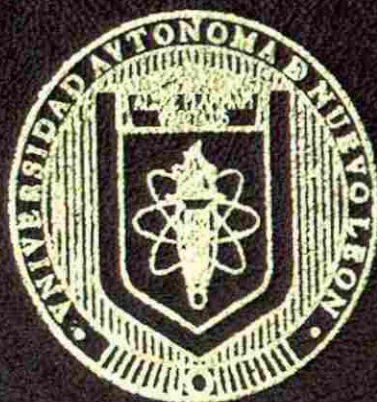


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACION DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACION
TRANSPLACENTARIA Y POSTNATAL DE ARSENICO SOBRE
EL CUERPO ÉSTRIBADO 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

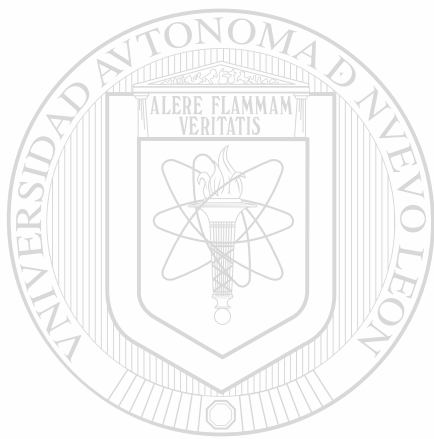
TD
QL813
.M55
S36
2006
c.1

2006

C.F.B. Y.M.C. MARIATHA EUGENIA SANTOYO PEREZ



1080156862



UANL

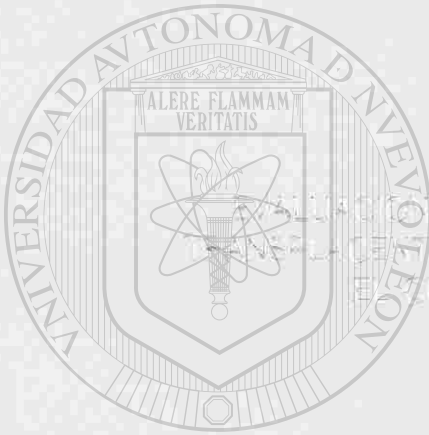
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



ELECCIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN
DE UNO DE LOS ANÁLISIS Y POSTMORTAL DE ARSENICO SOBRE
EL CUERPO ESTIRADO DE LA RATA

UANL

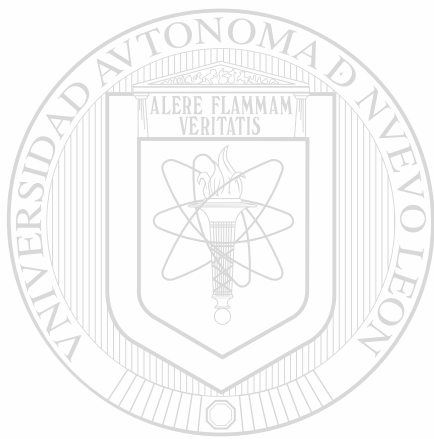
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POR:
G.F.B. Y M.C. MARTHA EUGENIA SANTOYO PEREZ
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

DICIEMBRE 2006





UANL

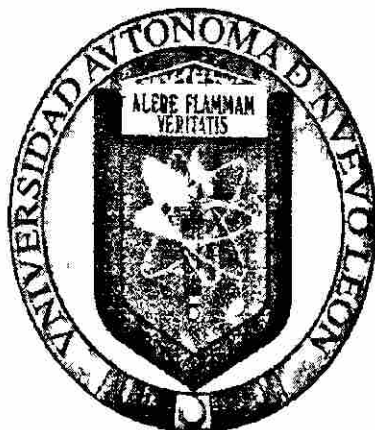
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**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.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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

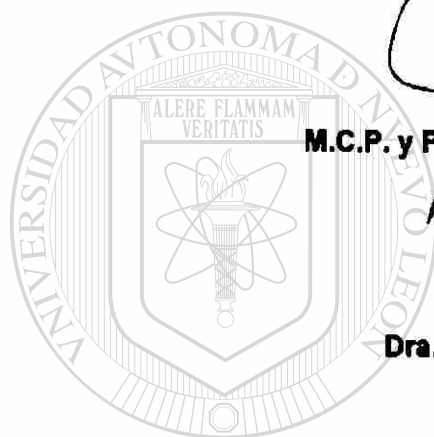
M.C.P. y PhD JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA.
Co-director de tesis

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



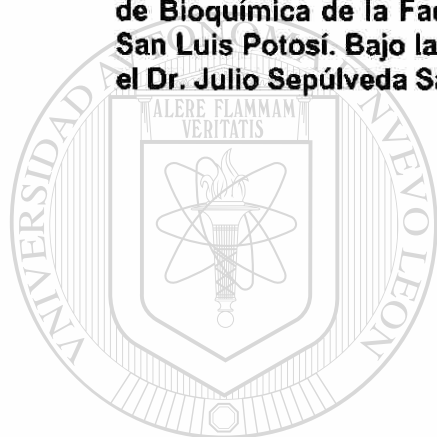
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

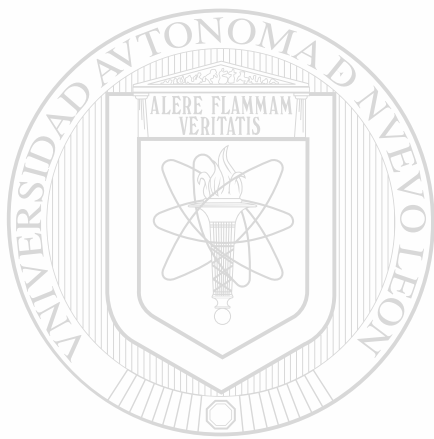


FIRMAS UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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**.

UANI

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 guerra, Chela y Jesús**. Gracias por sus comentarios y por aceptarme como soy. Los 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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
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 vividos contigo. Gracias, por tu apoyo y hospitalidad.

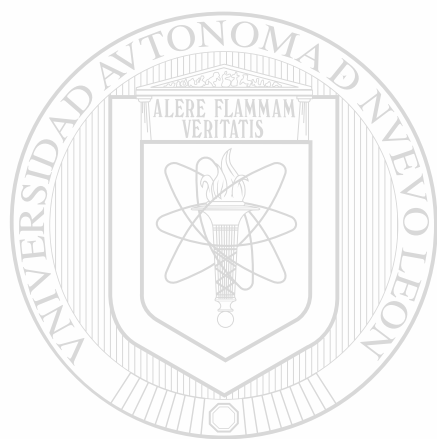
Las palabras sobran para expresarles a **Lilia, Pury, Lety y Celia**, el cariño que les tengo. Gracias por ser mis amigas.

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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MARTHA EUGENIA SANTOYO PÉREZ

Fecha de Graduación: diciembre del 2006

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

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 déficit 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 podría 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 hematoxilina – 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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1. Localización del neocórtex 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

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



%	Por ciento
±	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

BH₄⁻ — Borohidruro

BHMT — Betaina homocisteína metiltransferasa

bra — brazo

°C — Grado centígrado

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 ₂ O	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	Militros
MS	Metionina – sintasa
MTHFR	Metilen tetra hidrofolato reductasa
m/v	Masa/volumen
NST	Núcleo subtálmico
nm	Nanometros
NO	Oxido nitrico
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

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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 carcinógeno 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 diencefalo. 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 prefrontal. 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 subtálmico**, y **sustancia nigra** (figura 1).

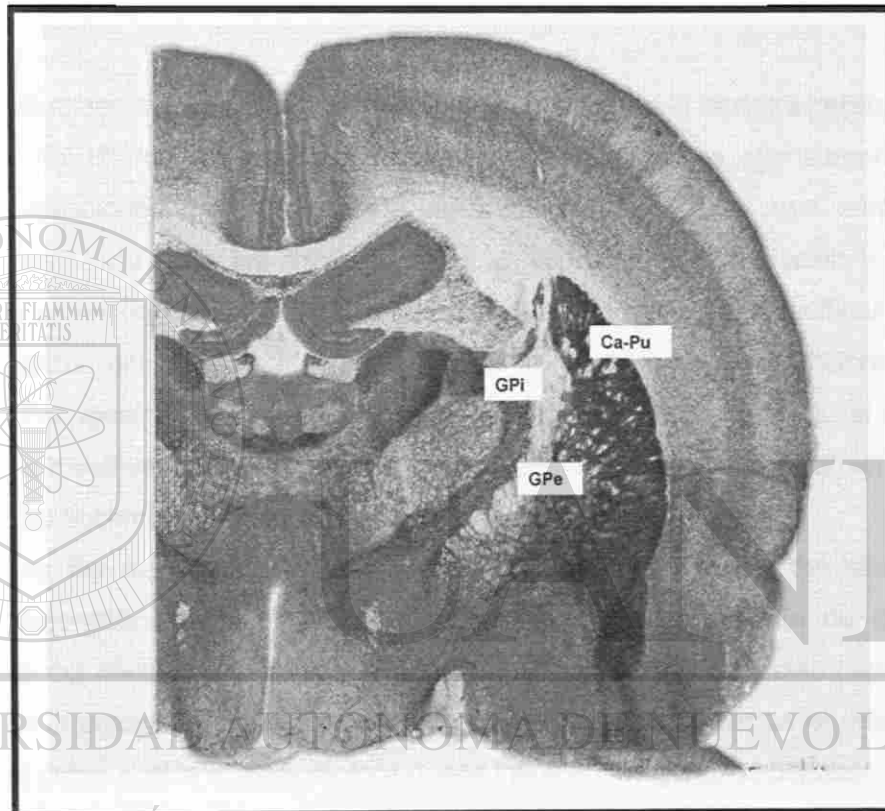


Figura 1. Localización del *neostriado* y los dos segmentos del globo pálido, en cerebro de rata. **Ca-Pu**; caudado putamen, **GPi**; globo pálido interno, **GPe**; globo pálido externo. Tomada de Paxinos y Watson. 2004.

El núcleo **caudado y putamen** se desarrollan a partir de la misma estructura telencéflica debido a ello se encuentran constituidas por los mismos tipos celulares, estos dos núcleos en conjunto son denominados *neostriado* y son los núcleos de entrada de los ganglios basales.

El **globo pálido (GP)** se deriva del diencefalo 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 subtálmico (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 *neostriado* 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 *neostriado* y por lo tanto también tienen funciones diferentes y específicas. 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 *neostriado* 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 *neostriado* es una ruta adicional por la cual la corteza motora puede influir en los ganglios basales.

También las proyecciones que envía el *neostriado* 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 *neostriado* recibe una importante proyección dopaminérgica a partir de la SNpc.

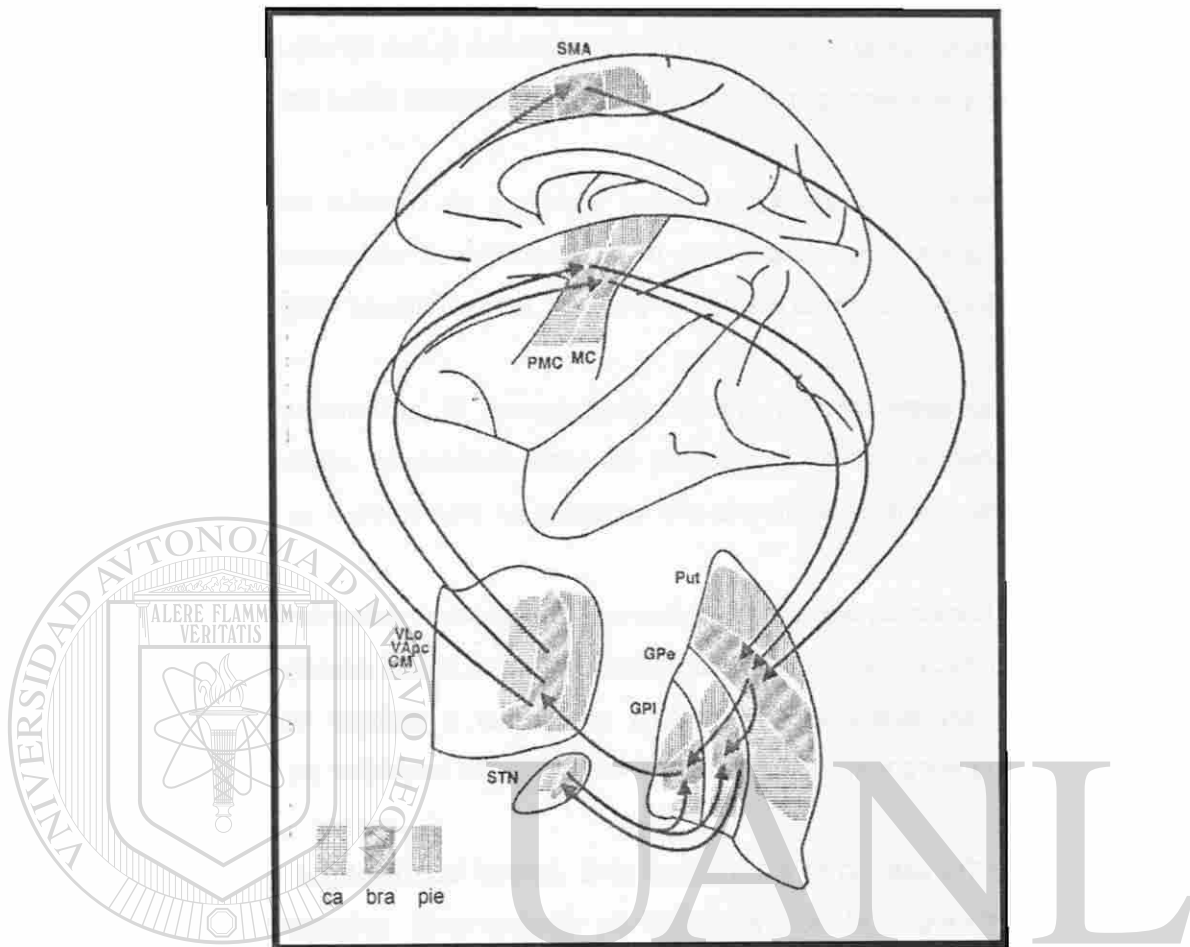


Figura 2. La organización somatotópica del circuito motor entre los ganglios basales, tálamo y la corteza se muestra en las proyecciones medial y lateral del cerebro de un mono. El significado de las abreviaturas se mencionan en la tabla de nomenclatura. Tomado de Garret y Michael. 1990.

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 implicada 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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



1.2.6 Los circuitos dentro de los ganglios basales.

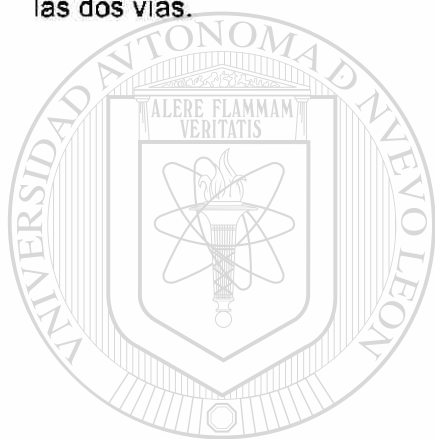
Las aferencias corticales que llegan al *neoestriado* son excitatorias y mediadas por las neuronas glutamatérgicas. Hay dos principales vías a través de los ganglios basales. La vía **directa** que va desde el estriado al GPi y SNpr (núcleos de salida de los ganglios basales), la cual después proyecta 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 tálamo-corticales 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 desinhibición del núcleo subtálmico, 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 neocórtex. 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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

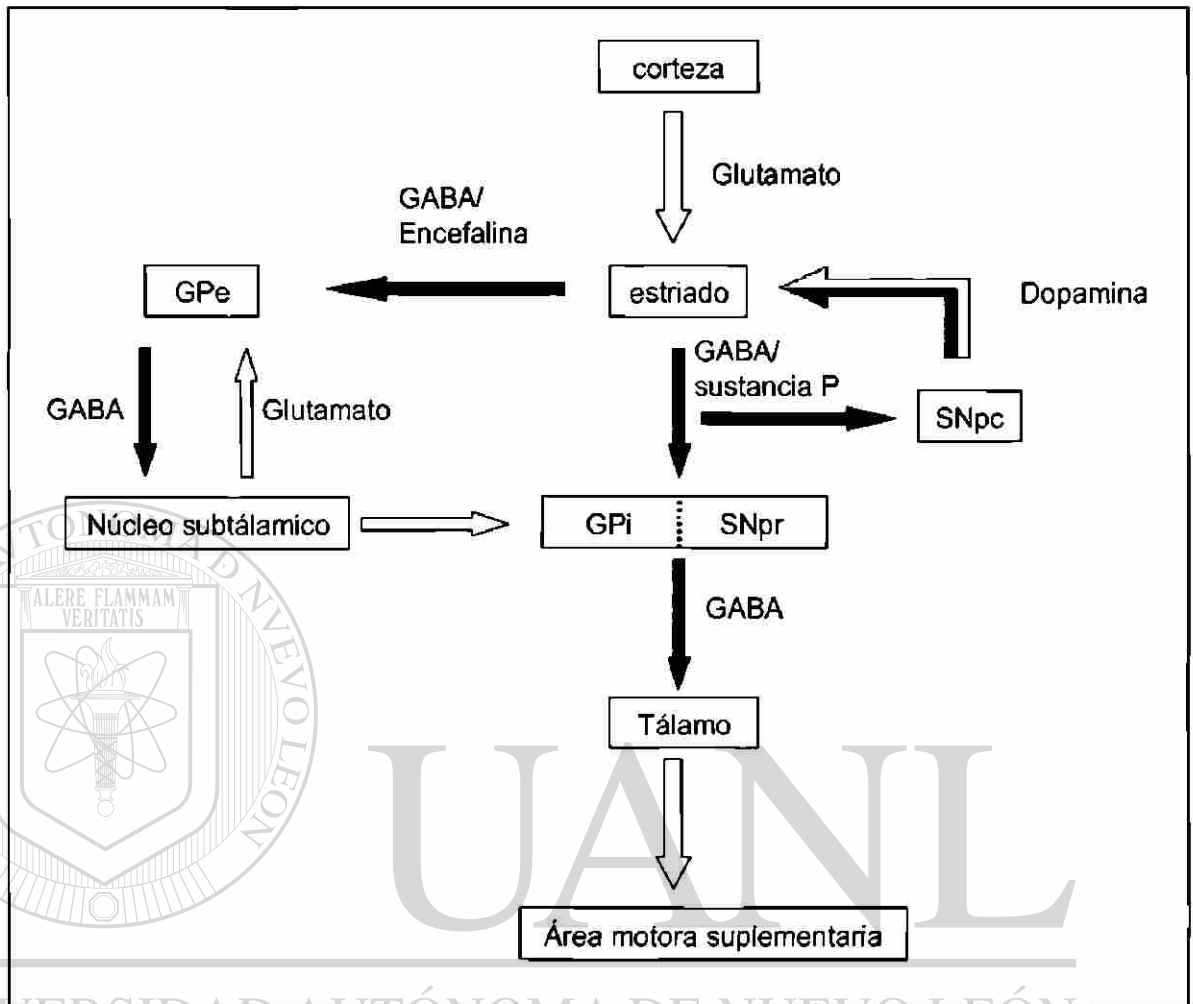


Figura 3. Circuito de los ganglios basales.

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 (neostriado) 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 aferencias 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 12-20 μ m 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 50 μ m, 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).

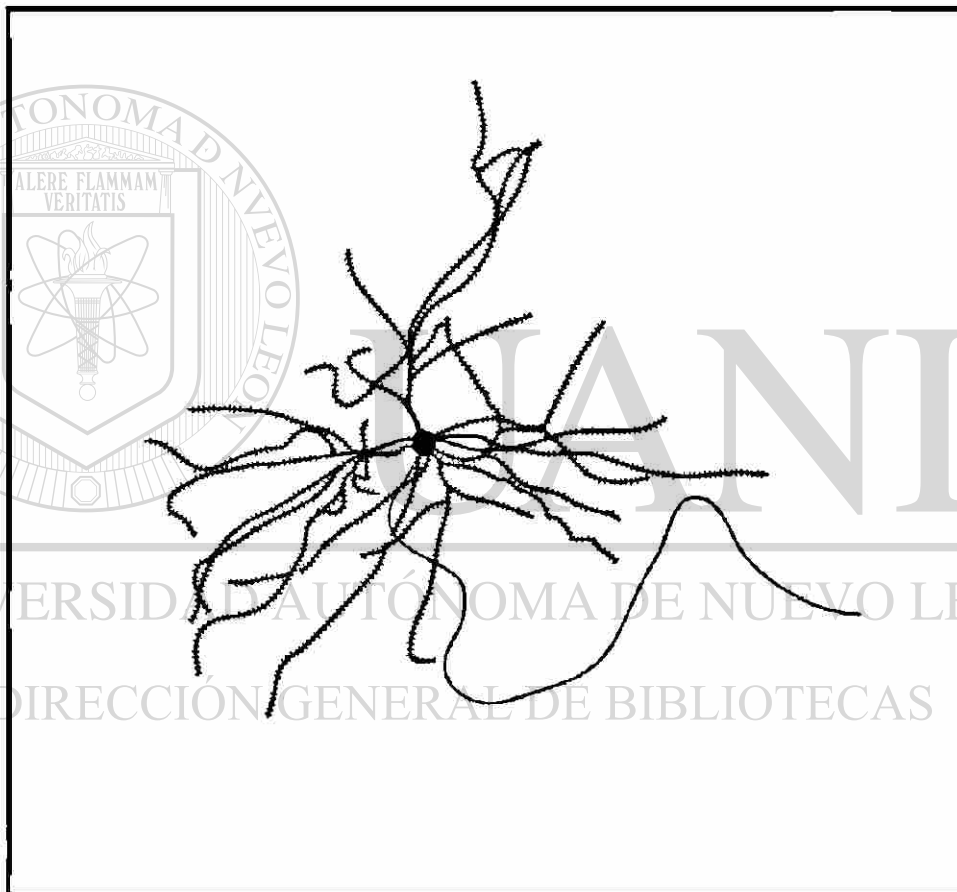


Figura 4. Dibujo de una neurona espinosa mediana. Obsérvese que el axon no tiene espinas. Tomada de Squire y col. 2003.

