

T
529

0879

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

EFEECTO DEL TALIO SOBRE DIFERENTES MARCADORES DE ESTRES
OXIDATIVO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATAS

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Biológicas

PRESENTA:

SONIA GALVAN ARZATE

Enero 2006

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la
Universidad Autónoma Metropolitana
pertenece al Padrón de Posgrados de
Excelencia del CONACyT y además
cuenta con el apoyo del mismo Consejo,
con el convenio PFP-20-93”

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presentó

SONIA GALVAN ARZATE

El día 20 de Enero de 2006

Comité Tutorial:

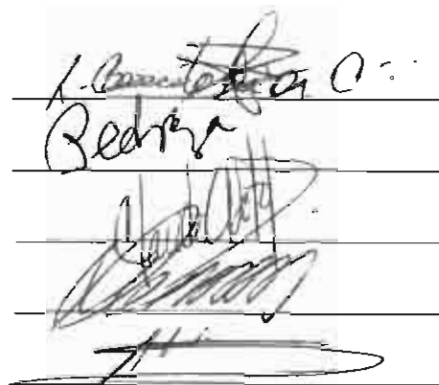
Presidente: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Vocal: Dr. José Pedraza Chaverri

Vocal: Dra. Claudia Soto Peredo

Vocal Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Secretario Dr. Abel Santamaria Del Angel



The image shows five handwritten signatures, each written on a horizontal line. The signatures are: 1. Luis Camilo Ríos Castañeda (President), 2. José Pedraza Chaverri (Vocal), 3. Claudia Soto Peredo (Vocal), 4. Javier Velázquez Moctezuma (Vocal), and 5. Abel Santamaria Del Angel (Secretary). The signatures are written in black ink and are somewhat stylized.

I read through the paper and the abstract of the thesis and find very interesting. Dr. Sonia Galvan-Arzata did an excellent job performing these experiments. These studies showed that a single of Thallium increased lipid peroxidation, decreased antioxidant enzymes glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different brain regions in rats. Thallium also produced hypokinesia and distribution of this metal was uniform throughout the brain. Thallium is a very interesting metal, beside its exposure through occupational and non-occupational ways, lately it has also been used in the biomedical field as a tracer to detect cardiovascular problems. So the effects observed in these studies just by one single dose may have long term implications. The mechanism of action that Thallium produced neurotoxicity by generating ROS and free radicals is justified well by measuring different neurochemical and molecular markers. I am very impressed with the whole project and strongly recommend to be considered for the Ph.D. degree.

Syed F. Ali, Ph.D
Senior Biomedical Research Scientist
Head Neurochemistry Laboratory
Professor of Biochemistry & Molecular Biology, Neurology and
Pharmacology and Toxicology
Division of Neurotoxicology, HFT-132
National Center for Toxicological Research/FDA
3900 NCTR Road, Jefferson, AR 72079-9502
Tel: 870-543-7123, Fax: 870-543-7745

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a las autoridades del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía M.V.S., particularmente al Director General Dr. Julio Sotelo Morales y a la Directora de Investigación Dra. Esperanza García Mendoza por su apoyo.

A mis Co-tutores: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda y Dr. Abel Santamaría Del Ángel, por la contribución que cada uno tuvo para que este trabajo se concluyera.

A mis Asesores durante el Doctorado: Dr. José Pedraza Chaverri y Dr. Carlos Alejandro Torner Aguilar, por sus valiosos comentarios que sirvieron para desarrollar esta tesis.

A los miembros del jurado: Dra. Claudia Soto Peredo y Dr. Javier Velásquez Moctezuma, por sus comentarios y correcciones que enriquecieron este trabajo.

A la Comisión de Doctorado y a los Coordinadores con los que tuve el gusto de tratar durante la realización de mi Doctorado.

A la Dra. Ma. Esther Jiménez Cataño y al Dr. Syed F. Ali, por su revisión al manuscrito, sus correcciones y valiosos comentarios.

