



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

ALTERACIONES NEUROCONDUCTUALES Y NEUROQUÍMICAS EN EL RATÓN CD1 POR EXPOSICIÓN CRÓNICA AL ARSÉNICO

Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Neurobiología)
presenta
BIÓL. CLAUDIA LETICIA MORENO ÁVILA

Directoras de tesis:
Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova
Dra. María Magdalena Giordano Noyola

Campus Juriquilla, Querétaro. Octubre 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Claudia Leticia Moreno Ávila, cuyo título es: “Alteraciones neuroconductuales y neuroquímicas en el ratón CD-1 por exposición crónica al arsénico” 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. Mauricio Díaz Muñoz

Secretario (Tutor)

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

Vocal

Dra. Luz María del Razo Jiménez

Suplente

Dr. Alfonso Cáramez Trejo

Suplente

Dra. Gina Lorena Quirarte

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del programa

RESUMEN

El arsénico (As) es un elemento ubicuo cuya exposición se asocia con diferentes alteraciones sensoriales y motoras en humanos; mientras que en modelos animales produce alteraciones motoras, conductuales y en los sistemas de neurotransmisión. En el presente estudio ratones machos adultos de la cepa CD-1 fueron expuestos a 0.5 ó 5 mg As/L en el agua para beber durante 6 meses. La actividad locomotora, las conductas interespecíficas y la apariencia física, los niveles de monoaminas y la expresión de los receptores de dopamina fueron evaluados. Los grupos tratados con 0.5 ó 5 mg As/L muestran una disminución en la actividad locomotora en comparación con el grupo control, en el segundo y sexto mes de tratamiento. El tratamiento con As no produce alteraciones en conductas como la agresión y sus componentes; pero produce tanto aumentos como disminuciones en la conducta de incorporación. La apariencia física refleja un aumento en el componente del peluqueo en los animales tratados con 5 mg As/L en comparación con el grupo control en el primero y segundo mes. Por otra parte, la exposición a As no resultó en alteraciones en los niveles de neurotransmisores (dopamina o serotonina) o sus metabolitos en ninguna de las regiones cerebrales analizadas; sin embargo, se encontró disminuida la expresión del mensajero del receptor dopaminérgico tipo D2 en el estriado de los ratones expuestos a 5 mg As/L. La exposición crónica a 0.5 ó 5 mg As/L produce alteraciones particulares en el sistema dopaminérgico, hipoactividad y cambios en la conducta de incorporación.

SUMMARY

Arsenic (As) is an ubiquitous metalloid present in the environment and As exposure has been associated with sensory and motor alterations in humans; whereas rodents exposed to this metalloid show alterations in locomotor activity, behavioral tasks and neurotransmitters systems. It is important to note that there are few studies that evaluate the effects of chronic As exposure using concentrations present in the environment. In the present study adult male CD-1 mice were exposed to 0.5 or 5 mg As/L of D. W. by 6 months. Locomotor activity, interspecific behavior and physical appearance, monoamines levels, and expression of the messenger for dopamine receptors were assessed during As exposure. Chronic As exposure produced decreases in locomotor activity in comparison to the control group, on the second and the sixth month of exposure. Other behaviors such as rearing, on-wall rearing and barbering showed both increases and decreases; the groups treated with As did not show any significant alterations on aggressive behavior. We found a significant increase in the barbering of mice exposed to 5 mg As/L in the first and the second month of As exposure. Arsenic exposure did not cause any alteration in monoamines levels and their metabolites in the brain regions analyzed; but a decrease in the level of expression of the messenger for D2 receptors was found in the striatum of mice exposed to 5 mg As/L. These results show that chronic exposure to 0.5 or 5 mg As/L produces specific alterations in locomotor activity, rearing and in the dopaminergic system.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM. Número de cuenta: 509003326. Así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Becario número: 270233.

A mis tutoras, la Dra. Verónica Rodríguez Córdova y la Dra. Magdalena Giordano Noyola por su dirección, comentarios y todo el apoyo otorgado para realizar este trabajo, su apoyo y guía fueron sustanciales para realizar este estudio.

Al Dr. Alfonso Cárabez Trejo y a la Dra. Isabel Miranda Saucedo por formar parte de mi comité tutelar, gracias por todas sus aportaciones.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico y en general al personal de la Unidad de Enseñanza.

Al personal de la biblioteca del campus Juriquilla coordinado por el Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela, especialmente al jefe de biblioteca Román Pacheco Barrita.

Al personal del área de cómputo del campus Juriquilla encabezado por el Ing. Ramón Martínez Olvera.

Al Dr. Jorge Humberto Limón Pacheco por sus enseñanzas en el área de biología molecular, por todo su apoyo y contribución en este trabajo. Así como al personal encargado de la Unidad de Proteogenómica, particularmente a la Dra. Anaid Antaramian y a la M. en C. Adriana Gallardo.

Asimismo, agradezco el apoyo y las aportaciones de diferentes miembros del Instituto de Neurobiología que contribuyeron de alguna manera con este trabajo. Particularmente a la M.V.Z. Norma Serafín López por las facilidades otorgadas para el

análisis de las pruebas conductuales, por su disposición y apoyo en cada momento, así como al responsable del bioterio al MVZ. José Martín García Servín.

Agradezco a la bióloga Soledad Mendoza Trejo y al MVZ Fernando Rodríguez, ya que su apoyo fue muy importante en el desarrollo de este trabajo.

A Dorothy Pless quiero expresarle un agradecimiento especial por su tiempo, paciencia, por permitirme estar en su grupo y por facilitarme material que ha sido incluido en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo y por el conocimiento que compartieron conmigo, así como las aportaciones de mis compañeros de otros laboratorios y el apoyo de mis amigos durante estos años merecen otro sincero agradecimiento.

También quiero agradecer a la Dra. Beatriz Braniff Cornejo por su apoyo y por permitirme escoger una “investigación biológica” que me acerca a las cosas del infra y del supermundo por las que ella profesa tanta entrega.

Finalmente, hago el agradecimiento más extensivo a cada miembro de mi familia por apoyarme en cualquier aspecto y en cada momento.

*Yo que aprendí a volar con cada vuelo
de profesores puros
en el bosque, en el mar, en las quebradas,
de espaldas en la arena
o en los sueños,
me quedé aquí, amarrado
a las raíces...*

*...el hombre anda perdido si no vuela:
no puede comprender la transparencia.*

*...y aprendí de las aves
la sedienta esperanza,
la certidumbre y la verdad del vuelo.*

(fragmentos de El vuelo, Pablo Neruda)

A mis tutoras,
por contribuir con mi formación académica y personal

A mis padres y a mi amado hermano Mario,
por ser un aliciente para aprender a volar

ÍNDICE

RESUMEN.....	II
SUMMARY	III
AGRADECIMIENTOS	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 ARSÉNICO	2
2.1.1 <i>Propiedades físico-químicas</i>	2
2.1.2 <i>Vías de exposición</i>	2
2.1.3 <i>Toxicocinética</i>	3
2.1.4 <i>Mecanismo de acción</i>	6
2.2 SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS	9
2.2.1 <i>Dopamina</i>	10
2.2.2 <i>Síntesis y metabolismo de la dopamina</i>	11
2.2.3 <i>Receptores de dopamina</i>	13
2.3 EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO Y ALTERACIONES ASOCIADAS.....	15
2.3.1 <i>Alteraciones en seres humanos expuestos a As</i>	15
2.3.2 ALTERACIONES EN MODELOS ANIMALES EXPUESTOS A AS.....	17
2.3.2.1 <i>Efectos de la exposición a As en la conducta</i>	17
2.3.2.2 <i>Efectos de la exposición a As en la neuroquímica monoaminérgica</i>	19
2.4 ETOGRAMA DE MUS MUSCULUS Y CEPA CD-1	22
2.4.1 <i>Conducta agresiva</i>	23
2.4.2 <i>Conducta estereotipada, sistema dopaminérgico y TOC</i>	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVOS	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 <i>SUJETOS</i>	33
6.2 <i>SOLUCIONES</i>	33
7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
7.1 <i>PRUEBAS CONDUCTUALES</i>	35
7.1.1 <i>Actividad locomotora espontánea</i>	35
7.1.2 <i>Conducta estereotipada</i>	35
7.1.3 <i>Paradigma residente-intruso</i>	36
7.1.4 <i>Otras conductas típicas en los roedores</i>	37
7.2 <i>DETERMINACIÓN DE MONOAMINAS</i>	37
7.2.1 <i>Preparación de muestras y análisis con cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico</i>	37
7.3 <i>EXPRESIÓN DEL RNAM DE RECEPTORES DE DOPAMINA TIPO D1 Y D2</i>	38
7.3.1 <i>Extracción de RNA y síntesis de cDNA</i>	38
7.3.2 <i>PCR tiempo real</i>	39
7.4 <i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	40
8. RESULTADOS.....	41
8.1 <i>EFFECTO DEL ARSÉNICO EN EL PESO CORPORAL</i>	41
8.2 <i>EFFECTO DEL ARSÉNICO EN LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA</i>	42
8.2.1 <i>Período de habituación previo al registro</i>	42
8.2.2 <i>Registro mensual del ciclo de actividad (24 h)</i>	42

8.3 EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A ARSÉNICO EN LA CONDUCTA AGRESIVA	45
8.4 EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS RATONES TRATADOS CON ARSÉNICO	46
8.5 EFECTO DEL ARSÉNICO EN LOS NIVELES DE MONOAMINAS	49
8.6 EFECTO DEL ARSÉNICO EN LA EXPRESIÓN DEL RNÂM DE RECEPTORES DE DOPAMINA.....	50
9. DISCUSIÓN.....	52
9.1 PESO CORPORAL	52
9.2 ACTIVIDAD LOCOMOTORA	52
9.3 CONDUCTA AGRESIVA Y APARIENCIA FÍSICA DE LOS RATONES.....	55
9.4 DETERMINACIÓN DE MONOAMINAS.....	56
9.5 EXPRESIÓN DEL RNÂM DE RECEPTORES DE DOPAMINA	57
10. CONCLUSIONES.....	60
11. BIBLIOGRAFÍA	62
ÍNDICE DE FIGURAS	74
ÍNDICE DE TABLAS	76
ANEXOS.....	77

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental con arsénico (As) es una problemática de importancia a nivel mundial debido a que la exposición a este metaloide ha sido asociada con efectos adversos en la salud de las personas expuestas. Algunos países que sufren por contaminación con As incluyen a Bangladesh, China, India, Argentina, Australia, Chile, México y Taiwán, entre otros (IARC, 2004).

En nuestro país, se ha reportado contaminación con As por actividades antropogénicas en el área de Morales, San Luis Potosí (Díaz-Barriga et al., 1993; Calderón et al., 2001); en Anapra, Chihuahua (Díaz-Barriga et al., 1997); en la Comarca Lagunera, Durango; en Salamanca, Guanajuato y en Zimapán, Hidalgo (Soto et al., 2003).

La fuente de exposición más común a As es el agua de pozo. Los límites permisibles de As en agua para beber son de 0.01 mg As/L (OMS, 2001) y de 0.025 mg As/L en México (DOF, 2008). Sin embargo, las concentraciones presentes en nuestro país son variables y pueden alcanzar niveles de hasta 0.4 mg As/L (García-Vargas et al., 1994).

La exposición crónica a As en el agua para beber está asociada con problemas cutáneos tales como la melanosis, queratosis y cáncer de piel, también se ha relacionado con cáncer de vejiga, riñón y pulmón, con enfermedades vasculares, trastornos reproductivos y alteraciones en el desarrollo intelectual de niños y adolescentes (Calderón et al., 2001; Tsai et al., 2003; Chaudhuri et al., 2008).

En el sistema nervioso (SN) la exposición aguda al As causa neuropatía, encefalopatía y alteraciones en las funciones neurológicas superiores. Sin embargo, la información acerca de los efectos del As en este sistema es limitada (Rodríguez et al., 2003).

En este sentido, desarrollar investigaciones enfocadas en conocer el efecto del As en el cerebro y cómo este metaloide produce alteraciones neuroquímicas y neuroconductuales proporcionará información para tratar de comprender de una manera más clara y completa cuál es el efecto del As en el SN, no sólo desde el punto de vista fisiológico sino también a nivel conductual como vía final de lo que ocurre en el medio interno.

2. ANTECEDENTES

2.1 ARSÉNICO

2.1.1 *Propiedades físico-químicas*

El arsénico (As) se clasifica químicamente como un metaloide, ya que tiene propiedades tanto del grupo de los metales como de los no metales, tiene un peso atómico de 74.92 y se puede encontrar en tres estados de oxidación (-3, +3, +5), las especies trivalentes y las pentavalentes son las más importantes por sus efectos tóxicos asociados a su exposición en humanos (Klaassen, 2008).

Los compuestos inorgánicos trivalentes de este metaloide son el trióxido de arsénico, el arsenito sódico y el tricloruro de arsénico. Los compuestos inorgánicos pentavalentes son el pentóxido de arsénico, el ácido arsénico y los arsenatos (ej: arsenato de plomo y el arsenato de calcio). Los compuestos orgánicos del As también pueden ser trivalentes o pentavalentes (Goyer y Clarkson, 2006).

Muchas de las formas orgánicas o inorgánicas son de color blanco o carecen de color y no huelen, por lo que es difícil determinar si están presentes en el aire, en la comida o en el agua (ATSDR, 2007).

El ciclo del arsénico puede tener lugar en ausencia de oxígeno y puede contribuir a la oxidación de la materia orgánica. En los acuíferos, las reacciones microbianas pueden movilizar el As de la fase sólida a la fase acuosa, lo que puede resultar en agua contaminada (Oremland y Stolz, 2003).

2.1.2 *Vías de exposición*

El As es un elemento ubicuo por lo que puede estar presente en la atmósfera, en el suelo, rocas, en el agua natural y en los organismos. Diferentes procesos pueden hacer que el As se movilice entre diferentes medios tales como las reacciones de intemperización, la actividad biológica y las emisiones volcánicas, así como las diferentes actividades antropogénicas (Smedley y Kinniburgh, 2002).

Se considera que la principal fuente de exposición al As para el ser humano es la ingestión de agua y alimentos contaminados. En los alimentos se encuentra como As orgánico, una forma química considerada de poca toxicidad o no tóxica, con ≤ 1.5 %

presente en el pescado y del 10 al 20 % en los mariscos como arsenobetaina, arsenocolina, arsenolípidos y arsenoazúcares (Borchers et al., 2009).

En el caso del agua para beber se encuentra como arsénico inorgánico, en forma de arsenato o arsenito, con concentraciones muy variables en diversas regiones del mundo: en Bangladesh las concentraciones van desde 0.050 mg As/L hasta 0.300 mg As/L, puede ser tan altas como las encontradas en Taiwan alcanzando hasta 0.800 mg As/L, en Chile de 0.500 mg As/L y en Córdoba, Argentina de 0.178 mg As/L (Smith et al., 2000). Mientras que en México se han reportado concentraciones de 0.045 mg As/L en la región de Zimapán, Hidalgo (Valenzuela et al., 2005) y en en el rango de 0.010 hasta 0.4 mg As/L en la Comarca Lagunera (García-Vargas et al., 1994; Pineda-Zavaleta et al., 2004).

Otra forma de exposición proviene del As que se libera al ambiente a partir de las fuentes antropogénicas, tales como las fundidoras primarias de cobre, zinc y plomo, de las fábricas de vidrio que añaden As a las materias primas e industrias químicas; en algunos casos se ha utilizado éste en la producción de pesticidas, la preservación de la madera, la manufactura de vidrio, entre otros usos. Mientras que de manera natural se encuentra presente en la corteza terrestre (Jones, 2007; Klaassen, 2008). De esta manera, los humanos pueden estar expuestos al As de manera directa y constante, principalmente por la ingestión de agua y alimentos, por lo que aumenta con ello la posibilidad de sufrir efectos adversos en la salud.

2.1.3 Toxicocinética

Tanto el arsenato como el arsenito se absorben por vía oral, por inhalación y se pueden absorben también por la piel, aunque esta ruta no está bien caracterizada (ATSDR, 2007).

El As que ha sido absorbido puede distribuirse y concentrarse en diferentes tejidos o tipos celulares. Aunque no se ha establecido un mecanismo bien definido de cómo ingresa a las células se ha propuesto la participación de diversos transportadores. En el caso del arsenato se ha descrito que puede hacer uso de los transportadores de fosfato debido a que tiene gran similitud con el fosfato (Rosen y Liu, 2008); mientras que se ha sugerido que proteínas de membrana como las aquagliceroporinas 7 y 9 (Aqp7 y Aqp9)

(Liu, 2010) y las proteínas resistentes a drogas (Mrp-1) pueden tener un papel importante en el ingreso y la extrusión de las formas trivalentes (Kimura et al., 2005).

Una vez que el arsénico está en el interior de las células puede ser biotransformado por alguno de los 2 esquemas de reacción propuestos (Figura 1):

a) En la ruta clásica una serie de reacciones de reducción y metilación oxidante convierten el arsénico del estado pentavalente (As^{V}) a trivalente (As^{III}) y finalmente a arsenicales metilados (Waters et al., 2004; Thomas., 2007), los cuales no son desalquilados (Zakharyan et al., 2001). El ácido lipoico, el glutatión, el sistema tiorredoxina y en otros casos la enzima glutatión-S-transferasa omega ($\text{GST}\Omega$), con una participación menor, funcionan como reductores endógenos. Mientras que el proceso de metilación está modulado por la enzima metiltransferasa del arsénico (AS3MT), una enzima que es limitante en el proceso (Thomas et al., 2001, 2007), la cual cataliza la transferencia de un grupo metilo de la sulfo-adenosil metionina (AdoMet) a sustratos que contienen As, en dicha transferencia se produce además sulfo-adenosilhomocisteína (AdoHcy) como producto, entonces permiten la generación del ácido metilarsónico (MMA^{V}); el cual posteriormente es reducido a ácido monometilarsenoso (MMA^{III}) y éste a su vez es metilado a dimetilarsínico (DMA^{V}), se reduce a ácido dimetilarsínico (DMA^{III}) y, finalmente, estas especies dimetiladas son convertidas a óxido trimetilarsina (TMA^{III}) (Thomas, 2007).

b) Un esquema alternativo involucra la transferencia secuencial de grupos metilo a un sustrato que contiene As sin que sea necesaria la oxidación del As^{III} , de manera que esta forma trivalente puede ser conjugada con glutatión y formaría arsenito triglutatión [$\text{As}^{\text{III}} (\text{GS})_3$], después se formaría glutatión monometilarsónico [$\text{As}^{\text{III}} (\text{GS})_2$] y finalmente glutatión dimetilarsínico [$\text{As}^{\text{III}} (\text{GS})$]; estas dos últimas formas pueden sufrir degradación espontánea y producir formas metiladas como MMA y DMA en estado de oxidación trivalente y pentavalente (Hayakawa et al., 2005; Flora 2011).

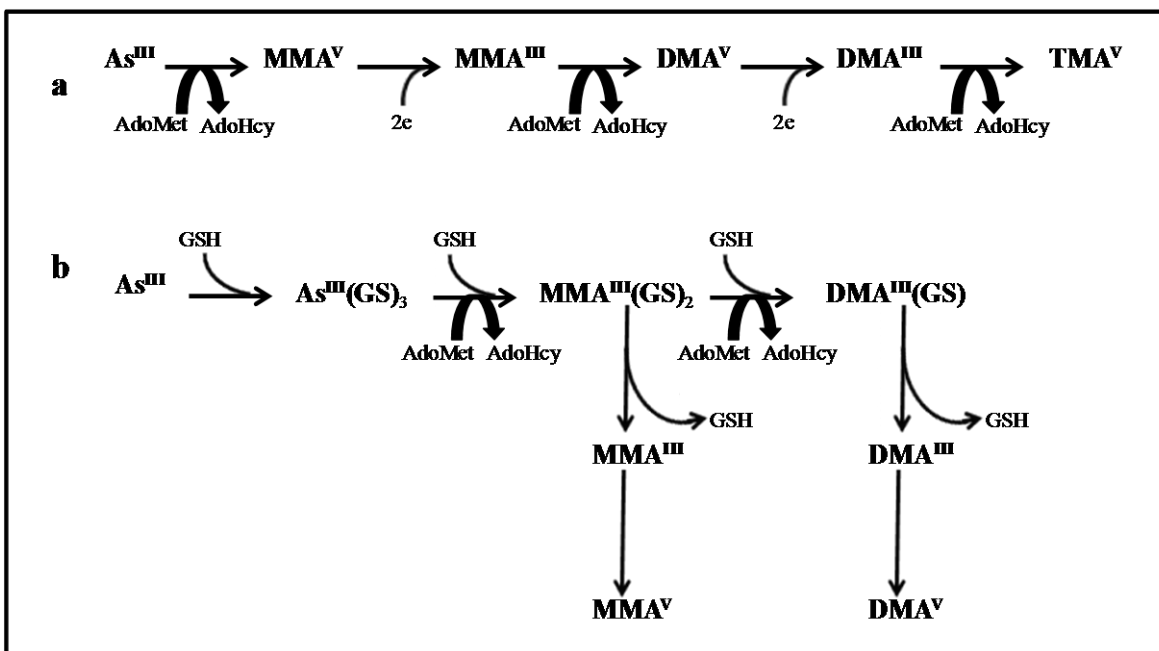


Figura 1. Esquemas alternativos para la biotransformación del arsénico (As) en metabolitos metilados. (a) Las reducciones y metilaciones oxidantes intercaladas permiten que el As trivalente (As^{III}) sea convertido en ácido metilarsónico (MMA^{V}), el cual es reducido a ácido monometilarsenoso (MMA^{III}), posteriormente este arsenical es convertido a ácido dimetilarsínico (DMA^{V}) y reducido a ácido dimetilarsínoso (DMA^{III}). Finalmente, estas especies dimetiladas son convertidas a óxido trimetilarsina (TMA^{III}). En (b) la metilación del As involucra la formación de complejos de arsénico-glutatión. Sulfo-adenosilmetionina (AdoMet), sulfo-adenosilhomocisteína (AdoHcy), glutatión (GSH) (Modificado de Thomas, 2007).

En cualquier caso, debería considerarse a todos los compuestos arsenicales como altamente tóxicos ya que el arsénico inorgánico y sus metabolitos interactúan con blancos moleculares específicos y alteran la función celular, por lo que dichas interacciones constituyen un factor crítico en el mecanismo de acción de los arsenicales como toxinas o carcinógenos (Thomas, 2007).