1.4 NÚCLEO ACCUMBENS.

1.4.1 Descripción.

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 estria 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).

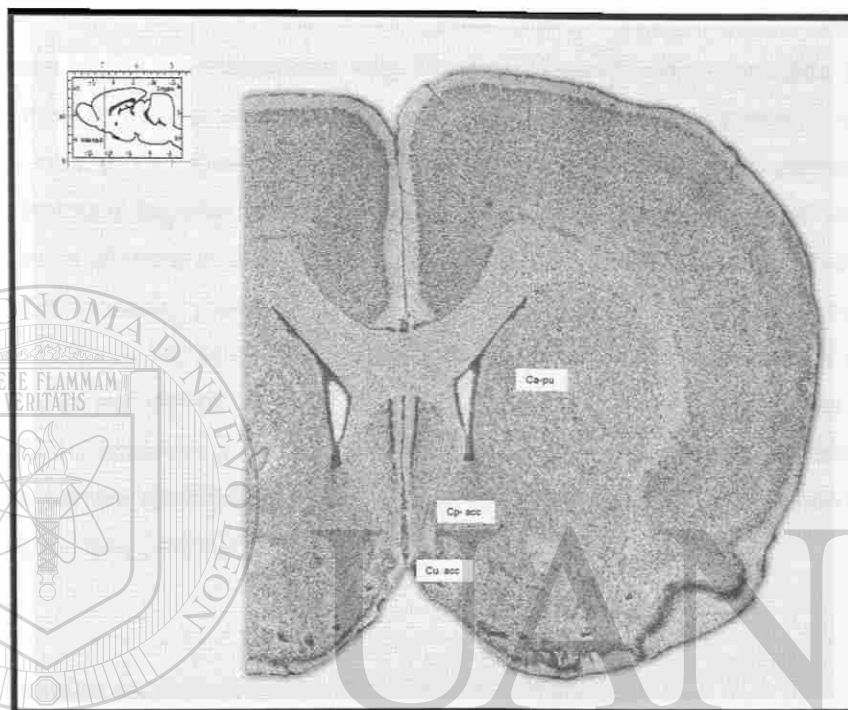


Figura 5. Cuerpo y cubierta del núcleo accumbens, en el cerebro de rata **Ca-pu**; caudado putamen, **Cp-acc**; cuerpo del accumbens; **Cu-acc**; cubierta del accumbens. Tinción con violeta de cresilo. Tomada de Paxinos y Watson. 2004.

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 sulfhidrido 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 sulfhidrido 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 sulfhidrido 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 glutatión reductasa y disminuye los niveles intracelulares del glutatión 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 detoxificación (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 glutatión (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 ($DMAs^{III}$) 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).

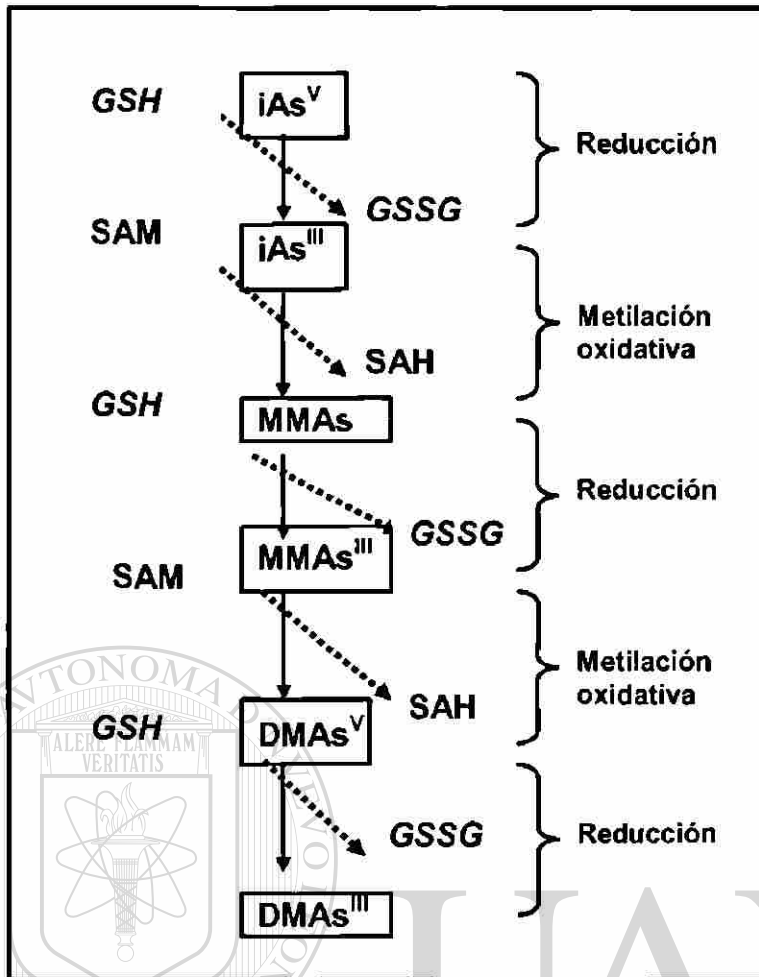


Figura 6. Metabolismo del arsénico.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 neurotransmisores (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 (Rodríguez 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).

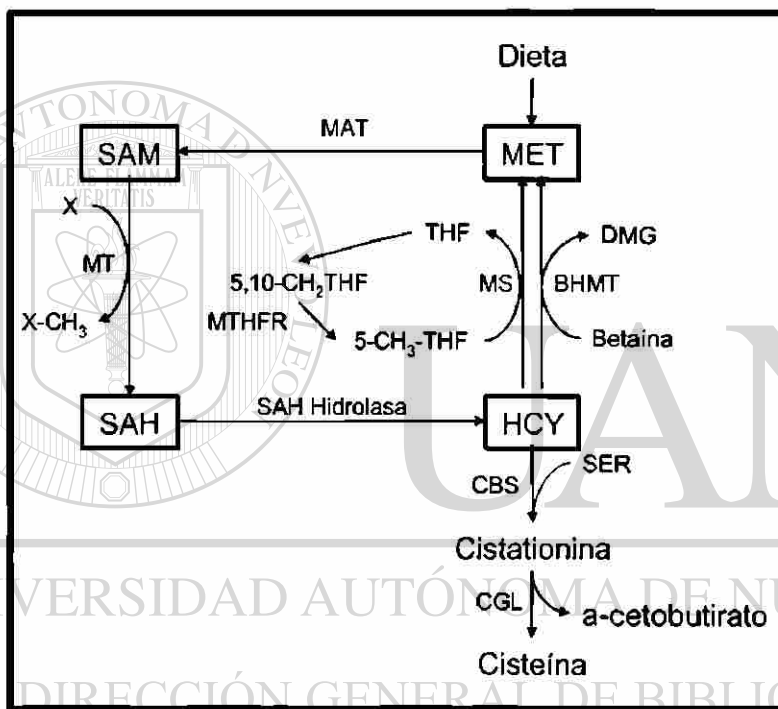


Figura 7. Metabolismo de la metionina.

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 aplicar 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 ESPECÍFICOS.

1. **Reproducir** el modelo animal establecido de exposición pre y posnatal 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 polvo 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 $1000 \pm 3\mu\text{g} / \text{ml}$ en 2% de ácido nítrico de la marca "High – purity standards".
- B. Los ácidos clorhídrico, nítrico 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 ultrapura (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 paraplant.

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

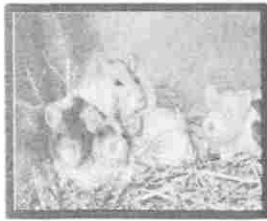
- Histo center II marca Allied.
- Baño para cortes en flotación marca Lab-line.
- Fotomicroscopio marca Nikon modelo LABOPHOT- 2
- Ultramicrotomo LKB BROMNA ULTRATOME.
- Preparador de cuchillas de vidrio LKB BROMNA modelo 7800 knife Maker.
- Agitador magnético marca Corning modelo PC- 410.
- Parrilla 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.

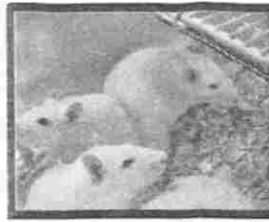
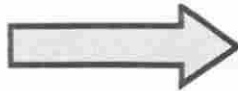
Desde el apareamiento, durante la gestación y hasta el destete, los animales fueron expuestos al arsenito de sodio en el agua de bebida (36.7 mg/l), y de los animales destetados se escogieron dos hembras de cada camada y se les continuó la exposición con el arsenito de sodio hasta los cuatro meses de 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 perfundidos 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

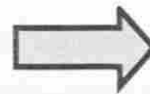
MODELO EXPERIMENTAL



Desde el apareamiento 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.



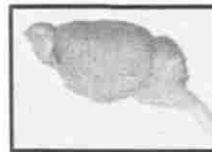
Ocho días antes de terminar el tratamiento fueron sometidas a la prueba del laberinto acuático.



Estudios químicos



Disecar el estriado

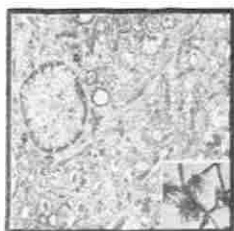
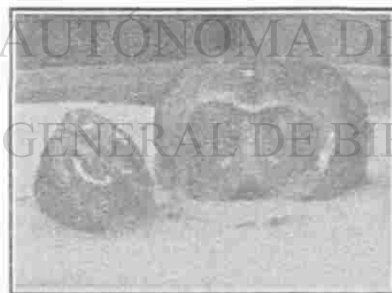


Se extrajo el cerebro.

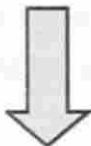


Objetivos dos, tres y cuatro.

Estudios morfológicos



Ultraestructurales.



Inmunohistoquímicos.



Histológicos.

Hematoxilina - Eosina.
Nissl.
Klüver- Barrera.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 apareamiento hasta el destete 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 periodo 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:



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 MICROSCOPIA 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 MICROSCOPIA 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 1 μ m 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 procedimiento 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 mostraron déficits en una prueba conductual y un aumento significativo de la concentración de arsénico en cerebro.

3.1.1 Prueba 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.

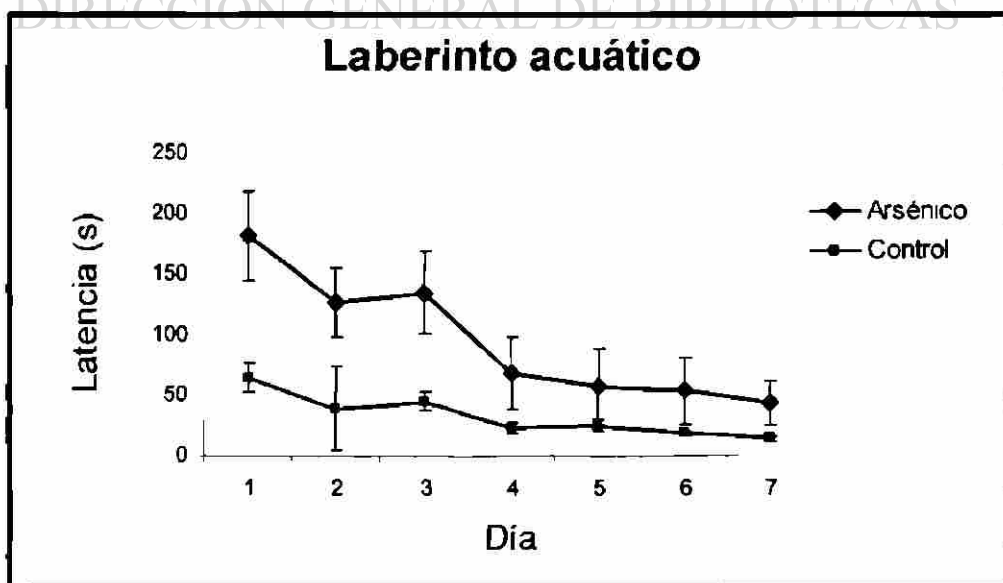


Figura 9. Resultados de la prueba de conducta obtenidos del grupo de animales expuestos por cuatro meses con arsenito de sodio.

Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico y dos meses sin estar expuestas 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.

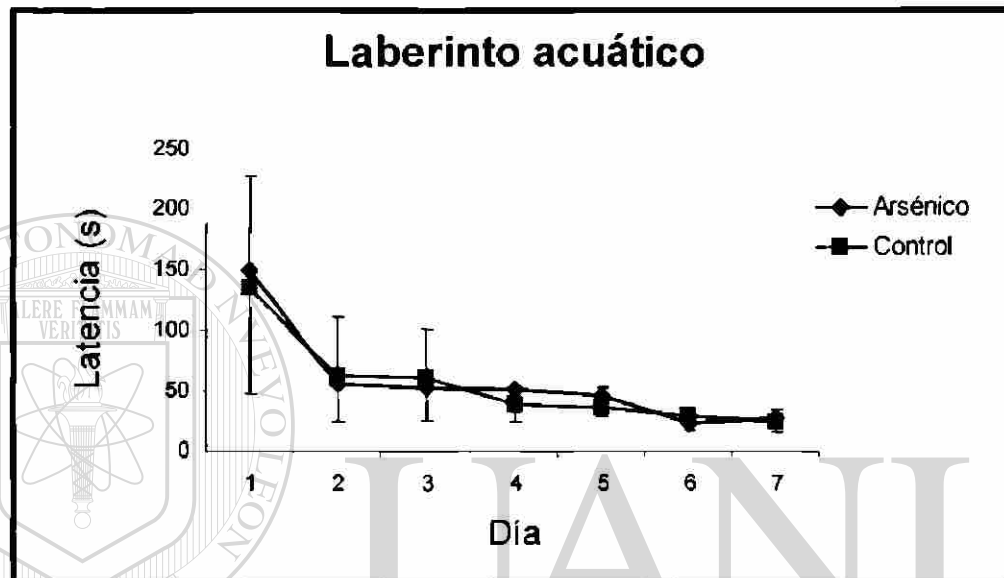


Figura 10. Resultados de la prueba de conducta obtenidos del grupo de animales expuestos por cuatro meses con arsenito de sodio y dos meses sin estar expuestos al arsénico.

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.

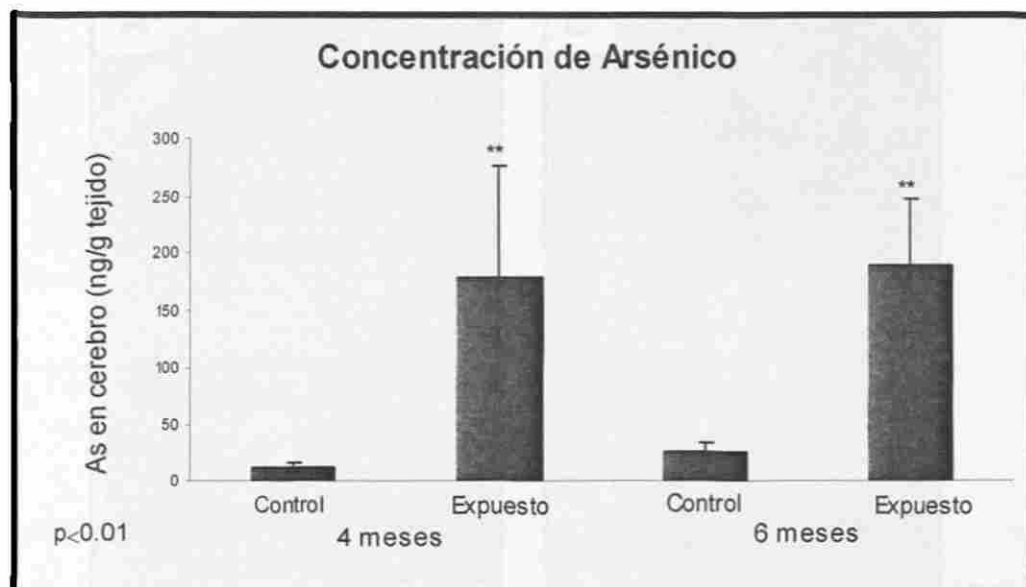


Figura 11. Resultados de la concentración de arsénico en cerebro, obtenidos del grupo de animales expuestos por cuatro meses con arsénico y del grupo de animales expuestos por cuatro meses con arsénico y dos meses sin estar expuestos al arsénico (seis meses), nótese que las concentraciones de arsénico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

3.2 ANÁLISIS MORFÓLOGICO.

3.2.1 Microscopía de luz.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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 hiper cromáticos y picnóticos (figura 12 B). Estos hallazgos fueron consistentes en animales expuestos y controles, ya que, se realizaron cortes de $7\mu\text{m}$ y se recolectaron cada $150\mu\text{m}$ en toda la superficie del estriado.

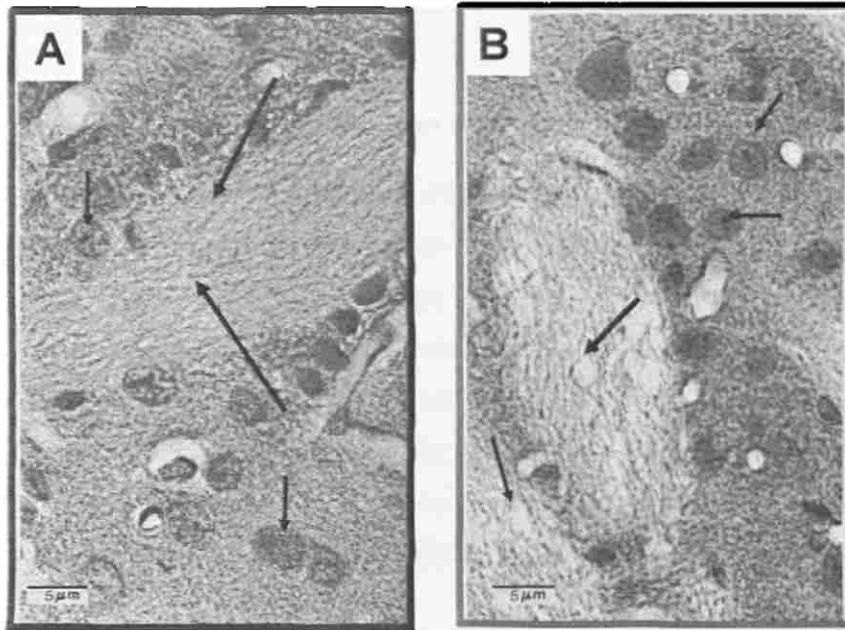


Figura 12. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento. Se muestran cuerpos neuronales normales con núcleos eucromáticos y nucleolos evidentes (flecha corta), y un tracto de fibras nerviosas con tinción homogénea (flecha larga). B. Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio. Se observan cuerpos neuronales con núcleos heterocromáticos, y picnóticos (flecha corta). Además 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 expuestas 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).

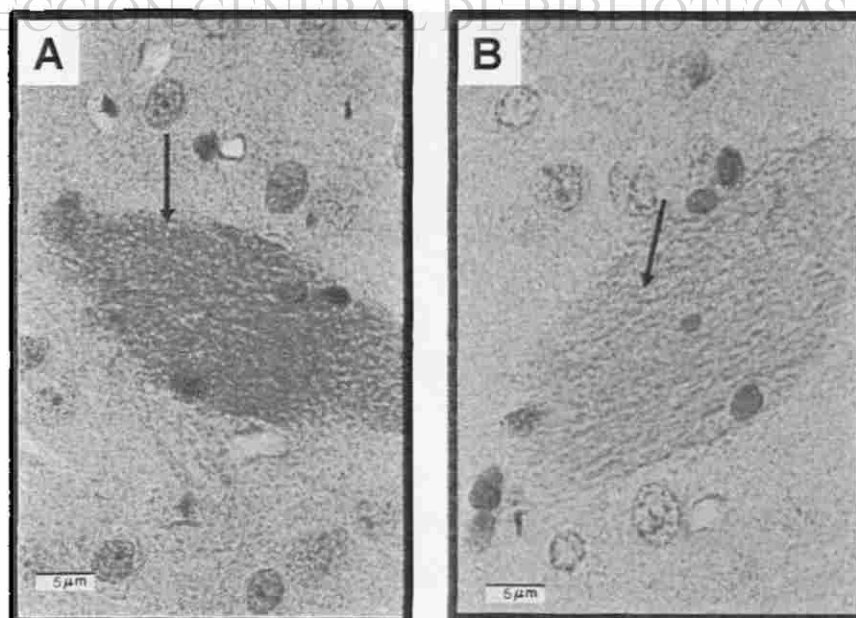


Figura 13. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento. Tracto de fibras nerviosas normales (flecha). B. Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio y dos meses sin estar expuestos al arsénico. Notese la tinción homogénea del tracto nervioso (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 $7\mu\text{m}$ y se recolectaron cada $150\mu\text{m}$ en toda la región ocupada por el cuerpo estriado.

