UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

EVALUACION DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACION TRANSPLACENTARIA Y POSTNATAL DE ARSENICO SOBRE EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA

POR:

Q.F.B. Y M.C. MARTHA EUGENIA SANTOYO PEREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Morfología

DICIEMBRE 2006

Q.F.B. Y M.C. MARTHA EUGENIA SANTOYO PEREZ

TD
QL813
.M55
S36
2006
c.1

2006

1080156862

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

EVALUACION DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACION TRANSPLACENTARIA Y POSTNATAL DE ARSENICO SOBRE EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA

POR:

Q.F.B. Y M.C. MARTHA EUGENIA SANTOYO PEREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Morfología

DICIEMBRE 2006

U Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS DOCTORADO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN TRANSPLACENTARIA Y POSTNATAL DE ARSÉNICO SOBRE EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA.

POR

Q.F.B. Y M.C. MARTHA EUGENIA SANTOYO PÉREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Morfología

Diciembre del 2006

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN TRANSPLACENTARIA Y POSTNATAL DE ARSÉNICO SOBRE EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA.

Aprobación de la tesis:

PhD MARÍA ESTHER JIMÉNEZ CATAÑO.
Directora de tesis

M.C.P. y PhD JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA.
Co-director de tesis

Dra. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS.
Co-directora de tesis

Dra. RAQUEL BALLESTEROS ELIZONDO.
Co-directora de tesis

Dra. Med. LOURDES GARZA OCAÑAS.
Comisión de tesis

Dr. DIONICIO A. GALARZA DELGADO.
Subdirector de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN TRANSPLACENTARIA Y POSTNATAL DE ARSÉNICO SOBRE EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA.

Presentado por:

M.C. MARTHA EUGENIA SANTOYO PÉREZ

Este trabajo se realizó en el departamento de Histología de la Facultad de Medicina,de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y en el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Bajo la dirección de la Dra. María Esther Jiménez Cataño y el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra.

FIRMAS

PhD. María Esther Jiménez Cataño.
Directora de tesis

M.C.P. y PhD Julio Sepúlveda Saavedra
Co-director de tesis

Lo más preciado que tenemos en la vida es nuestra familia. **Gracias** a mi **Esposo** y a mi **hija.**

Mamita linda Dios no ha permitido que tu presencia física me acompañara hasta esta época de mi vida, sin embargo fueron tantos e innumerables los momentos que vivimos juntas que te siento a mi lado apachándome como siempre lo hiciste. Gracias mamita por darme la vida.

AGRADECIMIENTOS

Necesitaría no tener conciencia, para en primer lugar no darle gracias a **DIOS** por permitirme llegar y disfrutar de estos momentos tan valiosos para familia, y para mi.

Estoy segura, porque así lo siento que mi **papá, Alvaro, Salvador, mi tía Angelita y mi abuelita** que se encuentran entre los ángeles del cielo están muy felices y orgullosos de este logro obtenido.

Any, Francisco, Rosquis y Lolis, no sé que hubiera pasado si ustedes no hubieran estado a mi lado durante todo este tiempo, pues el apoyo que de ustedes tuve y sigo teniendo es invaluable.

A mis hermanos **Lucita, a la guera, Chela y Jesús**. Garcias por sus comentarios y por aceptarme como soy. Las quiero mucho.

Como olvidar aquel día, que le pregunte a la doctora **María Esther** ¿si me aceptaba como su alumna de doctorado? nunca me imaginé las experiencias tan enriquecedoras que viviría con ella, pues no solo me transmitió sus conocimientos académicos sino también me brindó su amistad sincera. Gracias.

Al doctor **Julio Sepúlveda**, no tengo palabras para agradecerle todo su apoyo, paciencia y comprensión, a él le debo la gran parte de mi formación académica. Gracias doctor.

A mis amigas **Marthita, Perin y Liliana**, quienes a través del tiempo me han demostrado lo que de verdad es una amistad.

Tere, contigo he aprendido que no se requiere estar cerca para cultivar una amistad. Nunca olvidaré los momentos vívidos contigo. Gracias, por tu apoyo y hospitalidad.

Las palabras sobran para expresarles a **Lilia. Pury, Lety y Celia**, el cariño que les tengo. Gracias por ser mis amigas.

Al Biol. **Víktor Romero** y al Maestro. **Enrique Ramírez**, por todo su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo.

Gracias al doctor. **Alfonso Cárabez Trejo** y a la **I.B Ma. Lourdes Palma Tirado** por el apoyo brindado.

Al doctor **Jesús Noyola Bernal** Director de la Facultad de Medicina de la UASLP, que gracias a su intervención en mi área laboral logré culminar con éxito este posgrado.

Realmente me siento muy afortunada, de haber sido aceptada como becaria de **"PROMEP"** ya que, gracias al apoyo de este programa gubernamental me fue posible realizar este posgrado.

RESUMEN

MARTHA EUGENIA SANTOYO PÉREZ

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: diciembre del 2006

Título del Estudio: Evaluación del efecto de la administración transplacentaria y postnatal de arsénico sobre el cuerpo estriado de la rata.

Número de páginas: 77

Candidata para el grado de Doctorado en Ciencias con Especialidad en Morfología.

Area de Estudio: Morfología.

Propósito y método del Estudio. En países como México, la India, China, entre otros, un gran número de habitantes se encuentran expuestos al arsénico a través de emisiones contaminantes y de otras fuentes. La exposición a este metaloide se asocia con una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, cáncer y alteraciones en el sistema nervioso. Se han demostrado alteraciones cognitivas en niños y adolescentes expuestos crónicamente al arsénico. Ratas expuestas crónicamente al arsénico muestran alteraciones de la locomoción espontánea y en tareas de aprendizaje. El propósito de este trabajo es investigar si estas alteraciones del comportamiento son acompañadas de cambios morfológicos en el cuerpo estriado de la rata ya que ésta es una de las áreas del cerebro que participan en las tareas conductuales que se han visto alteradas por arsénico en animales expuestos. Para ello se expuso ratas Wistar al arsenito de sodio en el agua de bebida (aproximadamente 5 mg/kg/día) desde la gestación y durante la lactancia y a las hembras destetadas se les continuó la exposición con el arsenito hasta los cuatro meses de edad. Se evaluó la conducta de los animales mediante la prueba del laberinto acuático, se determinó la concentración de arsénico en cerebro, se analizó la morfología por microscopía de luz y electrónica y para la detección de apoptosis se utilizó la técnica de TUNEL.

Conclusiones y Contribuciones: En el cuerpo estriado el arsénico causa alteraciones celulares y desmielinización. Estos cambios pueden tener relación con el deficit de la prueba de aprendizaje espacial. Se demostró que la desmielinización fue reversible al suspender por un período de dos meses la exposición al arsénico, pero no así las alteraciones neuronales. Las concentraciones de arsénico en el SNC de los dos grupos experimentales no mostraron diferencias significativas, lo cual sugiere que el arsénico no se eliminó en el período de dos meses. En la tarea de aprendizaje espacial los animales mostraron una recuperación, lo cual puodría asociarse al efecto de remielinización. El presente trabajo contribuyó al esclarecimiento del mecanismo de neurotoxicidad del arsénico, especialmente en el área morfológica ya que mediante estas técnicas se demostró que existe una correlación entre las alteraciones de comportamiento ya demostradas y cambios a nivel celular. Asimismo los resultados de este trabajo servirán como base para la realización de otros proyectos.

FIRMAS

Dra. María Esther Jiménez Cataño.
Directora de tesis

M.C.P. y PhD Julio Sepúlveda Saavedra
Co-director de tesis

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo **Página**

I INTRODUCCIÓN

1.1 SISTEMA NERVIOSO 3

1.1.1 Generalidades 3

1.2 GANGLIOS BASALES 3

1.2.1 Generalidades 3

1.2.2 Componentes de los ganglios basales 4

1.2.3 Aferencias y eferencias en los componentes basales 5

1.2.4 Participación de los ganglios basales en el control del movimiento 6

1.2.5 Los circuitos dentro de los ganglios 7

1.3 ESTRIADO 9

1.3.1 Generalidades 9

1.3.2 Células del estriado 10

1.4 NÚCLEO ACCUMBENS 12

1.5 EL ARSÉNICO 13

1.5.1 Generalidades 13

1.5.2 El arsénico se presenta en dos estados de oxidación 14

1.5.3 Metilación del arsénico 15

1.5.4 Metabolismo del arsénico 15

1.5.5 S- adenosil metionina (SAM) 16

1.5.6 El arsénico en el sistema nervioso 17

1.6 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS 19

1.6.1 Justificación 19

1.6.2 Hipótesis de trabajo 19

1.6.3 Objetivos específicos 19

Capítulo **Página**

II MATERIALES Y MÉTODOS 20

2.1 MATERIAL 20

2.1.1 Material biológico 20

2.1.2 Tratamiento de los animales 20

2.1.3 Técnicas para evaluar la conducta de los animales 20

2.1.3.1 Prueba del laberinto acuático 20

2.1.4 Técnicas analíticas 20

2.1.4.1 Técnica de espectrometría de fluorescencia atómica 20

2.1.5 Técnicas morfológicas 21

2.1.5.1 Técnicas histológicas 21

2.1.5.1.1 Tinción hematoxilina-eosina 21

2.1.5.1.2 Tinción de Nissl 22

2.1.5.1.3 Tinción de Klüver – Barrera 22

2.1.5.2 Técnicas inmunohistoquímicas 22

2.1.5.2.1 Técnica de TUNEL 22

2.1.5.3 Técnica de microscopía electrónica 22

2.2 EQUIPO 22

2.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 24

2.4 MÉTODOS 25

2.4.1 Reproducción del modelo animal establecido de exposición pre y postnatal al arsénico 25

2.4.2 Pruebas de conducta 25

2.4.2.1 Prueba del laberinto acuático. 25

2.4.3 Obtención de la muestra 25

2.4.4 Determinación analítica de arsénico 26

2.4.4.1 Técnica de espectrometría de fluorescencia atómica por generador de hidruros. 26

Capítulo **Página**

2.4.5 Análisis morfológico 26

2.4.5.1 Microscopía de luz 26

2.4.5.1.1 Técnica de hematoxilina-eosina 27

2.4.5.1.2 Técnica de Nissl 27

2.4.5.1.2 Técnica de Klüver - Barrera 27

2.4.5.2 Inmunihistoquímica 27

2.4.5.2.1 Técnica de TUNEL 27

2.4.5.3 Microscopía electrónica 27

2.4.6. Análisis estadístico 28

III RESULTADOS **29**

3.1 MODELO ANIMAL 29

3.1.1 Prueba de conducta del laberinto acuático 29

3.1.2 Concentración de arsénico en cerebro 30

3.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICO 31

Microscopía de luz 31

3.2.1.1 Tinción de hematoxilia – eosina 31

3.2.1.1.1 Tratamiento por 4 meses con arsénico 31

3.2.1.1.2 Tratamiento por 4 meses con arsénico y dos meses sin exposición al arsénico 32

3.2.1.2 Tinción de Klüver - Barrera 33

3.2.1.2.1 Tratamiento por 4 meses con arsénico 33

3.2.1.2.2 Tratamiento por 4 meses con arsénico y dos meses sin exposición al arsénico 33

3.2.1.3 Tinción de Nissl 34

3.2.1.3.1 Tratamiento por 4 meses con arsénico 34

Capítulo **Página**

3.2.1.3.2 Tratamiento por 4 meses con arsénico y dos meses sin exposición al arsénico 35

3.2.1.4 Cortes semifinos 36

3.2.1.4.1 Tratamiento por 4 meses con arsénico 36

3.2.1.4.2 Tratamiento por 4 meses con arsénico y dos meses sin exposición al arsénico 36

3.2.2 Inmunohistoquímica 37

3.2.2.1 Tratamiento por 4 meses con arsénico 37

3.3.3 Microscopía electrónica 38

3.3.3.1 Tratamiento por 4 meses con arsénico 38

3.3.3.2 Tratamiento por 4 meses con arsénico y dos meses sin exposición al arsénico 39

IV DISCUSIÓN **40**

V CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES 45

5.1 Conclusiones 45

5.2 Perspectivas 46

5.3 Contribuciones 47

APÉNDICES

APÉNDICE A.Tablas 48

APÉNDICE B Soluciones 54

APÉNDICE C Técnica inmunohistoquímica de TUNEL 62

BIBLIOGRAFÍA **64**

AUTOBIOGRAFÍA **76**

LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
1. Prueba de conducta del laberinto acuático	48
2.Técnica de espectrometría de fluorescencia atómica por generador de hidruros	49
3. Técnica de hematoxilina - eosina	50
4 Técnica de Nissl (violeta de cresilo)	51
5. Técnica de Klüver – Barrera	52
6. Técnica de inclusión en resinas epóxicas (microscopía electrónica)	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA **Página**

1. Localización del neoestriado y los dos segmentos del GP en cerebro de rata. 4

2. Aferencias y eferencias de los ganglios basales. 6

3. Circuito de los ganglios basales . 9

4. Dibujo de una neurona espinosa mediana 11

5. Cuerpo y cubierta del núcleo accumbens. 13

6. Metabolismo del arsénico. 16

7. Metabolismo de la metionina. 17

8. Modelo experimental. 24

9. Gráfica de resultados de la prueba del laberinto acuático, en animales expuestos por 4 meses con arsénico. 29

10. Gráfica de resultados de la prueba del laberinto acuático, en animales expuestos por 4 meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico. 30

11. Gráfica de resultados de la concentración de arsénico en cerebro. 31

12. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata, en animales expuestos por 4 meses con arsénico. técnica H&E, 32

13. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata, en animales expuestos por 4 meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico. Técnica H&E 32

14. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata, en animales expuestos por 4 meses con arsénico. Técnica K-B 33

FIGURA **Página**

15. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata, en animales expuestos por 4 meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico. técnica K-B 34

16. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata, en animales expuestos por 4 meses con arsénico. Técnica de Nissl 35

17. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata, en animales expuestos por 4 meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico. Técnica de Nissl 35

18. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata, en animales expuestos por 4 meses con arsénico. Tinción con azul de toluidina 36

19. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata, en animales expuestos por 4 meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico. Tinción con azul de toluidina 37

20. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata, en animales expuestos por 4 meses con arsénico.Técnica de TUNEL 38

21. Micrografía electrónica de cuerpo estriado de cerebro de rata, en animales expuestos por 4 meses con arsénico. 39

22. Micrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata, en animales expuestos por 4 meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico. 39

NOMENCLATURA

%	Porciento
±	Más menos
λ	Longitud de onda
<	Menor que
*	Diferencia estadística significativa
-	Menos
Ach	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterasa
As	Arsénico
iAs^{III}	Arsénico inorgánico trivalente
iAs^{V}	Arsénico inorgánico pentavalente
ATP	Adenosin trifosfato
BH^{-}_{4}	Borohidruro
BHMT	Betaina homocisteína metiltransferasa
bra	brazo
°C	Grado centrígrado
ca	cara
CBS	Cistaionina β - cintaza

CGL	Cistaionina γ - liasa
CN	Núcleo centromedial
CNPasa	2´3´- nucleótido cíclico 3- fosfodiesterasa.
cm	Centímetros
Col	Colaboradores
CV	Cristal violeta
D1	Receptores de dopamina D1
D2	Receptores de dopamina D2
DA	Dopamina
DAB	Diaminobenzidina
$DMAs^{III}$	Ácido dimetil arsenoso
$DMAs^{V}$	Ácido dimetil arsónico
DNA	ácido desoxiribonucleico
g	gramos
GABA	Ácido Gama amino butírico
GB	Ganglios basales
GP	Globo pálido
GPi	Globo pálido interno
GPe	Globo pálido externo
GR	Glutation reductasa
GSH	L-γ-glutamil – cisteinil –glicina(en forma reducida)
GSSG	L-γ-glutamil – cisteinil –glicina(en forma oxidada)
H^+	Iones hidrógeno
H-E	Hematoxilina-eosina
H_2O	Agua
HyC	Homocisteína
K-B	Klüver-Barrera
l	Litros

MC	Corteza motora
MET	Microscopio electrónico de transmisión
ME	Microscopía electrónica
ML	Microscopía de luz
M	Molar
m	Metros
MAT	Metionina adenosil-transferasa
MAs^{III}	Ácido metil arsenoso
MAs^{V}	Ácido metil arsónico
MET	Metionina
5 MeTHF	5 Metil tetra hidrofolato
mg	Miligramos
mg/l	Miligramos por litro
ml	Mililitros
MS	Metionina – sintasa
MTHFR	Metilen tetra hidrofloato reductasa
m/v	Masa/volumen
NST	Núcleo subtálamico
nm	Nanometros
NO	Oxido nítrico
OH^{-}	Iones hidroxilo
PBM	Proteína básica de la mielina
PBS	Buffer de fosfatos salino
Pie	pierna
pH	Potencial de hidrógeno
PMC	Corteza premotora
ppm	Partes por millón (mg/l)
ppb	Partes por billón ((μg/l)

Put	Putamen
p/v	Peso sobre volumen
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAH	S- adenosil homocisteína
SAM	S- adenosil metionina
Ser	Serina
SMA	Área motora suplementaria
SN	Sustancia nigra
SNC	Sistema nervioso central
SNpc	Sustancia nigra pars compacta
SNP	Sistema nervioso periférico
SNpr	Sustancia nigra pars reticulata
TdT	Deoxinucleotidiltransferasa
µl	Microlitros
µg	Microgramos
µg/l	Microgramos por litro
µg/ml	Microgramos por mililitro
µM	Micromolar
µm	Micrometros
VTA	Área ventral tegemental.
VLo	Núcleo ventral lateral pars oralis
VApc	Núcleo ventral pars anterior parvocelularis
v/v	Volumen sobre volumen

CAPITULO 1

I INTRODUCCIÓN.

El análisis morfológico de los daños causado por arsénico al sistema nervioso se enfocó durante décadas al estudio de la neuropatía periférica. Los casos en que el arsénico alcanzaba a producir neurotoxicidad se debían a exposición a altas dosis, frecuentemente en la industria, o a intentos de suicidio, por lo que predominaron las investigaciones sobre el efecto carcinógenico por la exposición a dosis más bajas, así como de daño a otros tejidos como el hígado y el riñón. Sin embargo, a partir de la presente década, el panorama acerca de los efectos del arsénico sobre el sistema nervioso ha cambiado radicalmente. Conforme fue aumentando el número de habitantes expuestos crónicamente a arsénico en diferentes partes del mundo, ya sea por fuentes naturales o antropogénicas, se fue ampliando el conocimiento acerca de los efectos en salud de la exposición a arsénico, aún a dosis muy bajas, y el efecto neurotóxico cobró gran importancia en estas circunstancias. A través de estudios en población expuesta, se ha encontrado que el arsénico afecta funciones cerebrales superiores, especialmente en niños y adolescentes, los cuales presentaron alteraciones auditivas, deficiencias en la comprensión verbal, memoria a largo plazo y lenguaje, disminución del coeficiente intelectual y deficiencia en pruebas de función cognitiva (Bencko y Simon., 1977; Calderón y col., 2001; Wasserman y col., 2004). Asimismo, adultos que estuvieron expuestos aproximadamente durante 14 años al arsénico mostraron alteraciones en la fuerza con la que podían sujetar los objetos, movimiento de los dedos y no tenían coordinación entre las manos y la mirada, además mostraron temblores (Gerr y col., 2000).

Todos estos síntomas manifestados en los humanos sugieren que existen alteraciones neuronales en las regiones cerebrales que participan en funciones motoras así como en los procesos de integración de la memoria y el aprendizaje, sin embargo no se han llevado a cabo estudios morfológicos sobre los efectos de arsénico en el sistema nervioso central.

El curso que ha seguido la investigación sobre la neurotoxicidad del arsénico ha sido la exploración de efectos a nivel neuroquímico y conductual, en modelos animales como la rata y el ratón (Rodríguez *y col., 2001,2002).* En estos estudios, se reportan efectos neurotóxicos de arsénico a dosis que no se asocian ni con la muerte, ni a pérdida de peso en los animales de experimentación y han permitido identificar alteraciones en varios sistemas de comunicación y en funciones integrales del SNC que podrían ser similares a lo que ocurre en el cerebro humano. El siguiente paso crucial entonces es identificar en estos modelos mediante análisis morfológico la topografía de las lesiones, así como la naturaleza y características del daño. Esta información será de enorme utilidad para correlacionarla o para explicar los efectos neuroquímicos y neuroconductuales encontrados. Por lo tanto, el análisis morfológico permitirá completar el perfil neurotoxicológico del arsénico en modelos animales.

Las alteraciones en las tareas de aprendizaje y conductuales que se han encontrado en los modelos animales mencionados se asocian a disfunción de los ganglios basales. Recientemente se han realizado múltiples estudios en los que se ha demostrado que el cuerpo estriado es un componente de los ganglios basales especialmente susceptible a daño por agentes tóxicos. Las neuronas espinosas medianas que constituyen aproximadamente el 95% de la población celular del estriado y que en su mayoría contienen GABA son el blanco de la mayor parte de aferencias glutamatérgicas de la corteza cerebral y participan en la coordinación motora. Por otro lado el núcleo accumbens, un constituyente del estriado ventral es una de las áreas de cerebro que participa en el procesamiento de la memoria y el aprendizaje además de las tareas conductuales.

En el presente trabajo se reprodujo este modelo animal y se llevó a cabo un análisis morfológico de los componentes del cuerpo estriado utilizando métodos de microscopía de luz y electrónica para conocer si los cambios neuroquímicos y conductuales que se manifiestan en animales expuestos al arsénico se correlacionan con alteraciones celulares o de los tractos nerviosos. Asimismo, se investigó si estas alteraciones podrían ser reversibles al suspender por un periodo de tiempo la exposición.

Como antecedentes de este trabajo se iniciará con las generalidades del sistema nervioso, la descripción de los componentes de los ganglios basales y sus sistemas de conexión, así como las funciones, componentes celulares e importancia del estriado. A continuación se expondrán generalidades sobre el arsénico y sus efectos tóxicos, y finalmente se referirán los trabajos que hasta hoy se han publicado referentes al efecto neurotóxico del arsénico, como antecedentes directos de este trabajo.

1.1 SISTEMA NERVIOSO.

1.1 Generalidades.

El tejido nervioso está distribuido por todo el organismo formando una red de comunicaciones que constituye el sistema nervioso. Desde el punto de vista anatómico, este sistema se divide en: **sistema nervioso central** (SNC) formado por el encéfalo y la médula espinal y el **sistema nervioso periférico** (SNP) formado por los nervios y por pequeños grupos de neuronas denominados ganglios nerviosos. Los nervios están formados principalmente por las prolongaciones de las neuronas (células nerviosas) localizadas en el SNC o en los ganglios nerviosos. El SNC integra y procesa la información que recibe de los nervios periféricos y de los sistemas endócrino e inmune.

Dentro del sistema nervioso central se encuentran diversas estructuras con los hemisferios cerebrales, como **la corteza, tálamo, tallo cerebral, ganglios basales** y **cerebelo** los cuales desempeñan un papel clave en la planeación, inicio, y ejecución de los movimientos (Marin y col., 1998, Squire y Knowlton, 1995), y sobre el cuerpo estriado que es un componente de los ganglios basales se centró nuestra investigación.

1.2 GANGLIOS BASALES.

1.2.1 Generalidades.

Los ganglios basales son estructuras subcorticales interconectadas con el cerebro anterior, medio y el diencéfalo. Estas estructuras comparten ciertas características funcionales, ya que todas participan en el control de movimientos. Sin embargo, a diferencia de otros componentes del sistema motor, los ganglios basales no hacen conexiones directas ni indirectas con la médula espinal. La mayor parte de aferencias que recibe son de la corteza cerebral, envían señales al tálamo y éste las regresa a las cortezas motora, premotora y prefrontral. Estudios patológicos en humanos que padecieron alguna enfermedad neurológica, como Parkinson, Huntington y hemibalismo, revelaron alteraciones celulares en los ganglios basales, por lo que se concluyó que estas estructuras están directamente relacionadas con el control motor. Debido a estos hallazgos se consideró que los ganglios basales son los mayores componentes del sistema motor extrapiramidal y que junto con el sistema motor piramidal controlan los movimientos. Además de su participación en el funcionamiento motor, también se han asociado con algunos aspectos del conocimiento y el comportamiento.

1.2.2 Componentes de los ganglios basales.

Los componentes de los ganglios basales son: el cuerpo **estriado** (caudado- putamen y núcleo accumbens), **globo pálido, núcleo subtálamico, y sustancia nigra** (figura 1).

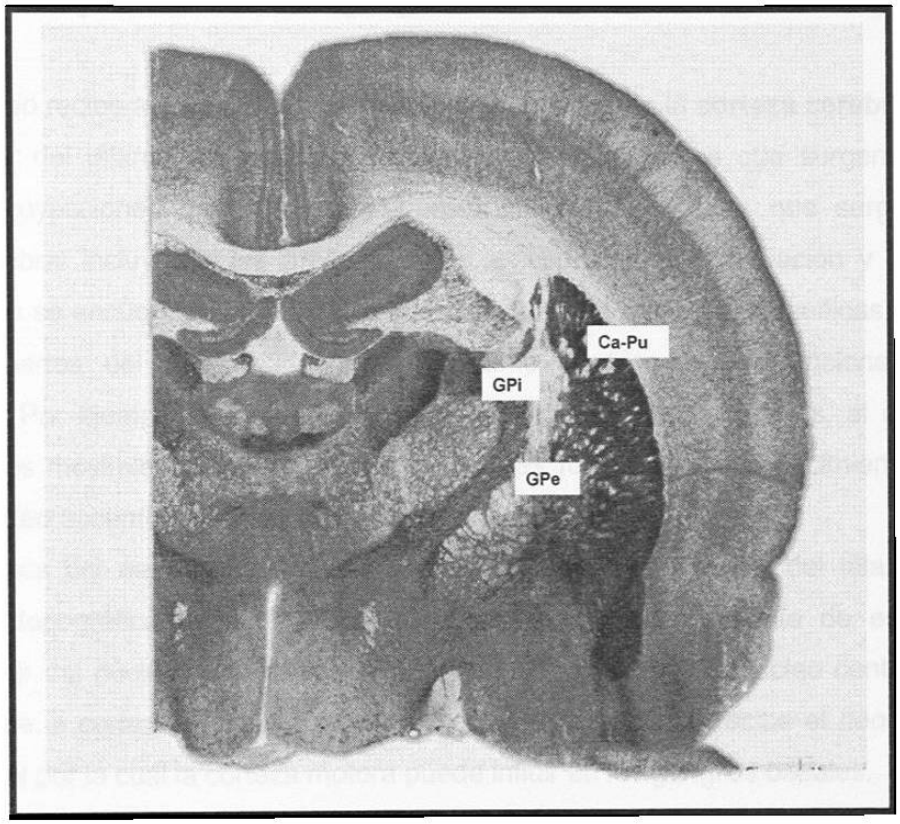


Figura 1. Localización del *neoestriado* y los dos segmentos del globo pálido, en cerebro de rata. **Ca-Pu**; caudado putamen, **GPi**; globo pálido interno, **GPe**; globo pálido externo. Tomada de Paxinos y Watson. 2004.