El arsénico inorgánico en la forma de arsenito (trivalente) es mucho más tóxica que la forma de arsenato (pentavalente) (Petrick, 2000; Aposhian y Aposhian, 2006) y se ha propuesto que el arsenito es la principal forma que se une a los tejidos (Vahter y Marafante, 1983).

Diferentes aproximaciones experimentales han demostrado que la distribución del arsénico en los tejidos es órgano- específica, concentrándose principalmente en la vejiga urinaria, riñón y pulmón (Hughes y Kenyon, 1998; Hughes et al., 2003, 2005). Esta distribución es importante porque es coincidente con la incidencia de cáncer de órganos internos en personas que han sido expuestos al As mediante el agua para

beber, cuyo riesgo aumenta en 1 de cada 100 personas que consumen 50 μg As/L (Smith et al., 2011). Como se señaló previamente esta evidencia es importante por su relación con los efectos en humanos a nivel sistémico, pero en dichos estudios no refieren qué pasa en el cerebro.

La eliminación del As principalmente es por medio de la orina y en humanos se ha reportado que la mayor parte corresponde a formas metiladas como DMA (60-70%) y MMA (10-20%), aunque también se excreta arsénico inorgánico (10-30%) (Vahter, 1999). Mientras que en los modelos animales se ha observado que la mayor parte del As que se absorbe es excretado rápidamente por medio de la orina como lo muestra el estudio de Hughes et al. (2003) al exponer ratones a una sola dosis o de manera repetida a 9 dosis de arsenato en una concentración de 0.5 mg As/kg por vía oral, siendo el metabolito predominante en la orina el DMA^V (aproximadamente 9-10 $\mu\text{g}/\text{día}$) y en un período de 24 h después de la administración de arsenato marcado radioactivamente.

Los metabolitos producidos durante el proceso de biotransformación juegan un papel fundamental en la toxicidad y en la excreción del arsénico, entre los cuales el MMA y el DMA resultan ser más reactivos en comparación con el As inorgánico (As_i) (Vahter, 2002). Particularmente, las formas trivalentes del As_i (MMA^{III} y DMA^{III}) se ha descrito que producen efectos de inhibición enzimática, citotoxicidad y genotoxicidad (Styblo et al., 2000; Waters et al., 2004).

2.1.4 Mecanismo de acción

Los mecanismos celulares y moleculares del As no están claramente definidos, ya que debido a su especiación y a los efectos duales de este metaloide puede existir más de un mecanismo. La evidencia experimental ha mostrado que el As induce estrés oxidante en las células a partir de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS); que puede unirse a los grupos sulfhidrilo de péptidos y proteínas (Fluharty y Sanadi, 1960), así como a enzimas dependientes de zinc (Kitchin y Wallace, 2008); puede provocar daño en el DNA y alterar los procesos de reparación de éste; así como modificar la expresión de genes e interferir con las vías de transducción de señales nucleares y citoplasmáticas. Actualmente el estrés oxidante es

uno de los mecanismos más estudiados y tiene amplia aceptación como modelo para explicar la toxicidad del As (Flora, 2011).

Los radicales libres que se producen derivados de la exposición al As incluyen el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), al oxígeno singulete (1O_2), el radical dimetilarsénico ($(CH_3)_2As^{\cdot}$) y el correspondiente radical peroxil ($(CH_3)_2AsOO^{\cdot}$) (Yamanaka et al., 1990; Kitchin, 2001; Flora, 2011).

Una producción importante de estos radicales se lleva a cabo en las mitocondrias a nivel del complejo I y II de la cadena transportadora de electrones, ya que este organelo es un blanco directo del arsénico (Németi y Gregus, 2002). El aumento de ROS causa desequilibrio en la concentración del calcio celular y disminuyen el potencial de membrana mitocondrial, permitiendo la apertura del poro membranal y la liberación excesiva del citocromo C de la mitocondria, lo cual activa diversas rutas de señalización cascada abajo activando la apoptosis dependiente de caspasas. En cuanto a las vías de señalización las más afectadas incluyen al sistema de fosforilación de tirosina, las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y diversos de factores de transcripción que incluyen al factor nuclear kappa B (NFKB), el activador de la proteína 1 (AP-1) y el factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2), entre otros (Flora, 2011).

Por ejemplo, Nrf2 regula la maquinaria transcripcional para el sistema de defensa celular incluyendo las enzimas antioxidantes y de la fase II que metabolizan drogas. Tanto Nrf2 como la proteína tipo kelch de unión a actina (Keap1) están formando en condiciones fisiológicas un complejo, las ROS pueden interactuar con Keap1 y Nrf2, estas dos proteínas son importantes porque detectan los antioxidantes presentes y ofrecen una respuesta celular adaptativa contra el arsénico (Kumagai y Sumi, 2007).

Por otra parte, el arsénico causa la modificación del DNA particularmente a través del radical $\cdot OH$ porque interactúa con todas las bases del DNA (este ácido es sensible porque presenta puentes insaturados en los anillos de purina y pirimidina); asimismo, el As interfiere con la maquinaria de reparación del DNA y regula a la baja la expresión de los genes de enzimas involucradas en la reparación. Otro tipo de genes que son alterados son los de la superfamilia de genes Ras que codifican para pequeñas GTPasas e incluye a Rac1 que regula el ciclo celular, la adhesión célula-célula, la motilidad y la diferenciación epitelial (Kitchin y Conolly, 2010).

Otro factor que contribuye al estrés oxidante en las células deriva del efecto del As sobre las enzimas que metabolizan ROS o enzimas antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión transferasa (GST) y glutatión reductasa (GR). Entonces, si la respuesta antioxidante es abrumada las células son más vulnerables a la toxicidad del arsénico, hay daño macromolecular irreversible y posteriormente la apoptosis. Aunque también puede ocurrir la proliferación celular descontrolada y defectuosa (Kitchin y Conolly, 2010; Jomova et al., 2011).

Estos eventos celulares son relevantes porque la manifestación de la toxicidad del As en los individuos expuestos se refleja en anomalías en el epitelio cutáneo (hiperpigmentación e hiperqueratosis) o en el desarrollo de cáncer de órganos internos (Smith et al., 2000, 2011); así como efectos teratogénicos o neurotoxicidad debido a la exposición prolongada.

Las especies reactivas de oxígeno están involucradas en el daño oxidante a lípidos, siendo particularmente susceptibles los ácidos grasos poliinsaturados; al interactuar estos con los radicales libres forman productos como malondialdehído (MDA), 4-hidroxinonenal (HNE) y 2-propenal (acroleína) e isoprostanos, dichos productos se usan comúnmente como biomarcadores de estrés oxidante. Los ácidos grasos poliinsaturados son muy abundantes en el cerebro y por ende son susceptibles de daño, ya que la lipoperoxidación es un factor común en los diferentes modelos *in vivo* que muestran un aumento en los niveles malondialdehído vía la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), aunque las estrategias experimentales difieren es consistente el aumento en la lipoperoxidación (Rodríguez y Giordano, 2009).

Sólo por citar un ejemplo, el As induce lipoperoxidación tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el sistema nervioso periférico (SNP) en las ratas tratadas con 10 mg As/kg administrado por una sonda durante 30 días en comparación con los grupos control, siendo el daño periférico mayor que a nivel central de acuerdo a la distribución de TBARS (nervio sural>nervio ciático>médula espinal~cerebro total) (García-Chávez et al., 2006).

Con base en lo anteriormente expuesto, es necesario desarrollar estrategias que permitan conocer con mayor profundidad cuáles son los efectos de este metaloide que

está causando efectos adversos en la salud pública de alrededor de 200 millones de personas a nivel mundial (Flora, 2011). Dado que la exposición a metales puede tener efectos sobre sistemas particulares a nivel del SNC, como es el caso del sistema dopaminérgico (Jones y Miller, 2008) y los sistemas nigroestriatal y mesolímbico (Rodríguez y Giordano, 2009), en este estudio nos enfocaremos en ellos.

2.2 SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS

Las monoaminas comprenden a las catecolaminas dopamina (DA), epinefrina (E) y norepinefrina (NE) y a las aminas biogénicas (entre éstas la serotonina, 5-HT), se producen en el cerebro, en células cromafinas y en los nervios simpáticos a partir del aminoácido tirosina, mientras que la 5-HT es producida a partir del aminoácido triptófano (Cooper et al., 2003; Siegel et al., 2006).

La organización básica de los sistemas neuronales que contienen catecolaminas y sus proyecciones axonales, específicamente la de las monoaminas está bien representada en una serie de nueve grupos celulares dopaminérgicos (A8 hasta A16) en el cerebro de mamíferos los cuales están distribuidos desde el meséncéfalo hasta el bulbo olfatorio (Figura 2), aunque la distribución de los diferentes cuerpos dopaminérgicos puede variar entre especies (Björklund y Dunnett, 2007).

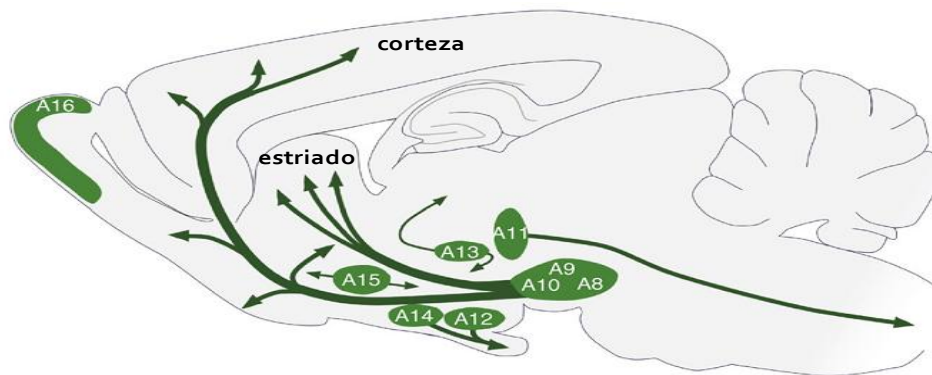


Figura 2. Localización y proyecciones de 9 grupos dopaminérgicos (A8 a A16) en el cerebro de una rata adulta (Modificado de Björklund y Dunnett, 2007).

Muchos de los cuerpos dopaminérgicos en el cerebro humano (cerca de 40 000) se encuentran en el núcleo denominado A9, el cual forma la zona compacta (la parte

dorsal de la *sustancia nigra* o SNC) y un número menor se distribuye en la zona más ventral o *reticulata* y en la zona lateral.

Los axones que proyectan de A9, junto con una pequeña contribución de los núcleos de A8, forman la principal ruta conocida como nigroestriatal que proyecta al estriado (núcleo caudado y putamen) y a la amígdala.

Existe una ruta más medial que proviene de un núcleo denominado A10, área tegmental ventral, la cual inerva el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio, esta vía se conoce como mesolímbica y también tiene conexiones con la corteza (sistema mesocortical), particularmente con la corteza prefrontal y perirrinal.

Otra vía importante está constituida por las proyecciones del núcleo arcuato (A12), dicha vía denominada tuberoinfundibular proyecta a la eminencia media y a la glándula pituitaria (Cooper et al., 2003).

2.2.1 Dopamina

La DA es un neurotransmisor catecolaminérgico muy importante en el SNC y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad¹, así como en la comunicación neuroendocrina, por lo que es un neurotransmisor con una regulación muy fina. Las neuronas dopaminérgicas constituyen la mayor fuente de DA en el SNC y dadas las características bioquímicas de estas células son propensas al daño por estrés oxidante debido a una tasa alta del metabolismo del oxígeno, los bajos niveles de antioxidantes y su alto contenido de hierro (Chinta y Andersen, 2005). Asimismo, se ha descrito que estas células son susceptibles a las alteraciones por la exposición a tóxicos ambientales (metales pesados y pesticidas), de tal manera que actúan sobre uno o múltiples aspectos de la neurotransmisión dopaminérgica y pueden propiciar la aparición de alteraciones en la conducta, enfermedades como el Parkinson o aumentar la sensibilidad a ciertas drogas, por ejemplo (Jones y Miller, 2008).

De manera fisiológica, la función de la DA se asocia con un efecto directo sobre la actividad de los ganglios basales como en el neostriado, núcleo blanco de la vía

¹ La emoción es una respuesta individual que describe y valora el estado de bienestar o la probabilidad de supervivencia en cada situación (sólo se experimenta). Mientras que el afecto es un proceso de interacción social entre dos o más organismos (se proporciona o recibe afecto) (Plutchik, 2008).

nigroestriatal; se ha sugerido también que los efectos de la transmisión dopaminérgica sobre los comandos motores pueden reflejar acciones combinadas de la DA en el neostriado, en la sustancia nigra pars reticulata (SNpr) y en el núcleo subtalámico (NST) (Waszczak y Walters, 1983). Además de la función motora, la DA se ha vinculado con procesos motivacionales como las conductas de tipo adictivo y la percepción del placer. Entonces, la acción de la DA en núcleos de los ganglios basales es importante en el proceso de la motivación y la acción. Por otra parte participa en la regulación neuroendocrina y en la cognición (Björklund y Dunnett, 2007).

Los núcleos asociados con la función motora y motivacional son muy vulnerables debido a sus características bioquímicas, las alteraciones en su funcionamiento se reflejan en alteraciones en la conducta (Giordano, 2007); por lo que resulta cada vez más interesante tratar de dilucidar cuál es el efecto del As sobre los sistemas dopaminérgicos mediante un modelo como la conducta motora que nos permite hacer buenas aproximaciones sobre los cambios que ocurren debido a la exposición a xenobióticos.

2.2.2 Síntesis y metabolismo de la dopamina

La DA se produce en las terminales nerviosas dopaminérgicas en un proceso que depende de la actividad de la enzimas tirosina hidroxilasa (TH) y descarboxilasa de ácidos aromáticos o DOPA descarboxilasa (DDC). El proceso inicia con la hidroxilación del aminoácido L-tirosina, la enzima TH cataliza la adición de un grupo hidroxilo en la posición meta de la tirosina para formar la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). La TH también puede hidroxilar la fenilalanina a la forma de tirosina, la cual es entonces convertida a L-DOPA, que bajo la acción de la enzima DDC, da origen a la DA (Siegel et al., 2006) (Figura 3).

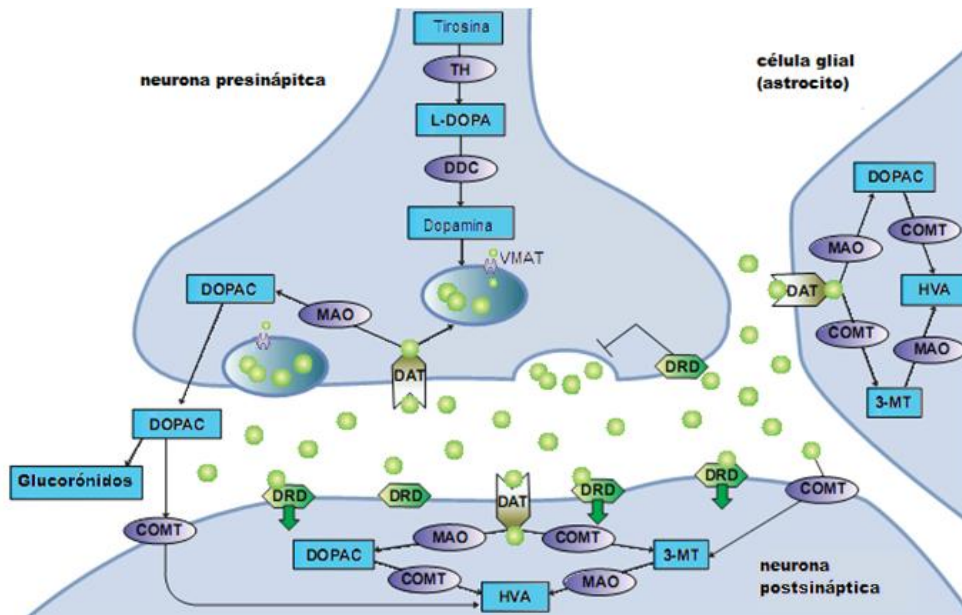


Figura 3. La ruta de síntesis de la dopamina (DA) inicia con la conversión de la tirosina a levodopa (L-DOPA) y la subsecuente descarboxilación de ésta a DA por medio de la DOPA descarboxilasa (DDC). La DA puede ejercer su acción sobre las neuronas postsinápticas al interactuar con sus receptores (DRD). Este neurotransmisor es metabolizado principalmente por la monoaminoxidasa (MAO) a ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y por la catecol metiltransferasa (COMT) a ácido homovanílico (HVA) (Modificado de Quaak et al., 2009).

Se ha observado que la DA que se libera de manera preferente en respuesta a la estimulación sináptica es la recién sintetizada. La regulación de la liberación de DA es muy fina y puede estar determinada por autoreceptores o heteroreceptores. Mediante los autoreceptores (clasificados como receptores D2 o DAR2) se puede modular la síntesis, la liberación y el impulso eléctrico, ya que son de 5 a 10 veces más sensibles a los efectos de la DA y porque su localización también influye en el sistema de retroalimentación de la transmisión dopaminérgica. Por ejemplo, los autoreceptores que se localizan en la porción somatodendrítica al ser estimulados disminuyen la velocidad de disparo de las neuronas dopaminérgicas; mientras que los que se encuentran en la terminal nerviosa inhiben la síntesis y la liberación de DA (Cooper et al., 2003). Por otra parte, la regulación por heteroreceptores está asociada a la presencia de otro tipo de receptores en las terminales dopaminérgicas tales como receptores a GABA, glutamato, acetilcolina y serotonina, por ejemplo la liberación de DA puede ser estimulada por la activación de receptores glutamatérgicos, GABAérgicos o colinérgicos (Bahena-Trujillo et al., 2000).

El efecto de la dopamina termina cuando se recaptura por las propias terminales nerviosas que la liberaron. La DA es entonces convertida en ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) por la enzima monoamino oxidasa (MAO), en particular por la isoforma A que está presente dentro de la terminal nerviosa; a su vez el DOPAC puede difundir al exterior de la terminal para ser convertido en ácido homovanílico (HVA) por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT). Mientras que la DA no capturada por la terminal dopaminérgica es metabolizada en HVA por la acción secuencial de las enzimas COMT y MAO A (Cooper et al., 2003). En el cerebro de la rata el principal metabolito de la DA es el DOPAC, de tal suerte que el DOPAC puede utilizarse como un indicador de la actividad dopaminérgica, pues implica que la dopamina fue liberada y después recapturada por la terminal, aunque también la determinación de HVA en tejidos cerebrales y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) se usa como índice de la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Bahena-Trujillo et al., 2000).

2.2.3 Receptores de dopamina

Como se mencionó previamente, la DA tiene un papel importante en el control de los movimientos y en diversas funciones fisiológicas, tales como la modulación de algunas hormonas. El efecto de la DA inicia con la estimulación de alguno de los 5 receptores que se localizan en la membrana de las células (Neve, 2010).

Los receptores se definen como proteínas especializadas que reconocen selectivamente a un ligando (agonista o antagonista) y que se activan con eficacia intrínseca (agonista) para iniciar un evento celular (Bahena-Trujillo et al., 2000).

Los receptores a DA pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, los cuales poseen 7 dominios transmembranales de 20 a 25 residuos hidrofóbicos cada uno. Los dominios intramembranales están conectados de forma alterna por asas citoplasmáticas (i1, i2, i3) y extracelulares (e1, e2, e3) y la región amino terminal corresponde a un dominio extracelular glicosilado. Existen 5 subtipos de receptores, los cuales han sido agrupados en 2 familias farmacológicas denominadas D1 y D2. Los receptores D1 comprenden a los receptores de tipo D1 y D5 que se caracterizan por tener un asa corta y una región carboxilo terminal grande, que se acopla a proteínas G estimuladoras (G_{cs}); mientras que la familia de receptores tipo D2

comprende a los receptores D2, D3 y D4, que están acoplados a proteínas G inhibitoras ($G_{\alpha i}$), tienen una estructura i3 larga y un extremo carboxilo terminal corto (Figura 4).

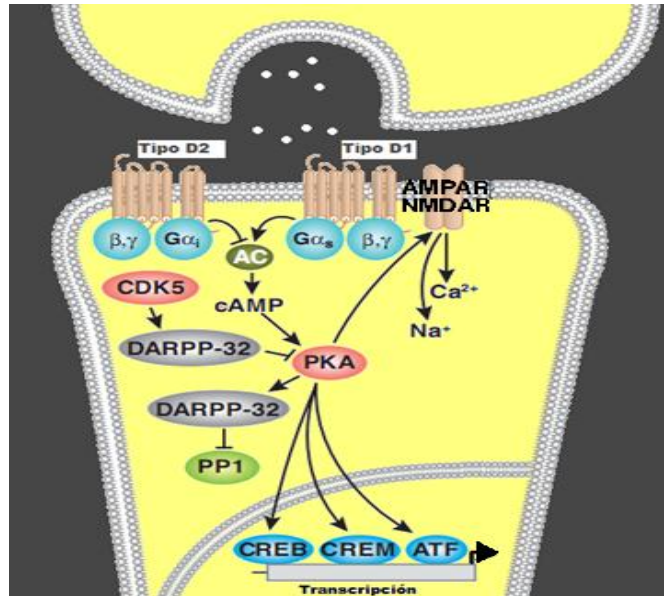


Figura 4. Los receptores de dopamina tipo D1 y D2 se acoplan diferencialmente a proteínas G que activan ($G_{\alpha s}$ o G_{β}) o inhiben ($G_{\alpha i}$) a la adenilato ciclasa (AC) para iniciar la señalización de la DA. La vía de activación requiere la conversión del ATP en AMPc, el cual desinhibe a la subunidad catalítica de una cinasa (PKA); a este nivel se regula la actividad de la PKA mediante la fosforilación de la fosfoproteína DARPP32 en diferentes residuos de treonina (Thr 34 ó Thr 75). La fosforilación de CREB modulada por la PKA, así como la activación de elementos moduladores (CREM) y el factor activador de la transcripción (ATF) permiten que se lleve a cabo la transcripción de numerosos genes y, por tanto, la modulación de procesos complejos como el movimiento. (Modificado de Cell Signaling Technology, 2011). [<http://www.cellsignal.com/pathways/neuroscience.jsp>].

Las vías de señalización que se activan por la estimulación del receptor pueden regularse mediante la producción de segundos mensajeros (AMPc) y la activación de proteínas cinasa A (PKA), a su vez reguladas por la fosforilación de DARPP-32; lo cual permite la fosforilación de una proteína (CREB) para que se inicie el proceso de transcripción de numerosos genes (Neve et al., 2010).