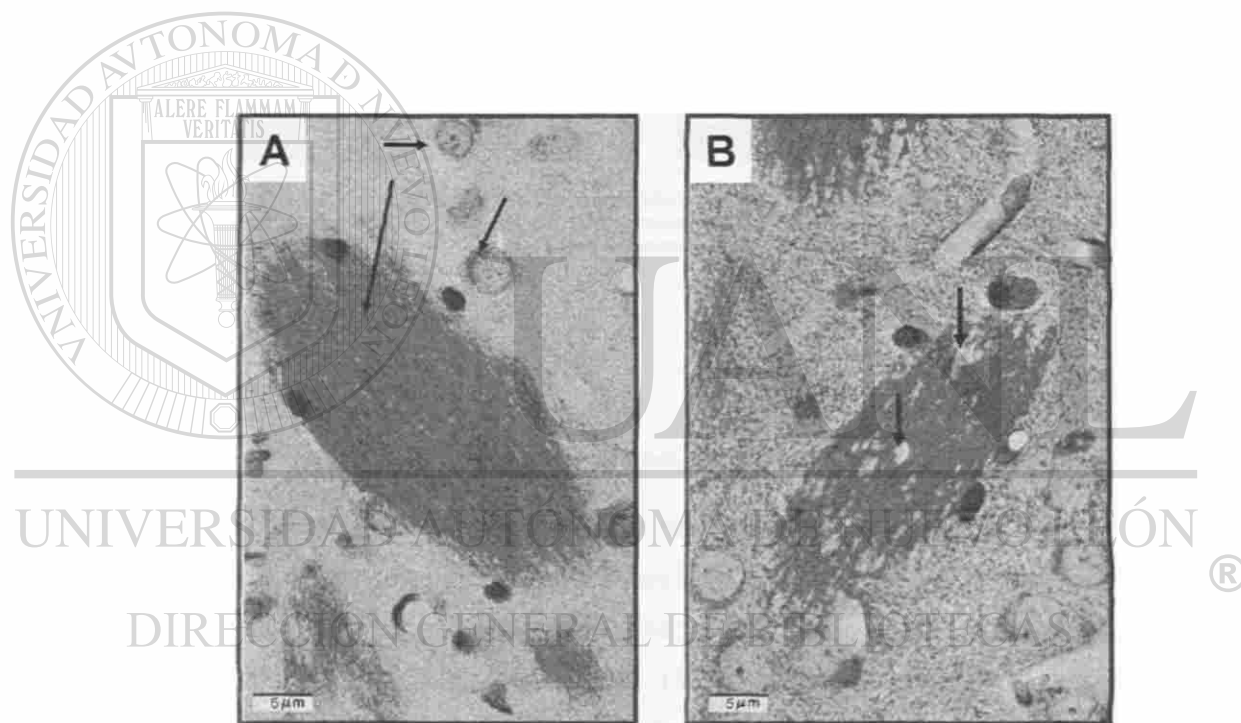


Figura 14. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento. Cuerpos neuronales (flecha corta), y fibras nerviosas (flecha larga) normales. B. Grupo expuesto por cuatro meses con arsénito de sodio. Se observa un tracto de fibras nerviosas en corte longitudinal 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 contraste 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).

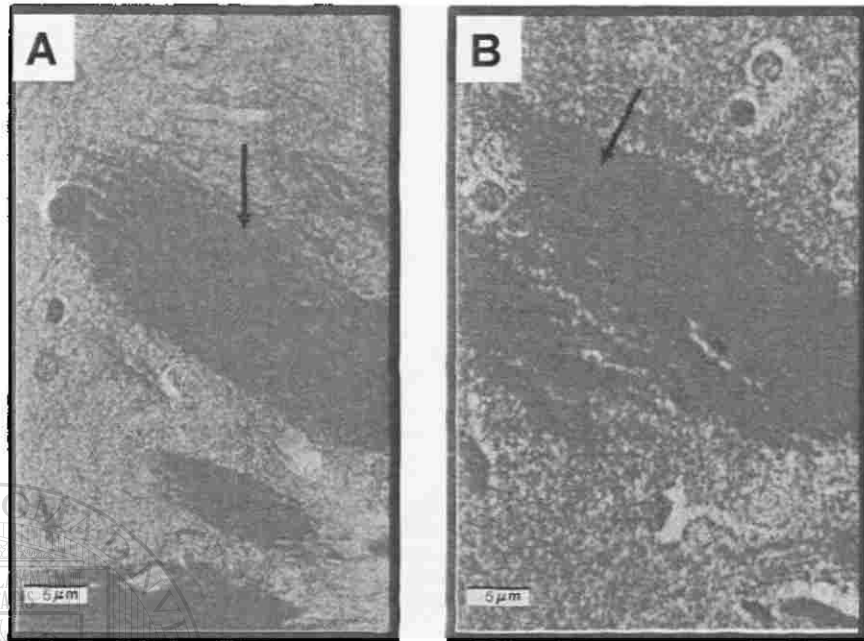


Figura 15. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento. **B** Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio y dos meses sin estar expuestos al arsénico. Obsérvese que la morfología de las fibras nerviosas (flecha) se asemeja al control. Tinción 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 neuropilo 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 hipercromacia debido al acúmulo de material basófilo, 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 7 μ m cada 150 μ m.

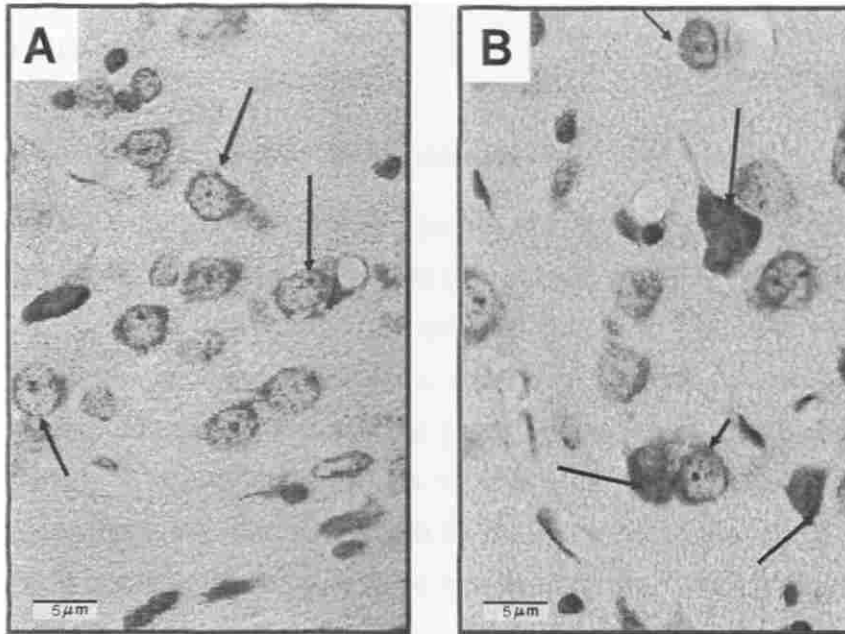


Figura 16. Fotomicrografía de Ccuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento. Se muestran cuerpos neuronales de apariencia normal (flecha). B. Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio. Se observan cuerpos neuronales normales (flecha corta) alternando con cuerpos neuronales con núcleos hiper cromáticos, 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 expuestas 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).

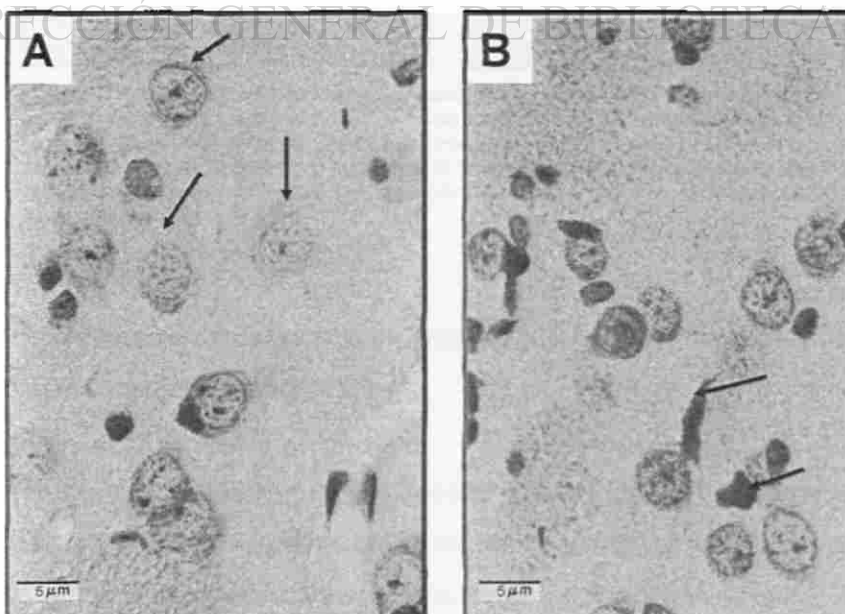


Figura 17. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento. B. Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio y dos meses sin estar expuestos al arsénico. Obsérvese que las alteraciones en los cuerpos neuronales persisten (flecha). Tinción violeta de cresilo. 390x.

3.2.1.4 Cortes semifinos.

3.2.1.4.1 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico.

Estas muestras de tejido fueron incluidas en resinas epóxicas, lo cual permite realizar cortes muy delgados (350 nm) facilitando así evaluar de una manera más fina los detalles morfológicos de los tejidos. En los cortes del cuerpo estriado del grupo control observamos tractos de apariencia normal, con una vaina de mielina íntegra (figura 18 A). En contraste con lo observado en los corte del cuerpo estriado del grupo expuesto, en este grupo los tractos de fibras nerviosas mostraron la apariencia de una masa amorfa, debido a que la vaina de mielina de estas fibras se encuentra fragmentada (figura 18 B). Estos resultados fueron consistentes en toda el área ocupada por el estriado, ya que se muestrearon los cortes en la totalidad de esta región.

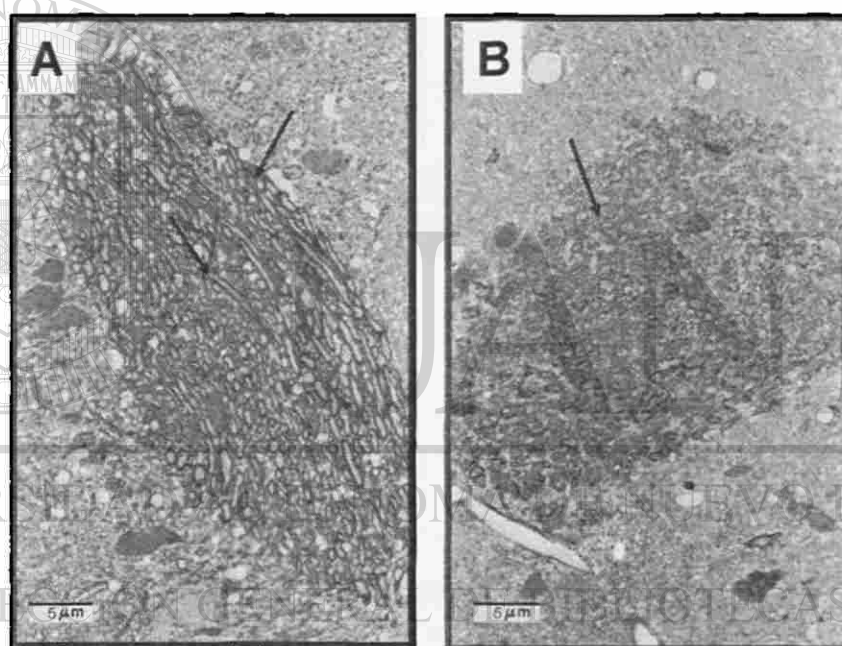


Figura 18. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. **A.** Control de animales sin tratamiento. Se muestra un tracto de fibras nerviosas con sus axones cubiertos por su vaina de mielina íntegra (flecha) **B** Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio. Se observa el tracto nervioso con apariencia de una masa amorfa debido a que las capas de mielina que recubren los axones se encuentra fragmentada. Inclusión en resinas epoxicas, azul de toluidina 390x

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

En el grupo al que se le suspendió por dos meses el tratamiento con arsénico (seis meses) observamos que las vainas de mielina de las fibras nerviosas mostraron una continuidad (figura 19 B), semejante a las que observamos en los cortes del cuerpo estriado de los animales control (figura 19 A).

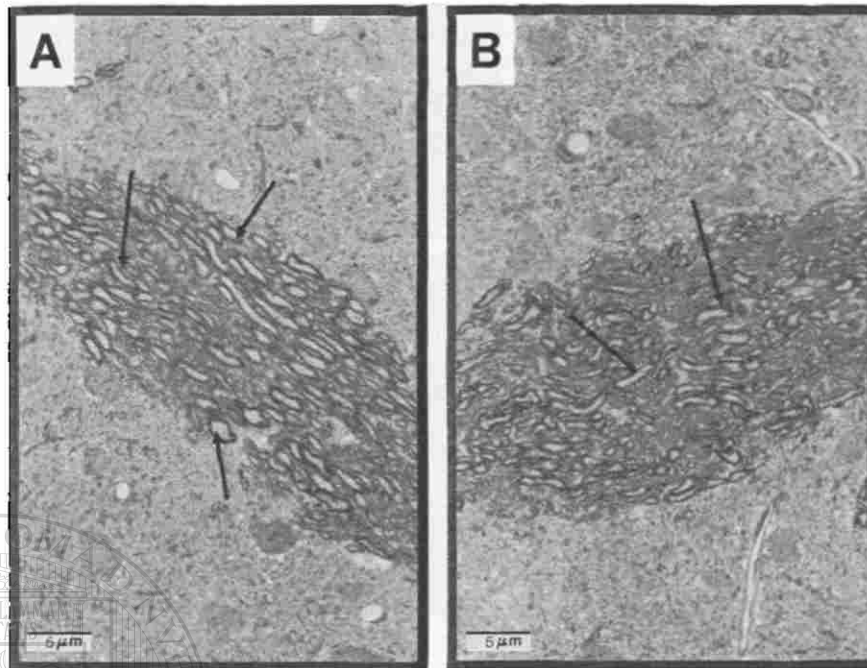


Figura 19. Fotomicrografía de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento. Se muestra fibras nerviosas con morfología normal (flecha). **B** Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio y dos meses sin estar expuestos al arsenico. Obsérvese que la vaina de mielina de las fibras se asemeja al control (flecha). Inclusión en resinas epoxicas azul de toluidina. 390x.

3.2.2 INMUNOHISTOQUÍMICA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

3.2.2.1 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico.

La técnica de TUNEL indica si existe fragmentación de la cromatina, un parámetro para evaluar la apoptosis. En la aplicación de esta técnica corrimos un control positivo en el cual inducimos la fragmentación de la cromatina indicándonos la positividad con la presencia de los núcleos intensamente teñidos (figura 20 A), además realizamos un control negativo en el cual omitimos la enzima de marcaje por ello los núcleos aparecen sin teñir (figura 20 B). Los resultados obtenidos al llevar a cabo el análisis de los cortes de estriado del grupo de animales control y del grupo expuesto, respectivamente, la coloración de los núcleos se asemejó al control negativo (figura 20 B), lo cual indica la ausencia del proceso apoptótico en el cuerpo estriado en el momento que se sacrificaron los animales (figura 20 C y D). Debido a estos resultados, ya no se efectuó la prueba de TUNEL en los restantes grupos experimentales (grupo de seis meses).

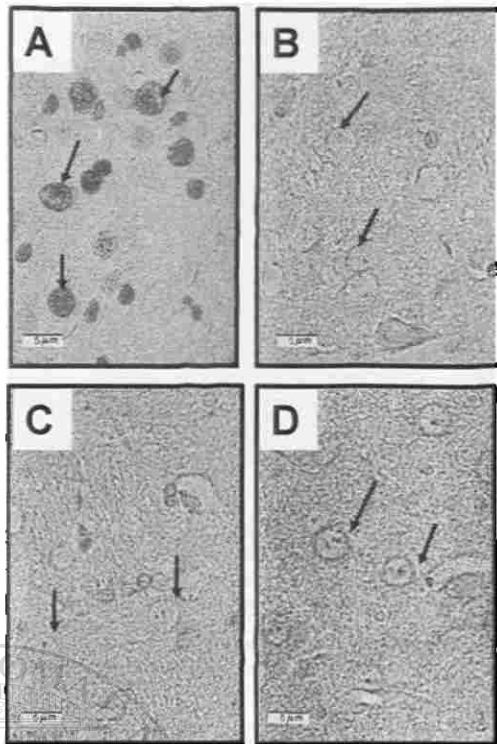


Figura 20. Fotomicrografías de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control positivo. Nucleos con la cromatina fragmentada indicando la positividad de la técnica (Flecha). B. Control negativo. C. Control sin tratamiento. D. Grupo expuesto con arsenito de sodio por cuatro meses. Obsérvese que los nucleos de los cortes de los dos grupos experimentales se asemejan a control negativo. Flecha. Técnica de TUNEL. 790x.

3.3.3 Microscopía electrónica.

3.3.3.1 Ratas expuestas por cuatro meses con arsénico.

Al llevar a cabo el análisis ultraestructural confirmamos lo que ya habíamos observado al microscopio de luz, ya que la vaina de mielina en los tractos de los cortes del cuerpo estriado de los animales control se mostró íntegra, con sus contornos bien delimitados (figura 21 A), en contraste con lo que se observó en los animales expuestos en donde los axones presentaron su vaina de mielina discontinua dando (figura 21 B). Estos hallazgos ultraestructurales confirman la desmielinización asociada a la exposición a arsénico.

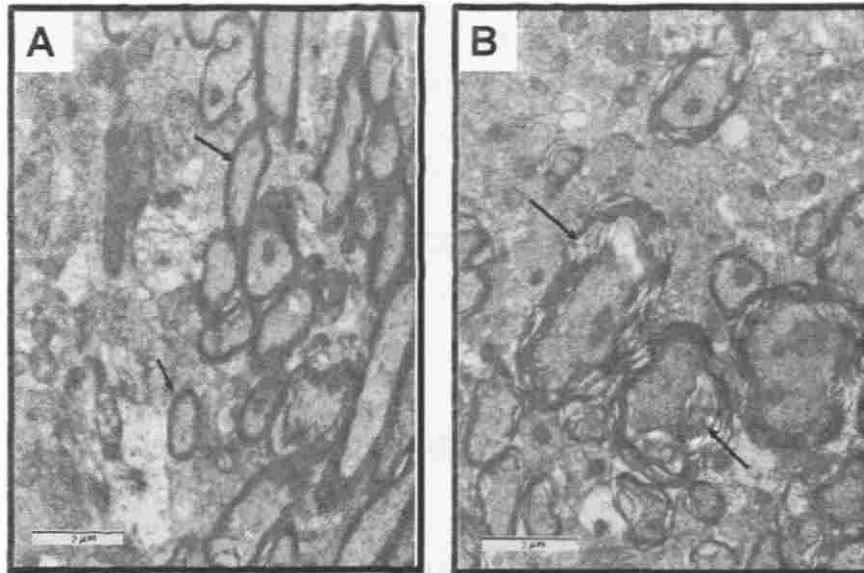


Figura 21. Micrografía electrónica de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento. Se muestran los axones con su vaina de mielina íntegra (flecha). B. Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio. Se observa un grupo de axones en corte transversal mostrando interrupción en su vaina de mielina (flecha negra) indicando desmielinización. Inclusión en resinas epoxicas contrastados con acetato de plomo citrato de uranio. 19000x.

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

La morfología ultraestructural de las vainas de mielina de los axones del cuerpo estriado, de este grupo experimental (figura 22 B) presentaron una vaina de mielina semejante al grupo control, de animales sin tratamiento (figura 22 A) con sus contornos bien delimitados. Estos hallazgos sugieren que la desmielinización fue reversible al suspender por dos meses la exposición al arsénico.

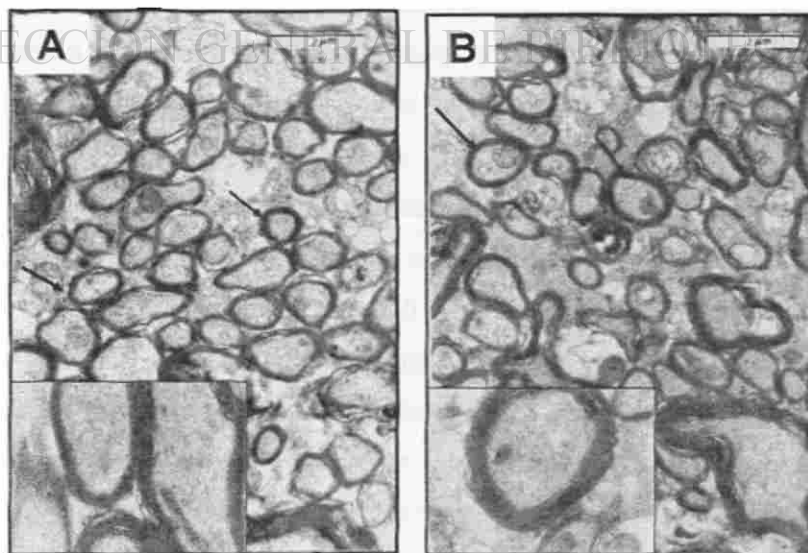


Figura 22. Micrografía electrónica de cuerpo estriado de cerebro de rata. A. Control de animales sin tratamiento. Se muestra grupo de axones con morfología normal (flecha). B. Grupo expuesto por cuatro meses con arsenito de sodio y dos meses sin estar expuestos a arsénico. Obsérvese que las vainas de mielina se asemejan a los controles (flecha negra) incluso en resinas epoxicas contrastados con acetato de plomo y citrato de plomo. 19 000x.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que la exposición crónica al arsénico en el agua de bebida (36 mg/l) causa alteraciones morfológicas a las neuronas y fibras nerviosas del cuerpo estriado de cerebro de rata, durante la gestación y etapas postnatales, y además que al suspender por dos meses la intoxicación se recupera notablemente el daño causado a las fibras nerviosas, mientras las alteraciones de los cuerpos neuronales persisten durante el tiempo de observación. De acuerdo a estos resultados, se acepta la hipótesis del trabajo “Dosis bajas de arsenito de sodio durante el desarrollo embrionario y posnatal de la rata producen alteraciones celulares en el cuerpo estriado”. Estos hallazgos se discutirán desde la perspectiva de su relevancia para el estudio de la neurotoxicidad del arsénico, así como desde el punto de vista de la inserción de esta información dentro de las hipótesis actuales sobre los mecanismos de toxicidad del arsénico.