El núcleo **caudado y putamen** se desarrollan a partir de la misma estructura telencéfalica debido a ello se encuentran constituidas por los mismos tipos celulares, estos dos núcleos en conjunto son denominados *neoestriado* y son los núcleos de entrada de los ganglios basales.
El **globo pálido** (GP) se deriva del diencéfalo y se encuentra medial al putamen y lateral a la capsula interna, se encuentra dividido en dos segmentos, el interno (GPi) y externo (GPe). El **núcleo subtálamico** (NST) se encuentra debajo del tálamo, y en unión con el mesencéfalo. La **sustancia nigra** (SN) tiene dos zonas: una ventral, llamada pars reticulata (SNpr) que se asemeja citológicamente al GP y una dorsal la pars compacta (SNpc), zona oscura y

pigmentada, que contiene neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares contienen neuromelanina, que es un polímero derivado de la dopamina; en los cortes de cerebro esta región aparece negra por ello la sustancia *nigra* recibe este nombre. Debido a sus similitudes en la citología, conectividad y funciones el GPi y la SNpr son considerados como una sola estructura solo divididos por la capsula interna. El GPi y SNpr son considerados los mayores núcleos de salida de los ganglios basales.

1.2.3 Aferencias y eferencias en los ganglios basales.

El *neoestriado* recibe aferencias de dos principales fuentes: de la **corteza cerebral** y del **núcleo intralaminar** del tálamo (figura 2). Las más importantes son las que surgen de la **corteza cerebral** (proyecciones corticoestriatales), esta vía contiene fibras que surgen de toda la corteza cerebral incluyendo las áreas motoras, sensoriales, de asociación y límbicas. Estas proyecciones se encuentran organizadas topográficamente en áreas específicas, son dirigidas a diferentes partes del *neoestriado* y por lo tanto también tienen funciones diferentes y especificas. Por ejemplo el putamen se relaciona con las áreas motoras, el caudado con el control de los movimientos de los ojos y con ciertas funciones del conocimiento y el estriado ventral (núcleo accumbens) se relaciona a funciones límbicas.

Las aferencias del *neoestriado* que surgen del **núcleo intralaminar** del tálamo también se encuentran topográficamente organizadas. Un importante componente de estas aferencias surge a partir del núcleo centromedial y termina en el putamen. El núcleo centromedial recibe aferencias de la corteza motora, y esta proyección de fibras que recibe el *neoestriado* es una ruta adicional por la cual la corteza motora puede influir en los ganglios basales.

También las proyecciones que envía el *neoestriado* están organizadas, de tal manera que cada región de éste proyecta a partes específicas del GP y SN, y estas vías son denominadas estriadopalidal y estriadonigral.

El NST recibe señales del GPe y envía señales a ambos segmentos del GP, y SNpr. El NST recibe aferencias topográficamente organizadas de las cortezas motora y premotora, proporcionando a la corteza motora otra vía para modular las eferencias de los ganglios basales. Finalmente el *neoestriado* recibe una importante proyección dopaminérgica a partir de la SNpc.

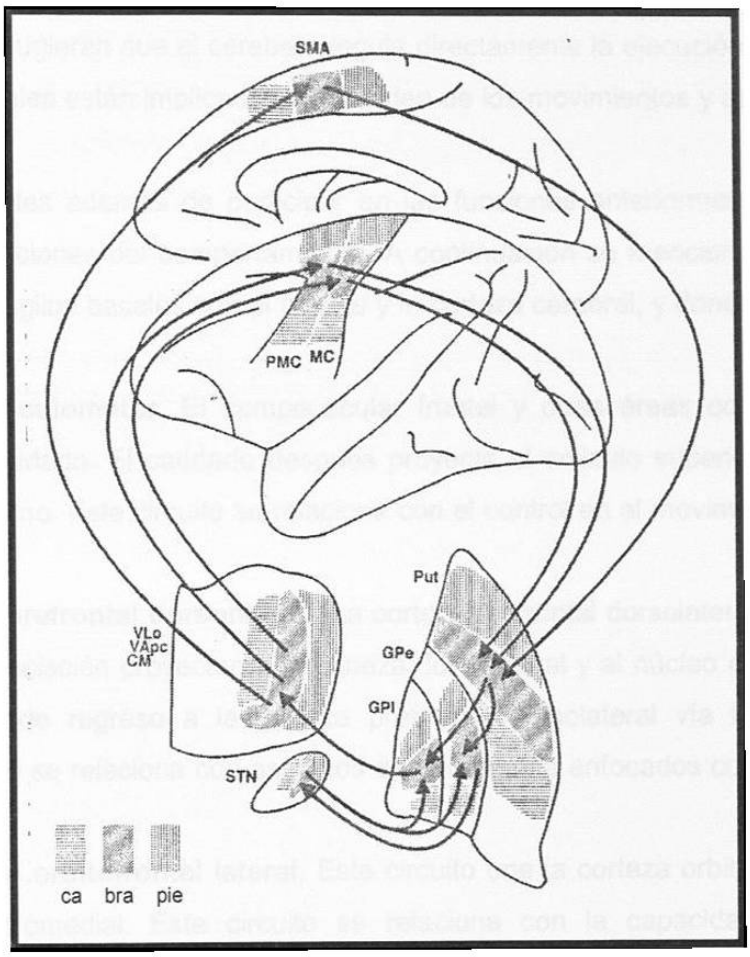


Figura 2. La organización somatotópica del circuito motor entre los ganglios basales, tálamo y la corteza se muestra en las proyecciones medial y lateral del cerebro de un mono. El significado de las abreviaturas se mencionan en la tabla de nomenclatura. Tomado de Garret y Michael. 1990.

1.2.4 Participación de los ganglios basales en el control del movimiento.

Los ganglios basales y el cerebelo son los principales constituyentes subcorticales del sistema motor. Ambos reciben abundantes proyecciones de la corteza cerebral y las proyectan de regreso a la corteza vía tálamo. Hay tres diferencias importantes entre las conexiones que existen de los ganglios basales y el cerebelo. Primero los ganglios basales reciben aferencias de toda la corteza cerebral y el cerebelo sólo las recibe de una región cerebral más restringida, la directamente relacionada con las funciones sensoriomotoras. Segundo, las eferencias del cerebelo se dirigen a la corteza motora y premotora, mientras que las de los ganglios basales no sólo se dirigen a las cortezas anteriores sino también a la corteza prefrontal de asociación. Finalmente el cerebelo recibe información sensorial somática de la médula espinal y tiene

mayores conexiones aferentes y eferentes con muchos núcleos del tallo cerebral que están directamente conectados con la médula espinal. Los ganglios basales tienen pocas conexiones con el tallo cerebral y ninguna conexión directa con la médula espinal.

Estas diferencias sugieren que el cerebelo regula directamente la ejecución de los movimientos y los ganglios basales están implicados en el orden de los movimientos y aspectos cognocitivos del control motor.

Los ganglios basales además de participar en las funciones anteriormente mencionadas, se relacionan con funciones del comportamiento. A continuación se mencionan tres circuitos que conectan a los ganglios basales con el tálamo y la corteza cerebral, y donde está impicada esta función.

1. **Circuito oculomotor**. El campo ocular frontal y otras áreas corticales proyectan al cuerpo del caudado. El caudado después proyecta al colículo superior y al campo ocular frontal vía tálamo. Este circuito se relaciona con el control en el movimiento sácadico de los ojos.
2. **Circuito prefrontal dorsolateral.** La corteza prefrontal dorsolateral y otras áreas de la corteza de asociación proyectan a la cabeza dorsolateral y al núcleo caudado, el cual a su vez proyecta de regreso a la corteza prefrontal dorsolateral vía tálamo. Este circuito probablemente se relaciona con aspectos de la memoria enfocados con la orientación en el espacio.
3. **El circuito orbitofrontal lateral.** Este circuito une la corteza orbitofrontal lateral con el caudado ventromedial. Este circuito se relaciona con la capacidad de cambio en el comportamiento.

1.2.6 Los circuitos dentro de los ganglios basales.

Las aferencias corticales que llegan al *neoestriado* son excitatorias y mediadas por las neuronas glutamatérgicas. Hay dos principales vías a través de los ganglios basales. La vía **directa** que va desde el estriado al GPi y SNpr (núcleos de salida de los ganglios basales), la cual después proyecta al tálamo. La vía **indirecta** constituye el circuito que va desde el *neoestriado* a GPe y este proyecta al NST. El NST a su vez proyecta de regreso a los dos segmentos palidales y a la sustancia nigra (figura 3).

La **vía directa** que va del estriado a los núcleos de salida esta mediada por GABA y sustancia P, esta vía es inhibitoria como lo es la que va desde los núcleos de salida al tálamo también mediada por GABA. Los movimientos resultan cuando las células tálamicas son liberadas de la inhibición tónica. Esto ocurre cuando las aferencias corticoestriatales excitan las neuronas estriatales con lo cual resulta una desinhibición fásica, una inhibición de células inhibitorias en los núcleos de salida de los ganglios basales.

La activación de las neuronas tálamocorticales se considera que facilita los movimientos por excitación de las áreas promotora y motora.

La vía indirecta de los ganglios basales opera de forma diferente. De la excitación corticoestriatal resulta una inhibición del GPe mediada por GABA y encefalina, y deshinibición del núcleo subtálamico, mediado por GABA, lo cual excita los núcleos de salida mediados por glutamato. Esta inhibe al tálamo y disminuye la excitación del área motora suplementaria.

La proyección dopaminérgica de la sustancia nigra tiene varios efectos sobre las neuronas en el neoestriado. La dopamina **excita** la vía directa, ya que las neuronas estriatales envían GABA y sustancia P a los núcleos de salida. En contraste la dopamina **inhibe** la vía indirecta, las neuronas estriatales envían GABA y encefalina proyectando al GPe. Puesto que la vía directa parece facilitar los movimientos por **excitación** del área motora suplementaria, mientras la indirecta tiene el **efecto opuesto**, la dopamina parece facilitar los movimientos, participando en las dos vías.

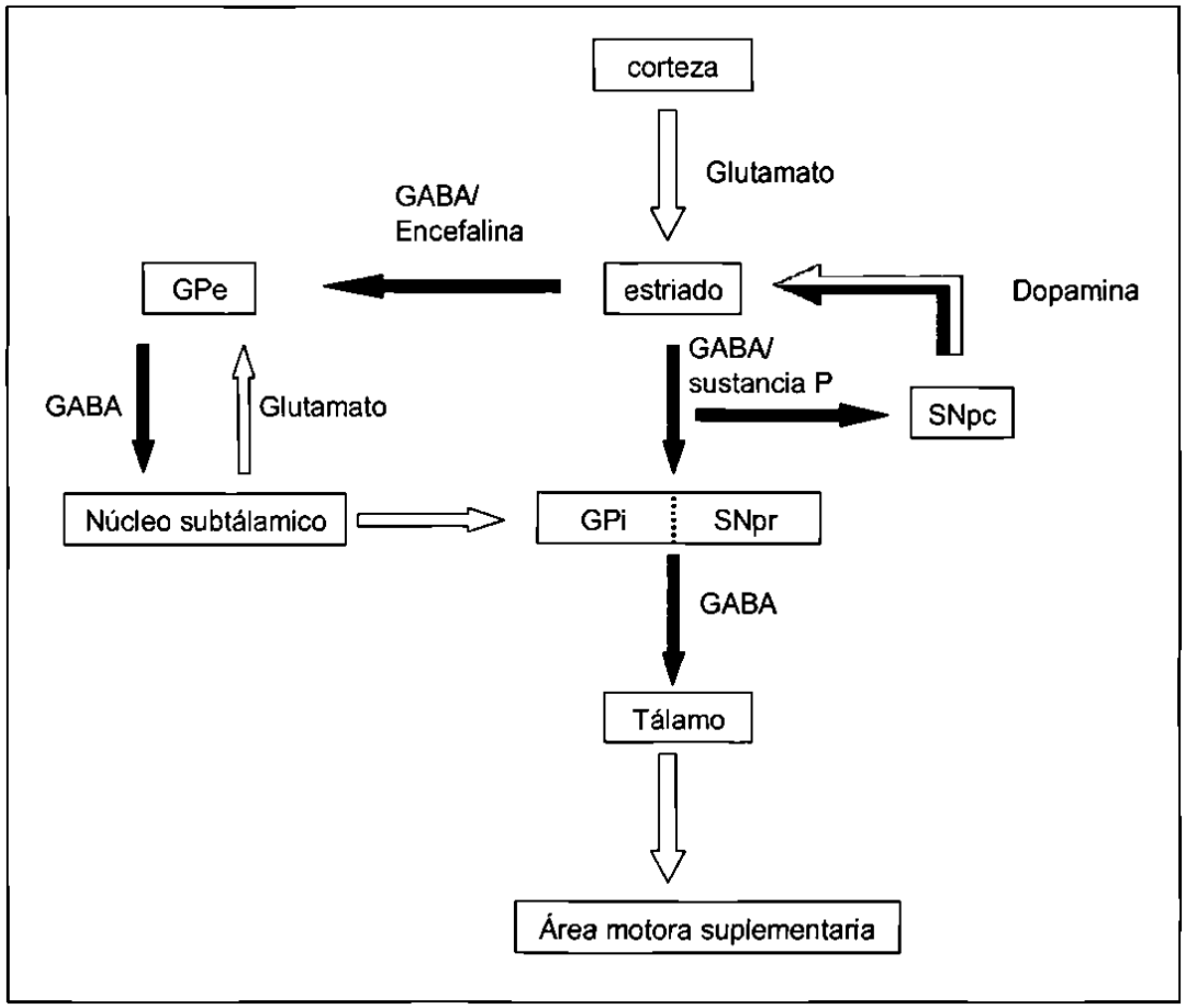


Figura 3. Circuito de los ganglios basales.

1.3 ESTRIADO.

1.3.1 Generalidades.

El cuerpo estriado es uno de los componentes de los ganglios basales, se encuentra dividido en dos regiones el **estriado dorsal**, constituido por el núcleo caudado y el putamen (neoestriado) y el **estriado ventral** por el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio y la porción ventral del estriado dorsal. (Heimer y col., 1995).