La serie de procesos desencadenados una vez que la DA interactúa con su receptor reflejan una regulación muy fina a nivel celular. Asimismo, la organización de los receptores en circuitos neuronales específicos tiene un papel importante en la modulación dopaminérgica que se lleva a cabo en el estriado a nivel de dos vías. La vía estriato nigral o vía directa cuyas neuronas (expresan sustancia P, dinorfina y receptores dopaminérgicos de la familia D1) envían proyecciones al globo pálido interno

(GPi) y SNpr; mientras que la vía estriato palidal o vía indirecta (cuyas neuronas expresan encefalina y receptores dopaminérgicos de la familia de receptores D2) actúa directamente sobre el GPi mediante acción inhibitoria e indirectamente a través de la sinapsis interpuesta con el NST y el GPi (Gerfen, 2006).

Básicamente, las neuronas medianas espinosas de la ruta directa expresan al receptor de dopamina D1 y las de la ruta indirecta expresan el receptor D2, la activación de estas vías puede resultar en la facilitación o inhibición del movimiento, respectivamente.

Lo descrito anteriormente permite entender entonces porque la distribución de los receptores de dopamina en el SN es amplia y abundante. El RNAm que codifica para el receptor D1 y para el D2, así como la expresión de la proteína es predominante en comparación con los otros tipos. Su presencia se ha detectado en el caudado-putamen, el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio, mientras que en el septum lateral, el bulbo olfatorio, el hipotálamo y la corteza su presencia es menor (Meador-Woodruff et al., 1991). Particularmente el receptor D2 se ha implicado en la fisiopatología de desórdenes neurológicos como en la enfermedad de Parkinson (Gerfen, 2006; Tinsley et al., 2009).

Los receptores D3 y D4 son menos abundantes y no tienen una distribución tan amplia en comparación con el receptor D2. En el primer caso se encuentra presente en el núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, hipocampo, hipotálamo, neostriado y meséncéfalo. Mientras que el receptor D4 se encuentra primariamente en áreas de la corteza cerebral (Neve et al., 2010).

El receptor D5 se restringe a núcleos talámicos específicos e hipotalámicos y a las células del hipocampo, con poca expresión del mensajero en el estriado dorsal, núcleo accumbens y en el tubérculo olfatorio (Cooper et al., 2003).

2.3 EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO Y ALTERACIONES ASOCIADAS

2.3.1 *Alteraciones en seres humanos expuestos a As*

La exposición a As se ha asociado con alteraciones en el SNC y el SNP, algunas de éstas están relacionados con la encefalopatía y alteraciones de las funciones

neurológicas superiores como la memoria, la concentración, la comprensión verbal y la atención, así como neuropatía periférica (Rodríguez et al., 2003). Las alteraciones mencionadas anteriormente varían dependiendo de la ruta de exposición, el tiempo de exposición y de la concentración de As ingerido.

Se han asociado ciertas afecciones gastrointestinales, neurotoxicidad aguda en el SNC y SNP, así como deterioro de la memoria de 2 pacientes que ingirieron agua contaminada con altas concentraciones de As, el agua provenía de un pozo contaminado por residuos de una mina abandonada cercana cuyas concentraciones alcanzaron desde 900 hasta 10 900 $\mu\text{g As/L}$ (Franzblau y Lilis, 1989). Asimismo, Calderón et al. (2001) reportaron menor coeficiente intelectual y verbal en 2 poblaciones de niños de 6 a 9 años de edad que estuvieron expuestos a polvo contaminado con As. Los valores promedio de As medido en la orina fueron de 62.90 ± 0.03 ($\mu\text{g As/g creatinina}$) para la población de Morales en San Luis Potosí, ubicada a 1.5 km de la fuente de emisión de un complejo fundidor de cobre y zinc; mientras que en la población de referencia conocida como Martínez los valores fueron menores (40.28 ± 0.03 $\mu\text{g As/g creatinina}$) aún cuando está población estaba localizada a 7 km de distancia del complejo donde se localizaba la fundidora.

Este estudio es importante porque muestra de manera patente que los impactos ambientales originados casi una década atrás, reportados como contaminación ambiental por Díaz-Barriga et al. (1993) en el suelo y en polvo contaminado con As en la zona de Morales, tienen una relación directa en alteraciones de tipo cognoscitivo en la salud de los pobladores de esta zona.

Los datos reportados por Wasserman et al. (2004), en su estudio con niños de 10 años que estuvieron expuestos a una dosis mayor a 50 $\mu\text{g As/L}$ indicaron que estos eran menos eficientes en el desempeño de pruebas de funciones intelectuales. Otros estudios también han descrito alteraciones en el aprendizaje, la memoria y la concentración, así como disminución en el coeficiente intelectual en humanos por la exposición al As (Franzblau y Lilis, 1989; Mukherjee et al., 2003; Tsai et al., 2003) (Tabla 1).

Tabla 1. Alteraciones en el sistema nervioso debido a la exposición a arsénico en seres humanos (Modificada de Rodríguez et al., 2003).

Alteración	Vía de exposición	Concentración As	Referencia
Alteraciones en la memoria, confusión y alucinaciones visuales	Agua para beber	9 000- 10 900 µg/L agua	Franzblau y Lilis (1989)
Disminución en el coeficiente intelectual y verbal	Exposición ambiental	14.2 µg/L agua 502.4 µg/L suelo 857.0 µg/L polvo 0.48 µg/m ³ aire	Calderón et al. (2001) Díaz- Barriga et al. (1993)
Alteraciones en los patrones de memoria y deficiencias en la atención	Agua para beber	131.19 ± 343.70 µg/L en orina 184.99 ± 225.29 µg/L en orina	Tsai et al. (2003)
Irritabilidad, falta de concentración, depresión, alteraciones de sueño, neuropatía periférica	Agua para beber	100 - 1000 µg/L	Mukherjee et al. (2003)
Disminución en las funciones intelectuales (verbales, escala completa y ejecución)	Agua para beber	0.094 - 790 µg/L	Wasserman et al. (2004)

Los estudios epidemiológicos de este tipo permiten discutir el efecto que tiene el As en funciones complejas como la memoria a largo plazo y el que tiene al provocar cambios emocionales.

2.3.2 ALTERACIONES EN MODELOS ANIMALES EXPUESTOS A As

2.3.2.1 Efectos de la exposición a As en la conducta

En cuanto a los estudios conductuales en modelos animales se han descrito alteraciones en la conducta motora en roedores expuestos a As. Itoh et al. (1990) describieron el aumento y la disminución de la actividad motora horizontal y vertical de ratones de la cepa ddY expuestos a dosis de 3 ó 10 mg de trióxido de As/kg, durante 14 días de exposición. Asimismo, se observó que en ratones de la cepa C57Bl/6J

expuestos a concentraciones de 0.05, 0.5, 5.0 ó 50 mg As/L en el agua para beber presentan un mayor número de estereotipias y cambios en la actividad locomotora tanto en machos como en hembras durante 4 meses de exposición, observándose una mayor sensibilidad en las hembras al presentarse las alteraciones conductuales con una latencia menor en comparación con lo que ocurre con los machos (Bardullas et al., 2009).

Estudios en ratas de la cepa Sprague-Dawley han reportado una relación entre la concentración de As en el tejido cerebral y la presencia de deficiencias en la actividad motora cuando el As se administra por vía intragástrica en las dosis de 5, 10 ó 20 mg/kg durante 2 ó 4 semanas, lo cual refleja los efectos neurotóxicos de este metaloide (Rodríguez et al., 2001). Otro estudio de Rodríguez et al. (2002) con ratas Sprague-Dawley expuestas durante 4 meses a 36.70 mg As/L en forma de arsenito de sodio administrado en agua para beber, reportó aumento en la actividad locomotora, la cual dependió del inicio de la exposición a As (15 días de gestación o día postnatal uno). Asimismo, el estudio de Chattopadhyay et al. (2002) en ratas neonatales y sus madres expuestas a arsenito de sodio (0.03, 0.30 ó 3.00 ppm) reveló una reducción de la actividad locomotora espontánea, cuyo efecto se relacionó con la dosis de exposición. De manera similar, el estudio de Schulz et al. (2002) en ratas Wistar macho de 4, 8 y 12 semanas de edad expuestas a 3.33, 6.66 ó 13.3 mg As/kg reportó hipoactividad en el plano horizontal y disminución en la conducta de acicalamiento.

En un estudio reciente realizado por el grupo de Rodríguez et al. (2010) con ratas que fueron expuestas durante un año a arsenito de sodio a las dosis de 0.05, 0.5 ó 50 mg As/L administrado en el agua para beber, se encontró que el As en la dosis de 50 mg As/L disminuye la actividad locomotora en varios de los parámetros evaluados cuando son comparadas con el grupo control. Este estudio también pone en evidencia el hecho de que se necesitan tiempos prolongados de exposición a As para observar los efectos adversos (Tabla 2).

Tabla 2. Alteraciones conductuales en roedores después del tratamiento con arsénico (Modificada de Rodríguez et al., 2003).

Efecto en la Conducta	Dosis y ruta de administración	Tiempo de exposición	Forma del compuesto	Roedor	Referencia
Incrementa la actividad locomotora Disminuye la actividad locomotora	3 mg As/kg de peso de corporal 10 mg As/kg de peso corporal (IG)	2 semanas	Trióxido de arsénico	ratón	Itoh et al. (1990)
Disminuye la actividad locomotora	5, 10 ó 20 mg As/kg (IG)	2 a 4 semanas	Arsenito de sodio	rata	Rodríguez et al. (2001)
Incremento en la actividad locomotora espontánea	36.7 mg As/L (AB)	16 semanas GD 15 y PND 15	Arsenito de sodio	rata	Rodríguez et al. (2002)
Disminuye la actividad locomotora	0.03, 0.3, 3.0 ó 5.0 mg As/L (AB)	20 días	Arsenito de sodio	rata	Chattopadhyay et al. (2002)
Disminuye la actividad horizontal y el acicalamiento	26.6 mg As/kg de peso corporal (IG)	16 semanas	Arsenito de sodio	rata	Schulz et al. (2002)
Incremento y disminución de la actividad locomotora	0.05, 0.5, 5.0 ó 50 mg As/L (AB)	16 semanas	Arsenito de sodio	ratón	Bardullas et al. (2009)
Disminuye la actividad locomotora	0.05, 0.5 ó 50 mg As/L (AB)	1 año	Arsenito de sodio	rata	Rodríguez et al. (2010)

Nota: intragástrica (IG); agua para beber (AB); día de gestación (GD); día posnatal (PND).

Es preciso señalar que los efectos del As no describen necesariamente una relación dosis dependiente y que varían entre especies o en función del tiempo de exposición.

2.3.2.2 Efectos de la exposición a As en la neuroquímica monoaminérgica

Por otra parte, diversos estudios han descrito el efecto deletéreo del As sobre los sistemas monoaminérgicos (Mejía et al., 1997; Rodríguez et al., 2001), colinérgico, GABAérgico, (Kobayashi et al., 1987) y glutamatérgico (Nagaraja y Desiraju, 1994), ya que modifica su metabolismo y función, alterando los niveles de estos neurotransmisores y sus metabolitos (Itoh et al., 1990). Por ejemplo, se ha reportado un

aumento en los niveles de 5-HT y NE en la corteza, en el hipocampo, en el hipotálamo y en el estriado de ratones expuestos a 10 mg/kg de trióxido de As durante 14 días; asimismo, se ha observado una disminución en los niveles de DOPAC y HVA en el estriado pero a una dosis de 3 mg/kg de trióxido de As (Itoh et al., 1990).

A estos estudios se suma el trabajo de Mejía et al. (1997) donde la administración de 13.8 mg/kg/día de arsenito de sodio produjo disminución de los niveles de DA (en estriado), DOPAC (en hipotálamo), de 5-HIAA (en estriado y mesencéfalo) y disminución en los niveles de NE (en hipotálamo); mientras que en la corteza disminuyeron los niveles de DOPAC con la dosis de 11 mg/kg/día de As.

En el estudio de Delgado et al. (2000) los ratones que fueron expuestos a 0, 20, 40, 60 ó 100 mg As/L en el agua para beber durante 9 semanas mostraron una disminución en los niveles de DOPAC en la corteza frontal, así como en los niveles de DA en el hipotálamo (desde un 51% hasta un 67%, dosis dependiente) y en la corteza frontal (con la dosis de 60 mg As/L). La dosis de 60 mg As/L produjo disminución de los niveles de 5-HT en el puente y la médula; mientras que los niveles de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de NE no se alteraron con ningún tratamiento.

En el estudio de Bardullas et al. (2009) se demostró que existen diferencias de género en ratones de la cepa C57Bl/6J expuestos a 0.05, 0.5, 5.0 ó 50 mg As/L en el agua para beber. Los ratones macho no mostraron alteraciones, pero en las hembras disminuyeron los niveles de dopamina y aumentaron los niveles de DOPAC en el estriado en la mayoría de las dosis, con excepción de la dosis más baja. Otra región donde los niveles de DA disminuyeron fue en el hipotálamo, en este caso todos los tratamientos administrados con As tuvieron efecto.

Otros estudios que demostraron alteraciones en los niveles de neurotransmisores y sus metabolitos usando como modelo experimental a la rata son los de Tripathi et al. (1997), Kannan et al. (2001) y Rodríguez et al. (2010). En el primer caso, las ratas fueron expuestas a arsenito de sodio (100 mg As/L) en el agua para beber y observaron un incremento en la concentración de As en el cerebro acompañado de una disminución en los niveles de DA y NE, pero sin alteración en los niveles de 5-HT en comparación con los animales no tratados (Tabla 3).

Tabla 3. Efectos de la exposición de arsénico sobre los sistemas monoaminérgicos en roedores (Modificada de Rodríguez et al., 2003).

Región cerebral	Efecto	Tiempo de exposición	As	Dosis y ruta de administración	Roedor	Referencia
Corteza Estriado	↑ NE, DOPAC, 5-HT, 5-HIAA ↓ DOPAC, HVA ↑ 5-HT, 5-HIAA	2 semanas	Trióxido de arsénico	3 ó 10 mg As/kg de peso corporal IG	ratón	Itoh et al. (1990)
Estriado Corteza Hipotálamo	↓ DOPAC, 5-HIAA ↑ DOPAC ↑ DOPAC, ↓ NE	2 semanas	Arsenito de sodio	11 y 13.8 mg As/kg de peso IG	ratón	Mejía et al. (1997)
Corteza	↓ DOPAC	9 semanas	Arsenito de sodio	20, 40, 60 80 ó 100 mg As/L AB	ratón	Delgado et al. (2000)
Cerebro	↓ DA, NE	16 semanas	Arsenito de sodio	100 mg As/L AB	rata	Tripathi et al. (1997)
Cerebro	↓ DA	16 semanas	Arsenito de sodio	25 mg As/L AB	rata	Kannan et al. (2001)
Estriado	↓ DA ↑ DOPAC	16 semanas	Arsenito de sodio	0.05, 0.5, 5.0 ó 50 mg As/L AB	ratón	Bardullas et al. (2009)
Estriado	↑ DA	1 año	Arsenito de sodio	0.05, 0.5 ó 50 mg As/L AB	rata	Rodríguez et al. (2010)

Nota: intragástrica (IG), agua para beber (AB), dopamina (DA), norepinefrina (NE), serotonina (5-HT), ácido 3-4 dihidroxifenil acético (DOPAC), 5-hidroxiindol acético (5-HIAA), monoamino oxidasa (MAO), acetil-colinesterasa (AChE).

El estudio de Kannan et al. (2001) reportó que la administración de 10 ó 25 mg As/L en el agua para beber durante 16 semanas produce disminución en los niveles de DA con ambas dosis sin alterar los niveles de NE y 5-HT, con respecto al grupo control. Mientras que el estudio de Rodríguez et al. (2010), describió un aumento en los niveles de DA en el estriado de las ratas tratadas solamente con la dosis de 50 mg As/L, otras regiones como el núcleo accumbens o la corteza prefrontal no mostraron alteraciones en los niveles de DA o 5-HT.

Los resultados tanto a nivel conductual como neuroquímico debidos a la exposición al As en los modelos animales son difíciles de conciliar porque existe variabilidad entre cepas de roedores (Adams et al., 2002; Cabib et al., 2002). En este estudio optamos

por un modelo experimental que simula la exposición en condiciones ambientales para los humanos (usando dosis relevantes para el ambiente) y también considerando que la variabilidad genética individual es un factor importante en el proceso de biotransformación de los tóxicos (Klaassen, 2008). El modelo animal que usamos (ratones de la cepa CD-1, outbred) muestra un amplio repertorio conductual que puede ser bien caracterizado, además de que esta cepa posee amplia variabilidad genética (Adams et al., 2002) en comparación con las cepas de tipo endogámico (llamadas en inglés inbred).

2.4 ETOGRAMA DE Mus musculus Y CEPA CD-1

Dado que la mayoría de los estudios se han enfocado en evaluar la actividad locomotora *grosso modo*, también es necesario describir qué otros aspectos de la conducta pueden ser afectados, ya que la conducta puede ser usada como un índice sensible de posibles cambios en las funciones centrales (Kulig y Jaspers, 1999). El modelo del ratón representa un abanico de posibilidades para explorar la conducta locomotora, ya que estos organismos ejecutan una gran variedad de conductas bien tipificadas como la locomoción, el olisqueo, las incorporaciones y el acicalamiento, por lo que a continuación se describen características generales de nuestro modelo de estudio, con un enfoque en la conducta agresiva.

Las conductas como la interacción social y la agresión representan estimadores confiables en la evaluación de los trastornos neuroconductuales en animales. En este contexto, diferentes pruebas han demostrado ser eficientes en la valoración de las alteraciones inducidas por psicofármacos o sustancias neurotóxicas (Fracchia et al., 2003).

La descripción conductual hecha por Koolhaas et al. (1980) usando como herramienta experimental el paradigma residente-intruso con ratas indica la frecuencia y preferencia por conductas de tipo social (representadas por el tamaño de los círculos y dirección de las flechas) en contraste con las conductas asociadas con la agresión (Figura 5).

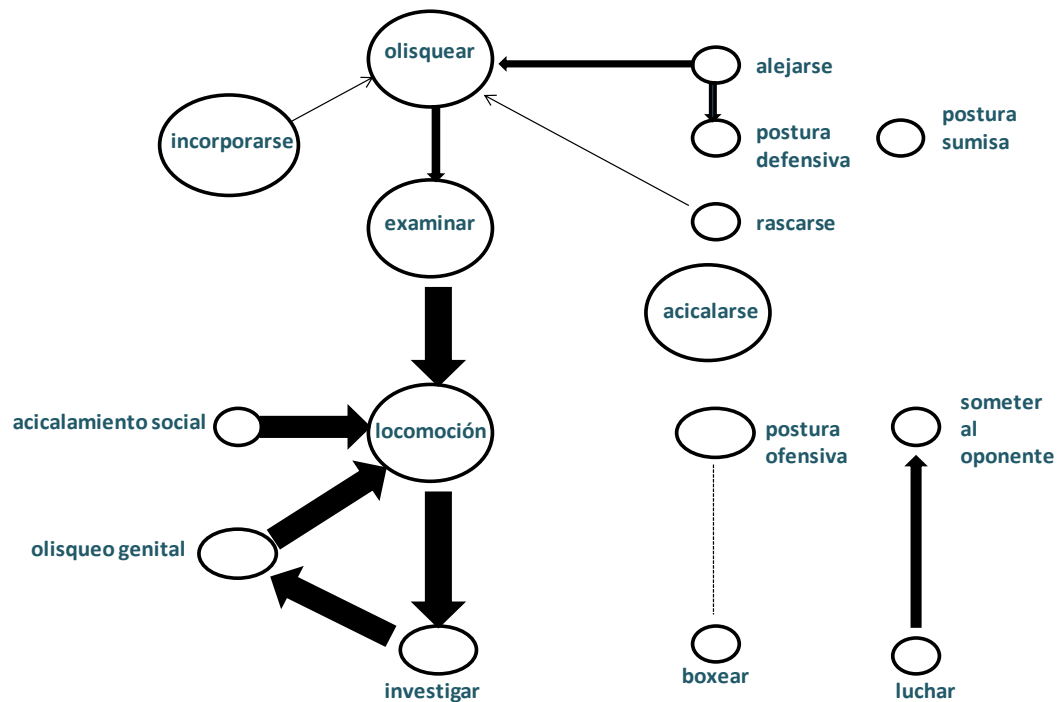


Figura 5. Estructura de la conducta de ratas cuando están en presencia de un conoespecífico subordinado. El tamaño de los círculos y el grosor de las flechas indican la preferencia por una conducta determinada (Modificado de Koolhaas et al., 1980).

No existen diferencias entre las conductas de ratas y ratones, salvo el hecho de que los ratones suelen ser más agresivos, tomando como referencia que el porcentaje de los ataques dirigidos hacia el cuerpo del oponente es mayor que en las ratas (Blanchard et al., 2003).

El ratón es una especie social, pero también la expresión de la conducta agresiva es un componente que determina el éxito reproductivo y regula la densidad de animales dependiendo de las condiciones ecológicas (Kawai et al., 2003).

2.4.1 Conducta agresiva

El hecho de que el término agresión no pueda ser definido como una conducta unitaria, ha propiciado que sea utilizado para referirse a una variedad de conductas de ataque motivadas y dirigidas (Blanchard et al., 2003). Sin embargo, también se puede emplear el término agonístico para aquellas conductas relacionadas con la agresión como las peleas o combates, las posturas de boxeo e incluso las conductas de sumisión, entre otras (Bell y Hepper, 1987). La agresión puede ser una conducta

biológicamente adaptativa importante en la adquisición de recursos, para la dominancia y el establecimiento de jerarquías sociales (Miczek et al., 2002). Bajo ciertas condiciones los animales de laboratorio pueden exhibir altos niveles de agresión, un patrón de conducta con ciertos aspectos similares a los de los seres humanos violentos (Centenaro et al., 2008).

Sin embargo, Karczmar et al. (1978) menciona que el término agresión sólo puede ser aplicado cuando se satisfacen los siguientes criterios: a) cuando un estímulo agresivo es dirigido hacia el otro sujeto, b) cuando hay evidencia de un intento de agresión, c) cuando hay evidencia de una aproximación a la conducta agresiva, o d) cuando hay una evidencia de que el blanco de ataque reacciona de manera adversa.

El ratón doméstico macho *Mus musculus* se caracteriza por ser extremadamente agresivo y territorial, sobre todo cuando los ratones macho se encuentran en ambientes seminaturales y en arenas artificiales complejas (Croft y Rowe, 1963). Asimismo, los ratones tienen el potencial de ser fuertemente territoriales aun cuando la densidad poblacional sea baja o moderada, o bien cuando los intereses de 2 o más individuos entren en conflicto.