Pertinencia de los modelos animales en el estudio de la neurotoxicidad del arsénico

Los efectos neurotóxicos del arsénico han despertado recientemente gran interés a raíz de estudios enfocados a población humana expuesta crónicamente a este metaloide, por lo que se han comenzado a construir modelos animales para su estudio. Dado que a través de estudios en población expuesta, se ha encontrado que el arsénico afecta funciones cerebrales superiores, especialmente en niños y adolescentes, la pregunta que surge es que si los resultados, obtenidos en animales como los roedores pueden proporcionar información relevante sobre lo que podría estar ocurriendo en los humanos. Con el fin de responder a ello, es conveniente volver a mencionar aquí que los niños expuestos presentaron alteraciones auditivas (Bencko y Simon., 1977), deficiencias en la comprensión verbal, memoria a largo plazo y lenguaje, disminución del coeficiente intelectual y deficiencia en pruebas de función cognitiva (Calderón y col., 2001; Wasserman y col., 2004). En China, uno de los países más contaminados por el arsénico en los mantos acuíferos, Tsai y colaboradores en el 2003 llevaron a cabo un estudio en adolescentes que estuvieron expuestos a altas concentraciones de arsénico (131- 185 ppb) a través del agua de bebida, y mediante una aplicación de cuatro

pruebas para evaluar el comportamiento demostraron deficiencias en la memorización de patrones y símbolos y en la atención. Estas alteraciones en humanos expuestos sugieren que daños neuronales en regiones cerebrales que participan en los procesos de integración de la memoria y el aprendizaje. Con el fin de aproximar este tipo de problemas mediante un modelo animal, se puede sólo recurrir a pruebas de conducta, por lo que construimos un modelo *in vivo* en el cual se reprodujeran los efectos neurotóxicos y las principales características que produce la exposición crónica al arsénico, específicamente la alteración del comportamiento y deficiencias en las tareas de aprendizaje, sin que presentaran signos de toxicidad, como sería diarrea, disminución de la ingesta, caída de pelo y cambios en el peso corporal.

Los resultados obtenidos en la prueba del laberinto acuático, en el grupo de los animales que estuvieron expuestos por cuatro meses al arsénico reflejan un déficit significativo en la habilidad para realizar esta prueba de memoria espacial. A pesar de que esta prueba de conducta se utiliza para evaluar la integridad del circuito hipocampal, y no el cuerpo estriado, existen evidencias que la vía nigroestriatal participa en el proceso de memoria aprendizaje y que este proceso es una vía independiente a la memoria hipocampal (Da Cunha y col., 2003). Y aún estudios recientes realizados en ratas dañadas evaluadas con esta prueba de conducta demuestran que el hipocampo dorsal es el implicado en esta tarea espacial y no el hipocampo ventral (Pothuizen y col., 2004). Teniendo en consideración que la prueba de conducta del laberinto en T es la más recomendada para evaluar la integridad del cuerpo estriado (El Massioui y col. 2001) aplicamos esta prueba en forma piloto en el presente trabajo. Sin embargo, los resultados que obtuvimos no fueron satisfactorios debido al poco tiempo de entrenamiento, el cual no era posible alargarlo ya que, para llevar a cabo esta prueba es necesario privar a los animales de agua, y ese era precisamente el medio de exposición al arsénico, por lo que para el estudio formal continuamos solamente con las pruebas del laberinto acuático, que no requieren privación de agua. Los resultados obtenidos con la prueba del laberinto acuático fueron muy satisfactorios ya que en relación con los parámetros morfológicos empleados en este trabajo, los valores obtenidos en el grupo de animales expuestos por cuatro meses al arsénico y dos meses con suspensión de tóxico (grupo de seis meses), reflejan una recuperación muy significativa en esta prueba de memoria espacial con respecto al grupo de intoxicación por cuatro meses. Consideramos que esta mejoría podría deberse a la remielinización de las fibras nerviosas que se observó en el grupo de seis meses.

Para conseguir este modelo animal apropiado desde el punto de vista conductual, es importante considerar que se emplearon dosis de arsénico mucho más altas que a las que se expone un humano. La concentración total de arsénico en cerebro encontrada en este trabajo es de 178 ± 100 ng/g, la cual es considerablemente más elevada que los niveles más altos

encontrados en sangre de humanos expuestos por largo tiempo al arsénico, los cuales variaban de 4.32 - 46.54 $\mu\text{g/l}$, según el estudio reportado por Wu y colaboradores en el año 2003.

Por otra parte, la concentración de arsénico, obtenida en el grupo de animales expuestos hasta los cuatro meses de edad (178 ± 98 ng/g), no mostró diferencia significativa con respecto a la cantidad obtenida en el grupo de animales a los que se les suspendió por dos meses la intoxicación. Este hallazgo sugiere que el arsénico no se eliminó en ese período de tiempo, tal vez porque la velocidad de remoción del arsénico en el cerebro se lleva a cabo lentamente; no como en otros órganos, en los que la velocidad de eliminación es más rápida como en pulmón que se elimina entre los 9 y 17 días, o en la piel en la cual se elimina más lentamente debido a que la queratina posee grupos sulfhidrilos y el arsénico es reactivo con estos grupos (Schoolmeester y White, 1980). Datos recientes proporcionados por Simeonova y colaboradores en el 2000 indican acumulación de arsénico inorgánico trivalente y pequeñas cantidades de su metabolito dimetilado (DMA V) en ratones expuestos por 4 semanas al arsenito en el agua de beber (100 ppm). Por lo que no se puede descartar que en nuestro modelo experimental el arsénico se remueva más lentamente. A pesar de que se encuentra bien documentado que después de la exposición aguda de arsénico en animales del laboratorio, el arsénico inorgánico se absorbe rápidamente y se distribuye a través del cuerpo en forma de sus metabolitos y es excretado principalmente en la orina (Odanaka y col., 1980; Vahter y Norin, 1980; Vahter, 1981; Hughes y col., 1994, 1999), la disposición del arsénico en el cerebro después de dosis repetidas no se encuentra documentada.

Por lo anterior, podemos concluir que si bien sería deseable conseguir un modelo animal donde hubiese manifestaciones conductuales a dosis más bajas, semejantes a las que se expone el humano, el presente modelo permitió analizar alteraciones morfológicas del sistema nervioso central en 3 condiciones que permiten hacer aportaciones relevantes: 1) modelo *in vivo* de exposición crónica, comparable con otros estudios reportados en la literatura y en el que se alcanzan niveles de arsénico en tejido alrededor de 8 veces más altos que los reportados en sangre en individuos expuestos, 2) alteraciones conductuales en ausencia de pérdida de peso y síntomas de intoxicación y, 3) reversibilidad de las alteraciones conductuales al cesar la exposición.

Desmielinización e hipótesis actuales sobre mecanismos de acción del arsénico.

La desmielinización del sistema nervioso central no se había reportado como un efecto de la exposición crónica a arsénico, mientras que la desmielinización en el sistema nervioso periférico se encuentra reportada desde hace décadas, ya que se conoce que la exposición a altas dosis

de arsénico causa una polineuropatía simétrica con degeneración Walleriana aguda de fibras mielinizadas (Heymann y col., 1956; Goebel y col., 1990). Por otro lado, también existen estudios en intoxicación con metales pesados (plomo), en los que se reporta una desorganización morfológica en la vaina de la mielina, la cual se atribuye a una alteración en la actividad de la CNPasa que participa en la síntesis de la mielina (Dabrowska-Bouta y col., 2004; Deng y Poretz, 2001). Basados en las principales hipótesis acerca del mecanismo de toxicidad del arsénico, consideramos que la desmielinización de las fibras nerviosas del SNC en animales expuestos crónicamente al arsénico, puede deberse ya sea a la generación de radicales tóxicos de oxígeno (ROS) y/o la hipometilación.

La mayoría de las especies reactivas de oxígeno se producen por una reducción parcial del oxígeno en el transporte de electrones en la mitocondria y es así como se produce el radical **superóxido** el cual es reducido a **peróxido de hidrógeno** por la superóxido dismutasa; este radical libre (peróxido de hidrógeno) a su vez es reducido a radicales **hidroxilo** mediante la intervención del hierro por la reacción de Fenton. Estas tres especies reactivas por sí mismas pueden inducir un daño, o también pueden activar vías de señalamiento intracelular alterando la función celular (García-Chávez y col., 2003), por lo que podrían estar interviniendo en el daño a membranas y consecuentemente en la desmielinización.

Por otra parte la **hipometilación** puede ser un evento ocasionado por la entrada del arsénico a las células nerviosas, ya que, el arsénico al entrar al cerebro lo hace a través de transportadores del glicerol, los cuales son canales de membrana multifuncionales (Lui y col., 2002), o bien por transportadores GLUT1 que se localizan en la membrana de los eritrocitos y células endoteliales de la barrera hematoencefálica (Vannucci y col., 1997), y una vez que éste ingresa al cerebro se metaboliza a sus especies mono-metiladas y dimetiladas, ya que el cerebro posee esta capacidad, como lo demostraron Rodríguez y colaboradores en el 2004.[®]

Como ya se conoce, S-adenosilmetionina (SAM) es un donador de grupos metilos que son necesarios para numerosas reacciones de **transmetilación**, entre las que se encuentra la biometilación del arsénico, la metilación de la fosfatidiletanolamina y la de la proteína básica de la mielina (PBM) (Lee y col., 1992; Small y col., 1981), dos componentes muy importantes de la mielina. Por ello consideramos que la alta demanda de grupos metilos para la biometilación de arsénico, disminuye la disponibilidad de estos grupos y por consecuencia inhibe la metilación del residuo 107 de arginina de la PBM (Small y col., 1981). Esta carencia de metilación puede conducir a una alteración de la mielina ya que la arginina metilada es esencial para mantener la compactación de las capas de mielina, y esto lo hace mediante reacciones de cadena cruzada, debido a que esta molécula es más hidrofóbica que la arginina por sí misma (Brostoff y Eylar, 1971). La hipometilación se ha reportado como un posible mecanismo de toxicidad del arsénico implicado en la carcinogenicidad (Chen y col 2004), y un segundo hallazgo en este trabajo que apunta a que esta alteración pueda estar implicada también en la desmielinización fue la recuperación de la vaina de mielina después de suspender por dos meses la exposición al

arsénico. Este resultado sugiere que, al ya no haber más entrada de arsénico al cerebro, ya no son necesarios metilos para su eliminación, y por lo tanto esos grupos químicos quedan disponibles para metilar la proteína básica de la mielina, y por consecuencia se recupere en la vaina mielina. Sin embargo, la persistencia de las alteraciones en los cuerpos neuronales sugiere que tal vez sea necesario más tiempo para su recuperación o que tal vez el daño ocasionado sea de manera irreversible.

Con respecto a la apoptosis, tanto la c- Jun N protein cinasa terminal (JNK) como la p38 son moléculas moduladores de la apoptosis en varios tejidos, además de otras funciones celulares. Namgung y Xia (2000) reportaron estudios *in vitro* en neuronas corticales de rata expuestas al arsenito de sodio y demostraron que JNK y p38 contribuyen a la apoptosis inducida por el arsenito de sodio en neuronas corticales. El arsénico también es inductor de apoptosis en células mononucleares humanas (De la fuente y col., 2002). Además, Chattopadhyay y colaboradores (2002 a y b) realizaron estudios *in vivo* e *in vitro* con dos modelos experimentales, el primero en el que ratas fueron expuestas durante toda la gestación a arsenito de sodio en el agua de beber (0.03, .30 y 3.0 ppm) y a los neonatos se les extrajo el cerebro y estos explantes cerebrales fueron mantenidos en cultivo. El segundo modelo consistió en explantes cerebrales fetales humanos, también expuestos al arsénico. Ellos reportan que la exposición al arsénico causó cambios en la membrana de las neuronas, indicado por la generación y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno. Estos autores proponen la presencia de apoptosis basados en criterios morfológicos, sin embargo, en las fotomicrografías que muestran no está clara la fragmentación de la cromatina ni la presencia de los cuerpos apoptóticos. Otro hecho de llamar la atención en el estudio antes referido es el comentario que los autores hacen acerca de que una dosis de 3 ppm de arsénico es una dosis cercana a letal, ya que en su estudio un gran número de madres abortaron y los productos murieron. Sin embargo, la dosis empleada en nuestro modelo y otros modelos es mayor (36 ppm) y con esta dosis no se presentaron abortos ni mortalidad. En contraste con estos antecedentes, el resultado negativo obtenido en el TUNEL en nuestro modelo muestra que las células no presentaban apoptosis al momento del sacrificio, que fue a la edad adulta, a diferencia de los estudios previos, donde el fenómeno se estudió durante el desarrollo o a través de una exposición *in vitro*.

CAPÍTULO CINCO

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES.

5.1 CONCLUSIONES.

1. Se acepta la hipótesis planteada “**Dosis bajas de arsenito de sodio durante el desarrollo embrionario y posnatal de la rata producen alteraciones celulares en el cuerpo estriado**”, ya que se demuestran por primera vez, alteraciones morfológicas en los cuerpos neuronales y desmielinización de las fibras nerviosas en esta región del cerebro.

2. Además se demuestra que la desmielinización **es reversible** al suspender por un período de dos meses la exposición al arsénico, sin embargo las alteraciones neuronales persistieron, durante el tiempo de observación.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



5.2 PERSPECTIVAS.

En vista de los resultados obtenidos en este trabajo, sería de gran interés continuar investigando los posibles mecanismos mediante los cuales la exposición crónica a arsénico causa desmielinización, así como qué tipos de neuronas están afectadas y en qué consisten las alteraciones observadas. Respecto a la desmielinización nosotros sugerimos que la vía mediante la cual se lleva a cabo este proceso es por hipometilación de la proteína básica de la mielina (PBM) (componente abundante en la vaina de mielina); debido a ello sería de interés: 1) **cuantificar** las concentraciones de especies metiladas del arsénico, así como 2) **cuantificar** las concentraciones de la proteína básica de la mielina, y 3) **cuantificar** las concentraciones de la s- adenosil metionina ya que esta molécula es la donadora de los grupos metilos, y los resultados constituirían un elemento clave para probar nuestra hipótesis. Por otro lado no se puede descartar que los oligodendrocitos, células de la glia encargadas de llevar a cabo la síntesis de mielina de las fibras nerviosas del sistema nervioso central se encuentren disfuncionales, o disminuidas en número, y ese sea el motivo por lo cual la vaina de mielina se muestre alterada, por ello, para descartar esta hipótesis valdría la pena realizar un **marcaje** mediante técnicas inmunohistoquímicas a este tipo celular con anticuerpos GalC, y más allá de la observación cualitativa realizar un análisis cuantitativo mediante morfometría.

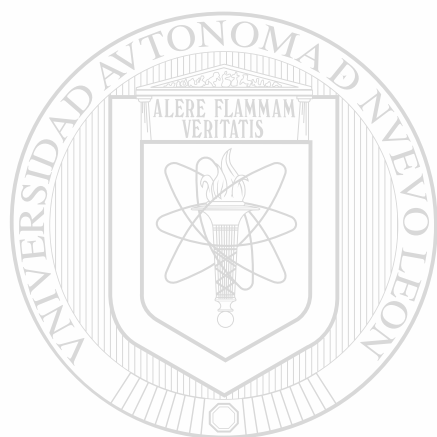
Otro hallazgo en este trabajo es la presencia de alteraciones neuronales observadas por microscopía de luz, por ello una continuación de este, sería **caracterizar** el tipo de neuronas alteradas mediante técnicas inmunohistoquímicas, la técnica de Golgi y el estudio ultraestructural.

La exposición al arsénico induce apoptosis según reportes previos, sin embargo en este trabajo no se encontró este tipo de muerte celular, sin embargo no se puede descartar que en otro momento, durante la exposición a arsénico la apoptosis se presente. Por ello, sería de interés **realizar** la misma la técnica del TUNEL que se aplicó en este trabajo a otros tiempos y así descartar esta hipótesis.

Por último, existen varias regiones del cerebro implicadas en el proceso de memoria-aprendizaje. Al presentarse un déficit en la prueba de memoria espacial en los animales expuestos al arsénico, cabe la posibilidad que no sólo se encuentre alterado el estriado sino también otras áreas de cerebro implicadas en estos procesos, como lo son el hipocampo y la corteza. Por tanto, **analizar** mediante parámetros bioquímicos y morfológicos estas áreas proporcionaría información importante.

5.3 CONTRIBUCIONES.

Con este estudio se contribuye a esclarecer el mecanismo de neurotoxicidad del arsénico, especialmente en el área morfológica ya que, mediante las técnicas aplicadas se demuestra que existe una coincidencia entre las alteraciones de comportamiento ya demostradas, y las alteraciones tanto de las neuronas como de las fibras nerviosas, sin embargo sería de gran interés, que se demostrara una relación causa-efecto entre los parámetros ya mencionados.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APÉNDICE A

TABLA 1

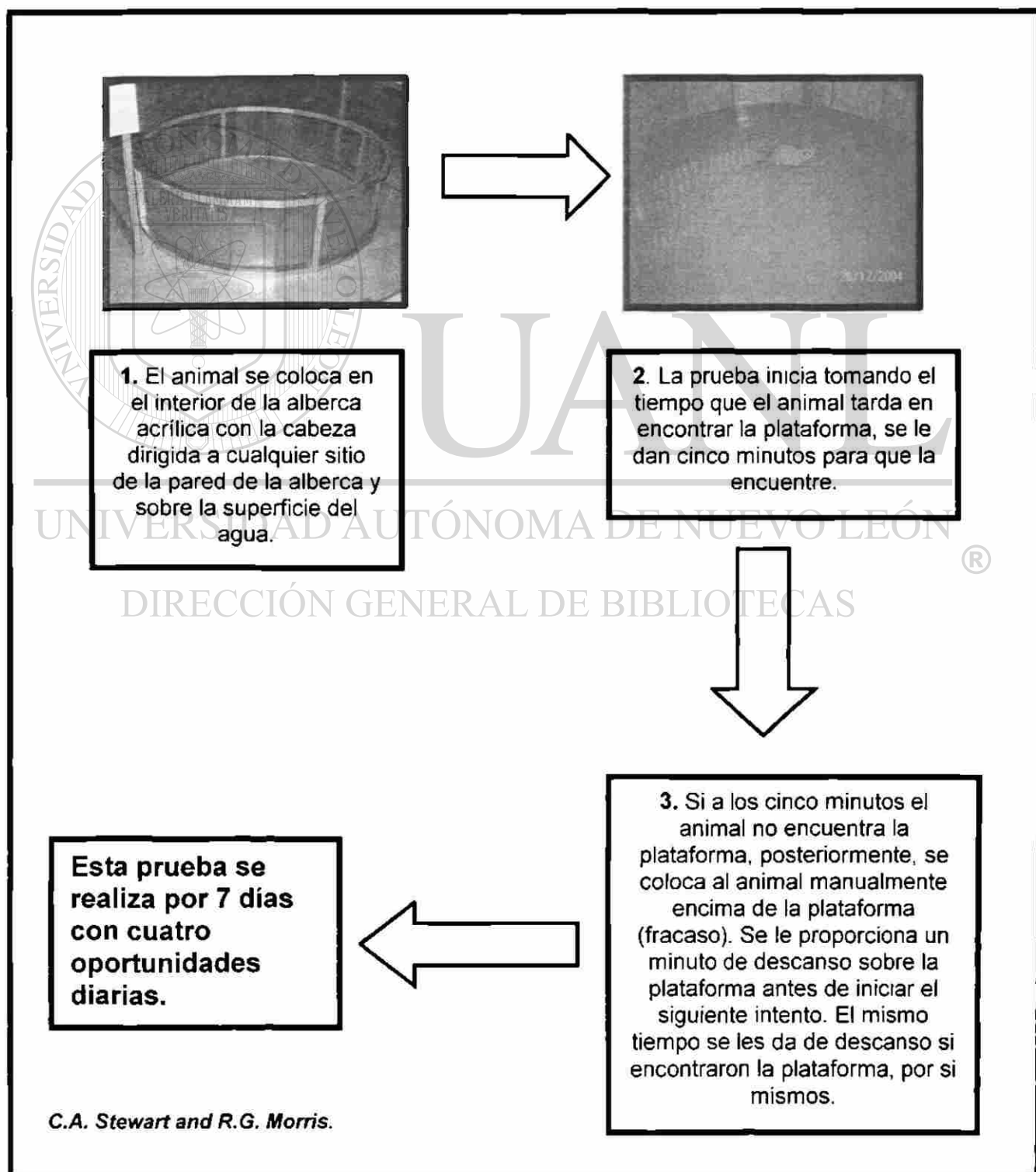
PRUEBA DE CONDUCTA DEL LABERINTO ACUÁTICO

TABLA 2

TÉCNICA DE ESPECTROMETRÍA DE FLUORESCENCIA ATÓMICA POR GENERADOR DE HIDRUROS.