El núcleo caudado y el putamen se encuentran divididos por la cápsula interna que se encuentra constituida por un grupo de fibras que corren entre la neocorteza y tálamo en ambas direcciones. Embriológicamente el estriado se desarrolla de la región basal de la vesícula

telencefálica lateral. Recibe el nombre de estriado debido a que su grupo de fibras nerviosas que lo componen dan la apariencia de estrías. En los roedores el caudado y putamen son estructuras sencillas con fibras de la capsula interna que cursan a través de ellos, sin embargo en los carnívoros y primates estas estructuras se encuentran separadas por la capsula interna.
El **estriado** se encuentra organizado en dos compartimentos celulares, los **estriosomas** y la **matriz**, los primeros se tiñen débilmente con acetilcolinesterasa (AChE) y se encuentran inmersos en la matriz la cual se tiñe fuertemente con AChE (Gerfen, 1984; Graybiel, 1983; Graybiel y Moratalla, 1989). Esta propiedad que posee el estriado histoquímicamente le proporciona una apariencia de parches. Las neuronas de los estriosomas y la matriz pueden diferenciarse con base en sus aferencia y eferencias, ya que los estriosomas reciben aferencias desde la capa cortical profunda 5 y 6, proyectando hacia la sustancia *nigra pars compacta* (la fuente del sistema nigroestriatal dopaminérgico). Mientras las neuronas de la matriz (matrisomas) reciben aferencias desde las capas superficial y supragranular de las áreas corticales sensorio-motoras y proyectan hacia la sustancia *nigra pars reticulata* (la aferente nigrotálamica no dopaminérgica) (Gerfen,1989). Y es debido a esta amplia gama de aferencias que recibe, que se le ha considerado un sistema integrador de la información, además es una de las regiones del cerebro donde se lleva a cabo el proceso de la integración de la memoria y del aprendizaje.

1.3.2 Células del estriado.

De acuerdo al tamaño de cuerpo celular y a la presencia o ausencia de espinas dendríticas, las neuronas del estriado se dividen en cuatro tipos, la primera y más numerosa es la *neurona espinosa mediana* (**figura 4**) también llamada *neurona de proyección* (células Golgi tipo I),estas células constituyen entre el 90 y 95% de toda la población celular del estriado, poseen un cuerpo que mide entre 12-20μm de diámetro y del cual nacen entre 4 a 5 dendritas primarias, contienen en su mayoría GABA, pero también co-expresan diferentes péptidos neuroactivos (sustancia P, encefalina, dinorfina y neurotensina), por ello se conoce que son morfológicamente homogéneas, pero químicamente heterogéneas. Estas neuronas envían proyecciones al GPi y SNpr. Y son es el principal elemento integrador del estriado, ya que procesan la información de aferentes locales y extrínsecas y la proyectan fuera del estriado (Parent y Hazrati, 1995).
El segundo tipo son *neuronas grandes no espinosas*. Estas células constituyen entre el 1-2% del total de la población celular estriatal, poseen un diámetro de 20 a 50μm, son interneuronas y contienen acetilcolina (ACh) como neurotransmisor. Reciben entradas del núcleo parafascicular

del tálamo, tienen colaterales axónicas diseminadas principalmente en la matriz, poseen sinapsis simétricas, muestran un disparo tónico irregular *in vivo*.

El tercer tipo, lo constituyen las *neuronas medianas no espinosas,* son también interneuronas, estas utilizan la somatostatina como neurotransmisor, y el cuarto tipo son las *neuronas pequeñas no espinosas* que se tiñen con parvalbúmina, estas son interneuronas que utilizan el GABA como neurotransmisor. Aunque pocas en número, las interneuronas son las responsables de la mayoría de la actividad tónica en el estriado. La proporción neuronas – interneuronas en el estriado de rata es 9:1 y en los primates es de 3:1 (Graveland y DiFiglia, 1985).

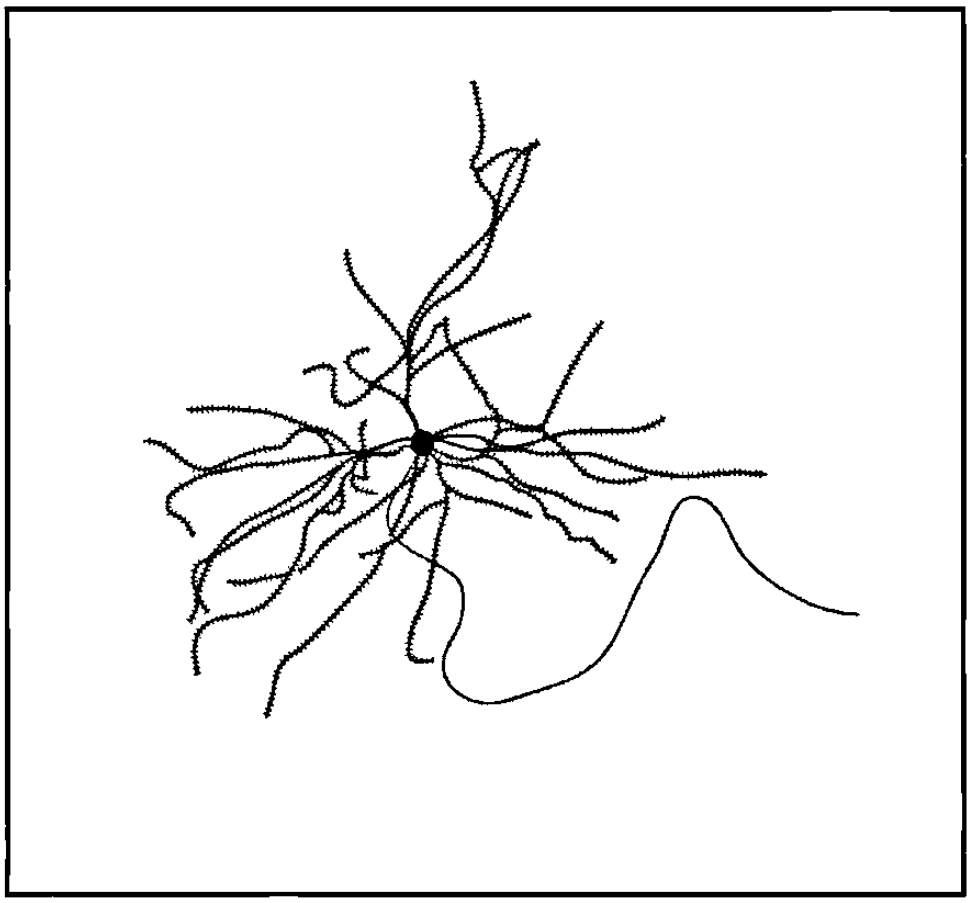


Figura 4. Dibujo de una neurona espinosa mediana. Obsérvese que el axon no tiene espinas. Tomada de Squire y col. 2003.

1.4 NÚCLEO ACCUMBENS.

1.4.1 Descripición.

El concepto de estriado ventral fue introducido por Heimer y Wilson en 1975 ellos describieron la relación entre el accumbens y el tubérculo olfatorio en ratas. Por lo tanto el núcleo accumbens (**figura 5**) es una estructura subcortical que forma parte del estriado ventral, se localiza en el cerebro de rata por debajo del caudado–putamen rostral y se encuentra asociada con el sistema límbico y con un grupo de estructuras que participan en la respuesta del comportamiento motivado. Esta asociación se basa en que, sus conexiones aferentes vienen de la amígdala y de la corteza prefrontal, y estas estructuras participan en las mismas respuestas.
El núcleo accumbens recibe aferencias del área ventral tegmental, amígdala basolateral, hipocampo y corteza prefrontal (principalmente región prelímbica) y proyecta a estructuras palidales y nigrales y a otras estructuras subcorticales incluyendo el núcleo de la cama de la estría terminal, septum, región preóptica y el hipotálamo lateral (Nauta y col., 1978).
La señalización glutamatérgica que recibe del hipocampo es por la vía del subiculum ventral (Aylward y col., 1993; De France y col., 1980), mientras que la proyección dopaminérgica mesolímbica que recibe es del área tegmental ventral (Dahlström y col.,1964; Oades y col., 1987). Estudios anatómicos han demostrado que estas entradas glutamatérgicas y dopaminérgicas no sólo se encuentran en aposición una con la otra sino que en algunos casos forman contactos sinápticos con las mismas células intrínsecas del accumbens (Sesack y Pickel., 1990), sugiriendo una posible interacción entre la dopamina y el glutamato a nivel de las neuronas del accumbens modulando su actividad (Brudzynski y Gibson, 1997).
Zaborszky y col., (1985) reconocieron mediante preparaciones histoquímicas en el accumbens un **cuerpo central**, el cual envuelve el extremo anterior de la comisura anterior y una **cubierta**, la cual rodea el cuerpo en sus lados medial, ventral y lateral. El cuerpo tiene una apariencia homogénea mientras la cubierta muestra una compleja organización. Otros autores también han reportado esta dicotomía **cuerpo-cubierta**, esto con base a su distribución en sustancias neuroactivas, receptores, citoarquitectura, organización sináptica, metabolismo de dopamina, respuestas electrofisiológicas, y a su vulnerabilidad cuando son expuestos a neurotóxicos como la 6-hidroxidopamina y ácido iboténico (Revisado en Heimer, 1995).
Es importante hacer notar que el cuerpo **y** la cubierta son sólo aparentes en las tres cuartas partes caudales del núcleo accumbens. En el cuarto rostral denominado **polo rostral** el patrón de conexiones aferentes y eferentes reflejan una mezcla del cuerpo y la cubierta.
Las cortezas ventral límbica, peduncular dorsal, infralímbica y piriforme posterior proyectan predominantemente a la **cubierta medial**, mientras que la corteza dorsal prelímbica, agranular,

insular dorsal, del cíngulo anterior y perirrinal envían proyecciones abundantes al **cuerpo** accumbens (Brog y col., 1993).

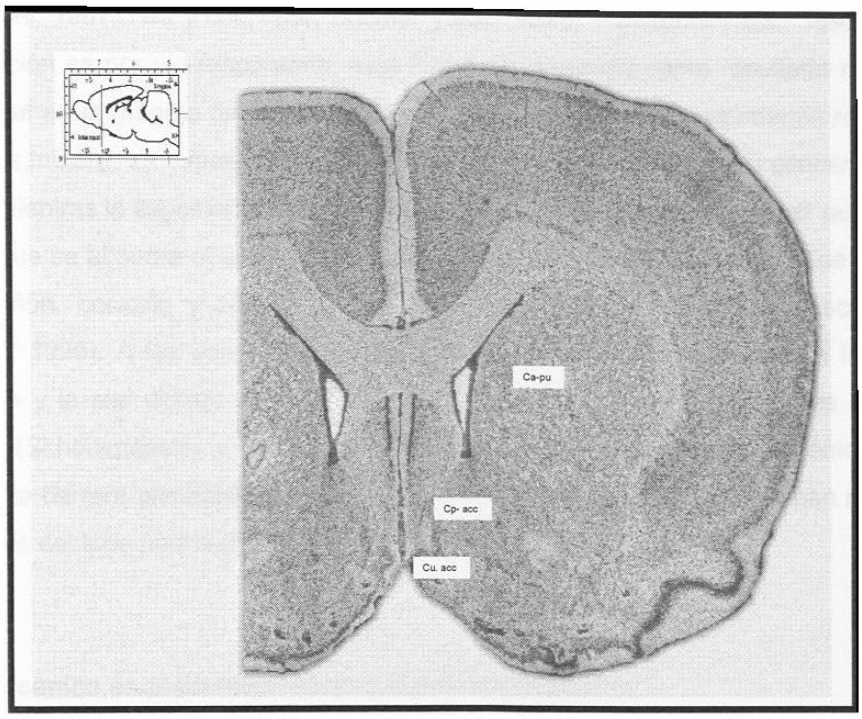


Figura 5. Cuerpo y cubierta del núcleo accumbens, en el cerebro de rata **Ca-pu**; caudado putamen, **Cp-acc**; cuerpo del accumbens; **Cu-acc**; cubierta del accumbens. Tinción con violeta de cresilo. Tomada de Paxinos y Watson. 2004.

1.5 EL ARSÉNICO.

1.5.1 Generalidades.

El arsénico es un metaloide que se encuentra normalmente en la naturaleza formando compuestos orgánicos e inorgánicos, o bien es liberado al medio ambiente a través de fuentes como la fundición de metales, residuos de la industria minera, manufactura del vidrio, chips de computadora, semiconductores, y en la producción de pesticidas, herbicidas y productos agroquímicos (Goyer, 1991; Klassen, 1996).

Se han demostrado altas concentraciones de arsénico en agua y en la tierra de varios lugares del mundo (Anawar y col., 2002; Del Razo y col ., 2002; Frisbie y col ., 2002), por ello los humanos se encuentran expuestos al arsénico principalmente a través del consumo de agua y comida contaminada, una manera es consumiendo productos marinos en los cuales se encuentran presentes las especies orgánicas del arsénico como la arsenocolina y la arsenobetaina las cuales producen altas concentraciones de arsénico en la sangre (Edmonds y Francesconi, 1987; Foa y col.,1984; Schäfer y col., 1999; Yamauchi y col., 1992). Otra manera de exposición es por vía respiratoria, esta forma se presenta como resultado de la exposición ocupacional en el manejo de los pesticidas en la agricultura o en actividades relacionadas con la industria minera. La exposición oral al arsénico se ha relacionado con cáncer en hígado, piel y vejiga, mientras la exposición por vía respiratoria se ha asociado con cáncer pulmonar.
Una vez que se absorbe el arsénico en organismos de animales o humanos, se almacena en el hígado, riñón, corazón y pulmón y pequeñas cantidades en el tejido muscular y nervioso (Klaassen, 1996). A las dos y cuatro semanas de haberse ingerido, éste se incorpora en las uñas, pelo y la piel debido a la afinidad que tiene para unirse a los grupos sulfhidrilo de la queratina (Schoolmeester y White, 1980). También se reporta que el arsénico es capaz de atravesar la barrera placentaria y afectar el desarrollo fetal del cerebro, se han reportado casos de defectos del tubo neural (Naqvi y col., 1994).