La agresividad en el ratón puede ser inducida fácilmente en el laboratorio por medio del modelo de agresión conocido como “residente-intruso” (Miczek y de Boer, 2005). Como parte de las respuestas agonísticas típicas espontáneas podemos mencionar el establecimiento de territorialidad, luchas ritualizadas en las cuales deben existir los 2 componentes etológicos de la agresión (la ofensiva y la defensiva), así como la presencia de cicatrices en el cuerpo que indican el antecedente de peleas para establecer jerarquías. Aunque también, se pueden considerar la presencia de conductas de sumisión, interacción social, olfateo perineal y la huida (Koolhaas et al., 1980).

De esta manera, el estudio de la agresión en un modelo animal como el ratón, puede ser muy útil dado que establecen comunidades bien definidas jerárquicamente por medio de la conducta de dominación y subordinación. Hasta ahora no hay estudios que traten de esclarecer si el As promueve la presencia de conductas agresivas tal como se ha tratado de establecer con otras sustancias tóxicas o con otros metales

pesados, para el caso del As sólo Mukherjee et al. (2003) ha reportado irritabilidad en personas expuestas endémicamente a agua contaminada.

En cuanto a los estudios de agresión en modelos animales, se ha reportado que la exposición a acetato de plomo (Pb) en una dosis de 0.5 ppm produce en los ratones de la cepa C3H mayor frecuencia de conductas agresivas con respecto al grupo control, así como una disminución en el tiempo de latencia para iniciar el primer ataque (Fracchia et al., 2003). Mientras que Martínez et al. (2001) encontraron que la exposición a plomo (en concentraciones de 1, 1000 ó 2000 ppm de Pb en el agua para beber) no produce alteraciones en las conductas sociales y no sociales en los animales de experimentación adultos; no obstante, la inactividad de los grupos experimentales puede deberse a la exposición a dosis muy altas de Pb que pudieron provocar un malestar general.

Otro estudio que indica que la exposición de metales en bajas concentraciones aumenta la agresión es el de Cervantes et al. (2005), en el cual se expuso a hámsteres dorados a acetato de plomo a las dosis de 0, 25, 100 ó 400 ppm en el agua para beber. Sin embargo, cabe señalar que en este estudio los sujetos de estudio estuvieron aislados. Esta condición es importante considerarla en los estudios sobre agresión, dado que autores como Van Loo et al. (2001) han reportado que el aislamiento es un factor que aumenta o determina la expresión de dicha conducta.

Aunque en humanos se han descrito una serie de estudios que involucran al Pb como un factor que predispone a las conductas violentas en infantes que sufrieron intoxicación por este metal, como lo sugiere el aumento en la agresividad y la impulsividad, no se puede aseverar que el plomo sea el factor determinante para que estas conductas se presenten. Las observaciones deben tomarse con cuidado debido a que existen otros factores sociales asociados que pueden favorecer la presencia de la conducta agresiva, por ejemplo, el medio social en el que se desenvuelven los individuos (Wakefield, 2002; Bellinger, 2008).

En nuestro laboratorio, observaciones preliminares indicaron la presencia de conductas agresivas en los ratones de la cepa CD1, los cuales fueron expuestos a dosis de 0.05, 0.5, 5.0 ó 50 mg As/L por 4 meses (Limón-Pacheco, 2009; comunicación personal).

La mayoría de los estudios sobre la conducta agresiva se enfocan en describir los diversos tipos de agresión *per se* y en identificar la relación que existe entre este tipo de conducta y el papel que tienen algunas regiones particulares del cerebro como la amígdala, el hipotálamo y la sustancia gris periacueductal (Carlson, 1999). En otros casos, la estrategia experimental ha consistido en emplear diferentes fármacos para inducir conductas agresivas como lo hizo Valzelli (1967), al tratar de establecer una relación entre el aumento en el nivel de NE en el cerebro de ratas y la conducta agresiva. Mientras que Serri y Ely (1984) trataron de mostrar que niveles bajos de 5-HT en las áreas hipotalámicas ventromediales, supraópticas y en la amígdala, en diferentes cepas de ratones como CBA, C57BL y DBA, están asociados con la presencia de conductas agresivas.

2.4.2 Conducta estereotipada, sistema dopaminérgico y TOC

Otro tipo de conductas de interés son las estereotipias, ya que anteriormente se había señalado su presencia en ratones macho expuestos a 0.5 mg As/L (Bardullas et al., 2009) en una cepa con poca variabilidad genética como la de tipo endogámico C57Bl/6J. Las estereotipias se caracterizan por ser movimientos repetitivos, invariables y que no tienen un propósito aparente. Dichas estereotipias pueden presentarse en ocasiones como un componente de ciertos desórdenes del desarrollo, genéticos y neuropsiquiátricos, pero también se asocian a condiciones de restricción ambiental para los animales, como puede ser estar alojado en una caja de laboratorio (Muñoz-Yunta et al., 2005).

Aunque los mecanismos que regulan la expresión de las estereotipias espontáneas aún se desconocen, existe evidencia que apoya la hipótesis de que la conducta estereotipada se expresa como una consecuencia de un incremento en la actividad neuronal entre el circuito de retroalimentación corteza-ganglios basales-corteza, es decir las conductas repetitivas espontáneas están relacionadas con una alteración neuroquímica estriatal. De hecho se ha demostrado que las manipulaciones farmacológicas del estriado pueden inducir, exacerbar o atenuar las conductas estereotipadas (Presti et al., 2003) e incluso se ha propuesto la participación de receptores de DA (Aouizerate et al., 2004).

El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) se describe como un desorden complejo con diversas manifestaciones neurológicas y síntomas neuromotores tales como la estereotipia (Korff y Harvey, 2006), que en algunos casos pueden estar acompañados por la presencia de tics y tricotilomanía (Yaryura y Neziroglu, 2001). Las bases biológicas de este síndrome al parecer corresponden a la sobreactivación de la corteza orbitofrontal (COF) y de la corteza cingulada anterior (CCA) (Korff y Harvey, 2006); de tal manera que la sobreactivación de la COF permitiría la presencia de pensamientos y la generación cognoscitiva de señales inapropiadas de detección del error, esta incapacidad de detectar el error estaría promoviendo la presencia de dichas conductas descontroladas o conductas repetitivas (Alptekin et al., 2001) (Figura 6).

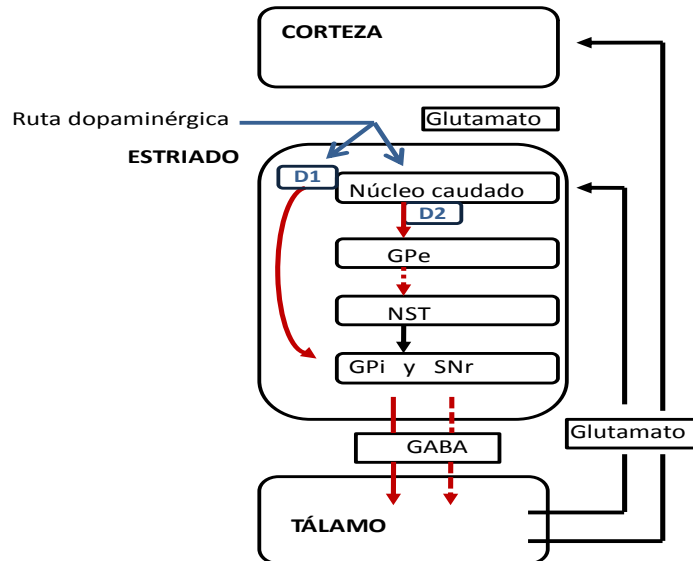


Figura 6. Alteración del circuito cortico-estriatal-tálamo-cortical (CSTC) en el trastorno obsesivo-compulsivo (TOC). La entrada cortical al estriado resulta en la activación del tálamo a través de la vía directa al globo pálido interno (GPi) y a la sustancia nigra pars reticulata (SNpr), mientras que la activación talámica decrece si se estimula la vía indirecta que incluye al globo pálido externo (GPe) y al núcleo subtalámico (NST). El circuito CSTC se cierra con las aferentes glutamatérgicas del tálamo a la corteza. En el TOC al parecer existe actividad exacerbada en la corteza y en el núcleo caudado, particularmente del núcleo caudado al GPi (Modificado de Korff y Harvey, 2006).

Los modelos animales que se han utilizado para abordar este trastorno comprenden la evaluación de conductas estereotipadas como la persecución de la cola, zigzaguar, el mordisqueo del pelo, el barbero o peluqueo, enterrar objetos y la dermatitis acral producida por lamerse la piel (Dodman y Shuster, 2005; Korff y Harvey, 2006). También existen otros modelos animales basados en la estereotipia y las compulsiones, cuya

limitante es la imposibilidad de observar las obsesiones que dirigen a la compulsión, dado que las obsesiones son de naturaleza cognitiva (Dodman y Shuster, 2005).

Como se mencionó anteriormente el TOC puede comprender un espectro de conductas asociadas tales como tricotilomanía en la que los animales tiran de su pelo (también conocido como barbereo), la cual es una conducta anormal en los ratones de laboratorio, pero no es necesariamente una conducta estereotipada. Aunque jalar el pelo es una conducta repetida, los patrones motores involucrados son variables y dirigidos (Sarna et al., 2000), distinto de las estereotipias en las cuales un patrón motor es repetido idénticamente sin alguna meta aparente.

Un estudio que valora la participación del sistema dopaminérgico en el control de las estereotipias es el de Glickstein y Schmauss (2004), al proponer que los mecanismos de control de las conductas motoras estereotipadas se deben a un exceso de la actividad de los circuitos neuronales de los ganglios basales que controlan la integración y el cambio de las respuestas motoras; ya que al sobreactivar el circuito con Anfetamina pueden observar estereotipias orofaciales tales como el mordisqueo, el lamer, morder y el acicalamiento.

Una de las posibles explicaciones que se han propuesto usando a los ratones como modelo es que las estereotipias focalizadas se presentan cuando los niveles de dopamina están aumentados más del 50% con respecto a los niveles normales y que estas estereotipias son sólo dependientes de la activación postsináptica del receptor D1 (Chartoff et al., 2001). Parece ser que los receptores tipo D1 y D2 juegan un papel importante en la inducción de estereotipias en respuesta a los psicoestimulantes que afectan las funciones dopaminérgicas pre y postsinápticas y en respuesta a la activación selectiva del receptor de DA postsináptico (Glickstein y Schmauss, 2004).

Estos antecedentes sobre la conducta estereotipada y la participación de los receptores de dopamina como promotores de dichos cambios podrían sugerir que la presencia de estereotipias en los ratones tratados con As (Bardullas et al., 2009) podría estar asociadas con una alteración a nivel de los receptores de dopamina. No obstante, el único antecedente sobre las alteraciones en los receptores de dopamina en modelos animales corresponde al estudio de Rodríguez et al. (2010) en el cual reportan disminución en la expresión del mensajero del receptor de dopamina en el núcleo

accumbens en ratas tratadas con arsenito de sodio (0.05, 0.5 ó 50 mg As/L) durante un año de exposición. Sin embargo, hay que considerar que la exploración en otros modelos animales como el ratón es necesaria, dado que la toxicocinética entre ratas y ratones es diferente.

3. JUSTIFICACIÓN

Diferentes reportes en la literatura, tanto internacionales como nacionales, han establecido una asociación causal de diferentes enfermedades en humanos expuestos al As. Asimismo, la información que se ha obtenido a partir de la experimentación en modelos animales también ha sido contundente al demostrar una asociación entre la exposición al As y los cambios que se producen a nivel celular y de manera sistémica (por ejemplo, a nivel de la conducta motora *grosso modo*). Sin embargo, los acercamientos que se han utilizado hasta ahora, han excluido la posibilidad de escudriñar con mayor detalle los diferentes componentes del repertorio conductual del modelo de estudio en cuestión en los estudios *in vivo*, así como las alteraciones sobre componentes particulares del SNC que no han sido explorados anteriormente.

Es importante realizar estudios en modelos animales que simulen lo más cercanamente posible las condiciones a las que los humanos están expuestos. Por lo que este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto que tiene el As en ratones expuestos de manera crónica y con dosis relevantes al medio ambiente, utilizando un modelo que presenta gran variabilidad genética como ocurre en los seres humanos.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis 1

La exposición crónica a As en agua para beber en concentraciones de 0.5 ó 5 mg As/L causará incrementos en la actividad locomotora espontánea, incrementos en el número de estereotipias e inducirá agresión exacerbada en los ratones macho CD-1.

Hipótesis 2

La exposición crónica a As en el agua para beber en concentraciones de 0.5 ó 5 mg As/L causará incrementos en los niveles de monoaminas (DA y 5-HT), sus metabolitos y causará aumento en el nivel de expresión de los receptores de dopamina en el estriado y núcleo accumbens de los sujetos expuestos.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el efecto de la exposición crónica a 0.5 ó 5 mg As/L administrado en agua para beber, sobre la actividad locomotora espontánea, la conducta agresiva y sobre los componentes del sistema dopaminérgico (monoaminas y receptores) del ratón CD1.

Objetivos específicos

Evaluar los efectos de la exposición a 0.5 ó 5 mg As/L, administrados en agua para beber, en:

1. la actividad locomotora espontánea.
2. la agresión.
3. la concentración de DA, 5-HT y de sus metabolitos DOPAC, HVA y 5-HIAA en el estriado, el núcleo accumbens y corteza frontal.
4. la expresión del mensajero de los receptores tipo D1 y D2 en el estriado y el núcleo accumbens.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 SUJETOS

Se usaron ratones macho de ocho semanas de edad de la cepa CD-1, que fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de Neurobiología-UNAM.

Cada uno de las pruebas realizadas se llevaron a cabo conforme las regulaciones establecidas por “El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación de la Salud” de la Secretaría de Salud Pública y según la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 en materia de “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”.

6.2 SOLUCIONES

Las soluciones de As se prepararon diariamente en agua desionizada a partir de una solución madre de 1000 mg As/L y el pH se ajustó a 7.0 para evitar la oxidación de arsenito a arsenato. El grupo control recibió agua desionizada con el pH ajustado a 7.0.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los ratones fueron asignados a 3 grupos experimentales de 15 ratones cada uno, los cuales fueron habituados a un ciclo invertido de luz/oscuridad (10:00/22:00 h). Los ratones tuvieron libre acceso al alimento (LabDiet 5001); asimismo, se permitió que los ratones bebieran agua *ad libitum* con alguno de los tratamientos (0.5 ó 5 mg As/L o bien agua desionizada). Todas las soluciones para beber fueron ajustadas a pH 7.0 y fueron administradas durante los 6 meses que duró el tratamiento.

Semanalmente se hicieron registros del peso corporal de los sujetos, así como una evaluación de la apariencia física que comprendía la evaluación de las características clasificadas como lesiones (heridas en el dorso, en las patas y en la región anogenital) y aquellas clasificadas como no lesiones (bigotes recortados, partes del cuerpo sin pelo y presencia de pelo erizo).

Se determinó la actividad locomotora espontánea al finalizar cada mes de tratamiento, así como la conducta estereotipada, la conducta agresiva y otras conductas típicas de los roedores como el acicalamiento y las incorporaciones.

Al finalizar el tiempo de exposición se sacrificó a los animales y se hicieron las disecciones del estriado y núcleo accumbens. Cada tejido se almacenó a -80 °C para analizar posteriormente el contenido de monoaminas y el RNAm de los receptores de DA (Figura 7).

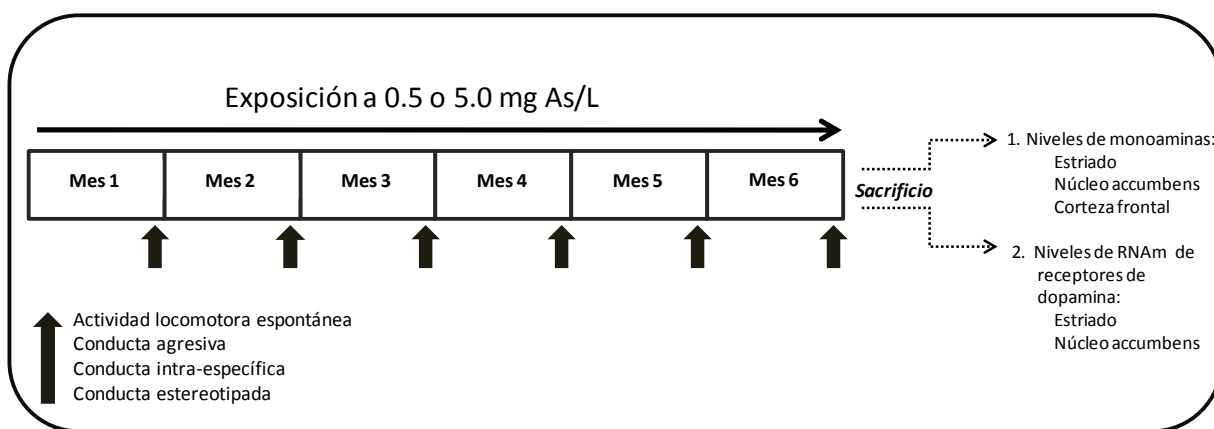


Figura 7. Secuencia de la metodología experimental, los grupos experimentales fueron expuestos durante 6 meses a arsénico (As) (Mes 1 al Mes 6).

7.1 PRUEBAS CONDUCTUALES

7.1.1 *Actividad locomotora espontánea*

La actividad locomotora espontánea se registró durante 25 h en un sistema de monitoreo de actividad animal estandarizado (Digiscan Animal Activity Monitors Accuscan Inc., Columbus OH) (Sanberg et al., 1987). Se depositaron a los ratones en las cajas y se registraron los siguientes parámetros:

- Distancia total recorrida (DT). Indicador de la actividad ambulatoria, el número resultante (cm) indica la distancia recorrida por el animal.
- Actividad horizontal (AH). Número total de interrupciones del sensor horizontal que ocurren durante tiempo de registro.
- Número de estereotipias (NE). Número de veces que el monitor registra al animal interrumpiendo el rayo de luz repetidamente.

7.1.2 *Conducta estereotipada*

Los ratones se depositaron individualmente en una caja de acrílico y se les permitió habituarse a la caja durante 8 minutos, transcurrido este tiempo se registraron las conductas estereotipadas clasificándolas como incorporaciones con o sin apoyo de la caja. El criterio para considerar una conducta como estereotipada fue con base en una modificación de la escala propuesta por Creese e Iversen (1973) y consistió en lo siguiente:

- a) La conducta debe mantenerse al menos por 5 s.
- b) Las incorporaciones sin apoyo se refieren a aquellas que realiza el ratón en el centro de la caja y describen una extensión completa del tronco del cuerpo del animal y, por tanto, rebasan la altura promedio del animal si éste estuviera apoyado en sus 4 extremidades.

- c) Las incorporaciones con apoyo se contabilizan siempre y cuando el ratón extiende completamente el tronco y permanezca de manera vertical, pero apoyado en las paredes de la caja en la que está siendo observado.

Para determinar cuáles conductas estereotipadas fueron precedidas o seguidas por conductas motoras específicas (tales como la inactividad o el acicalamiento) y en general la conducta social, se hizo un análisis secuencial utilizando las herramientas estadísticas del software The Observer (Noldus, Wageningen, Holanda).

7.1.3 Paradigma residente-intruso

Antes de iniciar la prueba de agresión se colocó durante 5 min en una caja a uno de los ratones experimentales (control o expuesto a alguna de las dosis con As), lo cual sirvió como período de habituación a la caja y, posteriormente, se registró la conducta agresiva.

Para evaluar la conducta agresiva se usó el paradigma residente-intruso como se ha reportado por Wersinger et al. (2007). El modelo consiste en depositar a un individuo en una caja e inmediatamente después se introduce en la caja a un ratón intruso (el cual es independiente a los grupos experimentales) y se observa la presencia de conductas agresivas durante 5 min. Cada uno de los componentes evaluados de la conducta agresiva de un residente hacia un intruso estuvo enfocado en evaluar el repertorio típico de conductas agresivas, desde los actos ofensivos, así como las posturas defensivas propuestas como repertorio conductual por Miczek et al. (2002).

Se midió el grado de agresión de acuerdo al paradigma descrito anteriormente, y se clasificó como conducta agresiva de acuerdo al sistema propuesto por Wersinger et al. (2007) como sigue:

- Latencia del ataque
- Número de ataques.
- Duración total del ataque
- Número de movimientos de colas verticales y horizontales.

Se consideró un ataque siempre y cuando el ratón residente (nuestro ratón experimental) aprovechó un estímulo para mostrar comportamiento agresivo (peleas e intentos de agresión). Mientras que la latencia del ataque se consideró como el tiempo en segundos que le toma al residente para iniciar un ataque durante una sesión inicial de 300 s, de no presentarse alguna conducta agresiva se concedieron 300 s más y se finalizaba la prueba.

La ocurrencia de un ataque agresivo (una serie continua de interacciones de comportamiento que incluyen al menos un acto agresivo) se definió como parte de la misma agresión, siempre y cuando entre un ataque y otro no transcurrieran más de 3 s; en caso contrario se contabilizaron como 2 ataques independientes (Owaga et al., 1999). La duración total de los ataques se definió como el tiempo de contacto de todos los encuentros agonísticos presentados durante la prueba.

Para evaluar el efecto del As en la conducta agonística se analizaron las frecuencias y las latencias de los ataques, usando como período máximo de observación 600 s.

7.1.4 Otras conductas típicas en los roedores

Se analizaron de manera adicional otro tipo de conductas exploratorias a las que los ratones dedican gran parte del tiempo como la conducta de acicalamiento y la ambulatoria con incorporaciones con o sin apoyo en las paredes de la caja. Esta evaluación se realizó al mismo tiempo con el paradigma del residente intruso. Para cada una de estas conductas se consideró la frecuencia y la duración total de todos los eventos presentados de una conducta registrada durante un período máximo de 300 s.

7.2 DETERMINACIÓN DE MONOAMINAS

7.2.1 Preparación de muestras y análisis con cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico

Al finalizar las pruebas conductuales se sacrificaron a los ratones por dislocación cervical, se extrajo el cerebro para disectar el estriado y el núcleo accumbens. Los tejidos se sonicaron y centrifugaron a 10000 rpm a 4 °C durante 20 min, el

sobrenadante se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el precipitado se utilizó para determinar la cantidad de proteínas por cada tejido disectado por el método de Lowry et al. (1951). El contenido de DA, 5-HT y de sus metabolitos (DOPAC, HVA y 5-HIAA) se determinó mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector electroquímico (HPLC-DE). Las monoaminas se oxidaron en un electrodo de carbono de vidrio a un potencial de 850 mV con respecto al electrodo de referencia del Ag/AgCl. Para determinar la concentración de monoaminas se construyó una curva de calibración y se analizaron los picos generados con el software Turbochrom 4 (Perkin Elmer, San José Cal. USA).