Para cuantificar la concentración de arsénico.

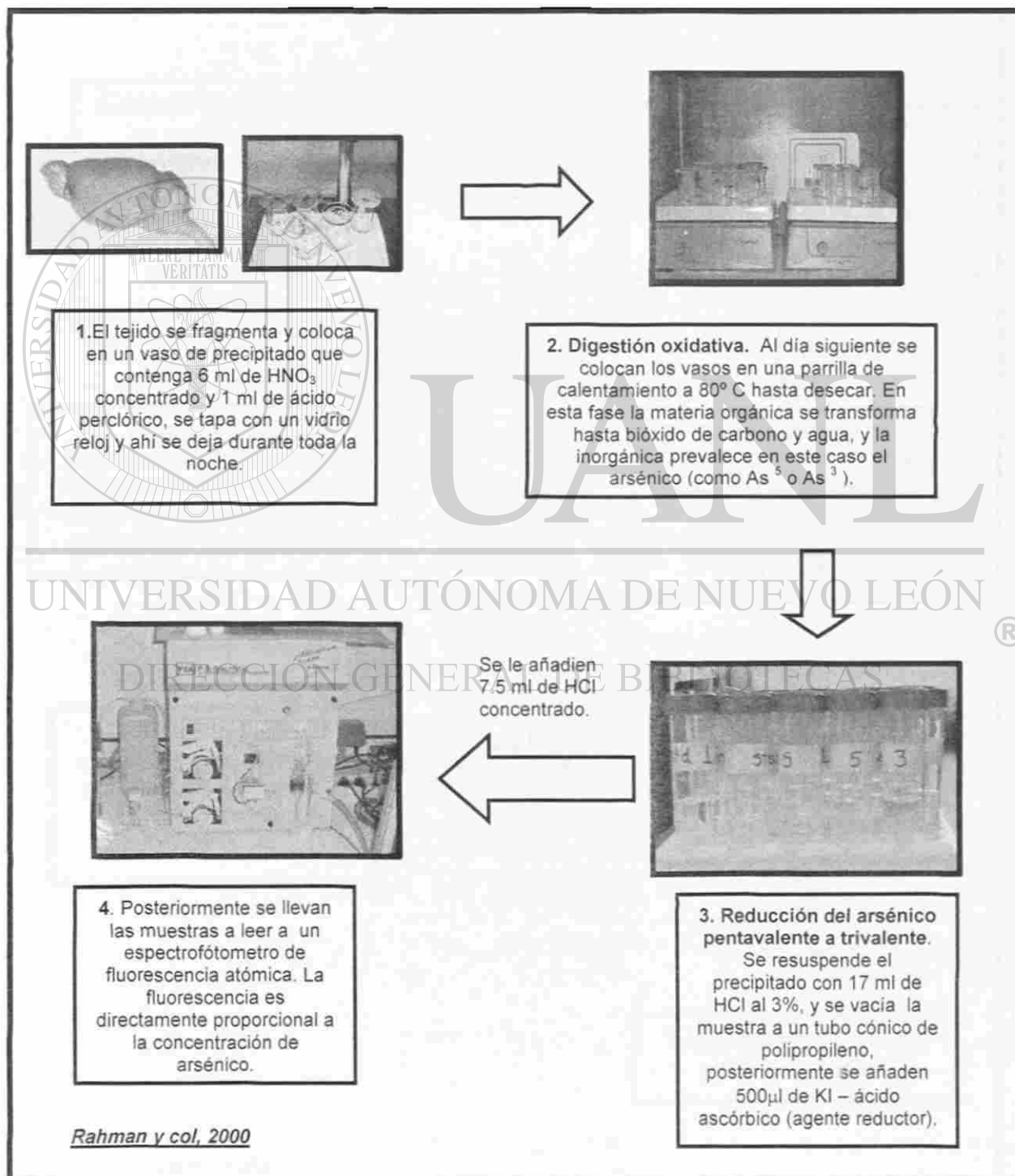


TABLA 3

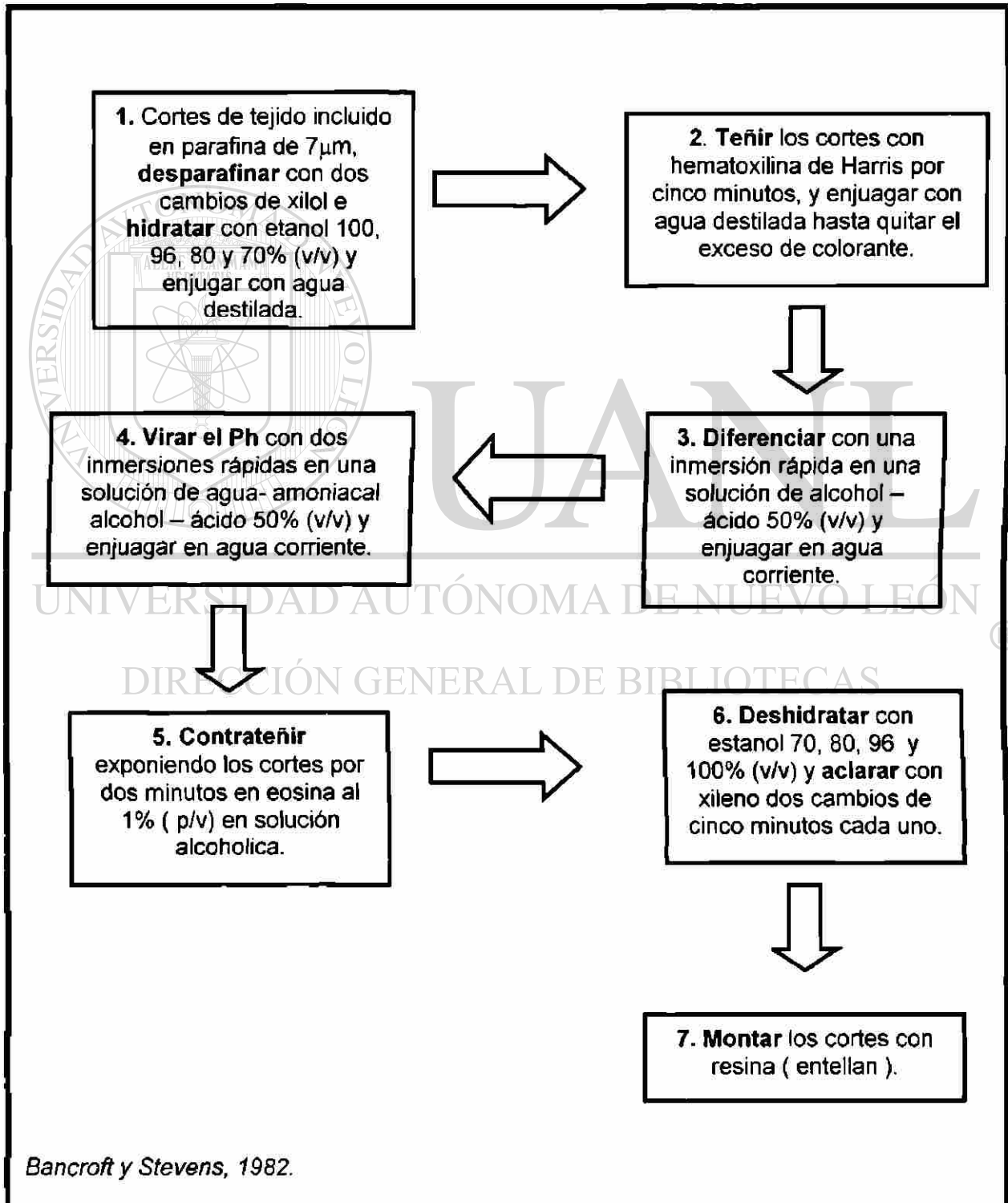
TÉCNICA DE HEMATOXILINA – EOSINA

TABLA 4

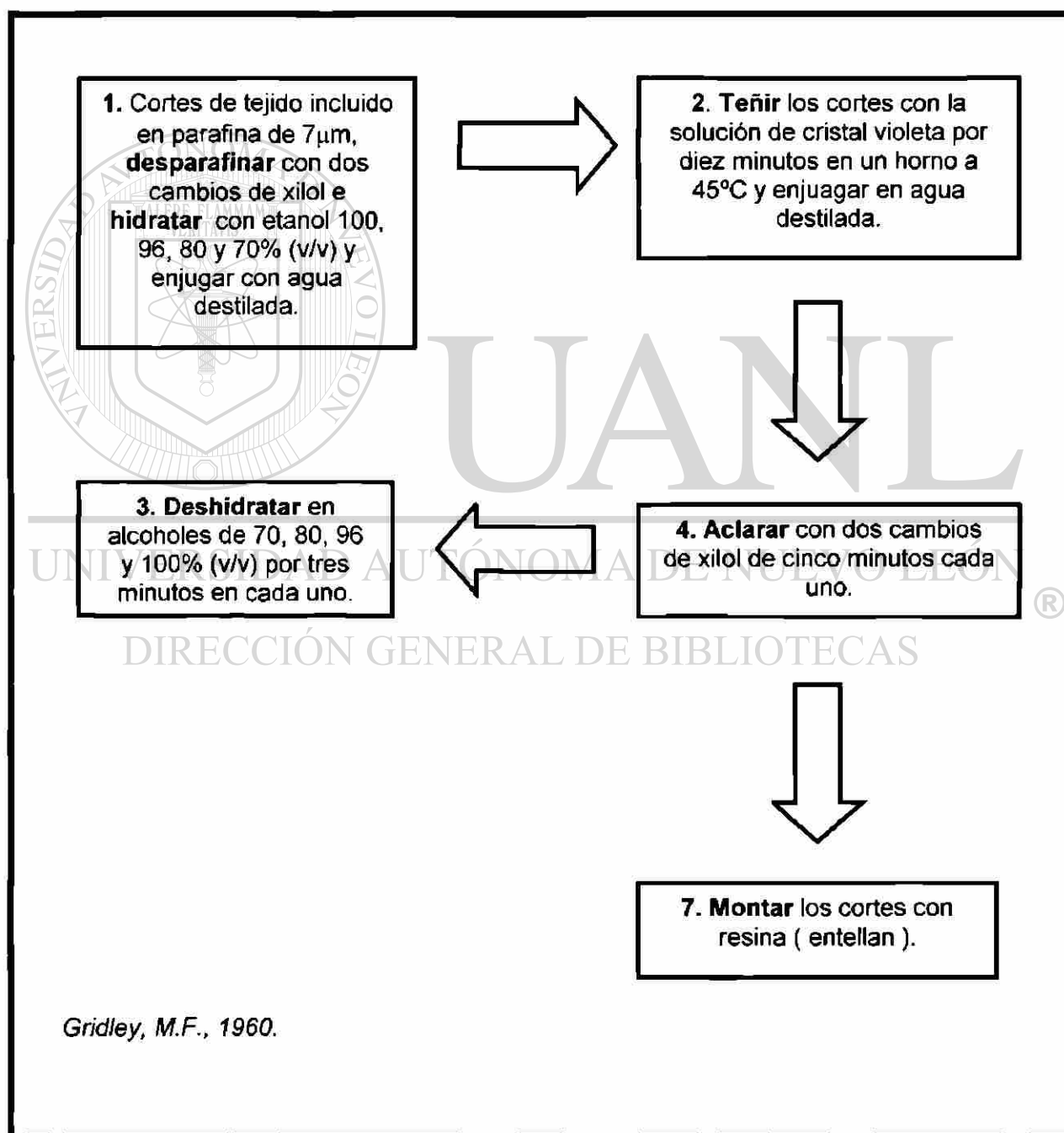
TÉCNICA DE NISSL.

TABLA 5

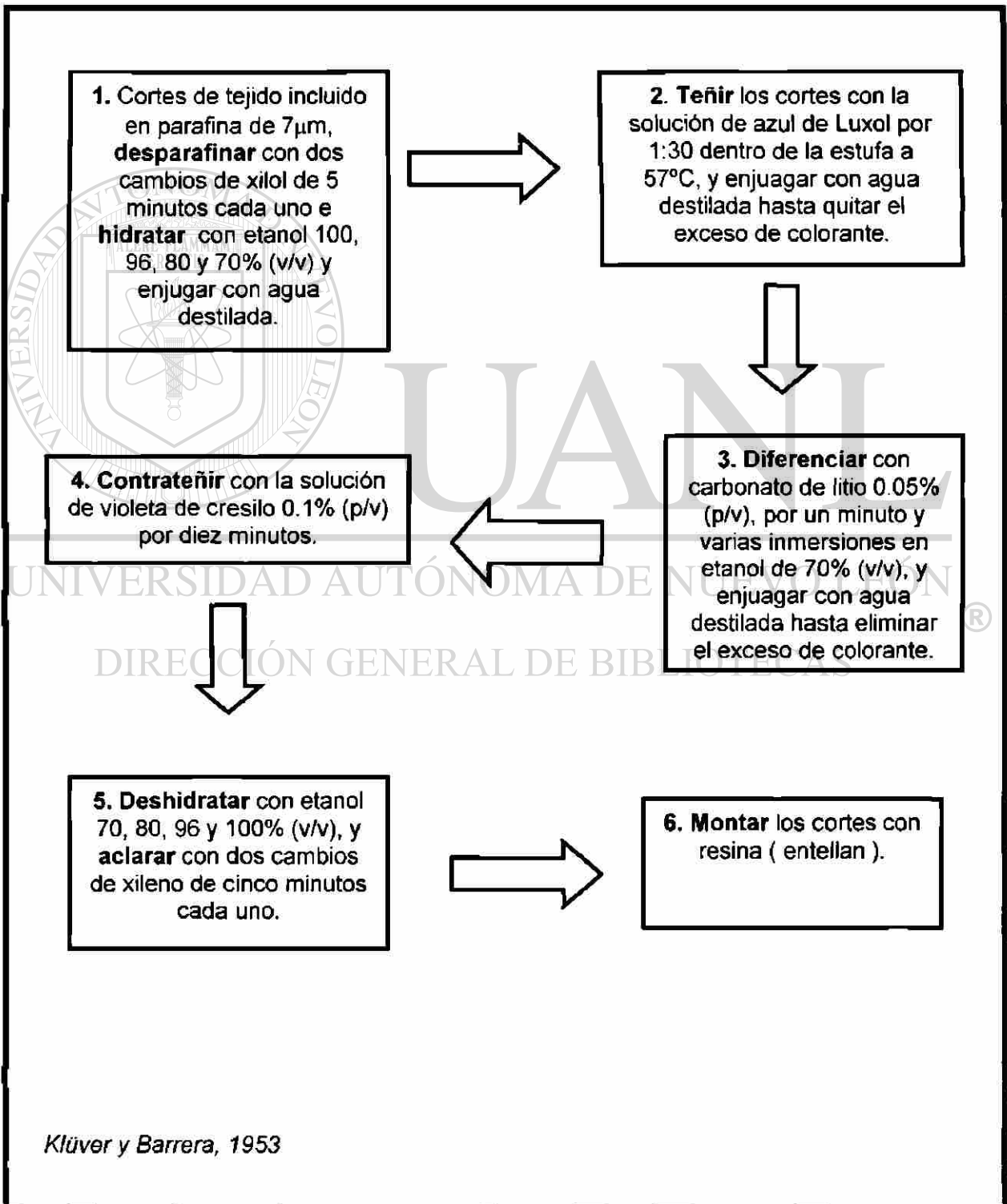
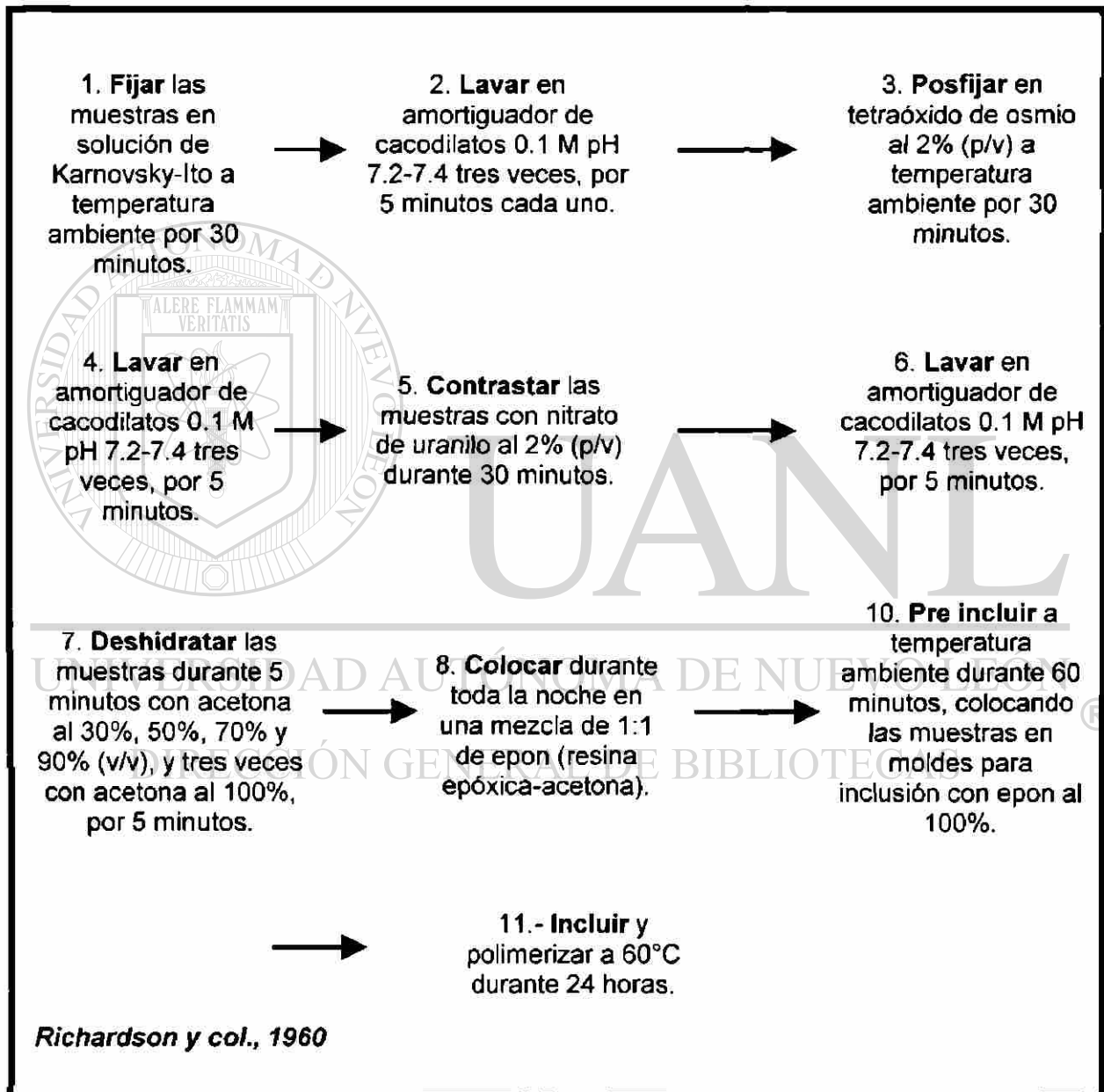
TÉCNICA DE KLÜVER - BARRERA

TABLA 6

TÉCNICA DE INCLUSIÓN EN RESINAS EPÓXICAS



APÉNDICE B

SOLUCIONES

B.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PARA LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS.

B.1.1 ÁCIDO CLORHÍDRICO AL 3%.

Ácido clorhídrico concentrado	3 ml.
Agua desionizada	100 ml.

B.1.2 SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE ARSÉNICO DE 1 ppm.

Solución estándar de arsénico de 1000 ppm 25 μ l.
Colocarla en un matraz volumétrico de 25 ml y aforarlo con agua desionizada.
A partir de esta solución se prepararon los estándares siguientes:

Estándar de arsénico de 1 ppm	
Estándar 1	25 μ l.
Estándar 5	125 μ l.
Estándar 15	375 μ l.
Estándar 30	750 μ l.

B.1.3 SOLUCIÓN DE YODURO DE POTASIO 50% m/v EN ÁCIDO ASCÓRBICO AL 10%.

Yoduro de potasio	50 g.
Ácido ascórbico	10 g.
Agua desionizada	100 ml.

B.1.4 SOLUCIÓN DE BOROHIDRURO DE SODIO 0.7% m/v en hidróxido de sodio 0.1M.

Borohidruro de sodio	7 g.
Hidróxido de sodio	4 g.
Agua desionizada	1000 ml.

B.1.5 BLANCO REACTIVO.

Ácido clorhídrico concentrado	300 ml.
Solución de yoduro de potasio 50% m/v en ácido	
Ascórbico al 10%.	20 ml.

Y aforar con agua desionizada hasta un volumen de 1000 ml.

B.2 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PARA LAS TÉCNICAS MORFOLÓGICAS.

B.2.1 SOLUCIONES PARA MICROSCOPIA DE LUZ.

B.2.1 .1 BUFFER DE FOSFATOS SALINO 0.1 M.

Solución madre.

Solución A.

Fosfato monobásico de sodio	27.58 g.
Agua desionizada	1000 ml.

Solución B

Fosfato dibásico de sodio	28.39 g.
Agua desionizada	1000 ml.

Solución de trabajo.

Solución A	95 ml.
Solución B	409.5 ml.
Cloruro de sodio	9 g.

Diluir en agua destilada y aforar a 1000 ml. Ajustar pH 7.4.