1.5.2 El arsénico se presenta en dos estados de oxidación.

El arsénico es un metal que existe en dos principales estados de oxidación: en la forma trivalente (+3) como **arsenito** y en la forma pentavalente (+5) como **arsenato**, y de esto depende su reactividad y sus efectos tóxicos. Tanto arsenito (+3) como arsenato (+5) son tóxicos para el organismo pero actúan a través de mecanismos diferentes. El **arsenato** posee una estructura semejante al fosfato inorgánico y por ello puede competir con la producción de ATP y de esta manera desacoplar el proceso de fosforilación oxidativa, formando un éster arsenato, el cual se hidroliza espontáneamente (Hughes, 2002) En contraste, **arsenito** interactúa con los grupos tiol uniéndose a los grupos sulfhidrilo de las proteínas y enzimas, esta unión altera el funcionamiento de muchas de ellas; un ejemplo son las enzimas que participan en el metabolismo de los carbohidratos como la succinato y piruvato deshidrogenasas (Aposhian, 1989). Asimismo, se une a los grupos sulfhidrilo libres de las proteínas de membrana, induciendo a una disminución de estos grupos libres y con ello altera las vías de señalamiento intercelular. Dos efectos también importantes que se atribuyen al arsenito es su capacidad de alterar los elementos del citoesqueleto (Clarkson, 1987; Li y Chou, 1992); además inhibe la glutation reductasa y disminuye los niveles intracelulares del glutation reducido (GSH), una molécula muy importante que participa en el balance de óxido- reducción y protege a la

célula contra el daño oxidativo por las especies reactiva de oxígeno (ROS) (Thomas y col., 2001).

1.5.3 Metilación del arsénico.

El arsenito y el arsenato sufren un proceso de **metilación** en las células de varias especies por ejemplo en el humano, rata, peces y otros organismos como bacterias, entre otros produciendo los ácidos **monometilados** y **dimetilados**. Los arsenicales metilados son importantes porque se excretan más rápido que los arsenicales inorgánicos. La velocidad de metilación varía entre las especies, y en los humanos se han observado grandes diferencias entre los individuos (Aposhian, 1997; Vahter, 1999; Vahter y Marafante, 1985; Yoshida y col., 1998; Zakharyan y col., 1995, 1996).

Puesto que la toxicidad de los arsenicales depende de la velocidad con que son eliminados del organismo (Klaassen, 1996), la metilación hasta hace poco se pensaba que era un mecanismo de destoxificación (Buchet y col., 1981; Moore y col., 1997; Yamauchi y Fowler, 1994), sin embargo ahora se considera como un proceso de biotransformación ya que los compuestos trivalentes metilados son más tóxicos que el mismo arsénico inorgánico (Ahmad y col., 2000; Mass y col., 2001; Petrick y col., 2000). La biometilación del arsénico se considera la ruta más importante de biotransformación y bioeliminación del arsénico en las especies animales (Tice y col., 1997), estudios realizados en animales demostraron que la deficiencia de **metionina, colina y folato** alteraron la metilación y eliminación del arsénico (Marafante y Vather, 1986; Vather y Marafante, 1987; Tice y col., 1997; Spiegelstein y col, 2003).

1.5.4 Metabolismo del arsénico.

En el metabolismo del arsénico inorgánico de los humanos se llevan a cabo dos reacciones químicas, la **reducción** de las especies pentavalentes a trivalentes y la **metilación oxidativa** de los arsenicales trivalentes y así se producen los metabolitos metilados pentavalentes (**figura 6**). La glutation (GSH) interviene en la reducción de las especies pentavalentes: (As^{V}), el ácido metilarsónico (MAs^{V}) y ácido dimetil arsínico ($DMAs^{V}$) a compuestos trivalentes: (As^{III}), el ácido metilarsenoso (MAs^{III}) y ácido dimetil arsínico ($DMAs^{II}$) en soluciones acuosas (Scott y col 1993; Delnomdedieu y col 1994). La metilación de los arsenicales trivalentes (As^{III}) y el ácido metilarsenoso (MAs^{III}) es catalizado por la As^{III}-metiltransferasa, la cual usa la S-adenosil metionina (SAM) como donador de metilos (Zakharyan R. y col, 1995;: Lin S y col, 2002).

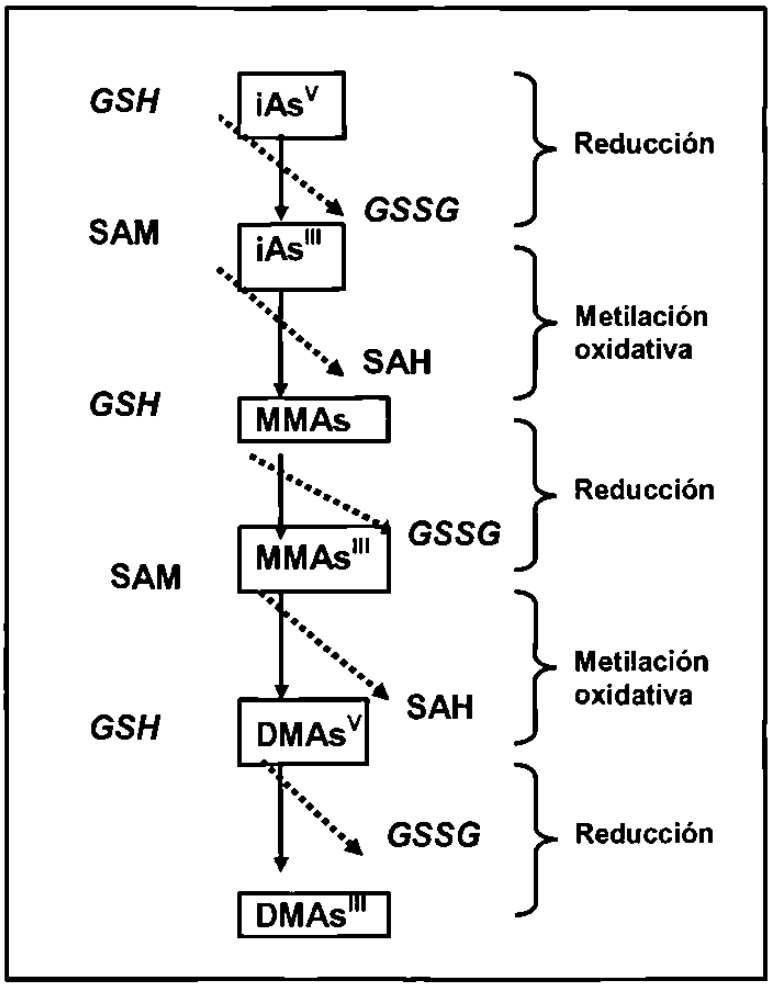


Figura 6. Metabolismo del arsénico.

1.5.5 S- adenosil metionina (SAM).

SAM es el principal donador biológico de metilos ya que por lo menos se le han identificado 39 metil-transferasas (Clarke & Banfield, 2001). Los productos de estas reacciones de las metil transferasas son un producto metilado y la S-adenosil homocisteína (SAH), la cual es subsecuentemente hidrolizada por la SAH hidrolasa a **homocisteína** y adenosina (**figura 7**). Estas reacciones de **transmetilación** probablemente ocurren en todas las células del organismo.

La biotransformación arsenical puede alterar la homeostasis de **SAM** y por consecuencia sus metabolitos intermedios: metionina,colina, folatos y vitaminas B_6, B_{12}, algunos de los cuales son importantes sustratos o co-factores en el metabolismo de neurotrasmisores (acetilcolina, monoaminas, aminoácidos) (Zeisel y Blussztajn, 1994; Bottiglieri y col 2000; Meck y Williams, 2003) o en el desarrollo del SNC (Rodríguez y col, 2002). En estudios recientes se demostró

que el cerebro de ratones tiene la capacidad de metilar el arsenito ya que se encontraron concentraciones de **MMA**, **DMA** en homogenados del cerebro de animales expuestos (Rodriguez y col., 2004).

Recientemente, se considera que existe una alta demanda de metilos en el proceso de biometilación del arsénico lo cual disminuye la disponibilidad de estos metilos que son necesarios para otras funciones celulares (reacciones de transmetilación) entre ellas la síntesis de la mielina. Por lo tanto la **SAM** además de considerarse el principal donador de metilos en la biometilación del arsénico también lleva a cabo la metilación de la proteína básica de la mielina (PBM) (Lee y col., 1992; Small y col., 1981).

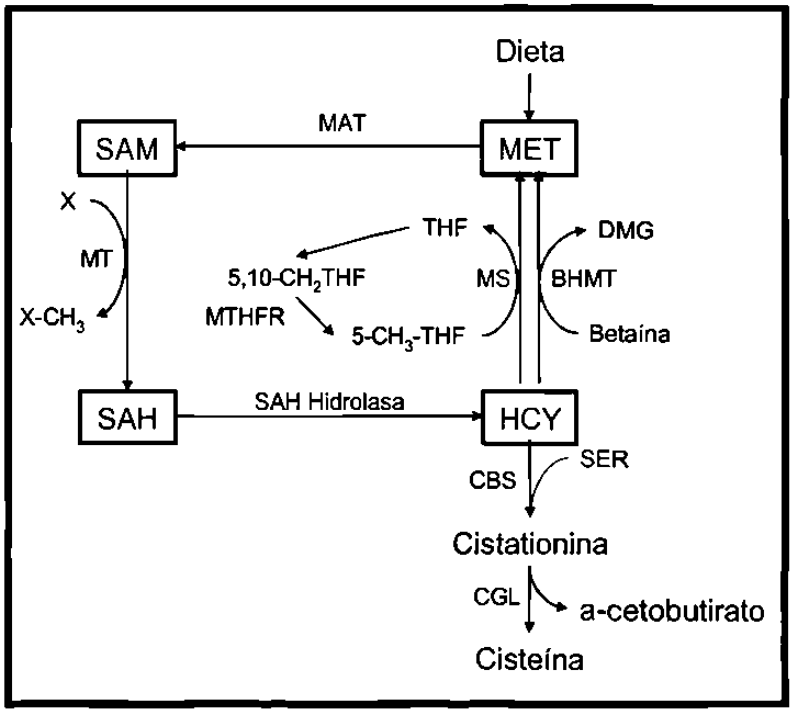


Figura 7. Metabolismo de la metionina.

1.5.6 El arsénico en el sistema nervioso.

El arsénico afecta tanto al sistema nervioso central como periférico, los primeros reportes que se tienen de daño neurológico son en el sistema nervioso periférico, donde causa neuropatía periférica simétrica (Heymann et al., 1956; Goyer, 1991; Yip y col., 2002), caracterizada por un aumento de la sensibilidad en los nervios. El arsénico ingresa al cerebro a través de un

mecanismo que se desconoce, sin embargo se sabe que al ingresar afecta las funciones cerebrales superiores (Gerr et al., 2000). Existen cinco casos reportados de personas crónicamente expuestas al arsénico, el primero data de 1977 en un estudio realizado a niños que vivían en una zona minera, en el cual se reporta que estos niños sufrieron alteraciones auditivas sugiriendo con ello que la exposición al arsénico produce polineuritis de estructuras como la cóclea (Bencko y Simon,1977). Otro caso se presentó en niños mexicanos (7 y 8 años) , quienes estuvieron expuestos al arsénico durante toda su vida por vivir en los alrededores de una fundidora de metales, estos niños mostraron deficiencias en la comprensión verbal, memoria a largo plazo y lenguaje (Calderón et al., 2001), otro estudio fue realizado en adolescentes (8-11 años) que consumieron durante la mayor parte de su infancia agua de bebida con altas concentraciones de arsénico, estos niños presentaron deficiencia en la destreza al desempeño continuo, memorización de patrones y símbolos, además alteraciones de atención (Tsai et al., 2003). Mientras tanto Wasserman y colaboradores en el 2004, reportaron disminución en la función intelectual en niños (10 años) expuestos al arsénico en el agua de bebida. Por otro lado, se reporta el estudio en adultos expuestos aproximadamente 14 años al arsénico, estos individuos fueron evaluados mediante pruebas neurológicas y neuropsicológicas y además de presentar una mayor incidencia a la neuropatía periférica se encontraron alteraciones en la fuerza con la que los individuos podían sujetar los objetos, movimiento de los dedos, coordinación mano-vista y temblor (Gerr et al., 2000).

Similarmente la exposición al arsénico inorgánico en roedores se ha relacionado con alteraciones en las tareas del aprendizaje (Nagaraja y Desiraju, 1994), alteraciones en la actividad locomotora.(Chattopadhyay y col., 2002a; Chattopadhyay y col., 2002b; Itoh y col., 1990; Pryor y col., 1983; Rodríguez y col., 2001, 2002), y un aumento en los errores al aplicares la prueba de conducta del laberinto en T (Rodríguez y col., 2001, 2002). Algunas de estas alteraciones podrían relacionarse a cambios en los sistemas colinérgicos, monoaminérgicos, gabaérgicos y glutamatérgicos, en varias regiones del cerebro como el estriado, mesencéfalo, hipotálamo e hipocampo (Delgado y col., 2000; Kannan y col., 2001; Mejia y col., 1997; Nagaraja y Desiraju, 1993, 1994; Rodríguez y col., 2001; Tripathi y col., 1997; Valkonen y col., 1983).

Teniendo como antecedente estos hallazgos, en el presente trabajo se utilizó el mismo modelo experimental en el cual ya se demostraron alteraciones del comportamiento, del contenido de monoaminas (corteza, mesencéfalo y cuerpo estriado), deficiencias en la actividad locomotora y alteraciones en las tareas de aprendizaje (V.M.Rodríguez y col., 2001,2002).

1.6 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

1.6.1 JUSTIFICACIÓN.

La exposición a arsénico altera la conducta de animales y humanos, y en particular existe un modelo animal en donde ya se demostraron las alteraciones del comportamiento; en el presente trabajo estudiamos las alteraciones morfológicas en el SNC, especialmente en el cuerpo estriado en este mismo modelo.

