponde a la reportada para esta proteína (Figura 9).

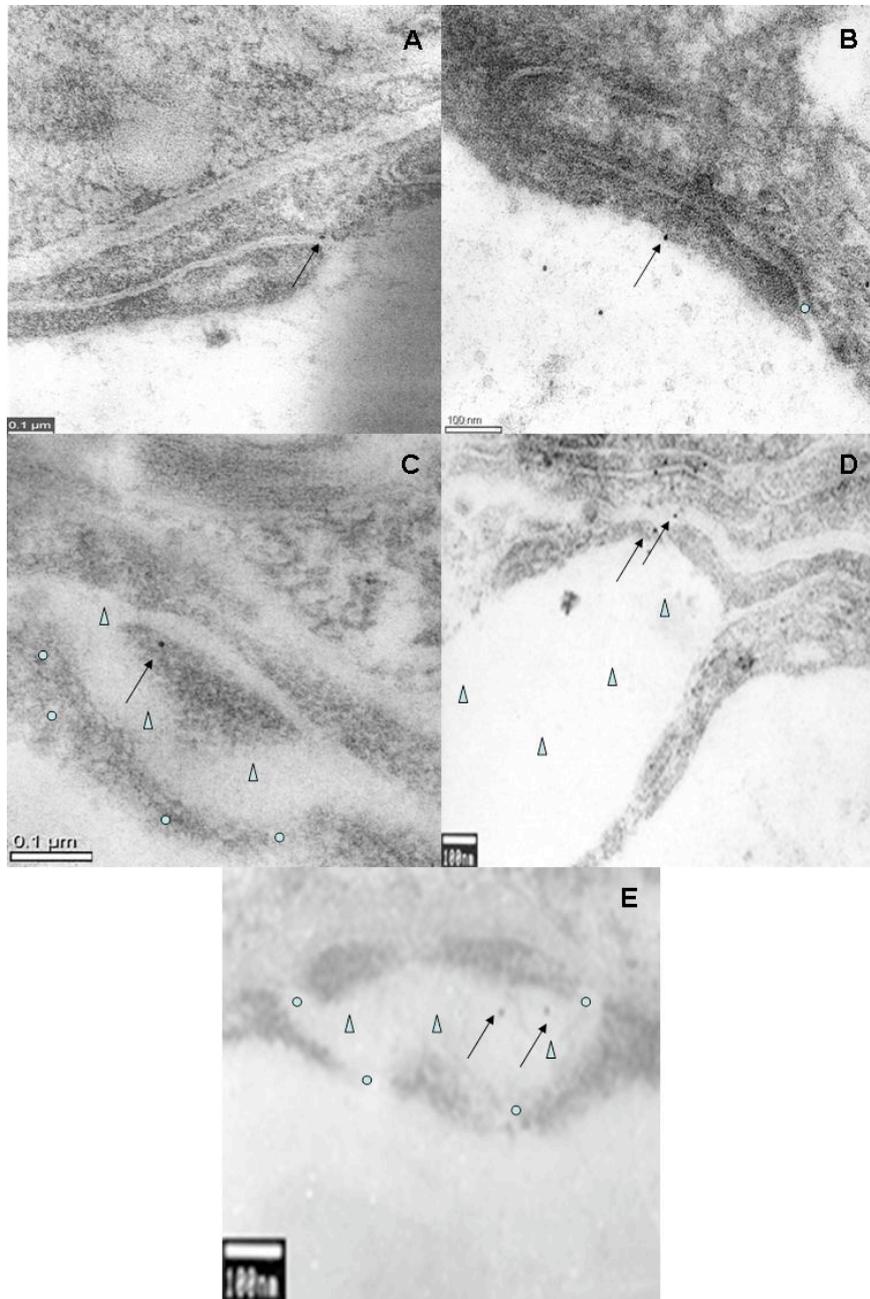


Figura 19. Immunolocalización de la proteína ocludina; daño progresivo provocado por el solvente tiner. A) Immunolocalización de la proteína ocludina en rata control (flechas); B) Daño a la unión hermética (círculo) e inmunolocalización a las 4 semanas de tratamiento; C, D y E) Daño al citoplasma de la célula endotelial (triángulo) y a la unión hermética (círculo) a las 8, 12 y 14 semanas de tratamiento.