B.2.1. 2 BUFFER DE FOSFATOS 0.2 M.

Solución madre.

Solución A.

Fosfato monobásico de sodio	27.58 g.
Agua desionizada	1000 ml.

Solución B.

Fosfato dibásico de sodio	28.39 g.
Agua desionizada	1000 ml.

Solución de trabajo.

Solución A	19 ml.
Solución B	81.9 ml.
Ajustar el pH 7.4.	

B.2.1. 3 SOLUCIÓN DE PARAFORMALDEHÍDO – GLUTARALDEHÍDO AL 2% EN BUFFER DE FOSFATOS.**Solución madre.**

Paraformaldehido	16 g.
Agua destilada	400 ml.

Mezclar y calentar hasta cerca de la ebullición, retirar de la parrilla y en agitación constante agregar gota a gota hidróxido de sodio hasta que la solución quede clara.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**Solución trabajo.**

Solución madre.	400 ml.
Buffer de fosfatos 0.2 M	400 ml.
Glutaraldehído al 25%	16 ml.

B.2.1. 4 ALCOHOL – ÁCIDO.

Alcohol de 96%	350 ml.
Ácido clorhídrico concentrado	5 ml.
Agua destilada	150 ml.

B.2.1. 5 AGUA AMONICAL AL 1%.

Hidróxido de amonio	5 ml
Agua destilada	495 ml

B.2.1.6 HEMATOXILINA DE HARRIS.

Hematoxilina	15 g.
Sulfato de aluminio y potasio	300 g.
Alcohol Etilico absoluto.	150 ml.
Agua destilada	3000 ml.
Óxido rojo de mercurio	7.5 g.

B.2.1.7 EOSINA.

Solución stock

Eosina amarillenta	1.0 g.
Alcohol Etilico al 96%.	80 ml.
Agua destilada	20 ml.

Solución de trabajo.

Solución stock	100 ml.
Etanol al 80%	300 ml.
Ácido acético glacial	2.0 ml.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

B.2.1 .8 VIOLETA DE CRESILO.

Cristal violeta rápido	1 g
Agua destilada	1000 ml
Ácido acético al 10%	10 ml

NOTA: filtrarla y guardarla en el horno a 45°C. Se puede usar muchas veces.

B.2.1.9 SOLUCIÓN DE AZUL DE LUXOL RÁPIDO AL 0.1%.

Azul de luxol	0.1g
Etanol al 96%	100 ml

Disolver el colorante en el alcohol, adicionar 0.5 ml de ácido acético al 10% por cada 100 ml de solución.

B.2.1.10 SOLUCIÓN DE VIOLETA DE CRESILO AL 0.1%.

Violeta de cresilo	0.1 g
Agua destilada	100 ml

Después de preparada, se adiciona 10 gotas de ácido acético glacial posteriormente se filtra y ya queda lista para usarse (no requiere calentamiento).

B.2.1.11 SOLUCIÓN DE CARBONATO DE LITIO AL 0.05% (solución diferenciadora).

Carbonato de litio	0.05%
Agua destilada	100ml

B.2.1.12 SOLUCIÓN DE ALCOHOL AL 70%.

Alcohol etílico absoluto	70 ml
Agua destilada	30 ml

B.2.2 SOLUCIONES PARA INMUNOHISTOQUÍMICA.

La técnica de TUNEL se determinó utilizando el Kid TACS™ 2 TdT *In situ* Apoptosis Detection de Trevigen®, las soluciones marcadas con * se deben de preparar no más de treinta minutos antes de usarse.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

*** B.2.2.1 Solución de proteinasa K (para cuatro muestras).**

Agua desionizada	200 µl
Proteinasa K	4 µl

*** B.2.2.2 Solución bloqueadora.**

Metanol	45 ml.
Peróxido de hidrógeno	5 ml

B.2.2.3 Solución de Buffer de marcaje TdT 1X.

Buffer TdT 10X	5 ml
Agua destilada	45 ml

Usar 50 ml de Buffer TdT 1X para procesar de una a diez muestras, separe una alícuota de 50µl por muestra para preparar la mezcla de reacción de marcaje y almacenar en hielo.

B.2.2.4 Mezcla de reacción de marcaje.

Descongelar la mezcla de TdT dNTP a temperatura ambiente, y colocarla en hielo para mantener la actividad óptima de la enzima, sacar del refrigerador el tubo de la enzima solo el tiempo necesario para tomar el volumen y mantener la mezcla en hielo.

Preparar 50µl por muestra de la manera siguiente:

	2 MUESTRAS	4 MUESTRAS	10 MUESTRAS
Mezcla de TdT dNTP	2 µl	4 µl	10 µl
Stock catiónica 50X	2 µl	4 µl	10 µl
Enzima TdT	2 µl	4 µl	10 µl
Buffer de marcaje TdT 1X	100 µl	200 µl	500 µl

B.2.2.5 Buffer Stop TdT 1X.

Buffer stop TdT 1X	5 ml
Agua destilada	45 ml

Usar 50 ml de Buffer stop TdT 1X para procesar de una a diez muestras. Almacenar a temperatura ambiente.

* B.2.2.6 Solución Strep – HRP.

	2 MUESTRAS	4 MUESTRAS	10 MUESTRAS
PBS 1X	100 µL	200 µL	500 µL
Strep – HRP	2 µL	4 µL	10 µL

Usar 50 μL solución Strep – HRP por muestra. Almacenar la solución a temperatura ambiente.

*** B.2.2.7 Solución de DAB.**

PBS 1X	50 ml
DAB	250 μL
Peróxido de hidrógeno al 30%.	50 μL

Descongelar DAB a 37°C. Almacene a temperatura ambiente, no en hielo. Preparar la solución no más de 30 minutos antes de usarla. Usar 50 ml de la solución de DAB para procesar de una a diez muestras.

B.2.2.8 Verde de metilo al 1%

Verde de metilo	1.0 g
Agua destilada	100 ml

Este reactivo ya viene preparado en el Kid. Puede re-usarse, almacene en recipiente cerrado, si precipita filtre. También puede ser preparado.

B.2.2.9 Para correr el control positivo.

TACS – Nucleasa y Buffer.

Buffer de marcaje TdT 1X	50 μl
Mezcla de TdT dNTP	1 μl
Stock Catiónica 50 X	1 μl
Enzima TdT	2 μl
TACS – Nucleasa	1 μl

B.2.2.10 Para correr el control negativo.

Preparar la mezcla igual que para el control positivo omitiendo la enzima TdT, por agua milli-Q.

B.2.3 SOLUCIONES PARA MICROSCOPIA DE ELECTRONICA.

B.2.3.1 Fijador de Karnovsky-Ito

Solución madre.

Paraformaldehído	16 g
Agua ultrapura	400 ml

Calentar cerca del punto de ebullición y agregar unas gotas de hidróxido de sodio, para quitar la turbidez.

Solución de trabajo.

Solución Madre	400 ml
Buffer de cacodilatos 0.1 M	400 ml
Glutaraldehído 25%	32 ml
Ácido pícrico	0.08 g

B.2.3.2 Fijador de tetraóxido de osmio al 2%.

tetraóxido de osmio	1.0g
Buffer de cacodilatos 0.1 M a pH 7.2 – 7.4	50 ml

B.2.3.3 Buffer de cacodilatos 0.1 M

Solución A	
Cacodilato de sodio	4.28 g
Agua ultrapura	100 ml

Solución B

Ácido clorhídrico concentrado	0.5 ml
Agua ultrapura	25 ml

Solución de trabajo

Solución A	100 ml
Solución B	5.4 ml

Aforar a 200 ml con agua ultrapura y ajustar el pH a 7.2 -7.4.

B.2.3.4 Preparación de la mezcla de resinas epóxicas.

DDSA	4.3 ml
Resina	4.34 ml
NMA	1.4 ml
DMP-30	0.2 ml

APENDICE C

C.1 MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO PARA DETECTAR LA FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA UTILIZANDO LA TÉCNICA DE TUNEL.

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

La fragmentación del DNA se detectó añadiendo dUTPs marcados en los extremos 3'OH libres del DNA mediante la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y posteriormente reconocidos por un anticuerpo antidigoxigenina unido a peroxidasa, la positividad se identificó con H₂O₂-diaminobencidina observando una coloración marrón oscuro en los núcleos positivos o bien verde claro (tinción de contraste: verde de metilo) en los núcleos negativos para esta técnica.

C.1.1 CONTROLES PARA LA TÉCNICA:

Control positivo: Los cortes fueron tratados con nucleasa para inducir la fragmentación del DNA.

Control negativo: Se empleó agua destilada en lugar de la enzima TdT.

C.1.2 PROCEDIMIENTO

Para tejido fijado con formaldehído al 4 % y embebido en parafina, y en cortes de 7 µm.

I.- DESPARAFINAR:

- 1.- Colocar los cortes en estufa a 57°C, cinco minutos.
- 2.- Pasar cortes a 2 cambios de xilol cinco minutos c/u.
- 3.- Hidratar en alcoholes graduales 100%, 95 % y 70%, cinco minutos c/u.
- 4.- Sumergir en PBS 1 X, dos cambios cinco minutos c/u.

Nota: No permita que los cortes se sequen.

II.- PROTOCOLO DEL KIT

- 1.- Sumergir las muestras en PBS 1 X diez minutos a temperatura ambiente.
* *Secar cuidadosamente alrededor de la muestra.*
- 2.- Cubrir con 50 μ L/muestra de solución de proteinasa K, incubar de 15 a 30 minutos. a 37°C.
- 3.- Lavar dos veces en agua desionizada dos minutos c/u.
- 4.- Sumergir las muestras en solución bloqueadora por cinco minutos (*no más*) a temperatura ambiente.
- 5.- Lavar las muestras en PBS 1 X, un minuto.
- 6.- Sumergir en Buffer TDT 1 X, cinco minutos.
- 7.- Cubrir la muestra con 50 μ L de mezcla de reacción de marcaje e incubar de 30 a 60 minutos. a 37°C en cámara húmeda.
- 8.- Sumergir en Buffer Stop TDT 1 X, cinco minutos a temperatura ambiente.
- 9.- Lavar dos veces en PBS 1X dos minutos c/u a temperatura ambiente.
- 10.- Cubrir la muestra con 50 μ L de solución Strep-HRP e incubar 10 minutos. 37 °C
- 11.- Lavar dos veces en PBS 1X dos minutos c/u.
- 12.- Sumergir en solución de DAB de dos a siete minutos.
- 13.- Lavar en varios cambios de agua desionizada dos minutos c/u.

III.- CONTRATINCIÓN:

- 1.- Sumergir las muestras en agua desionizada por dos minutos.
- 2.- Sumergir las muestras de cinco segundos a cinco minutos en verde de metilo.
- 3.- Lavar las muestras subsecuentemente sumergiéndolas 10 veces en cada uno:
 - Agua desionizada.
 - Etanol 70 %, 2 cambios.
 - Etanol 95 %, 2 cambios.
 - Etanol 100 %, 2 cambios.
 - Xilol 2 cambios.
- 4.- Limpie el exceso de xilol
- 5.- Montar y almacenar en oscuridad.
6. Observar al microscopio de luz.

BIBLIOGRAFIA

Ahmad, S., Kitchin, K.T. and Cullen W.R. Arsenic species that cause release of iron ferritin and generation of activated oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 382: 195-202.

Anawar, H.M., Akai, J., Mostofa, K.M., Safiullah, S. and Tareq, S.M. Arsenic poisoning in groundwater: health risk and geochemical sources in Bangladesh. *Environ. Int.* 2002; 27: 597-604.

Aposhian, H.V. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997; 37: 397-419.

Aposhian, H.V., Maiorino, R.M., Dart, R.C., Perry, D.F. Urinary excretion of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid in human subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1989 ;45; 5: 520-526.

Aylward, R. L. and Totterdell, S. Neurons in the ventral subiculum amygdala and entorhinal cortex which project to the nucleus accumbens: Their input from somatostatin-immunoreactive boutons. *J. Chem. Neuroanat.* 1993; 6: 31-42.

Bancroft, J.D., and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone. Edinburgh, London, Melbourne and New York. Second Edition. 1982. pp 109 -114, 180 – 190 and 217-223.

Bencko, V. and Simon, K. Test of environmental exposure to arsenic and hearing changes in exposed children. *Environ. Health Perspect.* 1997; 19: 95-101.

Bottiglieri, T., Laundry, M., Crellin, R., Toone, B. K., Carney, M. W. P., and Reynolds, E.H. Homocysteine, folate, methylation and monoamine metabolism in depression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2000; 69: 228-232.

- Brog, J.S.**, Salyapongse, A., Deutch, A.Y. and Zahm, D.S. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J. Comp. Neurol.* 1993; 338: 255-278.
- Brostoff, S.** and Eylar, E.H. Localization of methylated arginine in the A1 protein from myelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1971; 68: 765-769.
- Brudzynski, S.M.** and Gibson, C.J. Release of dopamine in the nucleus accumbens caused by stimulation of the subiculum in freely moving rats. *Brain Res. Bull.* 1997; 42: 303 - 308.
- Buchet, J.P.**, Lauwerys, R., Roels, H. Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate, or dimethylarsonate in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1981; 48: 71-79.
- Calderón, J.**, Navarro M.E., Santos M.A., Jiménez-Capdeville M.E., Golden A., Borja V. and Díaz-Barriga F. Exposure to Arsenic and Lead and Neuropsychological Development in Mexican Children. *Environ. Res.* 2001; 85: 69-76.
- Chattopadhyay, S.**, Bhaumik, S., Nag Chaudhury, A. and Das Grupa, S. Arsenic induced changes in growth development and apoptosis in neonatal and adult brain cells in vivo and in tissue culture. *Toxicol. Lett.* 2002 a; 128: 73-84.
- Chattopadhyay, S.**, Bhaumik, S., Purkayastha, M., Basu, S., Nag Chaudhuri, A., & Das Grupa, S. Apoptosis and necrosis in developing brain cells due to arsenic toxicity and protection with antioxidants. *Toxicol. Lett.* 2002b; 136: 65-76.
- Chen, H.**, Li, S., Liu, J., B.A., Barret, J.C. and Waalkes, M.P. Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypomethylation: implication for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2004; 25: 1779-1786.
- Clarke, S.** And Barfield, K. S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases. (2001) In *Homocysteine in health and disease.* Carmel, R., Jacobsen, D.W. Eds, pp 63-78. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Clarkson, T.W.** Metal toxicity in the central nervous system. *Environ. Health Perspect.* 1987; 75: 59-64.

Da Cunha, C., Wietzikoski, S., Wietzikoski, E.C., Miyoshi, E., Ferro, M. M., Anselmo-Franci, J. A. and Canteras, N.S. Evidence for the substantia nigra pars compact as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. *Neurobiol. Learn Mem.* 2003; 79 (3):236-42 .

Dabrowska-Bouta, G., Sulkowski, L., Struzynska, U. and Rafalowska. CNPase activity in myelin from adult rat brains after prolonged lead exposure in vivo. *Chem Biol Interact.* 2004; 150: 171-178.

Dahlström, A. and Fuxe, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Determination of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62 (Suppl: 232); 1964: 1-55.

De la Fuente, H., Portales-Pérez, D., Baranda, L., Díaz-Barriga, F., Saavedra-Alanis, V., Layseca, E., & González-Amaro, R. Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* 2002; 129: 69-77.

DeFrance, J.F., Marchand, J.E., Stanley, J.C. Sikes, R.W., Chronister, R.B. Convergence of excitatory amygdaloid and hippocampal input in the nucleus accumbens septi. *Brain Res.* 1980; 185: 183-186.

Del Razo, L.M., Garcia-Vargas, G.G., Garcia-Salcedo, J., Sanmiguel, M.F., Rivera, M., Hernández, M.C. and Cebrian, M.E. Arsenic levels in clogged food and assessment of adult dietary intake of arsenic in the Region Lagunera, México. *Food Chem. Toxicol.* 2002; 40: 1423-1431.

Delgado, J.M., Dufour, L., Grimaldo, J.L., Carrizales, L., Rodríguez, V.M., and Jiménez-Capdeville, M.E. Effects of arsenite on central monoamines and plasmatic levels of adenocorticotropic hormone (ACTH) in mice. *Toxicol. Lett.* 2000; 117: 61-67.

Delnomdedieu, M., Basti, M.M, Otros, J.D, Thomas, D.J. Reduction and binding of arsenate and dimethylarsenate by glutathione: multinuclear magnetic resonance study . *Chem. Biol. Interact.* 1994; 90: 139-155.

Deng, W. And Poretz, R.D. Lead exposure affects levels of galactolipid metabolic enzymes in the developing rat brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001; 172 (2): 98-107.

- Edmonds, J.S.**, Francesconi, K.A. Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia*. 1987; 43: 553-557.
- El Massiouï, N.**, Ouary, S., Hantraye, P., Brouillet E. Perseverative behavior underlying attentional set-shifting deficits in rats chronically treated with the neurotoxin 3-nitropropionic acid. *Exp. Neurol.* 2001; 172 (1): 172-182.
- Foa, V.**, Colombi, A., Maroni, M., Buratti, M. and Calzaferri, G. The speciation of the chemical forms of arsenic in the biological monitoring of exposure to inorganic arsenic. *Sci. Total Environ.* 1984; 34: 241-259.
- Frisbie, S.H.**, Ortega, R., Maynard, D.M. and Sarkar, B. The concentrations of arsenic and other toxic elements in Bangladesh's drinking water. *Environ. Health Perspect.* 2002;110: 1147-1153.
- García Chavez, E.**, Santamaria, A., Díaz Barriga, F., Mandeville, P., Juárez, B.I. and Jiménez-Capdeville, M.E. Arsenite-induced formation of hydroxyl radical in the striatum of awake rats. *Brain Res* 2003; 976: 82-89.
- Garret, E.**, Alexander and Michael D. Crutcher. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *TINS*. 1990; 266-271.
-
- Gerfen, C.R.** The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output system. *Nature* 1984; 311: 461-464.
- Gerfen, C.R.** The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science* 1989; 246: 385-8.
- Gerr, F.**, Letz., Ryan P.B. and Green R.C. Neurological effects of environmental exposure to arsenic in dust and soil among humans. *Neurotoxicology*. 2000; 21: 475-87.
- Goebel, H.H.**, Schmidt, P.F., Bohl, J., Tettenborn, B., Kramer, G. and Gutmann, L. Polyneuropathy due to acute arsenic intoxication: Biopsy studies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1990; 49: 137-149.
- Goyer, R.A.** Toxic effects of metals. In: Doull, J., Klaassen, C.D. and Amdur, M.O., Eds. *Toxicology*. New York: *Pergamon Press*, 1991: 623-679.

Graveland, G.A. and DiFigilia, M. The frequency and distribution of medium- sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res.* 1985; 327.

Graybiel, A.M. and Moratalla, R. Dopamine uptake sites in the striatum are distributed differentially in striosome and matrix compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1989; 86: 9020- 9024.

Graybiel, A.M. Compartmental organization of the mammalian striatum. *Prog. Brain Res.* 1983; 58: 247-256.

Gridley, M.F., 1960. Manual of Histology and Special Staining Techniques. McGrawHill, New York, 2nd Edition.

Heimer, L. and Wilson, R.D. 1975. The subcortical projections of the allocortex: similarities in the neural associations of the hippocampus, the piriform cortex, and the neocortex. In Golgi Centennial Symposium: Perspectives in Neurobiology. M. Santini, Ed: 177-193. *Raven Press. New York.*

Heimer, L., Zahm, D.S. and Alheid, G.F. Basal ganglia. In: Paxinos G, Ed. The rat nervous system. *San Diego, USA: Academic Press, 1995: 579-628.*

Heymann, A., Pfeiffer, J.B., Willet, R.W. and Tylor, H.M., Peripheral neuropathy caused by arsenical intoxication: A study of 41 cases with observation on the effects of BAL (2,3 dimercapto-propanol), *New Engl. J. Med.* 1956; 254: 401-409.

Hughes, M.F. Arsenic toxicity and potencial mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 2002; 133: 1-16.

Hughes, M.F., Kenyon, E.M., Edwards, B.C., Mitchell, C.T. and Thomas, D.J., Strain – dependent disposition of inorganic arsenic in the mouse. *Toxicology.* 1999; 137: 95-108.

Hughes, M.F., Menache, M. and Thompson, D.J., Dose-dependent disposition of sodium arsenate in mice following acute oral exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1994; 22: 80-89.

- Ito, S. and Karnovsky, M. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative containing trinitro compounds. *J. Cell. Biol.* 1968; 39: 168 – 170.
- Itoh, T., Zhang, Y.F., Murai, S., Saito, H., Nagahama, H., Miyate, H., Saito, Y., and Abe, E. The effects of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice. *Toxicol. Lett.* 1990; 54: 345-353.
- Kannan, G.M., Tripathi, N., Dube, S.N., Gupta, M., and Flora, S.J., Toxic effects of arsenic (III) on some hematopoietic and central nervous system variables in rats and guinea pigs. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2001; 39: 675-682.
- Klaassen, C.D. Heavy metals and Heavy-metals antagonist. In: Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S. and Taylor, P, Eds. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 1996: 1592-1614.
- Klüver, H. And Barrera, E. A. A method for the combined staining of cell and fibers in the nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1953; 12: 400-403.
- Lee, C.C., Surtees, R. and Duchon, L.W., Distal motor axonopathy and central nervous system myelin vacuolation caused by cycloleucine, an inhibitor of methionine adenosyltransferase. *Brain.* 1992; 115: 935-955.
-
- Li, W. And Chou, I.N. Effects of sodium arsenite on the cytoskeleton and cellular glutathione levels in cultured cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992; 114 (1): 132-139.
- Lin, S., Shi, Q., Nix, B., Styblo, M., Beck, M., Herbin-Davis, K.M, Hall, L.L., Simeonsson, J.B. and Thomas, D.J. A Novel S-adenosyl-L-methionine: arsenic (III) methyltransferase from rat liver. *Cytosol. J. Biol. Chem.* 2002, 277:10795-10803.
- Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J.M., Mukhopadhyay, R., Agre, P. and Rosen, B. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2002; 99: 6053-6058.
- Marafante, E., and Vahter, M. The effect of dietary and chemically induced methylation deficiency on the metabolism of arsenate in the rabbit. *Acta Pharmacol. Toxicol.* (Copenh.). 1986; 59 (Suppl 7), 35-38.