1.6.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Dosis bajas de arsénico durante el desarrollo embrionario y posnatal de la rata producen alteraciones celulares en el cuerpo estriado.

1.6.3 OBJETIVOS ESPECIFÍCOS.

1. Reproducir el modelo animal establecido de exposición pre y postnatal al arsénico .

A) Evaluación de la conducta mediante la técnica del laberinto acuático.

B) Cuantificación de la concentración de arsénico mediante la técnica de espectrometría fluorescente de masa atómica.

2. Evaluar la histología del cuerpo estriado del modelo experimental mediante tinciones especiales para el tejido nervioso.

3. Identificar la presencia de apoptosis en el cuerpo estriado mediante la técnica TUNEL en el mismo modelo animal.

4. Evaluar la ultraestructura de las fibras nerviosas del cuerpo estriado en el mismo modelo experimental.

5. Determinar si en el modelo experimental establecido existe un efecto de reversión en el daño causado, al suspender por dos meses la exposición al arsénico.

CAPÍTULO DOS

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL.

2.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron 48 ratas hembras de la cepa Wistar con un peso de 250 – 275 gramos. Estos animales se obtuvieron de 12 camadas de las cuales se eligieron 4 ratas hembras de cada camada, dos se utilizaron como controles y dos para administrarles el tratamiento.

2.1.2 TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES.

A. Se utilizó como vehículo agua purificada y en ella se disolvió el arsenito de sodio.
B. Arsenito de sodio en plovo de la marca Sigma.

2.1.3 TÉCNICAS PARA EVALUAR LA CONDUCTA DE LOS ANIMALES.

2.1.3.1 Prueba del laberinto acuático.

El laberinto acuático consiste en una alberca acrílica de 1.20 metros de diámetro, y 40 cm de profundidad, en su interior contiene una plataforma de 10 centímetros de diámetro.

2.1.4 TÉCNICAS ANÁLITICAS.

2.1.4.1 Técnica de espectrometría de fluorescencia atómica.

Los reactivos utilizados fueron de alta calidad analítica, el agua utilizada fue ultrapurificada (sistema Milli – Q de Millipore).
El material utilizado se lavó previamente en ácido nítrico 10 % y fue enjuagado en agua desionizada.

A. Estándar certificado de arsénico de una concentración de 1000 ± 3μg / ml en 2% de ácido nitríco de la marca "High – purity standards".
B. Los ácidos clorhídrico, nitríco e hidróxido de sodio de la marca J.T. Baker.
C. Ácido perclórico de la marca Merck.
D. Yoduro de potasio, ácido ascórbico de la marca Sigma.
E. Borohidruro de sodio de la marca Fulka.

2.1.5 TÉCNICAS MORFOLÓGICAS.

2.1.5.1 Técnicas histológicas.

FIJACIÓN.
A. Paraformaldehído de la marca Caledon.
B. Glutaraldehído al 25% de la marca Sigma.
C. Fosfato monobásico de sodio de la marca CTR.
D. Fosfato dibásico de sodio de la marca analit.
E. Agua ultraprura (sistema Milli – Q de Millipore).

DESHIDRATACIÓN.
A. Alcohol etílico absoluto de la marca Permont.

ACLARACIÓN.
A. Xileno de la marca J.T Baker.

INCLUSIÓN.
A. Parafina de la marca paraplast.

MONTAJE.
A. Portaobjetos y cubreobjetos de la marca Corning.
B. Medio de montaje entellan marca Merck.

2.1.5.1.1 Tinción de hematoxilina-eosina.

A. Hematoxilina de la marca merck.

B. Eosina amarillenta de la marca analit.

C. óxido de mercurio rojo de la marca Mallinckrodt.

2.1.5.1.2 Tinción de violeta de cresilo.

Violeta de cresilo rápido de la marca Michrome.

Ácido acético de la marca Merck.

2.1.5.1.3 Tinción de Klüver – Barrera.

Azul de luxol de la marca Sigma.

Violeta de cresilo de la marca Michrome.

Ácido acético de la marca Merck.

Carbonato de litio marca Merck.

2.1.5.2 Técnicas inmunohistoquímicas.

2.1.5.2.1 TUNEL.

A. La técnica de TUNEL se llevó a cabo utilizando el kit TACS ™2 TdT *In Situ* Apoptosis Detection de Trevigen® para muestras fijadas en paraformaldehído al 4%, incluidas en parafina y cortes de 7 μm.

2.1.5.3 Técnica de microscopía electrónica.

Los reactivos utilizados fueron de alta calidad analítica, el agua utilizada fue ultrapurificada (sistema Milli – Q de Millipore).

A. Glutaraldehído, tetraóxido de osmio, resinas epóxicas, cacodilato de sodio, acetato de uranilo, citrato de plomo, azul de toluidina, rejillas de cobre (200 "mesh") y moldes de inclusión, obtenido de Electrón Microscopy Sciences (EUA).
B. El vidrio para preparar las cuchillas de Pelco y la cuchilla de diamante de la marca Diatome (Suiza).

2.2 EQUIPO.

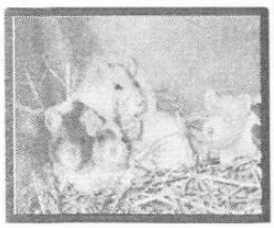
- Microscopio electronico JEOL JEM 1010
- Microtomo marca Leica modelo M-RM2125RT.
- Estufa marca Rios Roca modelo HS-33

- Histo center II marca Allied.
- Baño para cortes en flotación marca Lab-line.
- Fotomicroscopio marca Nikon modelo LABOPHOT- 2
- Ultramicrotomo LKB BROMNA ULTRATOME.
- Preparador de cuchillas de vidrio LKB BROMNA modelo 7800 knife Maker.
- Agitador magnético marca Corning modelo PC- 410.
- Parrilla de calentamiento marca thermolyne modelo HP- A1915B.
- Potenciometro marca Beckman modelo 45.
- PSA 10.400 Excalibur atomic fluorescente with autosampler 20.400.
- Balanza analítica marca Sartorius modelo BL 120 S.
- Sistema Millipore desionizador y purificador de agua Milli-Q, con cartuchos de intercambio iónico, de carbón y filtros de ésteres de celulosa (poro 0.22 μm) biológicamente inertes.

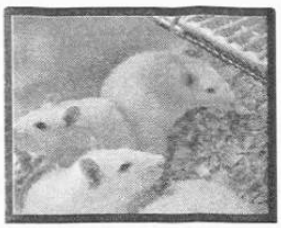
2.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Desde el apareamiento, durante la gestación y hasta el destete, los animales fueron expuestos al arsenito de sodio en el agua de bebida (36.7 mg/l), y de los animales destetados se escogieron dos hembras de cada camada y se les continúo la exposición con el arsenito de sodio hasta los cuatro meses de edad. Posteriormente se separaron en dos grupos: El **primer** grupo denominado de "cuatro meses" porque fue sacrificado a los cuatro meses de edad, es decir al término de la exposición y el **segundo** grupo denominado "seis meses" ya que, se le permitió vivir por dos meses más, sin estar expuestos al arsénico, por lo que se les mantuvo por ese lapso de tiempo con el agua de bebida sin el arsenito de sodio, y por lo tanto fueron sacrificados a los seis meses de edad. En conjunto con estos grupos experimentales se realizaron dos grupos control de animales sin tratamiento uno para cada grupo experimental (de cuatro y seis meses de edad). Ocho días antes del día del sacrificio, los animales fueron sometidos a la prueba del laberinto acuático para evaluar la memoria. Finalizada esta prueba de conducta, los animales fueron anestesiados y prefundidos por vía intracardiaca con solución salina (50 ml) y una solución glutaraldehído (2%) – formaldehído (2%) en buffer de fosfatos (50 ml); se extrajo el cerebro, del cual se eligió el cuerpo estriado para realizar estudios morfológicos (microscopía de luz, inmunohistoquímica y microscopía electrónica) y el resto de cerebro se utilizó para cuantificar la concentración de arsénico total (figura 8).
La estrategia experimental que se siguió se esquematiza en la figura 8

MODELO EXPERIMENTAL

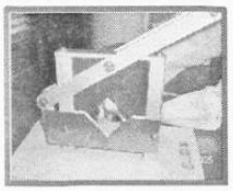


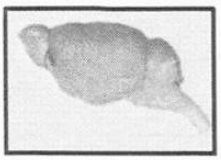
Desde el apariamiento se les empezó a tratar con arsenito de sodio (36.7 mg/l) en el agua de bebida, y hasta el destete.



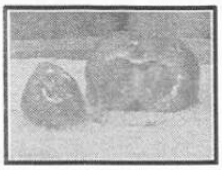
Dos hembras de cada una de las seis camadas, por cada grupo, y se continuó el tratamiento, hasta los 4 meses de edad .

Ocho días antes de terminar el tratamiento fueron sometidas a la prueba del laberinto acuático.



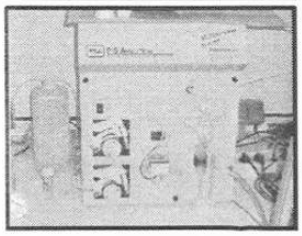


Se extrajo el cerebro.



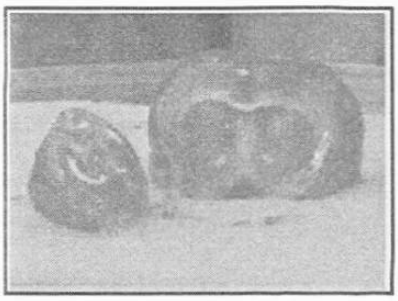
Disecar el estriado

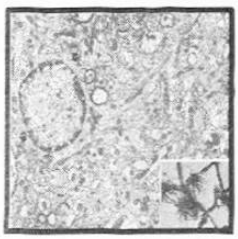
Estudios químicos



Objetivos dos, tres y cuatro.

Estudios morfológicos





Ultraestructurales.

Inmunohistoquímicos.

Histológicos.

Hematoxilna – Eosina.

Nissl.

Klüver- Barrera.

2.4 MÉTODOS.

2.4.1 REPRODUCCIÓN DEL MODELO ANIMAL ESTABLECIDO DE EXPOSICIÓN PRE Y POSTNATAL AL ARSÉNICO .

Ratas hembra Wistar con un peso aproximado de 250 – 275 g se expusieron a 36.7 mg/l de arsenito de sodio disuelto en el agua de beber, desde el apariamiento hasta el desteste y a las crías destetadas se les continuó con la intoxicación hasta los 4 meses de edad. Se escogieron dos ratas hembra de cada una de las seis camadas para cada grupo experimental.

2.4.2 PRUEBAS DE CONDUCTA.

Ocho días antes de terminar el período de intoxicación se realizó la prueba de conducta del laberinto acuático.

2.4.2.1 Prueba del laberinto acuático.

Esta prueba es una de las más utilizadas para evaluar el aprendizaje espacial de los animales, ya que muestra el funcionamiento de una de las regiones del cerebro donde se lleva a cabo el aprendizaje. En esta prueba, se utiliza una alberca acrílica la cual tiene una plataforma (10 cm de diámetro) en uno de los cuadrantes. Antes de iniciar la prueba, la alberca se llenó de agua hasta que la plataforma quedó oculta, posteriormente se le añadió un litro de leche, con la finalidad de que el animal pierda la visibilidad de la plataforma, debido a la turbidez del agua. Es importante resaltar que durante todo el tiempo que duró la prueba, la alberca permaneció siempre en el mismo sitio y la evaluación de los animales se realizó por las mismas personas y en una forma ciega. La prueba empezó colocando al animal con la cabeza dirigida a cualquiera de las paredes (de manera aleatoria) de la alberca y se tomó el tiempo que el animal tardó en encontrar la plataforma. Un día antes de iniciar la prueba, el animal se sometió a un ensayo como entrenamiento. El protocolo que se utilizó se describe en el apéndice A tabla 1.

2.4.3 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.

Ambos grupos experimentales (de cuatro y seis meses de edad), se dividieron en dos: un grupo se utilizó para realizar las pruebas histológicas e inmunohistoquímicas, y un segundo grupo para realizar el análisis ultraestructural y los parámetros bioquímicos.

2.4.4 DETERMINACIÓN ANÁLITICA .

2.4.4.1 Técnica de espectrometría de fluorescencia Atómica por generador de hidruros.

Esta técnica se utilizó para determinar las concentraciones de arsénico total en el cerebro, se fundamenta en medir la cantidad de energía lumínica que emiten los átomos en estado gaseoso que han sido excitados a más altos niveles de energía por la absorción de radiación electromagnética. La atomización se lleva a cabo por la generación de un hidruro adicionando una solución acuosa acidificada de la muestra a un volumen pequeño de borohidruro. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:

$$3BH_4^- + 3H^+ + 4H_3BO_3 \longrightarrow 3H_3BO_3 + 4AsH_3\,(g) + H_2O$$

El hidruro volátil (arsina) es arrastrado a la cámara de atomización por un gas inerte (argón). La cámara es un tubo de cuarzo calentado a muy alta temperatura (a varios cientos de grados centígrados) en una llama, y en esta cámara es donde se descompone el hidruro dando origen a los átomos de la sustancia por analizar.
Una lámpara de cátodo hueco o láser provee la excitación resonante para llevar los átomos a niveles de energía más altos. La fluorescencia atómica es dispersada y detectada por un monocromador y fotomultiplicador, similares al instrumental de la espectroscopia de emisión atómica.
La técnica se describe en el apéndice A tabla 2

2.4.5 ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

2.4.5.1 MICROSCOPÍA DE LUZ.

Las muestras fueron procesadas con la técnica habitual para microscopía luz: el tejido fue fijado en solución de paraformaldehído – glutaraldehído (2%) en buffer de fosfatos 0.2M con pH 7.2 – 7.4. Deshidratado, aclarado e incluido en parafina. Se realizaron cortes de 7μm y se les aplicaron las siguientes tinciones:

2.4.5.1.1 Técnica hematoxilina – eosina.

Para evaluar la morfología general de los tejidos se aplicó esta técnica en cortes de parafina de 7μm de espesor, la técnica se describe en el apéndice A tabla 3.