Claudina-1

La localización de la proteína claudina-1 no sufrió modificaciones a las 4 semanas de tratamiento, ya que se observaron partículas de oro coloidal embebidas a la membrana (Figura 20 B). Esta localización corresponde a la reportada para esta proteína (Figura 9).

Las modificaciones en la localización de esta proteína se evidenciaron a partir de las 8 semanas de tratamiento, ya que las partículas de oro coloidal se observaron en el citoplasma, sin estar embebidas en la membrana (Figura 20 C, D y E), contrario a lo observado en el control (Figura 20 A), y lo reportado para la localización de esta proteína (Figura 9).

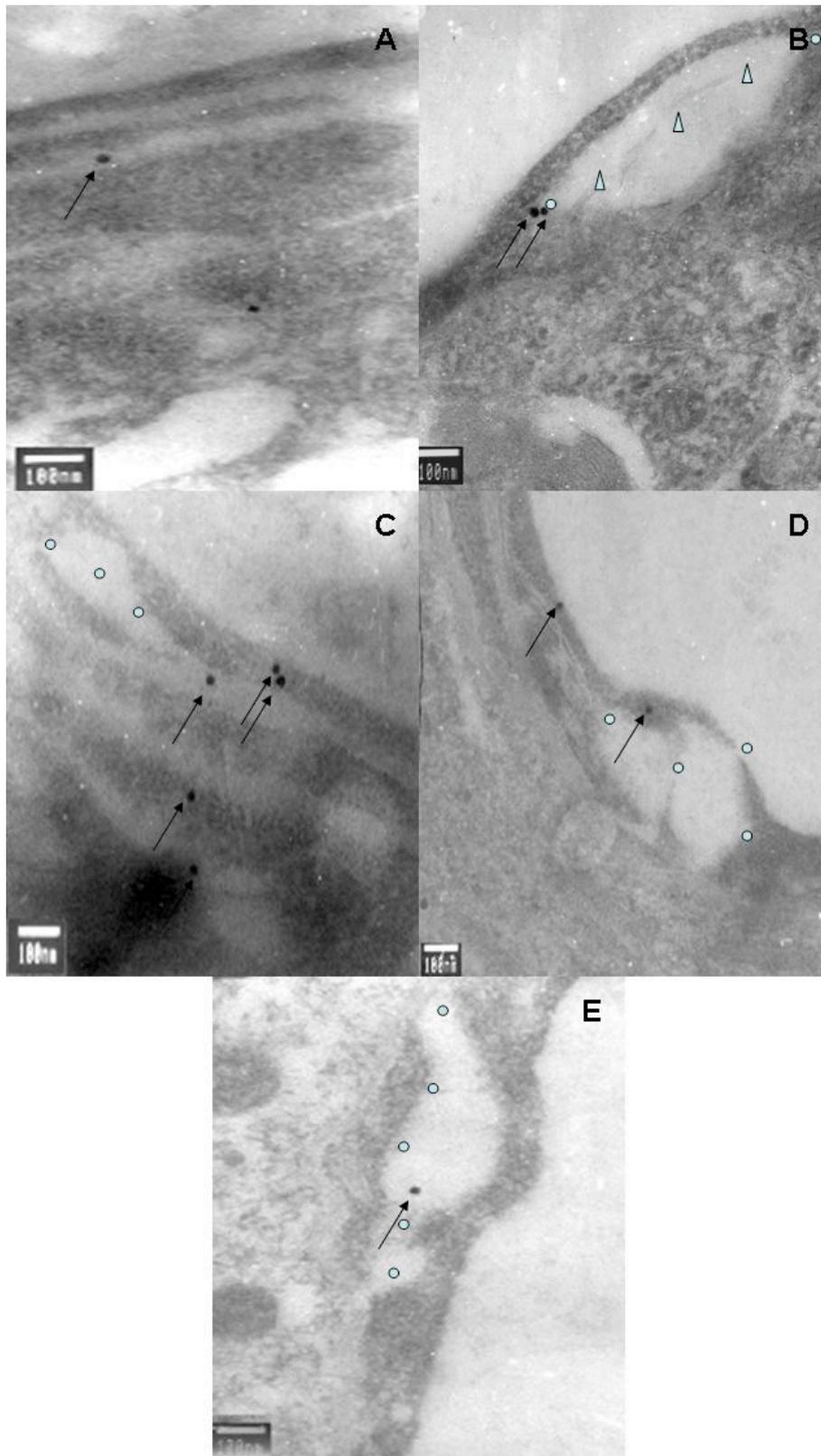


Figura 20. Immunolocalización de la proteína claudina-1; daño progresivo provocado por el solvente tiner. A) Immunolocalización de la proteína claudina-1 en rata control (flechas); B) Daño a la célula endotelial (triángulo) a las 4 semanas de tratamiento; C, D y E) Daño a la unión hermética (círculo) a las 8, 12 y 14 semanas de tratamiento.

DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que además de la baja en talla, el peso corporal de los sujetos expuestos crónicamente al tñer se redujo significativamente ($p < 0.001$) desde la primera semana hasta el final del estudio. Aparentemente este daño está asociado a las alteraciones en los mecanismos cerebrales de la ingesta de alimentos que se fueron acentuando gradualmente hasta la semana catorce del estudio. Asimismo, sugieren cierto grado de afectación por la exposición crónica al tñer sobre el eje hipotálamo – hipofisario y sus secreciones, pérdida de peso en la próstata y testículos (Ilgazli et al. 2004), además de patología de la glándula adrenal (Cárabez et al. 1998).

Las modificaciones observadas en la localización de las proteínas claudina-1, ocludina, y ZO-1 de las uniones herméticas de la microvasculatura cerebelar están relacionadas a la inhalación crónica de tñer para pintura, debido al metabolismo de los SOV, y su subsecuente biotransformación en metabolitos tóxicos (bioactivos), lo que pudo haber causado alteraciones en el ADN, que no lograron ser reparadas, y al haber replicación se sufrieron estas modificaciones.

La importancia de la correcta localización de la claudina-1 en la unión hermética de la microvasculatura cerebelar, es entre otras, el mantener la permeabilidad paracelular, la cual sufre un decremento al no estar correctamente localizada esta proteína, ya que no hay control en la concentración iónica de fluidos extracelulares. Otra función importante de esta proteína es que forma cordones pareados homotípicos y heterotípicos entre los diferentes tipos de claudinas, lo cual es importante pues también permite el establecimiento de las uniones herméticas, debido a que da origen al sello primario de éstas, lo que evidentemente no ocurre, al no estar esta proteína en su posición habitual.

Debido a las modificaciones observadas en la localización de la proteína ocludina se podría evitar un incremento, o bien producirse un decremento en la resistencia eléctrica transmembranal a lo largo de la BHE en células endoteliales maduras, mientras que en células endoteliales inmaduras habría un decremento en la permeabilidad paracelular. Aunque modificaciones en la localización de las JAM no fueron analizadas, cambios en la localización de estas proteínas podrían traer cambios en el control de la infiltración de los monocitos en condiciones inflamatorias.

Como la proteína ZO-1 es necesaria para el soporte de la estructura de las uniones herméticas, cambios en su localización afectarían a estas uniones, ya que las demás proteínas formadoras de las uniones herméticas (occludina, claudinas, y JAM, etc.) no podrían anclarse a esta proteína de soporte, y por lo tanto no se podría formar el complejo necesario para dar origen a la unión hermética. Hay que recordar que otro factor importante para el establecimiento de la unión hermética es la interacción entre dos proteínas que contengan el dominio PDZ, como por ejemplo la ZO-1 y la claudina-1. Esta interacción es necesaria para que haya unión directa con el carboxilo terminal de las claudinas, y poder fosforilar los residuos de prolina, para que así la superficie citoplasmática de los cordones de las uniones herméticas funcione como un imán que atrae y recluta proteínas que contienen el dominio PDZ, y de esta forma permitir la formación de las uniones herméticas.