- Marin, O.,** Smeets, W.J and Gonzalez, A. Evolution of the basal ganglia in tetrapods: a new perspective based on recent studies in amphibians. *Trends. Neurosci.* 1998; 21: 487-494.
- Mass, M.J.,** Tennant, A., Roop, B.C., Cullen, W.R., Styblo, M., Thomas, D.J. and Kligerman, A.D. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem. Res. Toxicol.* 2001; 14: 355-361.
- Meck, W.H.,** and Williams, C.L. Metabolic imprinting of choline by its availability during gestation: Implications for memory and attentional processing across the lifespan. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2003; 27: 385-399.
- Meeker, D.,** Kim, J.H. and Vezina, P. Depletion of dopamine in the nucleus accumbens prevents the generation of locomotion by metabotropic glutamate receptor activation. *Brain Res.* 1998; 812: 260 – 264.
- Mejia, J.J.,** Díaz-Barriga, F., Calderon, J., Rios, C., and Jiménez-Capdeville, M.E. Effects of lead-arsenic combined exposure on central monoaminergic system. *Neurotoxicol. Teratol.* 1997; 19: 489-497.
- Moore, M.M.,** Harrington-Brock, K. and Doerr, C.L. Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites. *Mutat. Res.* 1997; 386: 279-290.
-
- Nagaraja, T.N.,** and Desiraju, T. Effects on operant learning and brain acetylcholine esterase activity in rats following chronic inorganic arsenic intake. *Hum. Exp. Toxicol.* 1994; 13: 353-356.
- Nagaraja, T.N.,** and Desiraju, T. Regional alterations in the levels of brain biogenic amines, glutamate, GABA, and GAD activity due to chronic consumption of inorganic arsenic in developing and adult rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1993; 50: 100-107.
- Namgung, U** and Xia, Z. Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-Jun-N-Terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.* 2000; 20: 6442-6451.
- Naqvi, S.M.,** Vaishnavi, C. and Singh, H. Toxicity and metabolism of arsenic in vertebrates. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Arsenic in the Environment Part 2.* Wiley, New York. 1994: 143-157.

- Nauta, W.J.**, Smith, G.P., Faull, R.L. and Domesick, V.B. Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience* 1978; 3: 385 – 401.
- Niculescu, M.D.**, and Zeisel, S.H. Diet, methyl donors and DNA methylation: Interactions between dietary folate, methionine and choline. *J. Nutr.* 2002; 132: 2333S – 2335S.
- Oades, R.D.** and Halliday, G.M. Ventral tegmental (A10) system: Neurobiology. I. Anatomy and connectivity. *Brain Res. Rev.* 12; 1987: 117-165.
- Odanaka, Y.**, Mtano, O. and Goto, S. Biomethylation of organic arsenic by the rat and some laboratory animals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1980; 24: 452-459.
- Parent, A.** and Hazrati, L.N. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia- thalamo- cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 1995; 20: 91-127.
- Paxinos, G.**, and Watson, C. (2004). The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, New York.
- Petrick, J.S.**, Ayala-Fierro, F., Cullen, W.R., Carter, D.E., Vasken, and Aposhian, H., 2000. Monomethylarsonous acid (MMN (III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2000; 163: 203-207.
- Pothuizen, H.H.**, Zhang, W.N., Jongen-Relo, A.L., Feldon, J. and Yee, B.K. Dissociation of function between the dorsal and ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subjects, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 19 (3): 705-712.
- Pryor, G.T.**, Uyeno, E.T., Tilson, H.A., and Mitchell, C.L., Assessment of chemical using a battery of neurobehavioral tests: A comparative study. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 1983; 5: 91-117.
- Rahman, L.**, Corns, W.T., Bryce, P. and Stockwell, P. Determination of mercury, Selenium, Bismuth, arsenic and antimony in human hair by microwave digestion atomic Fluorescence Spectrometry. *Talanta.* 2000; 52: 833-843.

- Richardson, K.C.**, Jarret, E.H. and Finke, E.H. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.* 35; 1960: 313-325.
- Rodríguez, V.M.**, Carrizales, L., Jiménez-Capdeville, M.E., Dufour, L., and Giordano, M. The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat. *Brain Res. Bull.* 2001; 55: 301-308.
- Rodríguez, V.M.**, Del Razo, L.M., Limon-Pacheco, J.H., Giordano, M., Sánchez-Peña, L.C., Uribe-Querol, E., Gutiérrez-Ospina, G. and Gonsebatt, M.E. Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicol. Sci.* 2004; 00: 1-10.
- Rodríguez, V.M.**, Carrizales, L. Mendoza, M.S., Fajardo, O.R., and Giordano, M. Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 2002; 24: 743-750.
- Schäfer, S.G.**, Dawes, R.L.F., Elsenhan, B., Forth, W. and Schümann, K. Metals. In: Marquardt, H., Schäfer, S.G., McClellan, R.O. (Eds.), *Toxicology*. Academic Press, San Diego, CA. 1999: 755-790.
- Schmidt, W.J.** and Kretschmer, B.D. Behavioral pharmacology of glutamate receptors in the basal ganglia. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997; 21: 381 – 392.
-
- Schmitz, G.G.**, Walter, T. Seibl, R. and Kessler, C. Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.* 1991; 192: 222 – 23
- Schoolmeester, W.L.** and White, D.R. Arsenic poisoning. *South Med. J.* 1980; 73: 198-208.
- Scott, N.**, Hattelid, K.M., MacKenzie, N.E. and Carter, D.E. Reaction of arsenic (III) and arsenic (V) species with glutathione. *Chem. Res. Toxicol.* 1993, 6:102-106.
- Sesack S.R.** and Pickel V.M., In the rat medial nucleus accumbens, hippocamal and catecholaminergic terminals converge on spiny neurons and are in apposition to each other. *Brain Res.* 1990; 527: 266-279.
- Simeonova, P.P.**, Wang, S., Toriuma, W., Kommineni, V., Matheson, J., Unimye, N., Kayama, F., Harki, D., Ding, M., Vallyathan, V. and Luster, M.I. Arsenic mediates

cell proliferation and gene expression in the bladder epithelium: association with activating protein-1 transactivation. *Cancer Res.* 2000; 60: 3445-3453.

Small, D.H., Carnegie, P.R. and Anderson, R.M. Cycloleucine-induced vacuolation of myelin is associated with inhibition of protein methylation. *Neurosci. Lett.* 1981; 21: 287-292.

Spiegelstein, O., Lu, X., Le, X.C., Troen, A., Selhub, J., Melnik, S., James, J.S. and Finnell, R.H. Effects of dietary folate intake and folate binding protein- 1 (Folbp1) on urinary speciation of sodium arsenate in mice. *Toxicol. Lett.* 2003; 145: 167-174.

Squire, L.R. and Knowlton, B.J. Learning about categories in the absence of memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 12470-4.

Squire L.R., Bloom F.E., McConnell S.K., Roberts J.L., Spiter N.C. and Zigmond M.J. (Eds) Fundamental Neuroscience. Cap. 31 The Basal Ganglia. *Academic Press*, San Diego 2003, pp 815-840

Stewart, C.A. and Morris, R.G.M. The watermaze. in *Behavioural Neuroscience, Volume I, A Practical Approach* (ed. Sahgal, A.) 107–122 (IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1993).

Thomas, D.J. Styblo, M. and Shan, L. Cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001; 176: 127-144.

Tice, R.R., Yager, J.W., Andrews, P. and Crecelius, E. Effect of hepatic methyl donor status on urinary excretion and DNA damage in B6C3F1 mice treated with sodium arsenite. *Mutat. Res.* 1997; 386: 315-334.

Tripathi, N., Kannan, G.M., Pant, B.P., Jaiswal, D.K., Malhotra, P.R., and Flora, S.J. Arsenic-induced changes in certain neurotransmitter levels and their recoveries following chelation in rat whole brain. *Toxicol. Lett.* 1997; 92: 201-208.

Tsai, S.Y. , Chou, H.Y., The, H.W., Chen C.M. and Chen C.J. The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence. *Neurotoxicology.* 2003; 24: 747-53.

Vahter, M. and Marafante, E., 1985. Reduction and binding of arsenate in marmoset monkeys. *Arch. Toxicol.* 1985; 57: 119-124.

Vahter, M. and Norin, H. Metabolism of 74 As-labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. *Environ. Res.* 1980; 21: 446-457.

Vahter, M. Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats. *Environ. Res.* 1981; 25: 286-293.

Vahter, M. Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Sci. Prog.* 1999; 82: 69-88.

Vahter, M., and Marafante, E. Effects of low dietary intake of methionine, choline or proteins on the biotransformation of arsenite in the rabbit. *Toxicol. Lett.* 1987; 37: 41-46.

Valkonen, S., Savolainen, H. and Jarvisalo, J. Arsenic distribution and neurochemical effects in per oral sodium arsenite exposure of rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1983; 30: 303-308.

Vannucci, S.J., Maher, F. and Simpson, I.A. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia, *Glia.* 1997; 21: 2-21.

Wasserman, G.A., Liu, X., Parvez, F., Ahsan, H., Factor-Litvak, P., VanGreen, A., Slavkovich, V., Lolacono, N.J., Cheng, Z., Hussain, I., Momotaj, H., and Graziano, J.H. Water arsenic exposure and children's intellectual function in Araihasar, Bangladesh. *Environ. Health Perspect.* 2004; 112: 1329-1333.

Wu, W.W., Chiou, H.Y., Ho, I.C., Chen, C.J. and Lee, T.C. Gene expression of inflammatory molecules in circulating lymphocytes from arsenic- exposed human subjects. *Environ. Health Perspect.* 2003; 111:1429-1438.

Yamauchi, H. and Fowler, B.A. Toxicity and metabolism of inorganic and methylated arsenicals. In: Nriagu, I.O. (Ed.), Arsenic in the Environment. II. Human Health and Ecosystem Effects. Wiley, New York. 1994: 34-43.

Yamauchi, H., Takahashi, K., Mashiko, M., Saitoh, J. and Yamamura, Y. Intake of different chemical species of dietary arsenic by Japanese, and their blood and urinary arsenic level. *Appl. Organomet. Chem.* 1992; 6: 383-388.

- Yip, S.F.,** Yeung, Y.M., and Tsui, E. Y.K. Severe neurotoxicity following arsenic Therapy for acute promyelocytic leukemia: potentiation by thiamine deficiency. *Blood*. 2002; 99: 3481-3482.
- Yoshida, K.,** Inoue, Y., Kuroda, K.H., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Endo, G. Urinary excretion of arsenic metabolites after long-term oral administration of various arsenic compounds to rats. *J. Toxicol. Environ. Health*. 1998; 54: 179-192.
- Zaborszky, L.,** Alheid, G.F., Beinfeld, M.C., Eiden, L.E., Heimer, L and Palkovits, M. Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience* 1985; 14: 427 – 453.
- Zakharyan, R.,** Wildfang, E. and Aposhian, H.V. Enzymatic methylation of arsenic compounds. III. The marmoset and tamarin, but not the rhesus, monkeys are deficient in methyltransferases that methylate inorganic arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996; 140: 77-84.
- Zakharyan, R.,** Wu, Y., Bogdan, G.M. and Aposhian, H.V. Enzymatic methylation of arsenic compounds: assay, partial purification, and properties of arsenite methyltransferase and monomethylarsonic acid methyltransferase of rabbit liver. *Chem. Res. Toxicol.* 1995; 8: 1029-1038.
-
- Zeisel, S.H.,** and Blusztajn, J.K. Choline and human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 1994; 14: 269-296.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

MARTHA EUGENIA SANTOYO PÉREZ

Candidata para el grado de
Doctor en Ciencias con orientación en Morfología

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

Área de estudio: Morfología

Biografía:

Datos personales: Nacida en San Luis Potosí S.L.P. México El 19 de enero de 1956. Hija del ganadero de reses bravas Salvador Santoyo Morales y María Dolores Pérez Lamas.

Estado Civil. Casada.

Nombre de mi esposo. Lic. Lino Agundis Rodríguez.

Nombre de mi hija. Martha Eugenia Agundis Santoyo.

Escolaridad:

Los estudios de primaria, secundaria y preparatoria fueron realizados en el Instituto Hispano Inglés. Obtuvo el grado de **Químico Farmacobiólogo**, en Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP, con la tesis titulada " **Química y metabolismo de carbohidratos**" en 1979. El grado de **Maestría en Ciencias** con especialidad en Morfología, en la Facultad de Medicina de la UANL con la tesis titulada " **Efectos de la peroxisomicina A1 sobre el hígado de ratón tratado con clofibrato**" en el 2002.

Experiencia Profesional. Realizó el servicio social en el laboratorio farmacéutico "Codex, en el área de control de calidad. Desde 1981 hasta la fecha adscrita a la planta del personal docente de la Facultad de Medicina de la UASLP, en el departamento de **Ciencias Morfológicas**; impartiendo la materia de " **Histología y su laboratorio**" a los alumnos de pregrado de la licenciatura de MCP, desde 1986.y hasta la fecha. A partir del 2002, y hasta la fecha, profesor

adjunto en curso de **“Embriología y su laboratorio”** esta materia se imparte a los alumnos de pregrado de la licenciatura de MCP.

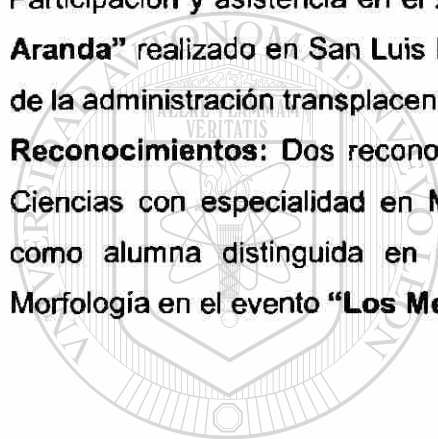
Participación y asistencia en el congreso **“International Symposim on Morphological Sciences”** realizado en Timisoara, Romania, en el 2002 con el trabajo titulado **“Clofibrate pretreatment protects against liver damage caused by peroxisomicine A1”** (plant toxin t-514)

Participación y asistencia en el congreso internacional **“The American Society for Cell Biology”** realizado en San Francisco Cal., en el 2003 con el trabajo titulado **“Clofibrate Protects Liver Damage Caused by Peroxisomicina A1”**

Participación y asistencia al **“First International Congreso of Histology and Tissue Engineering”** celebrado en Alcalá de Henares, Madrid, España en el 2005, con el trabajo titulado **“Morphological Alterations in the Rat Brain Associated to Subchronic Arsenic Exposure”** este trabajo obtuvo un premio a la **“Mejor Comunicación en Poster”**.

Participación y asistencia en el **XXI Congreso Nacional de Anatomía “ Dr. Abundio Estrada Aranda”** realizado en San Luis Potosí, en el 2006 con el trabajo titulado **“ Evaluación del efecto de la administración transplacentaria y postnatal de arsénico sobre el cuerpo estriado de la rata”**

Reconocimientos: Dos reconocimientos como **mejor alumna** del posgrado de Maestría en Ciencias con especialidad en Morfología en el periodo **1998-2000**. Reconocimiento Nacional como alumna distinguida en el posgrado de Maestría en Ciencias con especialidad en Morfología en el evento **“Los Mejores Estudiantes de México”** en el año 2002.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BOARD OF OFFICIAL MEMBERS AND DELEGATES OF THE
INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYMPOSIA OF MORPHOLOGICAL SCIENCES
(ICSMS)

ROMANIAN COLLEGIUM OF PHYSICIANS (CMR) ROMANIAN SOCIETY OF ANATOMISTS (RSA)
UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY "VICTOR BABES" TIMIȘOARA

ICSMS

MEMBERS

- Liberato J.A. Di Dio (Brazil)
- Tsunoo Fujita (Japan)
- Pietro M. Manzoni (Italy)
- José Antonio Esperanza-Pina (Portugal)
- Christo Chouckov (Belgium)
- Rolando Cruz-Gutiérrez (Costa Rica)
- Astolze Dierckx (Belgium)
- Chrysal Fournis-Keravani (Greece)
- Salvador Gómez Álvarez (Mexico)
- George Grigson (France)
- Bonacie Kravtsov (South Africa)
- Keith L. Moore (Canada)
- Mauricio Niculescu (Brazil)
- Virgiliu Niculescu (Romania)
- Domingo Ramos Gil (Spain)
- Xue Shepu (China)
- Gordana Tadićević Parajdić (Yugoslavia)

CERTIFICATE OF PARTICIPATION 286

We hereby certify that

Martha Eugenia SANTOYO PÉREZ

attended the

International Symposium
on Morphological Sciences
held on September 11 - 15, 2002; Timișoara, Romania

XVII

DELEGATES

- Oladapo A. Ashiru (Nigeria)
- Stavros Branner Thomas (UK)
- Édouard Hluka (Czech Republic)
- Levi Kolesnikov (Russia)
- Wolfgang Kullat (Germany)
- Donatila Lazarov (Macedonia)
- Ricardo J. Lasarido (Argentina)
- David J. Lave Guercia (Paraguay)
- Guido Marchionelli (Italy)
- Petru L. Matusz (Romania)
- José H. Meléndez (South Africa)
- İsmet Öbaç (Turkey)
- Imre Attila (Hungary)
- Yasuo Uchiyama (Japan)
- Yong-Chuan Wang (Hong Kong)
- Witold S. Wasiński (Poland)
- Quo-an Xu (China)
- Robert D. Yates (USA)

The Romanian Collegium of Physicians (CMR) credited the XVII ISMS 2002 with 75 hours of Permanent Medical Education (75 EMC) (proceeding from CMR 2513/12.07.2002)

Virgiliu Niculescu
Virgiliu Niculescu
President of XVII ISMS
Honorary President of RSA

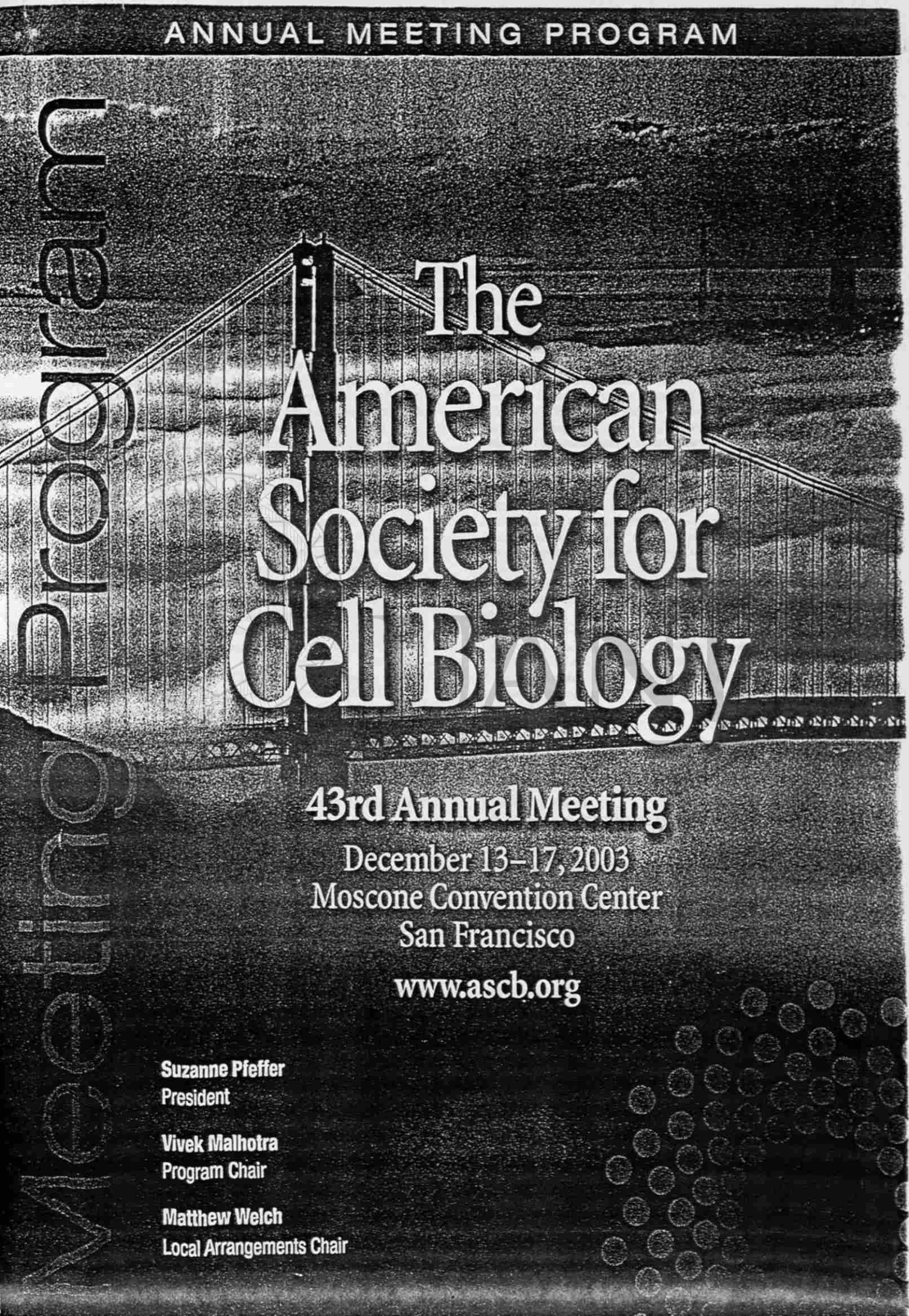
Liberato J.A. Di Dio
Liberato J.A. Di Dio
President ICSMS

Doru Bordoș
Doru Bordoș
President of the Collegium of Physicians
Timiș County

Petru L. Matusz
Petru L. Matusz
Scientific Secretary of XVII ISMS
General Secretary of RSA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





The
American
Society for
Cell Biology

43rd Annual Meeting

December 13–17, 2003

Moscone Convention Center

San Francisco

www.ascb.org

Suzanne Pfeffer
President

Vivek Malhotra
Program Chair

Matthew Welch
Local Arrangements Chair

ASCB 2003 Late Abstracts

Analysis of Neu5Gc content in common foods shows that Neu5Gc is rare in poultry and fish, common in milk products, and enriched in red meats. In addition, normal humans were shown to have variable amounts of circulating IgA, IgM, and IgG antibodies against Neu5Gc, with the highest levels comparable to the high titer anti- α -galactose xenoreactive antibodies. This is the first known example wherein humans absorb and incorporate a non-human dietary component enriched in foods of mammalian origin while generating xenoreactive, and potentially autoreactive antibodies against the same molecule. Thus, the potential consequences of the incorporation of this immunoreactive molecule pertaining to human disease should be investigated.