7.3 EXPRESIÓN DEL RNAm DE RECEPTORES DE DOPAMINA TIPO D1 Y D2

7.3.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Para cuantificar la expresión de RNAm se usó la técnica de RT-PCR semicuantitativa, para ello aislamos el RNA total de las regiones disecadas (estriado y núcleo accumbens) usando 0.6 ml de TRIzol (Invitrogen, CA, USA) para homogeneizar el tejido. La extracción y precipitación del RNA se hizo con cloroformo y alcohol isopropílico, respectivamente. Posteriormente, se disolvió el RNA en 29 μL de agua libre de RNAsas y determinamos la integridad del RNA mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Finalmente, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador MiniBis (DNR Bio-Imaging Systems) y la imagen fue analizada con DNR GelCapture (versión 3.0).

Asimismo, se midió la concentración de RNA total, se usó el cociente 260/280 para estimar la pureza. Se obtuvieron valores de 1.8 - 2.05 de pureza del RNA con el NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). La síntesis del cDNA se hizo usando 500 ng de RNA disuelto en agua libre de RNAsas más 0.5 μg de oligo dT y hexámeros sintetizados en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en un volumen final de 29 μL , se incubó esta mezcla a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min y después se colocó en hielo. Para sintetizar el cDNA se adicionó a cada muestra 5 μL de M-MLV 5X (buffer de reacción), 5 μL de 10 mM de una mezcla de dNTPs (Invitrogen), y 1 μl conteniendo 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI) en un volumen final de 40

μL. Esta mezcla se incubó a 37 °C en un termociclador MJ Mini Personal Thermal Cycler (Biorad) durante 1 h y después a 55 °C por 15 min.

7.3.2 PCR tiempo real

Para el análisis cuantitativo del cDNA en tiempo real se usó el LightCycler (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Las muestras de cDNA preparadas previamente fueron diluidas (1:5) y usadas como molde para el PCR de tiempo real. Las secuencias de cebadores usados para el receptor de dopamina D1 (NM_012546) y D2 (NM_010077) se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Cebadores utilizados para el PCR tiempo real.

Gen blanco	Secuencia del cebador
Receptor de dopamina D1	(S) 5' cag tcc atg cca aga att gcc aga 3' (AS) 5' aat cga tgc aga atg gct ggg tct 3'
Receptor de dopamina D2	(S) 5' tga aca ggc gga gaa tgg 3' (AS) 5' ctg gtg ctt gac agc atc tc 3'
β-actina	(S) 5' cca ggt cat cac tat tgg caa cga g 3' (AS) 5' tct tta cgg atg tca acg tca cac t 3'

Nota: sentido (S) y antisentido (AS).

La reacción de PCR se llevó a cabo usando el LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Mix. Cada reacción consistió en 1 μl de Master Mix, 2 ul de mezcla de cebadores en concentración 5 uM, 0.5 μL de MgCl₂, 5.5 μL de agua libre de RNAsas y 1 μL de templado dilución 1:5. Las condiciones de reacción son indicadas en la Tabla 5. Los resultados fueron analizados usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001) usando β-actina como gen de referencia.

Tabla 5. Condiciones usadas en el ensayo de PCR- tiempo real.

Modo de análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura blanco	Tiempo	Modo de adquisición
<i>Pre-incubación</i>					
ninguno	1		95 °C	10 min	Ninguno
<i>Amplificación</i>					
Cuantificación	50	Desnaturalización	95 °C	1 s	Ninguno
		Alineamiento	Dependiente del cebador	10 s	Ninguno
		Extensión	72 °C	12 s = (amplicon [bp/25]) s	Solo
<i>Curvas de disociación</i>					
Curvas de disociación	1	Desnaturalización	95 °C	0 s	Ninguno
		Alineamiento	55 °C	15 s	Ninguno
		Fusión	95 °C Proporción de salida=	0.25 s	Continuo
<i>Enfriamiento</i>					
Ninguno	1		40 °C	30 s	Ninguno

7.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las comparaciones estadísticas relacionadas con el peso de los ratones de cada grupo en tratamiento, así como la actividad locomotora registrada se analizaron con una prueba de análisis de varianza (ANDEVA) de 2 vías con medidas repetidas en un factor y como prueba post hoc se utilizó la LSD de Fisher.

Los datos relacionados con el contenido de monoaminas para las tres regiones disecadas por tratamiento fueron comparados con un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y como prueba post hoc se utilizó la LSD de Fisher.

Dado que algunos de los parámetros evaluados no siguen una distribución normal o fueron clasificados dentro de categorías, para su análisis se compararon los datos de los grupos tratados con arsénico contra el grupo control por medio de las siguientes pruebas estadísticas no paramétricas:

El análisis de las frecuencias y latencias de los datos de la conducta agresiva y de otras conductas típicas de los ratones, así como los datos correspondientes a la expresión del RNA mensajero de los receptores de dopamina tipo 1 y 2 se realizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y como prueba post hoc una prueba U de Mann-Whitney.

Finalmente, el análisis de las características físicas de los sujetos experimentales (clasificadas como lesiones y no lesiones) se hizo mediante comparaciones con tablas de contingencia, se reportan los valores de χ^2 y los valores significativos de p .

En todos los casos se reportan los valores de probabilidad (p), considerados significativos cuando fueron menores que 0.05. Los datos mensuales de los sujetos fueron analizados mediante el paquete estadístico Statview 5.0.

8. RESULTADOS

8.1 EFECTO DEL ARSÉNICO EN EL PESO CORPORAL

Durante el tiempo de exposición a los diferentes tratamientos los grupos experimentales no mostraron diferencias con respecto al peso corporal, ya que de acuerdo al análisis estadístico no existe un efecto de interacción (tratamiento x tiempo de exposición) y tampoco hay un efecto debido al tratamiento. Sin embargo, sí se encontró un efecto significativo de la edad [$F(2, 30) = 140.536, p < 0.0001$], lo cual refleja la ganancia de peso corporal de los sujetos tratados en el transcurso de los seis meses de tratamiento (Figura 8).

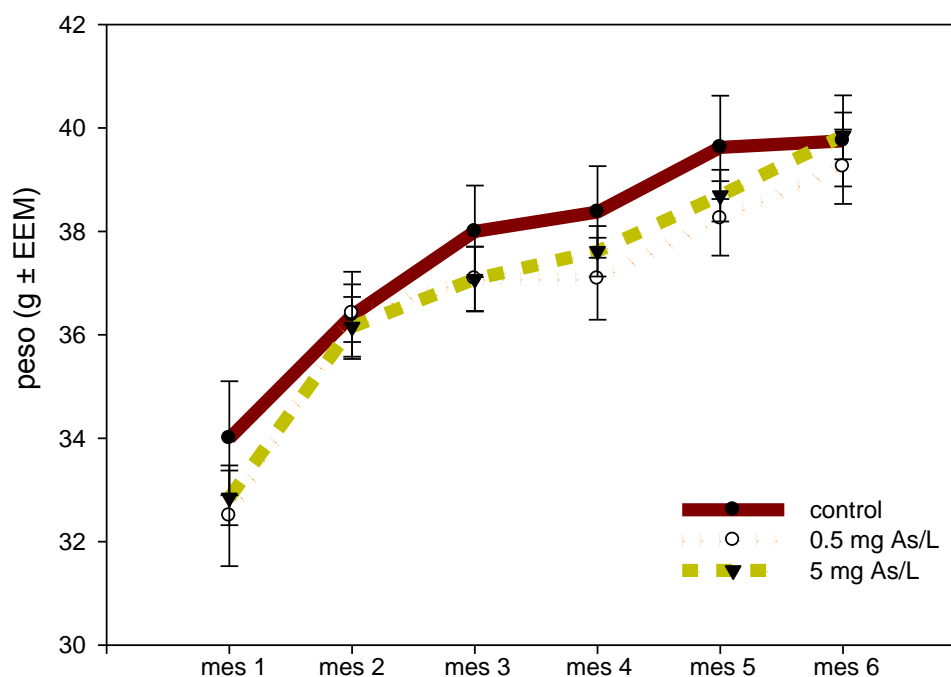


Figura 8. Peso corporal del grupo control y los grupos tratados con 0.5 ó 5 mg As/L administrados en el agua para beber durante 6 meses de tratamiento. El peso promedio inicial de los grupos experimentales fue de 32.5, 32 y 32.6 g, respectivamente.

8.2 EFECTO DEL ARSÉNICO EN LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA

8.2.1 *Período de habituación previo al registro*

Se consideró como tiempo de habituación a la actividad locomotora espontánea que ocurrió durante la primera hora de registro, dicha actividad es equivalente a un período de exploración en un ambiente novedoso. Para evaluar la actividad en este período se analizaron los parámetros de actividad horizontal (AH), distancia total (DT) y número de estereotipias (NE).

El análisis de varianza no mostró efecto significativo de interacción (tratamiento x tiempo de registro) en los parámetros evaluados y tampoco hubo un efecto de tratamiento (grupo). Solamente se observó un efecto de la edad en el parámetro de DT [$F(5,135) = 5.855, p < 0.0001$], pero no en los parámetros de AH y NE.

8.2.2 *Registro mensual del ciclo de actividad (24 h)*

En cuanto a la evaluación de la actividad locomotora analizada al final de cada mes de tratamiento se describen a continuación los resultados obtenidos en el segundo y sexto mes de exposición a As, ya que solamente en estos meses se encontraron efectos significativos en los parámetros evaluados.

En el segundo mes de tratamiento se observó una disminución en la actividad locomotora en la distancia total recorrida por los grupos experimentales. Se encontró un efecto significativo de la interacción (tratamiento x tiempo de registro) [$F(46, 690) = 1.493, p = 0.0210$], en cuanto al tratamiento no se encontró un efecto significativo, pero sí hay efecto en la hora de registro del ciclo de 24 horas [$F(23, 690) = 6.509, p < 0.0001$]. De acuerdo con la prueba post hoc de Fisher hay disminución en la actividad locomotora de los ratones tratados con 0.5 ó 5 mg As/L en el bloque de 10-12 horas, el cual corresponde a las primeras horas del ciclo de actividad de los ratones (fase de oscuridad) (Figura 9).

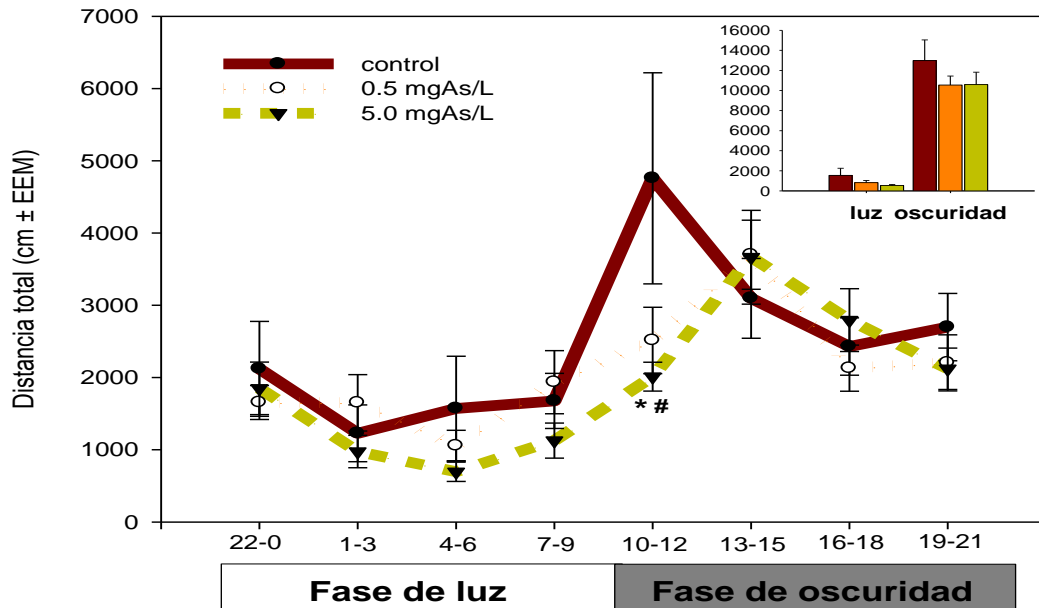


Figura 9. Distancia total recorrida de ratones control y expuestos a 0.5 ó 5 mg As/L en el segundo mes de intoxicación en un registro de 24 h continuas, los grupos expuestos a As recorren menos distancia (* y # diferente con respecto al grupo control, $p < 0.05$).

Las alteraciones que encontramos en la actividad locomotora en la distancia total vuelven a presentarse en el sexto mes de tratamiento, existe un efecto de interacción (tratamiento x hora de registro) [$F(46, 690) = 1.571, p = 0.0107$], con referencia al tratamiento no hay efecto, pero sí hay efectos en las horas de registro del ciclo de 24 h [$F(23, 690) = 10.180, p < 0.0001$]. Las pruebas post hoc de Fisher demuestran que los dos grupos de ratones tratados con As recorren menor distancia en comparación con el grupo control en el bloque correspondiente de horas de 16-18 de la fase de oscuridad, pero en el bloque de horas de 22-0 horas (fase de luz) los ratones tratados con la dosis de 5 mg As/L se mueven más que el grupo control (Figura 10).

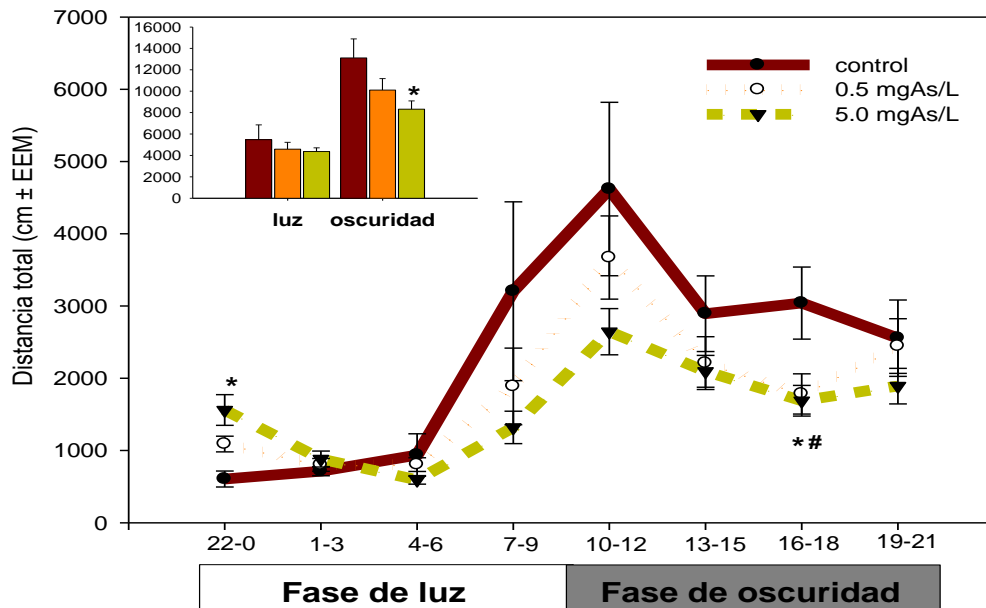


Figura 10. Distancia total recorrida de ratones control y expuestos a 0.5 ó 5 mg As/L en el sexto mes de intoxicación en un registro de 24 h continuas. En la fase de oscuridad los dos grupos de ratones tratados con arsénico se desplazan menos, mientras que en la fase de luz el grupo tratado con la dosis más alta es más activo (* y # diferente con respecto al grupo, $p < 0.05$).

Otro parámetro en el que encontramos cambios es en la actividad horizontal al sexto mes de intoxicación con As, aunque en los meses previos no se había observado efecto alguno. En este parámetro no hay efecto de interacción (tratamiento x hora de registro), pero existe un efecto significativo del tratamiento [$F(2, 30) = 6.589, p = 0.0042$] y con respecto a las horas de registro en el ciclo de 24 h [$F(23, 690) = 10.964, p < 0.0001$]. Las pruebas post hoc indican que en el bloque de 16-18 h, correspondientes a la fase de oscuridad, la actividad de los ratones intoxicados con ambas dosis de As es menor en comparación con el grupo control. Sin embargo, se presenta un efecto contrario en las primeras horas de la fase de luz (bloque de 22-0 h) al ser más activo el grupo tratado con 5 mg As/L que el grupo control (Figura 11).

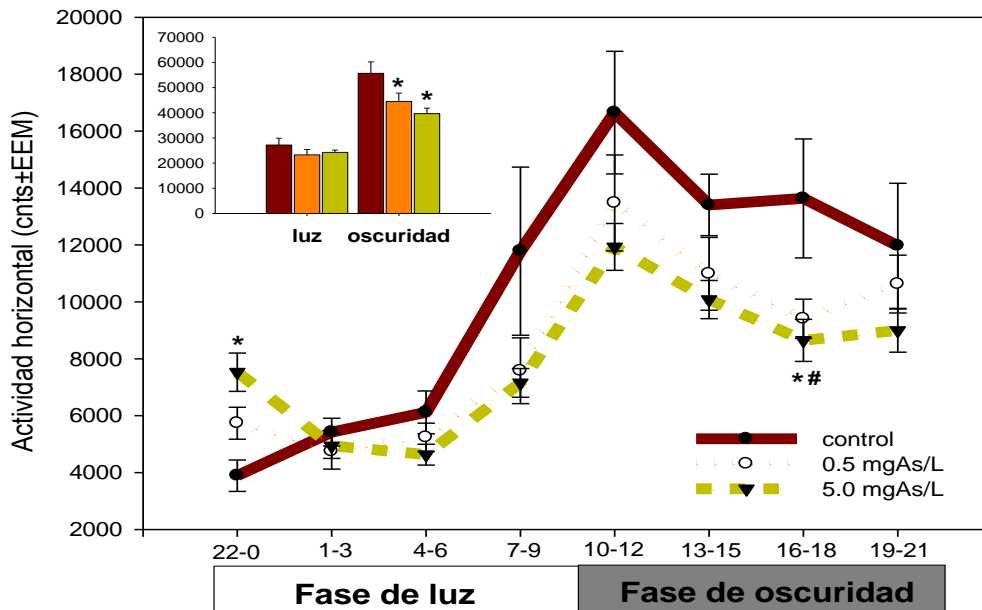


Figura 11. Actividad horizontal recorrida de ratones control y expuestos a dosis de 0.5 ó 5 mg As/L en el sexto mes de intoxicación en un registro de 24 h continuas. En el primer bloque de horas de la fase de luz es más activo el grupo tratado con 5 mg As/L, mientras que en el bloque de 16-18 h la actividad de los dos grupos tratados con arsénico disminuye (* y # diferente con respecto al grupo, $p < 0.05$).

Otro de los parámetros analizados fue el número de estereotipias, sin embargo no se registraron cambios en el número de estereotipias durante el tiempo de tratamiento.

En resumen, se encontraron alteraciones en la actividad motora espontánea en los ratones intoxicados con As en el segundo y en el último mes de tratamiento. En el último mes se observaron alteraciones en 2 de los 3 parámetros analizados de la actividad locomotora espontánea durante 24 h. Asimismo, cabe señalar que los ratones muestran una ligera alteración en el patrón característico de actividad de los roedores; es decir, escasa actividad durante la fase de luz y de mayor actividad durante la fase de oscuridad.

8.3 EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A ARSÉNICO EN LA CONDUCTA AGRESIVA

Los parámetros de la conducta agresiva evaluados durante cada mes de tratamiento incluyeron la frecuencia de ataques, latencia de aparición del primer ataque, duración total de los ataques, conducta de boxeo, persecución, movimientos de cola laterales y

verticales. Siendo nuestros indicadores principales de cambios en la conducta la latencia para iniciar el primer ataque, así como la frecuencia de la conducta en cuestión.

Durante los 6 meses de tratamiento no se registraron cambios en la frecuencia de los ataques en ninguno de los grupos durante la prueba conocida como paradigma residente-intruso. Tampoco hubo diferencias en la latencia de aparición del primer ataque o en la duración total de todos los ataques presentados durante el paradigma. Tampoco se alteraron otras conductas que forman parte del repertorio de la conducta agresiva, como son los movimientos verticales y laterales de la cola de los ratones o bien en la postura conocida como boxeo (para más detalles ver Anexo).

La observación de nuestros sujetos experimentales indica que otros componentes del repertorio conductual asociados con la conducta agresiva o con el establecimiento de la dominancia dentro de un grupo no se alteraron por el tratamiento con el As, ya que conductas como el acicalamiento social (que puede derivar en un acicalamiento agresivo), la olfacción anogenital u orofacial, la persecución u otros componentes típicos del repertorio conductual de los ratones siguen presentándose de acuerdo a lo propuesto por Koolhaas et al. (1980).

8.4 EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS RATONES

TRATADOS CON ARSÉNICO

Para valorar el estado físico de los ratones se evaluó la presencia-ausencia de ciertas características físicas en los sujetos de cada grupo experimental. Se clasificaron como lesiones las heridas en el área genital, en el dorso y costados o heridas en los dedos; mientras que características como bigotes recortados o ausencia de bigotes, pelo erizo o peluqueo fueron clasificados como no lesiones. El análisis estadístico, mediante una prueba de χ^2 , para comparar las características del grupo control *versus* los grupos tratados con As evaluadas durante los 6 meses de intoxicación dio los siguientes resultados:

a) Lesiones. La presencia de lesiones en el área anogenital fue significativa únicamente en el primer mes de exposición ($\chi^2 = 6.653$, g. l.= 1, $p = 0.0359$), pero de acuerdo con la prueba post hoc de Fisher no hay diferencias entre los ratones tratados con As y el grupo control. También hay presencia de lesiones en el dorso en los sujetos experimentales en el primer mes ($\chi^2 = 6.792$, g. l.= 1, $p = 0.0335$) y de acuerdo con la prueba post hoc el grupo tratado con 5 mg As/L presenta menos lesiones que el grupo control ($p = 0.0421$). Finalmente, no existen diferencias significativas en la presencia de lesiones en los dedos de las patas de los sujetos experimentales durante los 6 meses de intoxicación.

b) No lesiones. Respecto a las características clasificadas como no lesiones, no se encontraron diferencias significativas en la presencia de bigotes recortados o carencia de bigotes, mientras que en el caso de la presencia del pelo erizo o del peluqueo sí encontramos diferencias significativas.