El daño membranal altera la permeabilidad, produciendo modificaciones en la composición y volúmenes del microambiente neuronal, alterando el funcionamiento y los procesos integrativos que se dan en la intimidad de los locos neuronales. Cambios en la homeostasis cerebelar a consecuencia de los efectos xenobióticos de los metabolitos tóxicos producto de la biotransformación de los SOV, además de la acumulación de tolueno en las membranas neuronales afectan a las neuronas pontocerebelosas, cuyas fibras constituyen la principal vía aferente de los hemisferios cerebelosos, además de que son influenciadas por amplias regiones de la corteza cerebral concernientes a la planificación y ejecución de los movimientos. Tanto los cambios en la homeostasis, como la acumulación de SOV también dañan el lóbulo del paravermis, el cual es clave en la planificación lateral y motora, debido a las proyecciones que salen de este lóbulo hacia el núcleo dentado, que es la estructura encargada de esta planificación. Este núcleo es importante porque tiene conexiones recíprocas con la corteza cerebral, a través del tálamo y de los núcleos del puente. Debido a la existencia de estas conexiones con el cerebro, esta vía recibe el nombre de cerebro-cerebelosa, y parece actuar como disparador de la corteza cerebral, rigiendo los movimientos voluntarios y las propiedades de los movimientos durante su ejecución.

Otra vía que podría sufrir alteraciones son las fibras transversales de protuberancia, las cuales unen al cerebro y cerebelo entre sí. Los axones largos de las vías motoras y sensoriales cerebroespinales pasan por la profundidad de la protuberancia, en particular a la corteza motora del lóbulo frontal. De esta manera, el

neocerebelo ejerce su función de coordinador de los movimientos voluntarios, principalmente por medio de la acción sobre áreas corticales del cerebro que dan origen a las vías descendentes corticoespinal y corticobulbar.

La homeostasis cerebelar es de suma importancia, debido a las funciones que este desempeña, como por ejemplo, el hemisferio cerebelar lateral parece ser particularmente importante para el aprendizaje de tareas tanto motoras como cognitivas en las que las respuestas acertadas se desarrollan a través de práctica repetida. Al modificarse la localización de las proteínas de la unión hermética en este hemisferio, además de las funciones propias de este ya mencionadas, también se estaría dañando la vía cerebro-cerebelo, impidiendo que la información descendiera hacia la planificación lateral y motora. Tiene fundamento esta posibilidad debido a que el cerebelo también juega un papel importante en el aprendizaje motor debido a que muchas acciones de esta índole son iniciadas y ejecutadas sin planeación (retroalimentación anterógrada inmediata) la cual requiere calibración y ajustes adaptativos de los programas motores. Es por esto que recientemente se ha considerado que el cerebelo tiene un papel importante en operaciones netamente mentales, y en muchos aspectos sus funciones cognitivas parecen ser similares a las motoras.

Los daños observados en la localización de las proteínas de la unión hermética, así como en las células endoteliales de la microvasculatura cerebelar se deben principalmente al tolueno, y al xileno, ya que al no haber benceno en el tiner para pintura usado en este trabajo, se impidió la biotransformación del tolueno, además de que el xileno también juega un papel importante, ya que este compuesto es el que mantiene el efecto del tolueno, debido a que al ser inhalados estos dos solventes, hay una disminución en la biotransformación del tolueno, propiciando así que este compuesto se mantenga más tiempo intacto en el organismo, y por lo tanto sus efectos psicodislépticos sean posiblemente más duraderos, además de que la acumulación sea mayor en sus tejidos blanco.

Los efectos aquí obtenidos en la localización de las proteínas claudina-1, ocludina, y ZO-1 de las uniones herméticas de la microvasculatura cerebelar, son difíciles de referirlos para alguno de los componentes del tiner que se ofrece comercialmente como una mezcla de solventes. Al respecto, hay grupos de investigadores que están estudiando los efectos del tolueno, benceno, xileno, etc. como compuestos separados, ya que en algunos productos estos SOV están casi

puros, pero esto es muy raro debido a que es muy caro producir productos puros. En cambio, las industrias usan estos solventes en estados no tan puros, lo que aminora el costo, para que así se puedan fabricar productos más económicos y competitivos en el mercado. Uno de los problemas con este tipo de investigación es que no es igual el estudio de cada uno por separado que el estudiarlos como mezclas comerciales (como es el caso de este trabajo). Esto es debido a las interacciones y la competencia o efectos potenciadores que se presentan tanto en los efectos, como en los productos del metabolismo que se sabe existe, entre algunos de los componentes del tñner para pintura. Es cierto que cada compuesto por separado tiene diferentes efectos, los cuales algunas veces son contradictorios, ya que pueden causar mas daño, ser más benévolos o incluso inertes, en comparación a cuando se inhalan como un conjunto, dependiendo de los procesos metabólicos que sufran, y los metabolitos producidos de su biotransformación.