2.4.5.1.2 Técnica de Nissl.

Esta técnica nos sirve para evaluar la morfología de los cuerpos neuronales, se aplicó en cortes de parafina de 7μm de espesor. La técnica se describe en el apéndice A tabla 4.

2.4.5.1.3 Técnica de Klüver – Barrera.

Para evaluar la integridad de la capa de mielina se aplicó esta técnica en cortes de parafina de 7μm de espesor. La técnica se describe en el apéndice A tabla 5.

2.4.5.2 INMUNOHISTOQUÍMICA.

2.4.5.2.1 Técnica de TUNEL.

El TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin Nick-End Labeling) Schmitz y colaboradores en 1991 aplicaron esta técnica para detectar la fragmentación de la cromatina asociada a apoptosis, en cortes en parafina de 7μm de espesor. Este método permite detectar las zonas de fragmentación de cromatina, producto de las endonucleasas activadas, las cuales generan fragmentos de DNA con los extremos 3´OH libres, estos extremos por estar expuestos pueden ser detectados por la adición de deoxinucleótidos marcados en una reacción catalizada por la enzima TdT (deoxinucleotidil transferasa terminal), y mediante un sistema de detección biotina-estreptavidina y la adición de un sustrato como la DAB (diaminobenzidina) que nos revela la reacción mediante la formación de un precipitado negro insoluble en las zonas donde existe el DNA fragmentado. La técnica se describe en el apéndice C.

2.4.5.3 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Las muestras fueron procesadas con la técnica habitual para microscopía electrónica de transmisión: el tejido fue fijado en solución de Karnovsky – Ito (ácido pícrico, formaldehído,

glutaraldehído) en buffer de cacodilatos con pH 7.2 – 7.4. Postfijados en solución acuosa de tetraóxido de osmio al 2%, incluidos en resinas epóxicas. Se prepararon dos tipos de cortes:

A. Semifinos, de 1μm de grosor, se montaron en portaobjetos y se tiñieron con azul de toluidina, para análisis por microscopía de luz.
B. Finos, de aproximadamente 100 nm de grosor y contrastados en soluciones acuosas de acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0.4% para el análisis de la ultraestructura.

El procedimento que se llevó a cabo para realizar esta técnica se muestra en el apéndice A tabla 7.

2.4.6 Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos de la determinación analítica de la concentración de arsénico en el cerebro, se realizó un análisis estadístico mediante la prueba t de Student, para determinar la posible diferencia existente con respecto al control de animales sin tratamiento (control absoluto). Esta prueba se realizó con 6 animales por grupo. Para comparar los datos de latencia obtenidos en el laberinto acuático se utilizó un ANOVA de 2 vías para mediciones repetidas, considerando 2 factores: el tratamiento (control y arsénico) y las diferentes medidas de latencia para cada rata por grupo, obtenidas durante los 7 días del experimento. Fueron consideradas significativas aquellas diferencias asociadas a una $p < 0.05$.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. MODELO ANIMAL

Antes de proceder al análisis morfológico, se confirmó que los animales expuestos a arsénico desde la gestación y durante 4 meses de vida postnatal mostraran déficits en una prueba conductual y un aumento significativo de la concentración de arsénico en cerebro.

3.1.1Prueba de conducta del laberinto acuático.

Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico.

La **figura 9** muestra el promedio por día del tiempo que tardaron las ratas control y expuestas en alcanzar la plataforma. El análisis de varianza de 2 vías arrojó un efecto significativo del tiempo ($F_{6,126}$ = 35,$p<0.001$), ya que los animales aprenden a encontrar la plataforma conforme transcurren los días y tienen más ensayos para hacerlo. También se encontró un efecto significativo del tratamiento ($F_{1,21}$= 7.6, p= 0.012) ya que las ratas expuestas tardaron más tiempo que las ratas control en encontrar la plataforma durante los primeros tres días de la prueba, sin embargo, como se observa a partir del cuarto día, ambos grupos tardaron un tiempo muy semejante.

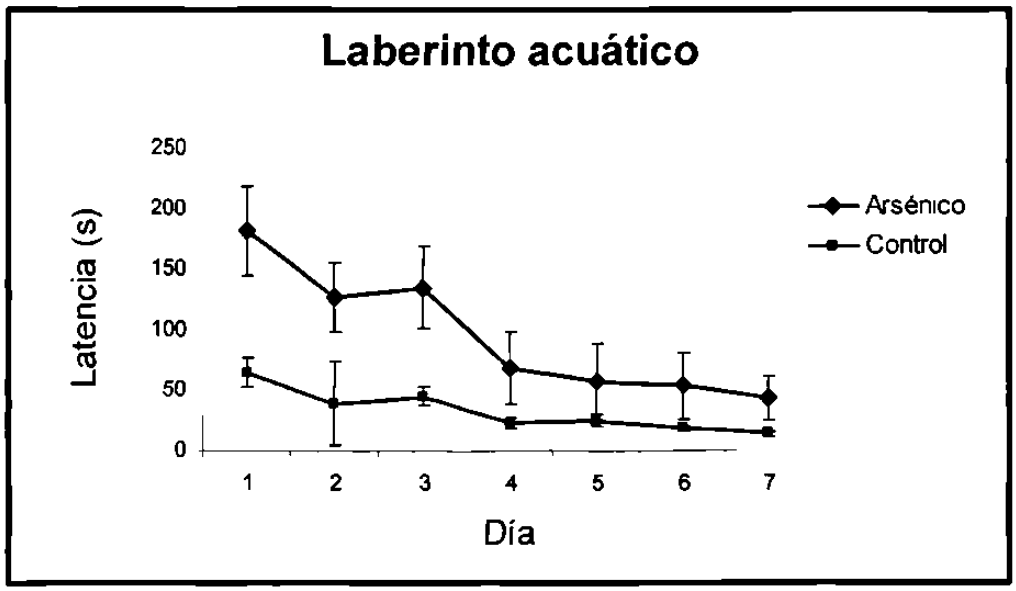


Figura 9. Resultados de la prueba de conducta obtenidos del grupo de animales expuestos por cuatro meses con arsenito de sodio.

Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico (6 meses) .

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10. De acuerdo a este gráfico, los animales de este grupo tardaron el mismo tiempo en encontrar la plataforma que el grupo de animales control, lo cual contrasta, con los resultados obtenidos en el grupo que fue expuesto por cuatro meses a arsénico.

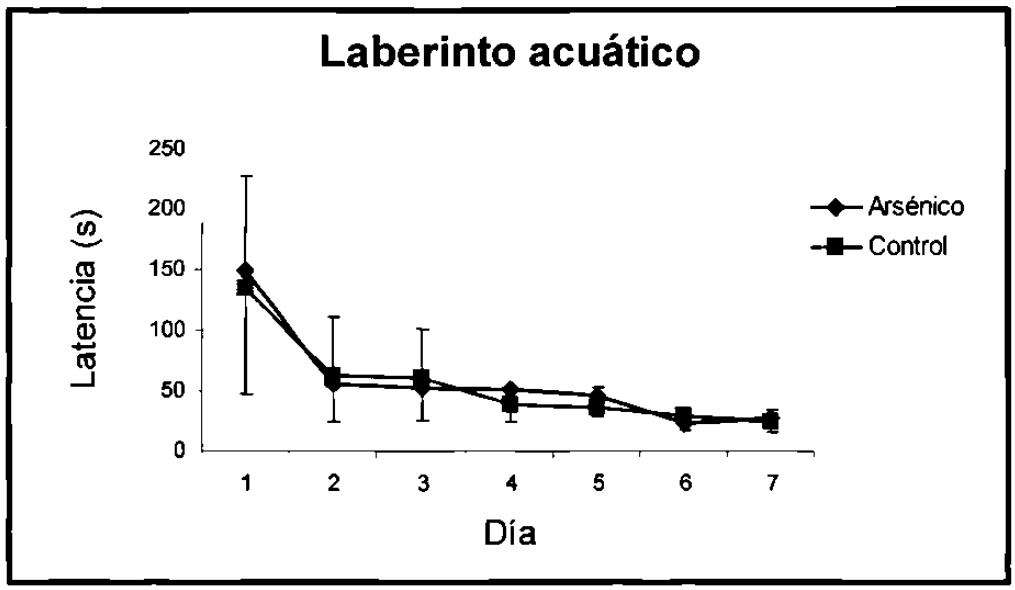


Figura 10. Resultados de la prueba de conducta obtenidos del grupo de animales expuestos por cuatro meses con arsenito de sodio y dos meses sin estar expuestos al arsénico.

3.1.2 Cuantificación de la concentración de arsénico en cerebro.

Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico (4 meses) y grupo que fue expuesto por cuatro meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico (6 meses) .

El contenido total de arsénico en el cerebro, obtenido en los dos grupos experimentales (grupos de cuatro y seis meses) y sus respectivos controles se muestran en la **figura 11**. Como se puede observar, en el grupo expuesto por cuatro meses la concentración de arsénico, (178 ± 98) alcanza hasta diez veces más, en comparación con el grupo de animales control, de esa misma edad; y las concentraciones de arsénico obtenidas en el grupo de seis meses se asemejan a las del grupo expuesto por cuatro meses.

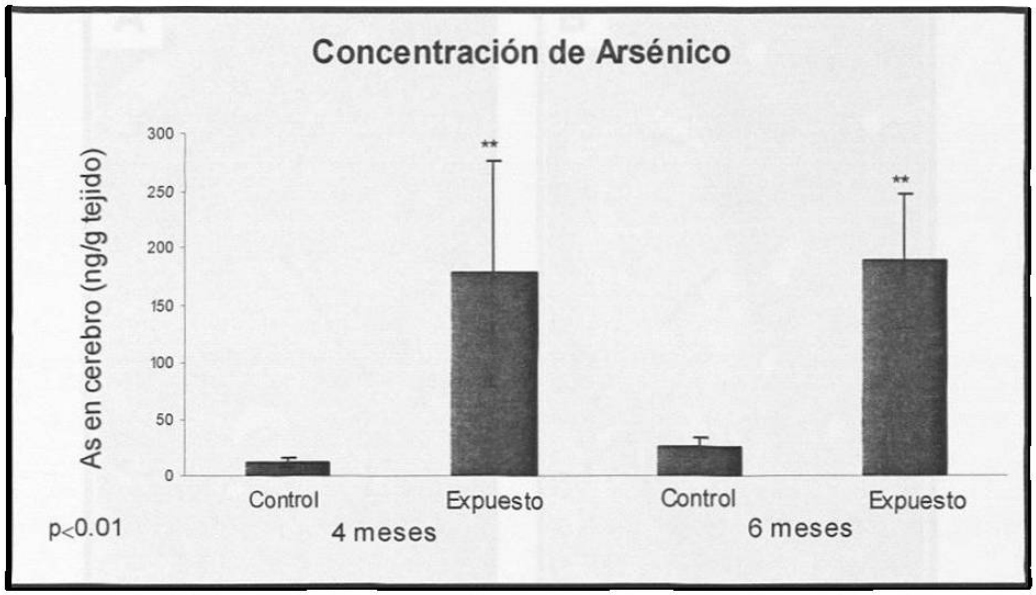


Figura 11. Resultados de la concentración de arsénico en cerebro, obtenidos del grupo de animales expuestos por cuatro meses con arsénico y del grupo de animales expuestos por cuatro meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico (seis meses), nótese que las concentraciones de arsénico en ambos grupos experimentales se asemejan.

3.2 ANÁLISIS MORFÓLOGICO.

3.2.1 Microscopía de luz.

3.2.1.1 Tinción de hematoxilina-eosina (H & E).

3.2.1.1.1 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico.

En los cortes obtenidos de los animales control sin tratamiento observamos la morfología normal del cuerpo estriado, tractos de fibras nerviosas cortados en varias direcciones, estas fibras muestran una tinción de forma homogénea, además, observamos cuerpos neuronales con núcleos eucromáticos y nucleolos evidentes, alternando con numerosas células de la glía (figura 12 A). En contraste con lo observado, en los cortes del cuerpo estriado del grupo de animales expuestos por cuatro meses al tóxico, observamos los tractos de fibras nerviosas, con espacios vacíos, debido a la ausencia de la mielina, además se muestran los cuerpos neuronales alterados con núcleos hipercromáticos y picnóticos (figura 12 B). Estos hallazgos fueron consistentes en animales expuestos y controles, ya que, se realizaron cortes de 7μm y se recolectaron cada 150 μm en toda la superficie del estriado.

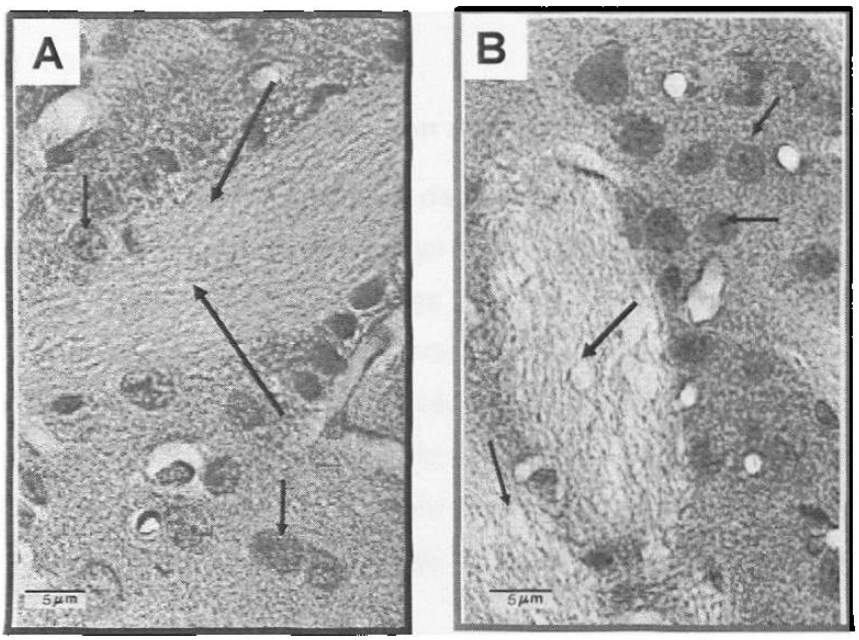


Figura 12. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento Se muestran cuerpos neuronales normales con nucleos eucromaticos y nucleolos evidentes (flecha corta), y un tracto de fibras nerviosas con tinción homogénea flecha larga) **B** Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio Se observan cuerpos neuronales con núcleos heterocromaticos, y picnóticos (flecha corta) Ademas dos tractos de fibras nerviosas con espacios vacíos (flecha larga), indicando ausencia de la capa de mielina. Tinción H& E. 390x.