Los resultados indican que la característica de pelo erizo es significativamente diferente entre los grupos experimentales en el segundo mes ($\chi^2 = 10.313$, g. l.= 1, $p = 0.0058$), en el tercer mes ($\chi^2 = 6.822$, g. l.= 1, $p = 0.0330$) y en el cuarto mes de tratamiento ($\chi^2 = 7.764$, g. l.= 1, $p = 0.0206$), pero contrario a lo que se esperaría, los ratones tratados con 0.5 ó 5 mg As/L tienen el pelo menos erizo que el grupo control en el mes 2 ($p = 0.0491$ y $p = 0.0421$, respectivamente), en el mes 3 y 4 el grupo que recibió la dosis de 5 mg As/L tenía el pelo menos erizo con respecto al grupo control ($p = 0.0318$ y $p = 0.0475$, respectivamente), de acuerdo con la prueba post hoc de Fisher.

En cuanto a la característica referida como peluqueo (presencia de parches en el cuerpo sin pelo), el análisis estadístico indica que únicamente hay diferencias en el primero ($\chi^2 = 7.126$, g.l.= 1, $p = 0.0284$) y segundo mes de tratamiento ($\chi^2 = 10.313$, g. l.= 1, $p = 0.0058$). En estos meses se observó que los ratones tratados con la dosis de 5 mg As/L están más peluqueados que el grupo control ($p = 0.0139$ y $p = 0.0421$, respectivamente), de acuerdo con la prueba post hoc de Fisher.

Por otra parte, otras conductas evaluadas fueron el acicalamiento y las incorporaciones sobre las patas traseras con el cuerpo extendido. Las pruebas estadísticas no mostraron diferencias entre el grupo control y los grupos tratados con

As en cuanto a la frecuencia y el tiempo de acicalamiento. Sin embargo, sí se encontraron diferencias en 2 variantes de la conducta de incorporaciones con y sin apoyo en las paredes de la caja. Las diferencias fueron las siguientes:

En el primer mes de tratamiento con As se encontró un efecto significativo de grupo [H (2, 33) = 10.158, p = 0.0062], la prueba post hoc mostró que los ratones del grupo tratado con 5 mg As/L presentan más incorporaciones sin apoyo con respecto al grupo control (U = 22.000, p = 0.0298), (Figura 12). El análisis de esta conducta en los meses posteriores de exposición a As no mostró variaciones entre los grupos tratados con As y el grupo control.

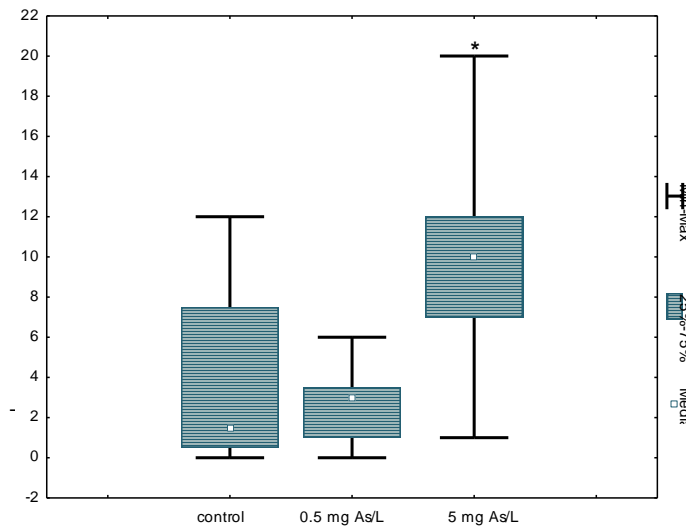


Figura 12. Frecuencia de incorporaciones sobre las patas traseras sin apoyo en las paredes de la caja durante el primer mes de exposición a As, los ratones del grupo 5 mg As/L se incorporan más ocasiones (* diferente con respecto al control, p < 0.05).

Otra variante de las incorporaciones, la que se ejecuta con apoyo de las patas anteriores en las paredes de la caja, mostró efectos de grupo en el segundo y tercer mes de tratamiento ([H (2, 33) = 6.166, p = 0.0458] y [H (2,33) = 8.569, p = 0.0138], respectivamente). Se encontró una mayor frecuencia en las incorporaciones en los ratones tratados con 5.0 mg As/L en comparación con el grupo control (U = 22.500, p = 0.0326) en el segundo mes de tratamiento. En cuanto al tercer mes de tratamiento se observa el efecto contrario para la dosis de 0.5 mg As/L (U = 22.000, p = 0.0449), ya que los ratones intoxicados con As presentaron una frecuencia menor de este tipo de conducta comparados con el grupo control (Figura 13). En los otros meses de

tratamiento no se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con As y el grupo control.

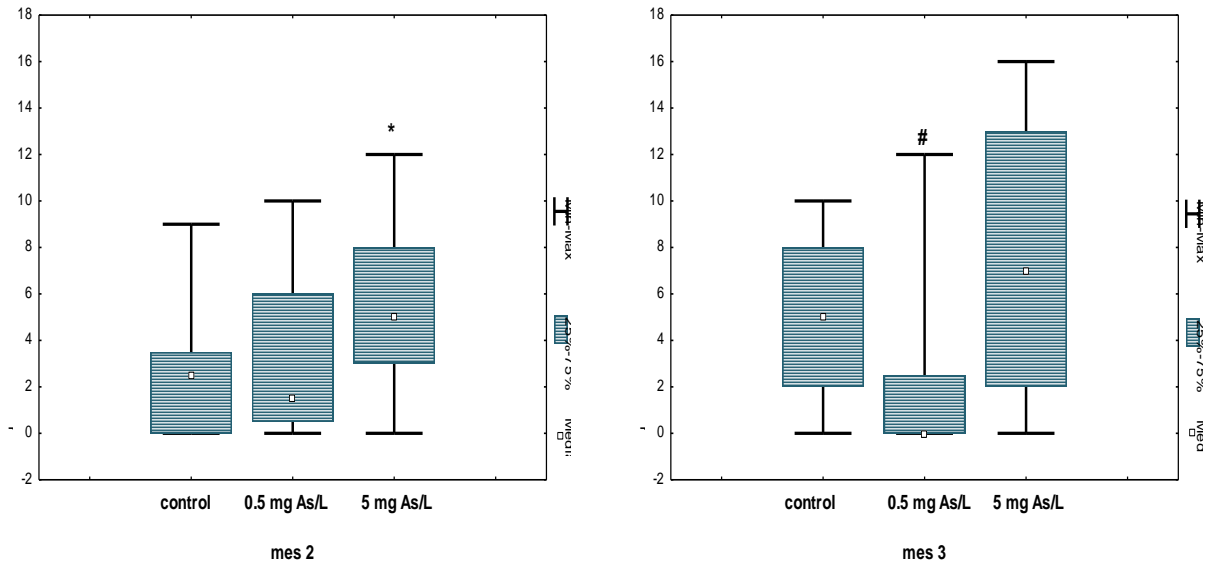


Figura 13. Frecuencia de incorporaciones sobre las patas traseras con apoyo en las paredes de la caja, los ratones tratados con 5 mg As/L se incorporan más en el segundo mes y en el tercer mes los ratones tratados con 0.5 mg As/L se incorporan menos (*, # diferente con respecto al control, $p < 0.05$).

8.5 EFECTO DEL ARSÉNICO EN LOS NIVELES DE MONOAMINAS

Al concluir los 6 meses de exposición con tres tratamientos diferentes se sacrificó a los ratones y se determinaron las concentraciones de catecolaminas en el estriado, núcleo accumbens y la corteza frontal.

No existen efectos debidos a la exposición de 0.5 ó 5 mg As/L en el contenido de dopamina y sus metabolitos en el estriado, núcleo accumbens o en la corteza. Asimismo el contenido de serotonina y de su metabolito no muestra diferencias significativas en ninguna de las regiones cerebrales evaluadas (Tabla 6).

Tabla 6. Concentración de monoaminas y sus metabolitos (ng/mg proteína) en 3 regiones cerebrales de ratones expuestos a 0.5 ó 5 mg As/L mediante agua para beber durante seis meses de tratamiento.

Región	GRUPO	DOPAC	DA	HVA	5-HIAA	5-HT	DOPAC/DA
ESTRIADO	CONTROL (n=7)	4.77 ± 0.90	80.60 ± 13.00	4.22 ± 0.95	2.87 ± 0.57	5.71 ± 1.26	0.05 ± 0.010
	0.5 mg As/L (n=11)	4.75 ± 0.81	91.23 ± 19.37	4.20 ± 0.70	2.58 ± 0.48	5.19 ± 1.36	0.05 ± 0.005
	5 mg As/L (n=10)	3.62 ± 0.49	55.70 ± 6.83	3.35 ± 0.46	2.29 ± 0.35	5.80 ± 1.05	0.06 ± 0.006

Tabla 6. Continuación.

NÚCLEO ACCUMBENS	CONTROL (n=7)	4.19 ± 0.97	59.36 ± 14.68	3.31 ± 0.48	4.71 ± 1.13	19.12 ± 4.70	0.07 ± 0.02
	0.5 mg As/L (n=10)	2.61 ± 0.32	40.77 ± 5.49	2.21 ± 0.29	3.15 ± 0.58	16.25 ± 3.69	0.06 ± 0.02
	5 mg As/L (n=13)	3.24 ± 0.74	50.34 ± 9.66	2.91 ± 0.47	2.63 ± 0.45	12.90 ± 1.76	0.06 ± 0.03
CORTEZA	CONTROL (n=7)	Nd	1.17 ± 0.31	Nd	2.42 ± 0.72	4.37 ± 1.51	Nd
	0.5 mg As/L (n=11)	Nd	1.86 ± 0.39	Nd	1.88 ± 0.42	6.18 ± 1.16	Nd
	5 mg As/L (n=13)	Nd	1.54 ± 0.28	Nd	2.22 ± 0.35	8.51 ± 2.17	Nd

Nota: Se muestra la media de los valores absolutos (ng/mg proteína ± EEM) de DOPAC (ácido 3-4 dihidroxifenilacético); DA (dopamina); HVA (ácido homovanílico); 5-HIAA (5-hidroxiindolacético); 5-HT (serotonina); Nd (no determinado).

8.6 EFECTO DEL ARSÉNICO EN LA EXPRESIÓN DEL RNAm DE RECEPTORES DE DOPAMINA

El análisis estadístico de la expresión del mensajero en el estriado para el receptor DAR-D1, no detectó ningún efecto significativo del tratamiento. En contraste, en el caso del DAR-D2 se encontró un efecto significativo de tratamiento en su expresión [$H = (2, N = 24) = 6.180, p = 0.045$] y las pruebas post hoc indicaron que hubo disminución en la expresión con la dosis de 5 mg As/L ($U's = 8, p = 0.011$) (Figura 14).

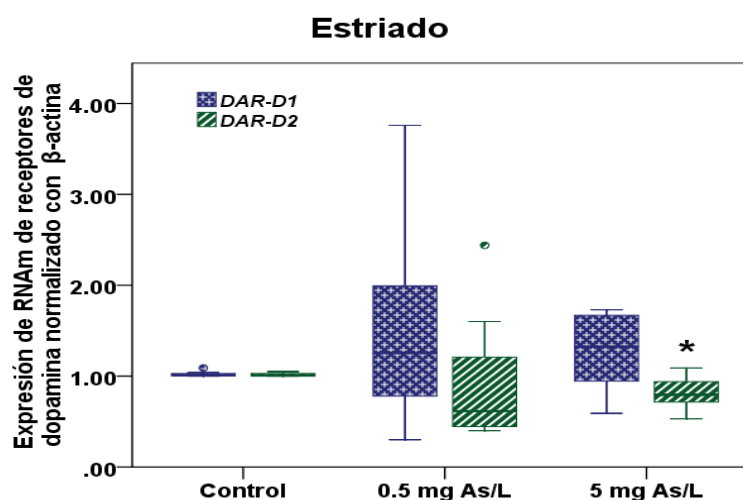


Figura 14. Niveles relativos de expresión de RNAm en miembros de la familia de receptores de dopamina (DAR D1 y D2) en el estriado de ratones expuestos crónicamente a 0.5 ó 5 mg As/L, datos normalizados con β -actina. En cada caso se representa el recorrido intercuartílico (caja), el valor mínimo y máximo (bigotes) de los niveles relativos de expresión de RNAm (* diferente con respecto al grupo control, $p < 0.05$).

En el caso del núcleo accumbens no fue posible hacer el análisis estadístico debido a que no se obtuvo un número suficiente de muestras, la Figura 15 muestra la expresión de los receptores de dopamina tanto del tipo D1 como D2 con una n de 5 para el grupo control y 2 para el grupo de 0.5 mgAs/L y de 5 mg As/L. No obstante, se puede apreciar que los receptores de dopamina tipo 1 tienden a aumentar en el grupo tratado con 0.5 mg As/L.

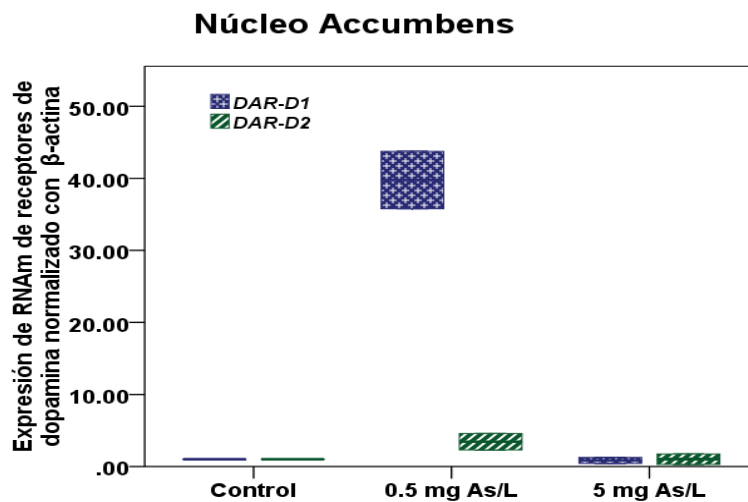


Figura 15. Niveles relativos de expresión de RNAm en miembros de la familia de receptores de dopamina (DAR D1 y D2) en el núcleo accumbens de ratones expuestos crónicamente a 0.5 ó 5 mg As/L, datos normalizados con β -actina. En cada caso se representa el recorrido intercuartílico (caja) de los niveles relativos de expresión del RNAm.

9. DISCUSIÓN

9.1 PESO CORPORAL

El tratamiento con As durante 6 meses no causó alteraciones en el peso corporal, ya que conforme transcurrieron las semanas de intoxicación hasta finalizar el tratamiento los ratones aumentaron de peso de manera semejante a los animales control. Los promedios de peso de todos los grupos fueron acorde con los percentilas registradas en el bioterio del Instituto de Neurobiología, de donde provenían los animales (García-Servín, 2010, comunicación personal). Los resultados obtenidos concuerdan con varios estudios que muestran que ratones expuestos a las dosis de 0, 20, 40, 60 ó 100 mg As/L no experimentaron una pérdida de peso después de 9 semanas de tratamiento, ni tampoco experimentaron aparentes signos de toxicidad (Delgado et al., 2000). Asimismo, el estudio de Bardullas et al. (2009) reportó que ratones macho de la cepa C57/BL6 tratados con 0.05, 0.5, 5.0 ó 50 mg As/L durante 4 meses no mostraron pérdida de peso durante el tratamiento con As. Tampoco se han observado alteraciones en la ganancia de peso cuando se utilizan dosis de 0.03 a 5.0 mg As/L en ratas (Chattopadhyay et al., 2002; Rodríguez et al. 2010).

9.2 ACTIVIDAD LOCOMOTORA

Contrario a lo esperado el As no produce aumento en la actividad locomotora espontánea, más bien las dosis de As administradas producen hipoactividad. Estudios previos ya habían demostrado que el este metaloide puede producir diferentes efectos en la actividad locomotora espontánea cuando se administran dosis altas o bajas, 2 estudios que representan un ejemplo claro de esto son los de Itoh et al. (1990) y Bardullas et al. (2009). En el primer estudio se encontró que una concentración de trióxido de As de 10 mg/kg de peso administrado oralmente produce hipoactividad mientras que una concentración de 3 mg/kg produce un aumento en la actividad. En tanto que el estudio de Bardullas et al. (2009) demostró que el tratamiento con As en

ratones machos con dosis bajas (0.5 mg As/L) produce hiperactividad y que la dosis alta (50 mg As/L) produce el efecto contrario.

Los datos presentados en este estudio también están de acuerdo con otros estudios que han utilizado diferentes estrategias experimentales y con tiempos variables de exposición como los de Rodríguez et al. (2001, 2010); Schulz et al. (2002), Chattopadhyay et al. (2002), en los cuales también se ha reportado hipoactividad. En la mayoría de estos estudios la disminución en la actividad locomotora se presenta al usar dosis superiores a los 10 mg As/L, con excepción del estudio de Chattopadhyay et al. (2002) que describe un efecto similar con dosis menores; asimismo, se ha propuesto que la administración de dosis altas puede estar asociada con un malestar general que produce a su vez una disminución en este tipo de conducta en los sujetos experimentales (Rodríguez et al., 2001).

El estudio de Rodríguez et al. (2010) en condiciones experimentales similares y con un período de administración de un año, mostró hipoactividad en las ratas tratadas con una dosis de 50 mg As/L en el último mes de tratamiento, de manera coincidente con el parámetro que nosotros analizamos (distancia total), en este estudio también encontraron disminución en la actividad a una dosis de 0.05 mg As/L.

La ganancia de peso corporal en nuestros sujetos experimentales conforme transcurre el tiempo de exposición, no permite atribuir las deficiencias en la actividad locomotora de los ratones tratados con As a un malestar general. También es importante recalcar que nosotros hemos encontrado que el efecto de disminución de la actividad locomotora se observa aún cuando administramos dosis diferentes.

Por otra parte, en el último mes de exposición se alteran 2 de los 3 parámetros evaluados en la actividad locomotora, ya que tanto en la fase de oscuridad (período de mayor actividad) como en la fase de luz (período de menor actividad) disminuye y aumenta la actividad de los dos grupos tratados con As, respectivamente. Este efecto bifásico ya había sido reportado por Bardullas et al. (2009) en una cepa de ratón de poca variabilidad genética a la que administraron un tratamiento de 50 mg As/L durante 4 meses.

El análisis de la conducta estereotipada no indicó un aumento debido al As como se esperaba, aunque los antecedentes apuntan en este sentido. Aún cuando las

estrategias experimentales son similares, parece ser que existen diferencias debidas a la cepa empleada en este estudio en comparación con el estudio de Bardullas et al. (2009) (CD-1 *versus* C57Bl/6J). Asimismo, se debería considerar que el análisis de la conducta estereotipada se podría realizar de manera conjunta usando un sistema automatizado y haciendo observaciones directas, con la finalidad de detectar conductas que también pueden ser clasificadas como estereotipias. Por ejemplo, las diferencias encontradas en la frecuencia de incorporaciones de los sujetos experimentales permiten detectar cambios debidos al tratamiento con As.

Por otra parte, resulta interesante el hecho de que los efectos observados en la actividad locomotora espontánea sólo se presenten en la parte inicial y final del tratamiento. Al respecto puede señalarse que existen diferentes modelos teóricos que podrían explicar este tipo de efectos. Por ejemplo, en el síndrome de adaptación al estrés se ha sugerido que una vez que un estímulo se aplica puede presentarse una fase de alarma o de respuesta, después de la cual puede presentarse una respuesta de adaptación o de resistencia a un estímulo estresante y después de cierto tiempo, no bien definido, puede presentarse una fase conocida como fase de agotamiento, en la cual el organismo puede sufrir efectos deletéreos o morir (Selye, 1937). En el caso de modelos toxicológicos, que muestran una curva dosis respuesta tipo J, U o U invertida, se describe un efecto similar en la respuesta de resistencia que también está asociado con un aumento en la producción de proteínas para combatir los efectos adversos de la exposición a diferentes sustancias tóxicas (Klaunig y Kamendulis, 2008). Es decir, probablemente estamos observando un efecto de resistencia al As que se traduce en períodos largos en los que no encontramos efecto alguno o bien puede ser que se necesite rebasar cierto umbral para observar los efectos como lo propone Rodríguez et al. (2003, 2010).

En términos generales, estos datos nos permiten afirmar que el tratamiento con As resulta en una reducción de la actividad locomotora espontánea y que este efecto se observa al poco tiempo de la exposición y 6 meses después.

9.3 CONDUCTA AGRESIVA Y APARIENCIA FÍSICA DE LOS RATONES

Contrario a lo propuesto en nuestra hipótesis, el As no induce o exagera la conducta agresiva. El repertorio conductual agonístico de los sujetos experimentales no se altera y continua expresándose de manera natural de acuerdo a lo propuesto por Koolhaas et al. (1980). Asimismo, nuestros sujetos experimentales muestran componentes conductuales como el acicalamiento social agresivo, la persecución y el peluqueo (Sarna et al., 2000), componentes que de manera natural usan los ratones como medio para establecer jerarquías sociales dentro de un grupo, dichas conductas tampoco se ven alterados por los tratamientos empleados.

Los datos aportados por este estudio son importantes porque indican que el As no provoca cambios en la conducta agresiva en esta cepa de ratones y porque existen pocos estudios que usan como modelo la exposición crónica con dosis que sean relevantes para el ambiente.

En cuanto a la apariencia física de los ratones observamos la presencia de parches sin pelo en el cuerpo (o zonas de peluqueo) en el grupo tratado con la dosis más alta, dichos parches están presentes hasta finalizar el tratamiento. De manera similar, Nagaraja y Desiraju (1993) describen la pérdida de pelo en algunos animales en forma de parches a los 20 días de edad cuando son expuestos a una concentración de 5.0 mg As/kg de peso, aunque dicho cambio desaparece de manera espontánea. Otro estudio que indica alteraciones en la apariencia física es el de Rodríguez et al. (2001) el cual incluye entre otras alteraciones la pérdida de pelo, en ratas que fueron expuestas a 20 mg As/kg de peso.

Por otra parte, el estudio de Bardullas et al. (2009) no reporta cambios en la apariencia general como la postura, la apariencia de la cola o las extremidades en ratones de la cepa C57B6L/J durante el tiempo de tratamiento con As. No existen más estudios que describan alteraciones en la apariencia física en ratones tratados con As de manera crónica, como lesiones o alguna otra característica similar a las evaluadas en este estudio.