L380

Clofibrate Protects Liver Damage Caused by Peroxisomycin A-1

J. Sepulveda-Saavedra,¹ M. Santoyo-Perez,¹ M. Moreno-Smith^{1, 2}; ¹ Histología, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico, ² Ciencias Morfológicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico, ³ Farmacología y Toxicología, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico
Toxin T-514 is one of the toxic products extracted from plants of genus *karwinskia*. Accidental ingestion of these fruits cause neuropathy both in animals and humans. Experimental animals intoxicated with T-414 present severe liver, lung and kidney damage. Morphometric studies have shown that in the liver of intoxicated mice, rats and monkeys there is a diminution of peroxisomal number. In methylotrophic yeast T-514 cause irreversible damage to the peroxisomal membrane, thus T-514 was renamed peroxisomycin A1 (PA1). Clofibrate is a hypolipidemic drug and induces peroxisomal proliferation in the liver of rodents. Recently, it has been reported that clofibrate protects the liver against damage by a variety of chemical agents. Thus we considered of interest to investigate if clofibrate might have the same effect in the intoxication caused by PA1. After pre-treatment for 10 days with clofibrate, mice received a single i.p. dose of PA1. Control groups received separately only vehicle pre-treatment and PA1 or only vehicle. Histological and ultrastructural evaluation of the liver was performed as well as the evaluation of catalase activity in liver homogenates. In serum aspartate and aminotransferase activity was determined. The control group of Clofibrate pretreatment only, induced peroxisomal proliferation; whereas animals treated with PA1 only, showed abundant lipid deposits, autophagic bodies and preapoptotic changes in mitochondria and apoptotic bodies. Clofibrate pretreatment diminished lipid deposition and cytotoxic effects. There is a 50% reduction of the cytolytic effects indicated by aminotransferases serum levels. However, clofibrate does not protect the liver against apoptosis since it is also present in animals pre-treated with this compound. These results indicate that PA1 causes apoptosis and cytotoxic effect by different pathways.

L381

Dietary Modulation of Enterocyte Redox Potential

W. L. Diehl-Jones,¹ J. Friel,² D. A. Askin,³ V. Shirwardkar,² P. Appah²; ¹ Faculty of Nursing and Department of Zoology, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada, ² Department of Human Nutritional Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada, ³ Faculty of Nursing and Department of Pediatrics, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada
Intracellular redox potential is a key regulator of cell function. The intestinal epithelium is subject to free radical injury from both luminal and systemic sources. We investigated the effects of dietary supplements commonly added to infant formulas on oxidative stress in both human breast milk and in two enterocyte cell lines: Caco-2BBE, a human colonic cancer line, and FHS 74 Int, a primary infant small intestine culture. Iron and vitamin supplementation of human breast milk induced formation of hydroperoxides in milk, as measured by the FOX and TBARS assays, and caused complementary changes in dienes, an intermediate lipid peroxidation product. Co-incubation with iron and vitamin C had a synergistic effect on hydroperoxide formation in milk. These effects were abolished by the addition of exogenous superoxide dismutase. Iron and vitamin supplements also induced oxidative stress in both cell lines, as measured by the free radical probe CM-H2DCFDA. Immunocytochemistry with a monoclonal antibody to 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, an oxidized nucleotide commonly used as a marker of oxidative stress, revealed significant DNA damage in enterocytes. Our results indicate that iron and vitamin supplementation,

while necessary for optimal growth of the premature infant, can increase oxidative stress in cultured enterocytes, which may in turn contribute in vivo to inflammatory processes affecting the newborn, such as necrotizing enterocolitis. Our data also illustrate differences in the antioxidant potential of the extracellular (milk) matrix versus the cytoplasmic matrix.

L382

Embryonic pulmonary vascular development is regulated by balanced expression of VEGF receptors, Flk-1 and Flt-1

Y. Yamamoto,¹ I. Shiraishi,² K. Hamaoka,² T. Takamatsu¹; ¹ Department of Pathology and Cell Regulation I, Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto, Japan, ² Department of Pediatric Cardiology and Nephrology 2, Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto, Japan

Backgrounds: A VEGF receptor Flk-1 promotes development of vascular endothelial cells while another receptor Flt-1 inhibits it as a "decoy". It is uncertain how VEGF-Flk-1 and VEGF-Flt-1 signals play a role during development of embryonic pulmonary vasculature. **Methods:** Embryonic mouse lungs (E9.5-E18.5) were stained with PECAM-1, VEGF, Flk-1, and Flt-1 antibodies. Cell proliferation was studied by using BrdU. Fetal lung explants (E11.5) were treated with antisense oligonucleotides complementary to Flk-1 or Flt-1 mRNA. **Results:** The developmental stages of pulmonary vasculature are, stage I: initial pulmonary vasculogenesis, stage II: formation of pulmonary vascular networks, stage III: pulmonary vascular remodeling, stage IV: formation of alveolar system. At stage I, Flk-1-positive vascular endothelial progenitor cells appeared. At stage II, PECAM-1-positive vascular endothelial cells appeared and encircled VEGF-positive bronchial epithelial cells. After stage III, a small number of Flt-1-positive endothelial cells appeared. Vascular endothelial cells actively proliferated during stages I and II but less active after stage III in spite of abundant VEGF expression. Inhibition of Flk-1 by antisense oligonucleotides impaired vascular intensity and branching, while inhibition of Flt-1 increased endothelial cell remodeling. **Conclusion:** Embryonic pulmonary vascular endothelial cells develop in association with bronchial and pulmonary epithelial cells via VEGF signal. Pulmonary vasculogenesis is regulated by VEGF-Flk-1 signal, while pulmonary angiogenesis is regulated by balance of VEGF-Flk-1 and VEGF-Flt-1 signals.

L383

Adenosine A₃ Receptors on Human Eosinophils are Positively Coupled to Adenylyl Cyclase

C. I. Ezeamuzie, E. Philips, Dept of Pharmacology, Kuwait University, Kuwait City, Kuwait
The adenosine A₃ receptors are believed to be negatively coupled to adenylyl cyclase (AC) in most systems but their reported mediation of anti-inflammatory effect in human eosinophils prompted us to investigate their coupling to AC in these cells. The A₃ receptor agonists N⁶-(3-indobenzyl)-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (IB-MECA) and chloro-IB-MECA caused a concentration-dependent generation of intracellular cAMP. Adenosine and the A_{2A} receptor agonists 2-[[[4-(2-carboxyethyl)phenyl]amino]-N-ethylcarboxamidoadenosine (CGS 21680), but not the A₁ agonist N-cyclopentyladenosine (CPA), were also effective. Both IB-MECA (EC₅₀ = 15.4 μ M) and Cl-IB-MECA (EC₅₀ = 1.8 μ M) were more potent than CGS 21680 (EC₅₀ = 15.4 μ M) and adenosine (EC₅₀ = 19.2 μ M). The effect of IB-MECA, but not CGS21680 or histamine, was significantly antagonized by the A₃-selective antagonist 9-chloro-2-(2-furyl)-5-phenylacetyl amino[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazoline (MRS 1220) (2.5 μ M) but not the A₁ and A₂ antagonists DMPX (2.5 μ M) and DPCPX (2.5 μ M), respectively. In all cases, the cAMP response was additive to that produced by forskolin (10 μ M). No inhibition of forskolin-induced cAMP response was seen at all concentrations of IB-MECA tested. The results show that in human eosinophils, A₃ receptors may be positively, rather than negatively, coupled to the AC system. This effect may represent the hitherto unknown mechanism of A₃-mediated anti-inflammatory effect in human eosinophils. *This work was supported by grant # MR 02/01 from Research Administration, Kuwait University.*



XIII Congreso Nacional de la Sociedad
Española de Histología e Ingeniería Tisular
*First International Congress of Histology and
Tissue Engineering*

14-17 de septiembre 2005

Universidad de Alcalá

S.E.H.I.T. 2005

CERTIFICADO DE ASISTENCIA

La Presidenta del XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de
*Histología e Ingeniería Tisular – First International Congress of Histology and
Tissue Engineering*

CERTIFICA QUE

D./Dña **Martha Eugenia SANTOYO**

ha asistido a este Congreso, celebrado en Alcalá de Henares, los días 14, 15,
16 y 17 de septiembre de 2005.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

En Alcalá de Henares, a 17 de Septiembre de 2005.

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dra. Julia Buján
Presidenta del Comité Organizador

Secretaria del Congreso.

Finda General de la Universidad de Alcalá
Departamento de Formación y Congresos
C/Alcalá, 13. 28014 Alcalá de Henares, Madrid
Tel: 91 8 9 74 30 Fax: 91 8 9 4 55
E-mail: seht@uclm.es www.seht2005.org.es



SEHIT

**XIII CONGRESO NACIONAL DE HISTOLOGIA E INGENIERIA TISULAR
FIRST INTERNATIONAL CONGRESS OF HISTOLOGY AND TISSUE
ENGINEERING**

Universidad
de Alcalá

Universidad de Alcalá

Alcalá de Henares (Madrid)

14 - 17 de Septiembre de 2005

CERTIFICADO DE COMUNICACIÓN

La comunicación

**“MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN THE RAT BRAIN ASSOCIATED TO
SUBCHRONIC ARSENIC EXPOSURE”**

cuyos autores/as son:

*Santoyo M.E., Sepúlveda-Saavedra J., Romero-Díaz V., Ceballos F., Delgado J.M.,
Martínez M.L., Juárez B.I., Ortiz M.D. y Jiménez M.E.*

ha sido presentada durante este congreso celebrado en Alcalá de Henares, entre los días 15 y 17 de Septiembre de 2005.

Prof. M. J. Gayoso
Presidente de la SEHIT

En Alcalá de Henares, a 14 de Septiembre de 2005

Prof. J. Buján
Presidenta del Congreso



SEHIT

**XIII CONGRESO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE HISTOLOGÍA E INGENIERÍA TISULAR
FIRST INTERNATIONAL CONGRESS OF HISTOLOGY
AND TISSUE ENGINEERING**



Universidad
de Alcalá

Alcalá de Henares

S.E.H.I.T.

2005

PREMIO A LA MEJOR COMUNICACIÓN POSTER

Sesión nº 2

"Proliferación y Muerte Celular"

**Santoyo ME, Sepúlveda-Savedra J, Romero Díaz V, Ceballos F,
Delgado JM, Martínez ML, Juárez BI, Ortiz MD, Jiménez ME.**

**"MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN THE RAT BRAIN ASSOCIATED TO SUBCHRONIC
ARSENIC EXPOSURE."**



Dra. J. Buján Varela
President
Organization Committee



Dr. M. Gayoso Rodríguez
President
S.E.H.I.T.

Dr. J. Rodrigo García
President
Scientific Committee



XXI CONGRESO NACIONAL DE ANATOMIA

“Dr. Abundio Estrada Aranda”

UANL

San Luis Potosí, S.L.P.

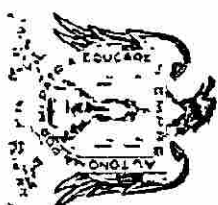
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
18, 19, 20 y 21 de octubre de 2006



EDITORIAL MEDICA
panamericana



SOCIEDAD MEXICANA DE ANATOMÍA A.C.
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

OTORGAN EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO A

M en C. MARTHA SANTOYO PEREZ, DR. JULIO SEPÚLVEDA-SAAVEDRA, VIKTOR ROMERO DIAZ, FÁTIMA CEBALLOS, JUAN MANUEL DELGADO, M. DE LA LUZ MARTÍNEZ, ODILA SAUCEDO CÁRDENAS, BERTHA JUÁREZ, MARIA DEOGRACIAS ORTIZ, MARÍA ESTHER JIMÉNEZ CATANO

POR SU PARTICIPACIÓN CON EL TRABAJO DE EXPOSICIÓN ORAL

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

XXI CONGRESO NACIONAL DE ANATOMÍA
"DR. ABUNDIO ESTRADA ARANDA"

18 AL 21 DE OCTUBRE DEL 2006. SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., MEXICO.

DR. JESÚS EDUARDO NOYOLA BERNAL
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE MEDICINA U.A.S.L.P.

DR. VIRGILIO W. ESCALANTE SILVA
PRESIDENTE DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE ANATOMÍA

similar a la descrita en *P. nudipes*. Los rasgos morfológicos descritos en conjunto y en relación a datos de campo y de bioteno, sugieren que *P. winkelmanni* presenta un ciclo estacional, oportunístico y políestríco.

28. 16:45 – 17:00 hrs
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN TRANSPLENTARIA Y POSTNATAL DE ARSÉNICO SOBRE EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA.

Martha E. Santoyo^{1,2}, Julio Sepúlveda-Saavedra², Viktor Romero Diaz², Fátima Ceballos¹, Juan Manuel Delgado¹, M. de la Luz Martínez¹, Odilia Saucedo Cárdenas², Bertha I. Juárez², María Deogracias Ortíz¹ y María Esther Jirimez² Departamentos de Bioquímica¹ y de Ciencias Morfológicas², Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. Departamento de Histología³, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

En países como México, la India, China, entre otros, un gran número de habitantes se encuentran expuestos al arsénico a través del agua de bebida y de emisiones contaminantes. La exposición a este metaloide se asocia con una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, cáncer, además de que se han demostrado alteraciones cognitivas en niños y adolescentes expuestos crónicamente al arsénico. En modelos animales de exposición a arsénico se han reportado 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. Para ello expusimos ratas Wistar al arsénito 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, al paralelo con este grupo experimental se realizó otro grupo de animales, a los que se les suspendió por dos meses el tratamiento con el arsénico, este último grupo de animales fue sacrificado a los seis meses de edad. Se evaluó la conducta de los animales mediante el 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. En el cuerpo estriado el arsénico causó alteraciones celulares y desmielinización, al estar expuestos al arsénico por un periodo de cuatro meses (postnatal). Los cuerpos neuronales se encontraron hipercrómicos con núcleos disminuidos de tamaño y picnóticos y las vainas de mielina presentaron un desarreglo estructural e incluso exhibieron espacios vacíos en la estructura multilaminar de la mielina. Al suspender por un periodo de dos meses la exposición al arsénico, se demostró que la desmielinización fue reversible pero no así las alteraciones neuronales, mientras que en la tarea de aprendizaje espacial los animales también mostraron una recuperación. 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 periodo de dos meses. Con estos resultados se concluye que la exposición crónica al arsénico produce alteraciones morfológicas en los cuerpos neuronales y en la vaina de mielina del cuerpo estriado de la rata y que al suspender la exposición al arsénico por un periodo de dos meses, existe una recuperación en la vaina de mielina, sin embargo la persistencia en el daño a los cuerpos neuronales nos sugiere un periodo de recuperación más prolongado o que tal vez ese daño sea irreversible.

29. 17:00 – 17:15 hrs

NERVIO CIÁTICO CON ORIGEN DIVIDIDO SUPRA E INFRAPIRAMIDAL. ESTUDIO DE UN CASO.

M. en C. Ramón Rosales Gutiérrez. M. en C. Francisco Jaramillo González
 Departamento de Morfología. Centro de Ciencias Básicas.
 Universidad Autónoma de Aguascalientes

El nervio *ischiatibialis* o ciático [mayor] se origina a partir de las raíces de L4 a S3 (S4) como el nervio periférico principal del *plexus sacralis* (plexo sacro). Sale de la cavidad pélvica adosado a la cara anterior del músculo *piriformis* (piriforme) [piramidal de la pelvis] pasando por el agujero ciático mayor, situado entre el músculo mencionado y el *gemellus superior* (gemelo o gémimo superior). Al llegar al tercio distal del muslo se divide en dos ramas terminales: nervio *peroneus (fibularis) communis* (nervio peroneo común) [nervio ciático popliteo externo] y el nervio *tibialis* (nervio tibial) [ciático popliteo interno]. Ocasionalmente ($\approx 12\%$), el nervio se divide desde su origen, de acuerdo a las partes anterior y posterior del plexo sacro, por lo cual se pueden encontrar algunas variantes anatómicas en su relación con el músculo piriforme. Como hallazgo de disección, en un cadáver del sexo masculino de 68 años de edad, se encontró la variante anatómica en la que la parte peroneal pasa por el borde superior del piriforme (suprapiramidal) y la parte tibial por el borde inferior (infrapiramidal). La literatura refiere que esta condición es una de las causas, en un 0.86%, del denominado síndrome del músculo piriforme, conjunto de manifestaciones relacionadas con el atrapamiento o pellizcamiento de cualquiera de las dos partes del nervio ciático o de ambas.

BIBLIOGRAFÍA.

Los Mejores Estudiantes de México, U.C.



*El Comité Nacional Permanente
de la Institución
Otorga el presente*

Diploma

a:

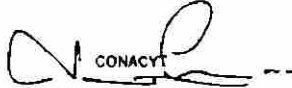
Martha Eugenia Santoyo Perez

*en consideración de haberse
distinguido como el mejor estudiante de:*

*Maestría En Ciencias Con Especialidad En Morfología
Universidad Autónoma De Nuevo León*

en el año de 2002

México, D.F. a 25 de noviembre de 2002


CONACYT

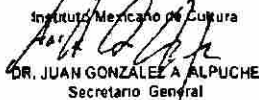
ING. JAIME PARADA AVILA
Director General


ANUIES
MTRO. JORGE LUIS IBARRA MENDIVIL
Secretario General

Diario de México

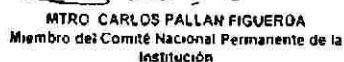
LIC FEDERICO BACAMONTES
Presidente Ejecutivo

Sociedad Mexicana de Geografía
y Estadística

Instituto Mexicano de Cultura

DR. JUAN GONZALEZ A. ALPUCHE
Secretario General

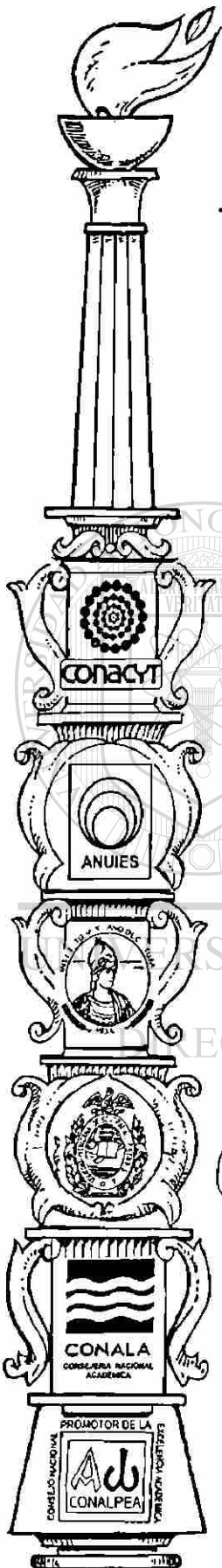
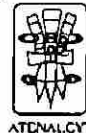
ING. JOEL ROMERO GALINAS
Presidente

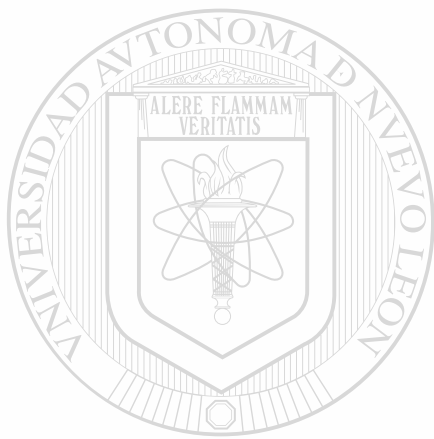
Consejero Nacional Académico de la Institución


MTRO. CARLOS PALLAN FIGUEROA
Miembro del Comité Nacional Permanente de la
Institución

ATENALCYT

LIC. ROLANDO RUEDA DE LEÓN SANCHEZ
Coordinador General





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