Aunado a esta complejidad de interacciones, y el papel fundamental del metabolismo en la biotransformación de los SOV otro aspecto importante en cuanto al estudio del tñner para pintura, es que esta es la forma más común y barata de inhalar voluntariamente una gran variedad de SOV, como por ejemplo lo que ocurre principalmente con niños y adolescentes en situación de calle.

CONCLUSIONES

- La demostración de la deslocalización de las proteínas ZO-1, ocludina y claudina-1 de las uniones herméticas es alterada por el daño del tiner sobre la ultraestructura de la unión hermética. Los resultados presentados pudieran ser consecuencia de los productos metabólicos generados durante el proceso de biotransformación, que tiene como objetivo desactivar a los SOV.
- Los mecanismos moleculares mediante los cuales se da este cambio en la localización de las proteínas en la unión hermética, no están claros hasta el momento, por lo que se requieren más estudios para poder aclarar la manera en que esto ocurre.
- Es evidente que a mayor tiempo de inhalación del solvente tiner el daño es progresivo, no solo en la unión hermética, sino que también afecta a la célula endotelial.
- Los hallazgos podrían integrarse con estudios futuros a nivel subcelular y molecular, para explicar el daño funcional y sus consecuencias en diferentes órganos y tejidos del organismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Askergren A, Allg en LG, Karlsson C, Lundberg I, Nyberg E. 1981. Studies on kidney function in subjects exposed to organic solvents. I. Excretion of albumin and beta-2-microglobulin in the urine. *Acta Med Scand.* 209:479-483
- Basu D, Jhirwal O, Singh J, Kumar S, Mattoo S. 2004. Inhalant abuse by adolescents: A new challenge for Indian physicians. *Indian J Med Sci.* 58:245-249
- Baydas G, Ozveren F, Tuzcu M, Yasar. 2005. Effects of thinner exposure on the expression pattern of neural cell adhesion molecules, level of lipid peroxidation in the brain and cognitive function in rats. *Eur J Pharmacol* 512:181– 187
- Brooks T, Nametz N, Charles R, Davis T. 2008. Diclofenac Attenuates the Regional Effect of β -Carrageenan on Blood-Brain Barrier Function and Cytoarchitecture. *JPET.* 325:665–673
- Bruckner J, Anand S, Warren D. Toxic effects of solvents and vapors. En Klaassen, Cirtis D. Casarett y Doull. 2008. *Toxicology-The Basic Science of Poisons*, 7a Edición, McGraw-Hill. pp 981-1051
- Cárabez A, Sandoval F, Palma L. 1998. Ultrastructural changes of tissues produced by inhalation of thinner in rats. *Micros. Res. And Tech.* 40:56-62
- Casarett y Doull. 1991. *Toxicology-The Basic Science of Poisons*, 4^a Edición, Pergamon Press. p 84
- Centros de Integración Juvenil, A.C. Farmacoterapia de los s ndromes de intoxicación y abstinencia por psicotr picos. http://www.cicad.oas.org/reduccion_demanda/esp/documentos/documentosa/mexico.pdf
- Contreras Pérez Carlos M. 1977. *Inhalación voluntaria de disolventes industriales*, 1a Edición, Editorial Trillas. pp 6-29
- Elkougny-Naor L, Abassi Z, Lagziel A, Gow A, Ben-Yosef T. 2008. Double gene deletion reveals lack of cooperation between claudin 11 and claudin 14 tight junction proteins. *Cell Tissue Res.* 333(3):427-438
- Farral A, y Wardlaw J. 2009. Blood Brain Barrier: Ageing and Microvascular Disease – Systematic Review and Meta – Analysis. *Neurobiol and Age.* 30: 337 – 352
- Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. 1999. Manner of interaction of heterogenous claudin species within and between tight junction strands. *J. Cell Biol.* 147:891-903
- Hayat MA 1986. *Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy*. Academic Press inc.