9.4 DETERMINACIÓN DE MONOAMINAS

Diferentes estudios habían señalado previamente que la exposición al As administrado en diferentes formas, vías de administración, concentraciones, en diferentes modelos animales e incluso en diferentes tiempos de exposición, causa alteraciones en los sistemas monoaminérgicos y en otros sistemas de neurotransmisión (Itoh et al., 1990; Tripathi et al., 1997; Nagaraja y Desiraju, 1993; Mejía et al., 1997; Rodríguez et al., 2001,).

Aunque nuestros datos no concuerdan con la evidencia experimental de los estudios señalados anteriormente y no respaldan nuestra hipótesis sobre el posible incremento en los niveles de monoaminas, sí son coincidentes con las observaciones de Rodríguez et al. (2010). En este estudio no hay alteración en los niveles de monoaminas después de un año de tratamiento; excepto cuando se administra una dosis muy alta (50 mg As/L), la cual produce incremento en los niveles de DA en el estriado de las ratas.

También habría que añadir al respecto que los efectos derivados de la exposición al As no necesariamente siguen una respuesta dosis dependiente. Por ejemplo, en el estudio de Delgado et al. (2000) en ratones de la cepa BALB/c expuestos durante 9 semanas a dosis desde 20 hasta 100 mg As/L muestran una disminución en los niveles de dopamina en el hipotálamo (con todas las dosis administradas), en otras regiones no se producen cambios o bien una dosis particular (60 mg As/L) produce el efecto contrario en otro neurotransmisor (por ejemplo, aumento de los niveles serotonina en la médula y el puente).

Estos datos en conjunto podrían sugerir por una parte que es necesaria la acumulación de una cantidad importante de As en el SNC y que la exposición por períodos prolongados es un elemento crítico para que se presenten alteraciones.

Por otra parte, otros estudios han demostrado que los cambios regionales en los niveles de monoaminas pueden ser dependientes del género, como lo muestra el estudio de Bardullas et al. (2009) en una cepa endogámica que fue sometida a condiciones de tratamiento con As similares a las nuestras, sólo que en este caso las alteraciones neuroquímicas se producen solamente en las hembras. Probablemente, los ratones macho sean más resistentes a la exposición prolongada con As.

La ausencia de alteraciones en la neuroquímica en nuestros datos sugiere que probablemente estén activados ciertos mecanismos de resistencia al As, como el propuesto por Delgado et al. (2000), asociado posiblemente a una menor captura del As hacia el interior de las células o bien que estén actuando mecanismos más complejos que pueden incluir diferentes características intrínsecas de las células, el tiempo de exposición, la distribución del tóxico, la tasa metabólica (Rodríguez et al., 2010) o bien que las características de cada organismo o cepa estén implicados en la resistencia (Kimura et al., 2005).

Aunque anteriormente se había propuesto que la hipoactividad exhibida en las ratas podría ser el resultado de alteraciones en el sistema dopaminérgico (Svensson et al., 1994), nosotros observamos hipoactividad aún en ausencia de alteraciones en los niveles de monoaminas. Entonces, cabe la posibilidad de que las alteraciones se produzcan a un nivel de la señalización celular, particularmente la señalización dopaminérgica, ya que dicha disfunción contribuye con la fisiopatología de enfermedades que presentan desórdenes de movimiento como la enfermedad de Parkinson (Neve et al., 2010). Asimismo, es necesario considerar que el arsénico tiene la capacidad de estimular o inhibir diferentes rutas de señalización (Kumagai y Sumi, 2007; Druwe y Vaillancourt, 2010), por lo que podría estar interfiriendo a este nivel.

9.5 EXPRESIÓN DEL RNAm DE RECEPTORES DE DOPAMINA

De manera opuesta a lo esperado, el As no induce un aumento en la expresión en los niveles del mensajero para los receptores de DA. Los efectos de la exposición crónica al As sobre los receptores de DA en este estudio indican una disminución en la transcripción del receptor tipo 2 únicamente en el estriado cuando los sujetos experimentales son expuestos a una dosis de 5 mg As/L. Esta observación es contraria a lo reportado por Rodríguez et al. (2010) para un modelo con ratas expuestas durante un año al evaluar la expresión del RNAm de los receptores de dopamina, ya que en el estriado encuentran un efecto opuesto para los DAR-D1 y no encuentran cambios con el DAR-D2. Asimismo, observan cambios en la expresión de los receptores de dopamina en el núcleo accumbens que son dependientes de la dosis (disminuye el DAR-D2 en todos los casos), así como cambios que se expresan sólo en presencia de

dosis muy altas (50 mg As/L) como en el caso del DAR-D1 que disminuye su expresión. Sin embargo, los ratones expuestos durante 6 meses en este estudio no mostraron alteraciones en el núcleo accumbens.

Es importante mencionar que no existen en la literatura más referencias sobre el efecto del arsénico en la transcripción de dichos receptores, por lo que se ha sugerido que el efecto puede estar asociado con la interacción de especies reactivas producidas por el As sobre los receptores (Rodríguez et al., 2010), esta posibilidad tiene que ser complementada con la evaluación de los niveles de proteína porque tampoco existen antecedentes al respecto.

Una posible explicación ante tales cambios podría ser abordada a partir de la evidencia experimental desarrollada para determinar la función e importancia de los receptores de dopamina. Se ha descrito que la locomoción está controlada primariamente por el estriado ventral a través de la activación de los receptores de DA D1, D2 y D3 (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994) y también que los animales que carecen de los receptores D2 son acinéticos o bradikinéticos, con una reducción significativa de los movimientos espontáneos (Baik et al., 1995). Otro hecho a considerar es que la activación conductual es dependiente de la dopamina endógena que estimula los receptores D2, cuando estos receptores están ocupados por raclopride no es posible la expresión de la conducta locomotora a pesar del bloqueo de los receptores D3 (Waters et al., 1993).

De acuerdo con el trabajo de Baik et al. (1995) que evaluó la conducta de ratones deficientes del receptor D2, dada su importancia para la transmisión dopaminérgica en la coordinación y en la regulación de los movimientos, los ratones tenían movimientos más lentos que las crías normales, la postura de estos ratones era anormal con las extremidades anteriores y posteriores aplanadas al suelo y cuando se evaluó a los sujetos experimentales sobre una superficie plana estos exhibían un gateo anormal con las patas anteriores extendidas. En los ratones homocigotos observaron una reducción en la locomoción del 74 %. Tanto en los ratones knockout homocigotos como heterocigotos se observó un desajuste motor, particularmente los heterocigotos mostraron una marcada reducción en la actividad vertical (incorporaciones).

Los resultados obtenidos en este estudio permiten establecer una posible relación entre la disminución en la actividad locomotora observada y las alteraciones en la expresión del mensajero de los receptores dopaminérgicos tipo 2 causada por la exposición a As.

10. CONCLUSIONES

La exposición crónica a las dosis de 0.5 ó 5 mg As/L produce alteraciones a nivel de SNC, asociadas a una reducción en el mensajero del receptor dopaminérgico tipo D2, sin cambios evidentes en la neuroquímica dopaminérgica.

Las dosis de As empleadas producen disminución en la actividad locomotora y alteraciones en otras conductas típicas en meses particulares de la exposición. Aunque la ausencia de efectos en la neuroquímica no nos permiten establecer una relación entre el cambio en la conducta y este parámetro, resulta evidente que las alteraciones son producto de la exposición a este metaloide.

Finalmente, el As altera los niveles de expresión del mensajero del receptor de dopamina 2 en el estriado de ratones expuestos a la dosis de 5 mg As/L y no hay efectos con la dosis de 0.5 mg As/L. Sin embargo, se debe considerar que los cambios inducidos en los receptores debido a la exposición del As son sólo uno de los diferentes componentes involucrados en la función del sistema dopaminérgico. Por esta razón es necesario hacer más estudios relacionados con la función de dichos receptores, la afinidad de los receptores por su ligando, la tasa de liberación de la DA u otros componentes que nos permitan acercarnos a entender de manera más certera el mecanismo por el cual posiblemente está actuando el As.

Asimismo, falta determinar cuáles son los posibles mecanismos que están asociados con los cambios observados en meses particulares y si estos mecanismos están implicados con una respuesta hormética, en particular si hay sobreexpresión de proteínas de respuesta al estrés implicadas en respuestas de adaptación a daños. También sería interesante evaluar la expresión de transportadores asociados con la entrada y la extrusión del As en las células; es decir, si existe una sobreexpresión de los transportadores como aquagliceroporinas (Aqp9 y Aqp7) o proteínas como Mrp-1 que estén favoreciendo la extrusión del As y nos permitieran dilucidar si hay menor toxicidad en aquellos meses donde no observamos cambios en la conducta locomotora.

Dado que no se observan cambios a nivel neuroquímico otra aproximación que puede abordarse es explorar si existe muerte de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo ventral en los meses que coinciden con una disminución de la actividad

locomotora, así como evaluar si existen alteraciones debidas al arsénico a nivel de la señalización celular una vez que los receptores de dopamina son activados.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adams B, Fitch T, Chaney S y Gerlai R. 2002. Altered performance characteristics in cognitive tasks: comparison of the albino ICR and CD1 mouse strains. *Behav Brain Res* 133(2), 351-361.
- Alptekin K, Degirmenci B, Kivircik B, Durak H, Yemez B, Derebek E y Tunca Z. 2001. Tc-99m HMPAO brain perfusión SPECT in drug-free obsessive-compulsive patients without depression. *Psychiatry Res* 107(1), 51-56.
- Aouizerate B, Guehl D, Cuny E, Rougier A, Bioulac B, Tignol J y Burbaud P. 2004. Pathophysiology of obsessive-compulsive disorder. A necessary link between phenomenology, neuropsychology, imagery and physiology. *Prog Neurobiol* 72(3), 195-221.
- Aposhian HV y Aposhian MM. 2006. Arsenic toxicology: Five questions. *Chem Res Toxicol* 19(1), 1-15.
- ATSDR. 2007. Toxicological profile for arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, USA. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp2.pdf>
- Bahena-Trujillo R, Flores G y Arias-Montaña JA. 2000. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Rev Biomed* 11(1), 39-60.
- Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M y Borrelli E. 1995. Parkinson-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 377(6548), 424-428.
- Bardullas U, Limón-Pacheco JH, Giordano M, Carrizales L, Mendoza-Trejo MS y Rodríguez VM. 2009. Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 239(2), 169-177.
- Bell R y Hepper PG. 1987. Catecholamines and aggression in animals. *Behav Brain Res* 23(1), 1-21.
- Bellinger DC. 2008. Neurological and behavioral consequences of childhood lead exposure. *PLoS Med* 5(5), 0690-0692.
- Björklund A y Dunnett SB. 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30(5), 194-202.

- Blanchard RJ, Wall PM y Blanchard DC. 2003. Problems in the study of rodent aggression. *Horm Behav* 44(3),161-170.
- Borchers A, Teuber SS, Keen CL y Gershwin ME. 2009. Food Safety. *Clin Rev Allergy Immunol* 39(2), 95-141.
- Cabib S, Puglisi-Allegra S y Ventura R. The contribution of comparative studies in inbred strains of mice to the understanding of the hyperactive phenotype. *Behav Brain Res* 130(1-2), 103-109.
- Calderón J, Navarro ME, Jiménez-Capdeville ME, Santos-Díaz MA, Golden A, Rodríguez-Leyva I, Borja-Aburto V y Díaz-Barriga F. 2001. Exposure to arsenic and lead and neurophysiological development in mexican children. *Environ Res* 85(2), 69-76.
- Carlson N. 1999. *Fisiología de la conducta*. España: Ariel Neurociencias.
- Cell Signaling Technology. 2011. <http://www.cellsignal.com/pathways/neuroscience.jsp>
- Centenaro LA, Vieira K, Zimmermann N, Miczek KA, Lucion AB y de Almeida RM. 2008. Social instigation and aggressive behavior in mice: role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 201(2), 237-248.
- Cervantes MC, David JT, Loyd DR, Salinas JA y Delville Y. 2005. Lead exposure alters the development of agonistic behavior in golden hamsters. *Dev Psychobiol* 47(2), 158-165.
- Chartoff EH, Marck BT, Matsumoto AM, Dorsa DM y Palmiter RD. 2001. Induction of the stereotypy in dopamine-deficient mice requires striatal D1 receptor activation. *Proc Natl Aca Sci USA* 98(18), 10451-10456.
- Chattopadhyay S, Bhaumik S, Nag Chaudhury A y Das Gupta S. 2002. Arsenic induced changes in growth development and apoptosis in neonatal and adult brain cells in vivo and in tissue culture. *Toxicol Lett* 128(1-3), 73-48.
- Chaudhuri S, Kundu M, Banerjee M, Das J, Majumdar P, Basu S, Roychoudhury S, Singh K y Giri A. 2008. Arsenic-induced health effects and genetic damage in keratotic individuals: involvement of p53 arginine variant and chromosomal aberrations in arsenic susceptibility. *Mutat Res* 659(1-2), 118-125.
- Chinta SJ y Andersen JK. 2005. Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol* 37(5), 942-946.

- Cooper JR, Bloom FE y Roth RH. 2003. The biochemical basis of Neuropharmacology. Oxford: Oxford University Press.
- Creese I e Iversen S. 1973. Blockage of amphetamine- induced motor stimulation and stereotypy in the adult rat following neonatal treatment with 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 55(2), 369-382.
- Croft P y Rowe F. 1963. Social organization and territorial behavior in the wild house mouse (*Mus musculus* L.). *Proc Zool Soc Lond Biol* 140(3), 517-531.
- Delgado J, Dufour L, Grimaldo J, Carrizales L, Rodríguez VM y Jiménez-Capdeville M. 2000. Effects of arsenite on central monoamines and plasmatic levels of adrenocorticotropic hormone (ACTH) in mice. *Toxicol Lett* 117(1-2), 61-67.
- Díaz-Barriga F, Santos M, de Jesús-Mejía J, Batres L, Yáñez L, Carrizales L, Vera E, del Razo LM y Cebrián ME. 1993. Arsenic and cadmium exposure in children living near a smelter complex in San Luis Potosí, Mexico. *Environ Res* 62(2), 242-250.
- Díaz-Barriga F, Batres L, Calderón J, Lugo A, Galvao L, Lara I, Rizo P, Arroyave PE y McConell R. 1997. The El Paso smelter 20 years later: residual impact on mexican children. *Environ Res* 74(1), 11-16.
- DOF. 2008. NORMA Oficial Mexicana NOM-127-SSA-1-1994, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. <http://www.economia-noms.gob.mx>
- Dodman NH y Shuster L. 2005. Animal models of obsessive-compulsive behavior: a neurobiological and ethological perspective. En Abramowitz JS y Houts AC (Eds.), *Concepts and controversis in obsessive –compulsive disorder. Series in Anxiety and Related Disorders.* (pp. 53-71). New York: Springer-Verlag New York Inc.
- Druwe IL y Vaillancourt RR. 2010. Influence of arsenate and arsenite on signal transduction pathways: an update. *Arch Toxicol* 84(8), 585-596.
- Flora SJ. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversability. *Free Radic Biol Med* 51(2), 257-281.
- Fluharty A y Sanadi DR. 1960. Evidence for a vicinal dithiol in oxidative phosphorylation. *Proc Natl Aca Sci USA* 46(5), 608-616.
- Fracchia L, Martínez N, Soria N, Gandur MJ y Riera N. 2003. Agresión e interacción social en ratones contaminados con plomo. *Rev Fac Med* 4(1), 23-27.

- Franzblau A y Lilis R. 1989. Acute arsenic intoxication from environmental arsenic exposure. *Arch Environ Health* 44(6), 358-390.
- García-Chávez E, Jiménez I, Segura B y del Razo LM. 2006. Lipid oxidative damage and distribution of inorganic arsenic and its metabolites in the rat nervous system after arsenite exposure: influence of alpha tocopherol supplementation. *Neurotoxicology* 27(6), 1024-1031.
- García-Vargas G, del Razo LM, Cebrian ME, Albores A, Ostrosky-Wegman P, Montero R, Gonsebatt M, Lim C y de Matteis F. 1994. Altered urinary porphyrin excretion in a human population chronically exposed to arsenic in Mexico. *Hum Exp Toxicol* 13(12), 839-847.
- Gerfen CR. 2006. Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 9(2), 157-158.
- Giordano M. 2007. El estriado dorsal y ventral: la interfase entre cognición, motivación y acción. En J Juárez (Ed.). *Neurobiología del hedonismo* (pp. 1-20). México: Manual Moderno.
- Glickstein SB y Schmauss C. 2004. Focused motor stereotypies do not require enhanced activation of neurons in striosomes. *J Comp Neurol* 469(2), 227-238.
- Goyer RA y Clarkson TW. 2006. Efectos tóxicos de los metales. En CD Klaassen y JB Watkins III (Eds.), *Fundamentos de toxicología*. (pp. 354-366). New York: McGraw-Hill.
- Hayakawa T, Kobayashi Y, Cui X y Hirano S. 2005. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch Toxicol* 79(4), 183-191.
- Hughes MF y Kenyon EM. 1998. Dose-dependent effects on the disposition of monomethylarsonic and dimethylarsinic acid in the mouse after intravenous administration. *J Toxicol Environ Health A* 53(2), 95-112.
- Hughes MF, Kenyon EM, Edwards BC, Mitchel CT, del Razo LM y Thomas DJ. 2003. Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicol Appl Pharmacol* 191(3), 202-210.
- Hughes MF, Devesa V, Adair BM, Styblo M, Kenyon EM y Thomas DJ. 2005. Tissue dosimetry, metabolism and excretion of pentavalent and trivalent monomethylated arsenic in mice after oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 208(2), 186-197.

- IARC. 2004 Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. International Agency for Research on Cancer. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/4f0b1:3>
- Itoh T, Zhang YF, Murai S, Saito H, Nagahama H, Miyate H, Saito Y y Abe E. 1990. The effect of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice. *Toxicol Lett* 54(2-3), 345-353.
- Jackson DM y Westlind-Danielsson A. 1994. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther* 64(2), 291-370.
- Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, Baros S, Liska J, Hudecova D, Rhodes CJ y Valko. 2011. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol* 31(2), 95-107.
- Jones FT. 2007. A broad view of arsenic. *Poult Sci* 86(1), 2-14.
- Jones DC y Miller GW. 2008. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: a posible role in drug adiction. *Biochem Pharmacol* 76(5), 569-581.
- Kannan GM, Tripathi N, Dube SN, Gupta M y Flora SJ. 2001. Toxic effects of arsenic (III) on some hematopoietic and central nervous system variables in rats and guinea pigs. *J Toxicol Clin Toxicol* 39(7), 675-682.
- Karczmar AG, Richardson DL y Kindel G. 1978. Neuropharmacological and related aspects of animal aggression. *Prog Neuro-Psychopharmacol* 2(5-6), 611-631.
- Kawai K, Nozaki T, Nishikata H, Aou S, Takii M y Kubo C. 2003. Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: The effects of metal exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 111(2), 175-178.
- Kimura A, Ishida Y, Wada T, Yokoyama H, Mukaida N y Kondo T. 2005. MRP-1 expression levels determine strain-specific susceptibility to sodium arsenic-induced renal injury between C57BL/6 and BALB/c mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 203(1), 53-61.
- Kitchin KT. 2001. Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 172(3), 249-261.

- Kitchin KT y Conolly R. 2010. Arsenic- induced carcinogenesis- oxidative stress as a posible mode of action and future research needs for more biologically based risk assessment. *Chem Res Toxicol* 23(2), 327-335.
- Kitchin KT y Wallace K. 2008. The role of protein binding of trivalent arsenicals in arsenic carcinogenesis and toxicity. *J Inor Biochem* 102(3), 532-529.
- Klaassen CD. 2008. *Toxicology. The basic science of poisons*. Nueva York: Mc Graw-Hill.
- Klaunig JE y LM. Kamendulis. 2008. Chemical carcinogenesis. En CD Klaassen (Ed.). (pp. 329-379).
- Kobayashi H, Yuyama A, Ishikara M y Matsusaka M. 1987. Effects of arsenic on cholinergic parameters in brain in vitro. *Neuropharmacology* 26(12), 1707-1713.
- Koolhaas JM, Schuurman T y Wiepkema PR. 1980. The organization of intraspecific agonistic behavior in the rat. *Prog Neurobiol* 15(3), 247-268.
- Korff S y Harvey BH. 2006. Animal models of obsessive-compulsive disorder: rationale to understanding psychobiology and pharmacology. *Psychiatr Clin North Am* 29(2), 371-390.
- Kulig B y Jaspers RMA. 1999. Assessment techniques for detecting neurobehavioral toxicity. En B Weiss y JL O'Donaghe (Eds). *Neurobehavioral toxicity: analysis and interpretation*. (pp. 70-113). New York: Raven Press.
- Kumagai Y y Sumi D. 2007. Arsenic: signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 243-262.
- Liu Z. 2010. Roles of vertebrate aquaglyceroporins in arsenic transport and detoxification. *Adv Exp Med Biol* 679, 71-81.
- Livak KJ y Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-(-Delta Delta C (T))} method. *Methods* 25(4), 402-408.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1), 265-275.
- Martínez N, Gandur M, Soria N y Riera N. 2001. Evaluación de las alteraciones conductuales y dopaminérgicas en ratones con bajas concentraciones de plomo. *Rev Tox* 18(2), 87-91.

- Meador-Woodruff JH, Mansour A, Healy DJ, Kuehn R, Zhou QY, Bunzow JR, Akil H, Civelli O y Watson SJ Jr. 1991. Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 5(4), 231-242.
- Mejía JJ, Díaz-Barriga F, Calderón J, Ríos C y Jiménez-Capdeville M. 1997. Effects of lead-arsenic combined exposure on central monoaminergic systems. *Neurotoxicol Teratol* 19(6), 489-497.
- Miczek KA, Fish EW, de Bold JF y de Almeida RMM. 2002. Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and gamma-aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology (Berl)* 163(3-4), 434-458.
- Miczek KA y de Boer S. 2005. Aggressive, defensive and submissive behavior. En IQ Wishaw IQ y B Kolb (Eds). *The behavior of the laboratory rat. A handbook with tests.* (pp. 344-352). Oxford: Oxford University Press.
- Mukherjee SC, Rahman MM, Chowdhury UK, Sengupta MK, Lodh D, Chanda CR, Saha KC, Chakraborti D. 2003. Neuropathy in arsenic toxicity from groundwater arsenic contamination in West Bengal, India. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 38(1), 165-183.
- Muñoz-Yunta JA, Palau-Baduell M, Díaz F, Aznar G, Veizaga JG, Valls-Santasusana A, Salvadó-Salvadó B y Maldonado A. 2005. Fisiopatogenia de las estereotipias y su relación con los trastornos generalizados del desarrollo. *Rev Neurol* 41(Supl. 1), S139-S147.
- Nagaraja TN y Desiraju T. 1993. Effects on operant learning and brain acetylcholine esterase activity in rats following chronic inorganic arsenic intake. *Hum Exp Toxicol* 13(5), 353-356.
- Nagaraja TN y Desiraju T. 1994. 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 Toxicology* 50(1), 100-107.
- Németi B y Gregus Z. 2002. Mitochondria work as reactors in reducing arsenate to arsenite. *Toxicol Appl Pharmacol* 182(3), 208-218.
- Neve K. 2010. *The dopamine receptors.* USA: Humana Presss.