3.2.1.1.2 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico (6 meses).

En este grupo experimental de seis meses, los cortes del grupo expuesto se mostraron semejantes al grupo control de animales sin tratamiento, los cuales tuvieron una apariencia morfológica normal (figura 13 A y B).

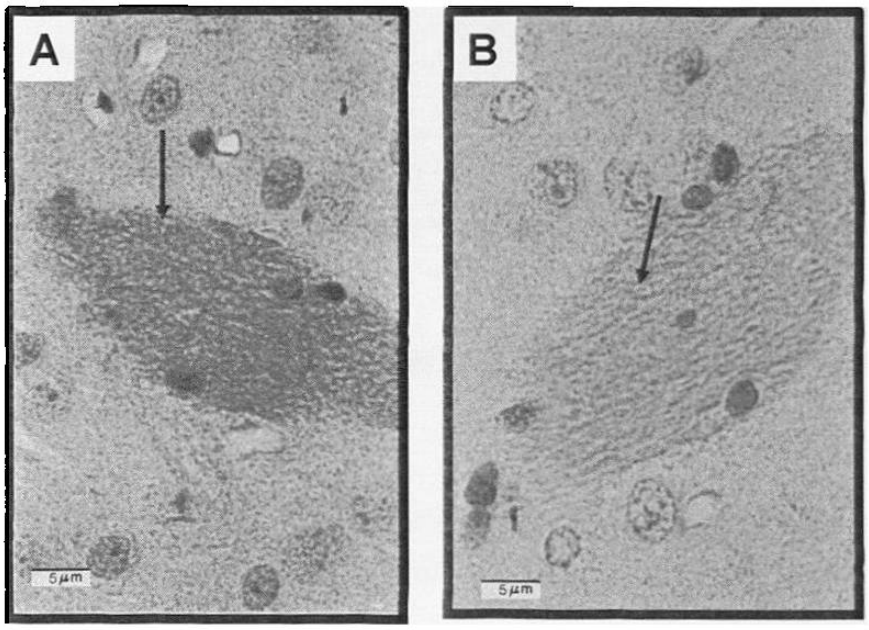


Figura 13. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento Tracto de fibras nerviosas normales flecha) **B** Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio y dos meses sin estar expuestos al arsenico Notese la tinción homogenea del tracto nervioso (flecha) que se asemeja al control Tinción H& E 390x

3.2.1.2 Tinción de Klüver- Barrera (KB).

3.2.1.2.1 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico.

La tinción de K-B es ampliamente utilizada para demostrar la integridad de la capa de mielina. Al aplicar esta técnica de tinción nos confirmó lo ya observado con la tinción de H&E, ya que en los cortes del cuerpo estriado de los animales expuestos por cuatro meses al arsénico observamos los, tractos con espacios vacíos indicándonos la pérdida parcial de la capa de mielina. (figura 14 B). En contraste, con lo observado en los cortes del grupo control, en donde se muestra el tracto de fibras nerviosas teñido de una manera uniforme de apariencia normal (figura 14 A). Estos resultados se reprodujeron en animales expuestos y controles, ya que, se realizaron cortes de 7μm y se recolectaron cada 150 μm en toda la región ocupada por el cuerpo estriado.

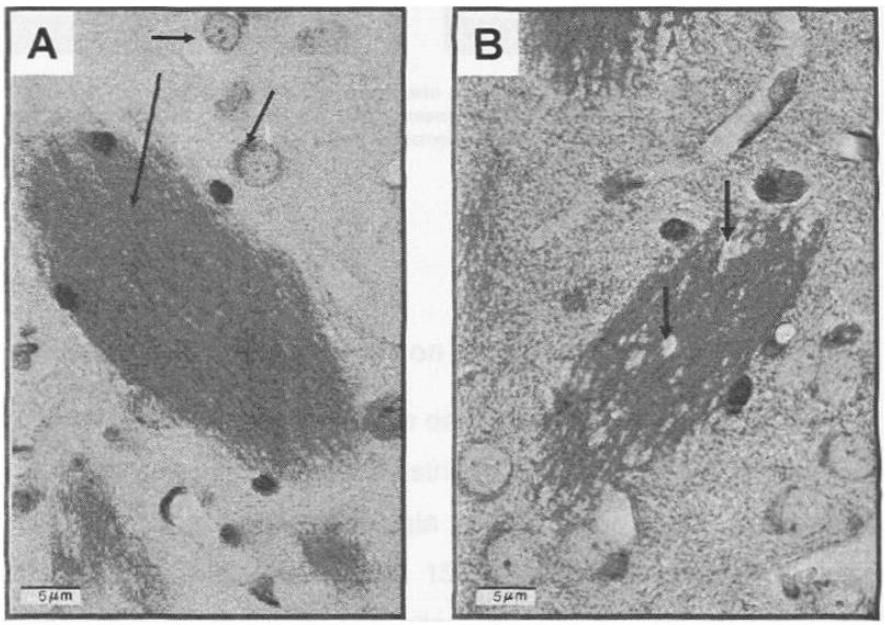


Figura 14. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento. Cuerpos neuronales (flecha corta), y fibras nerviosas (flecha larga) normales. **B.** Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio. Se observa un tracto de fibras nerviosas en corte longitudinal en el cual se muestran los espacios vacíos debido a la interrupción en la capa de mielina de las fibras nerviosas que conforman ese tracto. Tinción K&B. 390x.

3.2.1.2.2 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico y dos meses sin estar expuestas al arsénico (grupo de seis meses).

En contrate con los hallazgos obtenidos en el grupo expuesto por cuatro meses al arsénico en este grupo experimental al que se le suspendió por dos meses la exposición observamos que el

tracto de fibras nerviosas se tiñó de forma homogénea sugiriéndonos una recuperación en el daño de la mielina (figura 15 B).

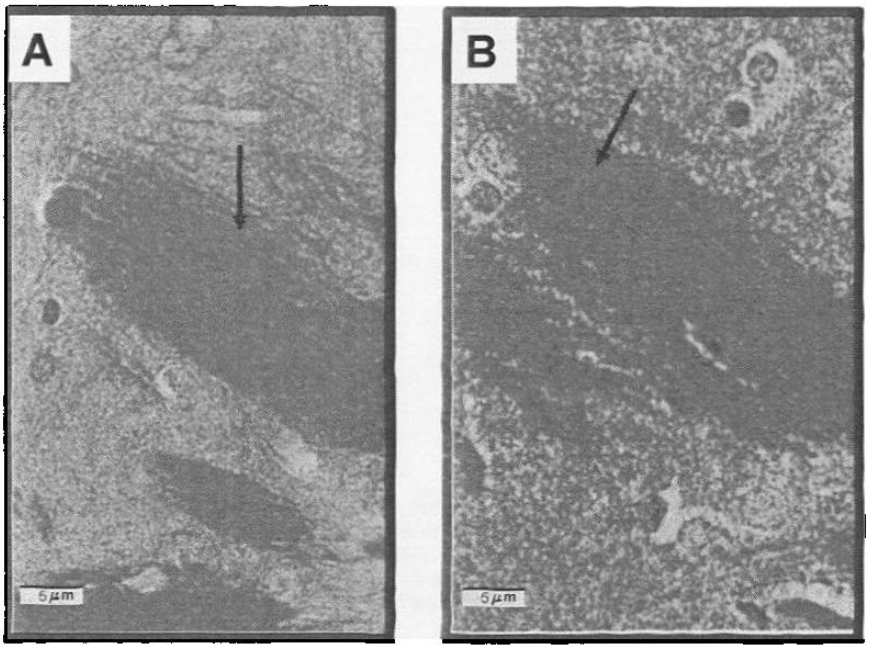


Figura 15. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento. **B** Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio y dos meses sin estar expuestos al arsénico Obsérvese que la morfología de las fibras nerviosas (flecha) se asemeja al control Tinción K&B 390x.

3.2.1.3 Tinción de Nissl.

3.2.1.3.1 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico.

La técnica de Nissl permite detallar la morfología de las células del sistema nervioso, y esto, nos permitió observar que en los cortes del cuerpo estriado del grupo control los cuerpos neuronales y las células de la glia, mostraban la morfología normal, además del neurópilo que de igual manera mostró una apariencia normal (figura 15 A), sin embargo en los cortes del grupo expuesto observamos los cuerpos neuronales alterados, con hipercromacía debido al acúmulo de material basólfilo, núcleos disminuidos de tamaño además de presentar una alteración en la forma (figura 15 B). Estos hallazgos fueron consistentes en animales expuestos y controles, ya que, se analizó en su totalidad el estriado mediante la recolección de cortes de 7µm cada 150 µm.

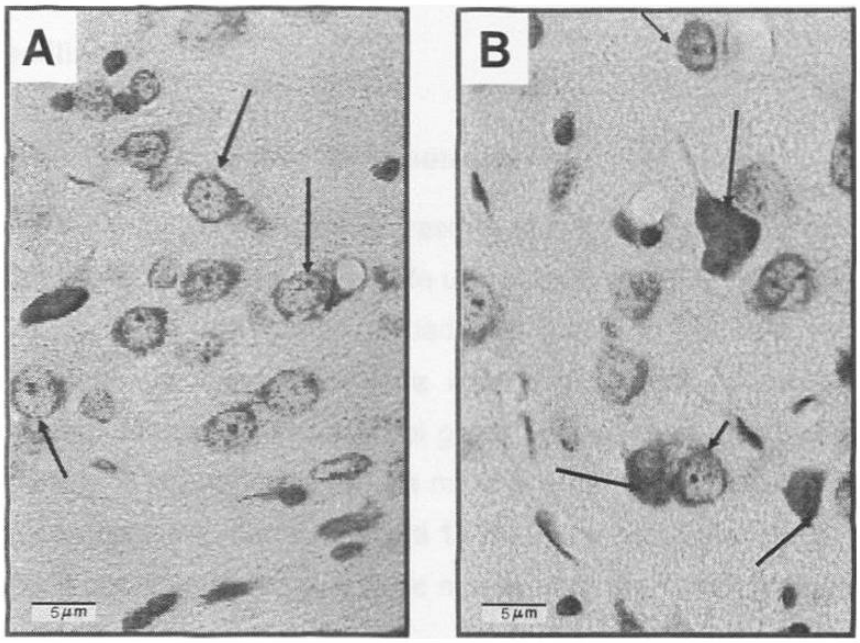


Figura 16. Fotomicrografía de Ccuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento Se muestran cuerpos neuronales de apar encia normal (flecha) **B** Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio Se observan cuerpos neurona es normales flecha corta) alternando con cuerpos neuronales con nucleos hipercromát cos, y aumentados de tamaño y de forma irregular flecha larga) Tinción violeta de cresilo 390x.

3.2.1.3.2 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico (grupo de seis meses).

Los cuerpos neuronales observados en el corte de estriado de los animales control mostraron una morfología normal (figura 17 A)., en contraste con lo observado en los cortes de los animales expuestos por cuatro meses al tóxico y dos sin estar expuestos al tóxico, ya que se mostró que la alteración de los cuerpos neuronales persistieron, por lo tanto no hubo recuperación, como observamos en la capa de mielina de los tractos (figura 17 B).

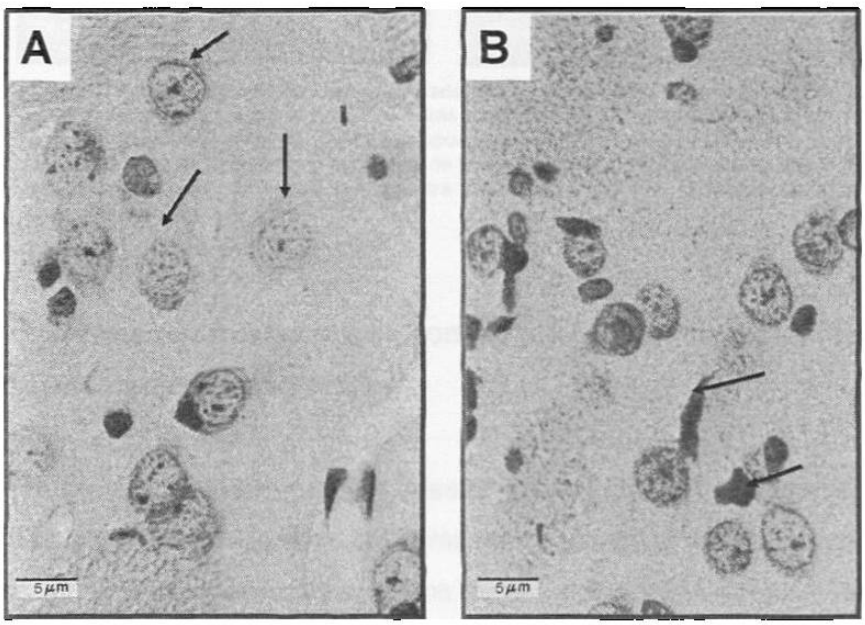


Figura 17. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de an ma es sin tratam ento **B** Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sod o y dos meses s n estar expuestos al arsén co Observese que as alterac ones en los cuerpos neuronales pers sten f echa T ncion violeta de cres lo 390x.