Hirase T, Staddon J, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin L. 1997. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 110:1603-1613

Ilgazli A, Sengul A, Maral H, Ozden M, Ercin C. 2004. The effects of thinner inhalation on superoxide dismutase activities, malondialdehyde and glutathione levels in rat lungs. *Clin Chim Acta.* 2004. 343(1-2):141-144

Ikeda M. Supresión mutua de la oxidación implicada en el metabolismo de los componentes del tiner. En Contreras Pérez Carlos M. 1977. Inhalación voluntaria de disolventes industriales, 1a Edición, Editorial Trillas, p. 24

Inoue O, Seiji K, Watanabe T, Kasahara M, Nakatsuka H, Yin SN, Li GL, Cai X, Jin C, Ikeda M. 1988. Mutual metabolic suppression between benzene and toluene in man. *Int Arch Occup Environ Health.* 60(1):15-20

Kandel E, Schwartz J, y Jessell T. 2000. Principles of Neural Science, 4a Edición, McGraw-Hill Nueva York. pP 833-853

Leszner G, Kis B, Snipes J, Gáspár T, Sándor P, Komjáti K, Szabó C, Busija D. 2007. Contribution of poly (ADP-ribose) polymerase to postischemic blood-brain barrier damage in rats. *J Cereb BF & Metabol.* 27:1318-1326

Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 142(1):117-127

Martínez-Alfaro M, Cárabez-Trejo A, Gallegos-Corona M, Pedraza-Aboytes G, Hernández-Chan N, y Leo-Amador G. 2010. Thinner inhalation effects on oxidative stress and DNA repair in a rat model of abuse. *J. Appl. Toxicol.* 30(3):226-32

Nag S. 2003. The Blood-Brain Barrier, Biology and Research Protocols, Humana Press, Totowa Nueva Jersey

National Institute of Health. Reporte no. 05-3818. 2001

National Research Council. 2003. Guidelines for the care and use of mammals. En: National Research Council Academies editor. Neuroscience and Behavioral Research. Washington D.C., National Academies Press. pp 209.

NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio

Omidi Y, Barar J, Ahmadian S, Heidari HR, Gumbleton M. 2008. Characterization and astrocytic modulation of system L transporters in brain microvasculature endothelial cells. *Cell Biochem Funct.* 26:381-391

- Paci E, Buiatti E, Seniori Costantini AS, Miligi L, Pucci N, Scarpelli A, Petrioli G, Simonato L, Winkelmann R, Kaldor JM. 1989. Aplastic anemia, leukemia and other cancer mortality in a cohort of shoe workers exposed to benzene. *Scand J Work Environ Health*. 15(5):313-318
- Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Müller S, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig I. 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J*. 22:146–158
- Rangan y Snyder citado en: Casarett y Doull's. 2008. *Toxicology-The Basic Science of Poisons*, 7a Edición, Pergamon Press. p 1008
- Saygı A, Zor E, Baloglu H, 1997. Effect of thinner on respiratory system. *Türk Ekopatol Derg* 3:1–5
- Shinya H, Hoshino K, Kiritoishi M, Kiuchi S, Yamagami K, Nakatani T. 2003. 2 cases of acute retrobulbar neuritis by thinner inhalation; detected methanol of high concentration in gas phase assay. *Chudoku Kenkyu*. 16(3):329-333
- Tang H, Chu K, Cheuk A, Tsang W, Chan H, Tong K. 2005. Renal tubular acidosis and severe hypophosphataemia due to toluene inhalation. *Hong Kong Med J*. 11(1):50-53
- Tardif R, Lapare S, Plaa G, Brodeur J. 1991. Effect of simultaneous exposure to toluene and xylene on their respective biological exposure indices in humans. *Int Arch Occup Environ Health*: 63:279-284
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:285–293
- Ulakoğlu E, Saygi A, Gümüştaş M, Zor E, Öztekin İ, Kökoğlu E. 1998. Alterations in superoxide dismutase activities, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled rat lungs: relationship between histopathological properties. *Pharmacol Res*. 38:209–214.
- Van Itallie C y Anderson J. 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*. 68:403–429
- Weidenfeller C, Svendsen C, Shusta E. 2007. Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood–brain barrier properties. *J Neurochem*. 101:555–565
- Wolburg H. En Dermietzel R, Spray D y Nedergaard M. 2006. *Blood-Brain Barriers. From Ontogeny to Artificial Interfaces*. Wiley-VCH Verlag GMBH & Co. Eggen, Weinheim, Alemania. pp 77-108
- Yeung D, Manias J, Stewart D, Nag S. 2008. Decreased junctional adhesion molecule-A expression during blood–brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol*. 115:635–642