- OMS. 2001. Arsenic in drinking water. Fact sheet No. 210, World Health Organization, WHO Media Centre. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs210/en/>
- Oremland RS y Stolz JF. 2003. The ecology of arsenic. *Science* 300(5621), 939-944.
- Owaga S, Chan J, Chester A, Gustafsson J, Korach K y Pfaff D. 1999. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor gene-deficit (β ERKO) male and female mice. *Proc Natl Aca Sci USA* 96(22), 12887-12892.
- Petrick JS, Ayala-Fierro F, Cullen WR, Carter DE y Aposhian HV. 2000. Monomethylarsonous acid (MMAIII) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 163 (2), 203-207.
- Pineda-Zavaleta AP, García-Vargas G, Borja-Aburto VH, Acosta-Saavedra LC, Vera E, Gómez-Muñoz A, Cebrián ME y Calderón-Aranda E. 2004. Nitric oxide and superoxide anion production in monocytes from children exposed to arsenic and lead in region Lagunera, Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol* 198(3), 283-390.
- Plutchik R. 2001. The nature of emotions; human emotions have deep evolutionary roots, a fact that may explain their complexity and provide tools for clinical practice. *American Scientist* 89(4), 344-350.
- Presti MF, Mikes HM y Lewis MH. 2003. Selective blockade of spontaneous motor stereotypy via intrastriatal pharmacological manipulation. *Pharmacol Biochem Behav.* 74(4), 833-839.
- Quaak M, van Schayck CP, Knaapen AM y van Schooten FJ. 2009. Genetic variation as a predictor of smoking cessation success. A promising preventive and intervention tool for chronic respiratory diseases? *Eur Respir J* 33(3), 468-480.
- Rodríguez VM, Carrizales L, Jiménez-Capdeville ME, Dufour L y Giordano M. 2001. The effects of sodium arsenite exposure on behavioural parameters in the rat. *Brain Res Bull* 55(2), 301-308.
- Rodríguez VM, Carrizales L, Mendoza MS, Fajardo OR y Giordano M. 2002. Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 24(6), 743-750.
- Rodríguez VM, Jiménez-Capdeville ME y Giordano M. 2003. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicol Lett* 145(1), 1-18.

- Rodríguez VM y Giordano M. 2009. Oxidative stress induced by arsenic exposure: their implications on the nervous system. En Díaz-Muñoz M y Santamaría A (Eds). Pro-oxidant reactions: Physiological and pathological implications. (pp. 121-154), India: Research Signpost.
- Rodríguez VM, Limón-Pacheco JH, Carrizales L, Mendoza-Trejo MS y Giordano M. 2010. Chronic exposure to low levels of inorganic arsenic causes alterations in locomotor activity and in the expression of dopaminergic and antioxidant systems in the albino rat. *Neurotoxicol Teratol* 32(6), 640-647.
- Rosen BP y Liu Z. 2008. Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environ Int* 35(3), 512-515.
- Sanberg PR, Zoloty SA, Willis R, Ticarich CD, Rhoads K, Nagy RP, Mitchell SG, Laforest RA, Jenks JA, Harkabus LJ, Gurson DB, Finnefrock JA y Bednarik E. 1987. Digiscan activity: automated measurement of thigmotactic and stereotypic behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 27(3), 569-572.
- Sarna JR, Dyck RH y Wishaw IQ. 2000. The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. *Behav Brain Res* 108(1), 39-45.
- Schulz H, Nagymajtenyi L, Institoris L, Papp A y Siroki O. 2002. A study on behavioral, neurotoxicological, and immunotoxicological effects of subchronic arsenic treatment in rats. *J Toxicol Environ Health A* 65(16), 1181-1193.
- Selye H. 1937. The significance of the adrenals for adaptation. *Science* 85(2201), 247-248.
- Serri GA y Ely DL. 1984. A comparative study of aggression related changes in brain serotonin in CBA, C57BL and DBA mice. *Behav Brain Res* 12(3), 283-289.
- Siegel GJ, Wayne R, Brady ST y Price DL. 2006. *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and chemical aspects*. Amsterdam: Elsevier.
- Smedley PL y Kinniburgh DG. 2002. A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *Appl Geochem* 17(5), 517-586.
- Smith AH, Lingas EO y Rahman M. 2000. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bull World Health Organ* 78(9), 1093-1103.
- Smith AH, Lopipero PA, Bates MN y Steinmaus CM. 2011. Public Health. Arsenic epidemiology and drinking water standards. *Science* 296(5576), 2145-2146.

- Soto P, Lara F, Portillo L y Cianca A. 2003. On overview of arsenic's groundwater occurrence in Mexico. Gerencia Subterránea de Aguas. Comisión Nacional del Agua. CNA. <http://www.igeograf.unam.mx/aih/pdf/T4/T4-31.pdf>
- Stybło M, del Razo LM, Vega L, Germolec RD, Lecluyse EL, Hamilton GA, Reed W, Wang C, Cullen WR y Thomas DJ. 2000. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch Toxicol* 74(6), 289-299.
- Svensson K, Carlsson A, Huff RM, Kling-Petersen T y Waters N. 1994. Behavioral and neurochemical data suggest functional differences between dopamine D2 and D3 receptors. *Eur J Pharmacol* 263(3), 235-243.
- Thomas DJ. 2007. Molecular process in cellular arsenic metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 222(3), 365-373.
- Thomas DJ, Stybło M y Lin S. 2001. The cellular metabolism and systematic toxicity of arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 176 (2), 127-144.
- Thomas DJ, Li J, Waters SB, Xing W, Adair BM, Drobna Z, Devesa V y Stybło M. 2007. Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. *Exp Biol Med* 232(1), 3-13.
- Tinsley RB, Bye CR, Parish CL, Tziotis-Vais A, George S, Culvenor JG, Li Qx, Masters CL, Finkenstein DI y Home MK. 2009. Dopamine D2 receptor knockout mice develop features of Parkinson disease. *Ann Neurol* 66(4), 472-484.
- Tripathi N, Kannan GM, Pant BP, Jaiswal DK, Malhotra PR y Flora SJS. 1997. Arsenic-induced changes in certain neurotransmitter levels and their recoveries following chelation in rat whole brain. *Toxicol Lett* 92(3), 201-208.
- Tsai S, Chou H, The H, Chen CM y Chen CJ. 2003. The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence. *Neurotoxicology* 24(4-5), 747-753.
- Vahter M. 1999. Variation in human metabolism of arsenic. En WR Chappel, CO Abernathy y RL Calderon (Eds). *Arsenic exposure and health effects III. Proceedings of the Third International Conference on Arsenic Exposure and Health Effects.* (267-279). USA: Elsevier.

- Vahter M. 2002. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 181-182, 211-217.
- Vahter M y Marafante E. 1983. Intracellular interaction and metabolic fate of arsenite and arsenate in mice and rabbits. *Chem-Biol Interact* 47(1), 29-44.
- Valenzuela OL, Borja-Aburto VH, García-Vargas GG, Cruz-González MB, García-Montalvo EA, Calderón-Aranda ES y del Razo LM. 2005. Urinary trivalent methylated arsenic species in population chronically exposed to inorganic arsenic. *Environ Health Perspect* 113(3), 250-254.
- Valzelli L. 1967. Drugs and aggressiveness. *Adv Pharmacol* 5, 79-108.
- Van Loo PLP, Mol JA, Koolhaas JM, Van Zutphen BFM y Baumans V. 2001. Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. *Physiol Behav* 72(5), 675-683.
- Wakefield J. 2002. The lead effect? *Environ Health Perspect* 110(10), A574-A580.
- Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Factor-Litvak P, van Green A, Slavkovich V, Lolocono NJ, Cheng Z, Hussain I, Momotaj H y Graziano JH. 2004. Water arsenic exposure and children's intellectual function in Arahazar Bangladesh. *Environ Health Perspect* 112(13), 1329-1333.
- Waszcak BL y Walters JR. 1983. Dopamine modulation of the effects of gamma-aminobutyric acid on substantia nigra pars reticulata neurons. *Science* 220(4593), 218-221.
- Waters N, Svensson K, Haadsma-Svensson SR, Smith MW y Carlsson A. 1993. The dopamine D3-receptor: a postsynaptic receptor inhibitory on rat locomotor activity. *J Neural Transm Gen Sect* 94(1), 11-19.
- Waters SB, Devesa V, del Razo LM, Styblo M y Thomas DJ. 2004. Endogenous reductants support the catalytic function of recombinant rat cyt19, an arsenic methyltransferase. *Chem Res Toxicol* 17(3), 404-409.
- Wersinger SR, Caldwell HK, Christiansen M y Young WS. 2007. Disruption of the vasopressin 1b receptor gene impairs the attack component of aggressive behavior in mice. *Genes Brain Behav* 6(7), 653-660.
- Yamanaka K, Hoshino M, Okamoto M, Sawamura R, Hasegawa A y Okada S. 1990. Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics, is for

the major part likely due to its peroxy radical. *Biochem Biophys Res Commun* 168(1), 58-64.

Yaryura J y Neziroglu F. 2001. Un viaje al interior del cerebro. El espectro obsesivo-compulsivo. Argentina: Polemos.

Zakharyan RA, Sampayo-Reyes A, Healy SM, Tsaprailis G, Board PG, Liebler DC y Aposhian H. 2001. Human monomethylarsonic acid (MMAV) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chem Res Toxicol* 14(8), 1051-1057.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquemas alternativos para la biotransformación del arsénico (As) en metabolitos metilados. (a) Las reducciones y metilaciones oxidantes intercaladas permiten que el As trivalente (As^{III}) sea convertido en ácido metilarsónico (MMA^V), el cual es reducido a ácido monometilarsenoso (MMA^{III}), posteriormente este arsenical es convertido a ácido dimetilarsínico (DMA^V) y reducido a ácido dimetilarsínico (DMA^{III}). Finalmente, estas especies dimetiladas son convertidas a óxido trimetilarsina (TMA^{III}). En (b) la metilación del As involucra la formación de complejos de arsénico-glutatión. Sulfo-adenosilmetionina (AdoMet), sulfo-adenosilhomocisteína (AdoHcy), glutatión (GSH) (Modificado de Thomas, 2007). 5
- Figura 2.** Localización y proyecciones de 9 grupos dopaminérgicos (A8 a A16) en el cerebro de una rata adulta (Modificado de Björklund y Dunett, 2007). 9
- Figura 3.** La ruta de síntesis de la dopamina (DA) inicia con la conversión de la tirosina a levodopa (L-DOPA) y la subsecuente descarboxilación de ésta a DA por medio de la DOPA descarboxilasa (DDC). La DA puede ejercer su acción sobre las neuronas postsinápticas al interactuar con sus receptores (DRD). Este neurotransmisor es metabolizado principalmente por la monoaminoxidasa (MAO) a ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y por la catecol metiltransferasa (COMT) a ácido homovanílico (HVA) (Modificado de Quaak et al., 2009). 12
- Figura 4.** Los receptores de dopamina tipo D1 y D2 se acoplan diferencialmente a proteínas G que activan ($G_{\alpha s}$ o G_{β}) o inhiben ($G_{\alpha i}$) a la adenilato ciclasa (AC) para iniciar la señalización de la DA. La vía de activación requiere la conversión del ATP en AMPc, el cual desinhibe a la subunidad catalítica de una cinasa (PKA); a este nivel se regula la actividad de la PKA mediante la fosforilación de la fosfoproteína DARP32 en diferentes residuos de treonina (Thr 34 ó Thr 75). La fosforilación de CREB modulada por la PKA, así como la activación de elementos moduladores (CREM) y el factor activador de la transcripción (ATF) permiten que se lleve a cabo la transcripción de numerosos genes y, por tanto, la modulación de procesos complejos como el movimiento. (Modificado de Cell Signaling Technology, 2011). [<http://www.cellsignal.com/pathways/neuroscience.jsp>]. 14
- Figura 5.** Estructura de la conducta de ratas cuando están en presencia de un conoespecífico subordinado. El tamaño de los círculos y el grosor de las flechas indican la preferencia por una conducta determinada (Modificado de Koolhaas et al., 1980). 23
- Figura 6.** Alteración del circuito cortical-estriatal-tálamo-cortical (CSTC) en el trastorno obsesivo-compulsivo (TOC). La entrada cortical al estriado resulta en la activación del tálamo a través de la vía directa al globo pálido interno (GPi) y a la sustancia nigra pars reticulata (SNpr), mientras que la activación talámica decrece si se estimula la vía indirecta que incluye al globo pálido externo (GPe) y al núcleo subtalámico (NST). El circuito CSTC se cierra con las aferentes glutamatérgicas del tálamo a la corteza. En el TOC al parecer existe actividad exacerbada en la corteza y en el núcleo caudado, particularmente del núcleo caudado al GPi (Modificado de Korff y Harvey, 2006). 27
- Figura 7.** Secuencia de la metodología experimental, los grupos experimentales fueron expuestos durante 6 meses a arsénico (As) (Mes 1 al Mes 6). 34
- Figura 8.** Peso corporal del grupo control y los grupos tratados con 0.5 ó 5 mg As/L administrados en el agua para beber durante 6 meses de tratamiento. El peso promedio inicial de los grupos experimentales fue de 32.5, 32 y 32.6 g, respectivamente. 41
- Figura 9.** Distancia total recorrida de ratones control y expuestos a 0.5 ó 5 mg As/L en el segundo mes de intoxicación en un registro de 24 h continuas, los grupos expuestos a As recorren menos distancia (* y # diferente con respecto al grupo control, $p < 0.05$). 43

Figura 10. Distancia total recorrida de ratones control y expuestos a 0.5 ó 5 mg As/L en el sexto mes de intoxicación en un registro de 24 h continuas. En la fase de oscuridad los dos grupos de ratones tratados con arsénico se desplazan menos, mientras que en la fase de luz el grupo tratado con la dosis más alta es más activo (* y # diferente con respecto al grupo, $p < 0.05$). 44

Figura 11. Actividad horizontal recorrida de ratones control y expuestos a dosis de 0.5 ó 5 mg As/L en el sexto mes de intoxicación en un registro de 24 h continuas. En el primer bloque de horas de la fase de luz es más activo el grupo tratado con 5 mg As/L, mientras que en el bloque de 16-18 h la actividad de los dos grupos tratados con arsénico disminuye (* y # diferente con respecto al grupo, $p < 0.05$). 45

Figura 12. Frecuencia de incorporaciones sobre las patas traseras sin apoyo en las paredes de la caja durante el primer mes de exposición a As, los ratones del grupo 5 mg As/L se incorporan más ocasiones (* diferente con respecto al control, $p < 0.05$). 48

Figura 13. Frecuencia de incorporaciones sobre las patas traseras con apoyo en las paredes de la caja, los ratones tratados con 5 mg As/L se incorporan más en el segundo mes y en el tercer mes los ratones tratados con 0.5 mg As/L se incorporan menos (* , # diferente con respecto al control, $p < 0.05$). 49

Figura 14. Niveles relativos de expresión de RNAm en miembros de la familia de receptores de dopamina (DAR D1 y D2) en el estriado de ratones expuestos crónicamente a 0.5 ó 5 mg As/L, datos normalizados con β -actina. En cada caso se representa el recorrido intercuartílico (caja), el valor mínimo y máximo (bigotes) de los niveles relativos de expresión de RNAm (* diferente con respecto al grupo control, $p < 0.05$). 50

Figura 15. Niveles relativos de expresión de RNAm en miembros de la familia de receptores de dopamina (DAR D1 y D2) en el núcleo accumbens de ratones espuestos crónicamente a 0.5 ó 5 mg As/L, datos normalizados con β -actina. En cada caso se representa el recorrido intercuartílico (caja) de los niveles relativos de expresión del RNAm. 51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Alteraciones en el sistema nervioso debido a la exposición a arsénico en seres humanos (Modificada de Rodríguez et al., 2003).....	17
Tabla 2. Alteraciones conductuales en roedores después del tratamiento con arsénico (Modificada de Rodríguez et al., 2003).....	19
Tabla 3. Efectos de la exposición de arsénico sobre los sistemas monoaminérgicos en roedores (Modificada de Rodríguez et al., 2003).....	21
Tabla 4. Cebadores utilizados para el PCR tiempo real.....	39
Tabla 5. Condiciones usadas en el ensayo de PCR- tiempo real.....	39
Tabla 6. Concentración de monoaminas y sus metabolitos (ng/mg proteína) en 3 regiones cerebrales de ratones expuestos a 0.5 ó 5 mg As/L mediante agua para beber durante seis meses de tratamiento.	49

ANEXOS

Anexo 1. Valores reportados para diferentes parámetros de la conducta agresiva, según las comparaciones de los grupos tratados con arsénico y el grupo control mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

	Mes 1		Mes 2		Mes 3		Mes 4		Mes 5		Mes 6	
	H	p	H	p	H	p	H	p	H	p	H	p
Frecuencia de ataques	1.162	0.559	4.164	0.125	2.138	0.336	1.741	0.419	0.049	0.976	0.385	0.825
Latencia de aparición del primer ataque	1.169	0.557	5.023	0.081	4.135	0.127	0.500	0.779	0.136	0.934	0.525	0.769
Duración total de todos los ataques	1.347	0.509	3.619	0.164	1.530	0.465	1.166	0.558	0.207	0.902	0.637	0.727
Movimientos de cola laterales	0.478	0.787	4.508	0.105	3.380	0.185	0.742	0.690	0.068	0.967	0.780	0.677
Boxeo	0.706	0.702	0.786	0.675	0.752	0.687	3.297	0.192	2.495	0.287	1.955	0.376

Nota: Para todos los casos (k-1)=2 y n=33. Valor de H (H) y valor de probabilidad (p).

Anexo 2. Valores reportados para conductas típicas de los ratones con referencia al grupo control, según la prueba de Kruskal-Wallis.

	Mes 1		Mes 2		Mes 3		Mes 4		Mes 5		Mes 6	
	H	p	H	p	H	p	H	p	H	p	H	p
Acicalamiento	1.570	0.456	4.187	0.123	1.068	0.586	2.698	0.260	0.138	0.932	4.493	0.106
Duración total del acicalamiento	2.520	0.284	0.177	0.916	1.254	0.534	1.621	0.445	0.226	0.893	5.331	0.070
Incorporaciones	10.158	0.006	8.855	0.012	7.364	0.025	2.896	0.235	0.455	0.797	2.722	0.267
Incorporaciones con apoyo	3.862	0.145	6.166	0.046	8.569	0.014	2.395	0.302	2.132	0.344	1.623	0.444

Nota: Para todos los casos (k-1)=2 y n=33. Las pruebas post hoc indican que la frecuencia de incorporaciones es mayor en el grupo de 5 mg As/L (mes 1) que el grupo control, los meses siguientes no son diferentes del control. Las incorporaciones con apoyo aumenta para el grupo de 5 mg As/L (mes 2) y disminuye para el de 0.5 mg As/L (mes 3), con respecto al grupo control. Valor de H (H) y valor de probabilidad (p).

Anexo 3. Evaluación de la conducta agresiva y otras conductas desde m1 a m6 mediante una prueba de Friedman.

	Control		0.5 mg As/L		5 mg As/L	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
Conducta agresiva						
Frecuencia de ataques	6.071	0.299	0.417	0.995	2.429	0.787
Latencia de aparición del primer ataque	1.518	0.911	0.476	0.993	2.626	0.757
Duración total de todos los ataques	5.429	0.366	2.595	0.762	2.077	0.838
Movimientos de cola laterales	1.250	0.940	2.083	0.838	3.813	0.577
Boxeo	3.804	0.578	1.536	0.909	3.681	0.596
Acicalamiento	9.464	0.092	10.250	0.069	4.154	0.528
Duración total del acicalamiento	2.161	0.827	16.643	0.005	9.703	0.084
Rearing	2.786	0.733	6.476	0.263	10.242	0.069
Wall rearing	5.911	0.315	10.107	0.072	5.418	0.367

Nota: Control (n, g.l.)= (8,5), 0.5 mg As/L (n, g.l.)= (12,5) y 5.0 mg As/L (n, g.l.)= (13,5). Valor de χ^2 (χ^2) y valor de probabilidad (p).

Anexo 4. Actividad locomotora espontánea analizada con análisis de varianza de medidas repetidas.

Variable		g.l.	Mes 1		Mes 2		Mes 3		Mes 4		Mes 5		Mes 6	
			F	p	F	P	F	p	F	p	F	p	F	p
AH	Grupo	a	0.128	0.881	0.657	0.526	0.373	0.692	2.663	0.086	0.837	0.443	6.589	0.004
	Tiempo	b	7.804	<.0001	10.141	<.0001	9.488	<.0001	8.380	<.0001	13.026	<.0001	10.964	<.0001
	interacción	c	1.239	0.138	1.043	0.397	0.974	0.523	1.274	0.110	1.276	0.106	1.288	0.101
DT	Grupo	a	0.587	0.562	1.176	0.322	1.661	0.207	1.240	0.304	1.156	0.328	3.057	0.062
	Tiempo	b	5.585	<.0001	6.509	<.0001	5.062	<.0001	5.707	<.0001	10.228	<.0001	10.180	<.0001
	interacción	c	1.318	0.081	1.493	0.0210	1.110	0.290	1.044	0.396	1.157	0.226	1.571	0.0107
NE	Grupo	a	0.577	0.568	0.300	0.743	0.295	0.747	0.920	0.410	0.919	0.410	27.04	0.083
	Tiempo	b	10.438	<.0001	10.930	<.0001	11.038	<.0001	10.441	<.0001	15.457	<.0001	13.768	<.0001
	interacción	c	1.339	0.067	0.895	0.672	0.886	0.688	1.051	0.383	1.230	0.146	1.138	0.250

Nota: Para todos los casos indicados con la letra a (2,30), b (23,690) y c (46,690). Valor de F (F) y valor de probabilidad (p).