A todas las personas que a diferentes niveles apoyaron para la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

Con todo mi amor a Alonso y Abel, por ser mi apoyo y mis alegrías, por ser los grandes motores en mi vida que me impulsan a ser cada día mejor

A mis padres: Estela y Leopoldo por su amor y su ejemplo eterno

A mis hermanos: Leopoldo, Blanca y Pilar. Y a mis sobrinos Mariana, Leopoldo, Alvaro, Rodrigo, Ana Paula, Constanza y Aldo por su cariño y compañía

A toda mi familia: tíos, primos y sobrinos, por mostrarme la importancia de estar unidos.

A mi suegra Ma. Esther y a toda mi familia "política" por su cariño y apoyo

A mis amigas y compañeras: Laura, Juanita, Lety, Lupita, Mónica, Conchita y Marisela por compartir conmigo los momentos de alegrías, tristezas y el trabajo del laboratorio

DEDICATORIAS

Con todo mi amor a Alonso y Abel, por ser mi apoyo y mis alegrías, por ser los grandes motores en mi vida que me impulsan a ser cada día mejor

A mis padres: Estela y Leopoldo por su amor y su ejemplo eterno

A mis hermanos: Leopoldo, Blanca y Pilar. Y a mis sobrinos Mariana, Leopoldo, Alvaro, Rodrigo, Ana Paula, Constanza y Aldo por su cariño y compañía

A toda mi familia: tíos, primos y sobrinos, por mostrarme la importancia de estar unidos.

A mi suegra Ma. Esther y a toda mi familia "política" por su cariño y apoyo

A mis amigas y compañeras: Laura, Juanita, Lety, Lupita, Mónica, Conchita y Marisela por compartir conmigo los momentos de alegrías, tristezas y el trabajo del laboratorio

RESUMEN

La toxicidad del talio (Tl^+) ha sido relacionada con la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y el estrés oxidante (EO) en el Sistema Nervioso Central. Dado que los cambios en los sistemas antioxidantes endógenos pueden contribuir al EO y a la neurotoxicidad aguda del Tl^+ , en este estudio nosotros medimos la concentración del metal y los niveles de peroxidación lipídica (PL) en diferentes regiones cerebrales (hipotálamo (Ht); cerebelo (Ce); cuerpo estriado (E); hipocampo (Hc) y corteza frontal (Cx)) en posible correlación con el contenido de glutatión reducido (GSH), las actividades de la glutatión peroxidasa (GPx) y la superóxido dismutasa (SOD), y el desempeño de los animales en diferentes pruebas conductuales, todo ello después de una administración única de acetato de Tl^+ (8 o 16 mg/kg, i.p.) a las ratas. Siete días después de la administración de Tl^+ , el metal fue acumulado de manera homogénea y dosis-dependiente en todas las regiones evaluadas. La PL aumentó en Ht, Ce y E, mientras que el GSH disminuyó en E y la actividad de la Cu,Zn-SOD disminuyó en Ht y E. Todos estos cambios ocurrieron con la dosis de 16 mg/kg y 7 días después del tratamiento con el metal. Adicionalmente, los animales tratados con Tl^+ exhibieron un patrón hipocinético general, pero sin cambios en el aprendizaje espacial. Nuestros hallazgos sugieren una respuesta tardía del cerebro al Tl^+ que podría ser el resultado de sus niveles residuales. A pesar de las alteraciones regionales producidas por el Tl^+ en la PL y los limitados cambios en los sistemas antioxidantes estudiados, existe una correlación entre el EO y las tareas conductuales afectadas, sugiriendo que, aún cuando moderados, el Tl^+ evoca patrones neurotóxicos bajo las condiciones experimentales probadas.

ABSTRACT

Thallium (Tl^+) toxicity has been related with the generation of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress (OS) in the central nervous system. Since changes in endogenous antioxidant systems might contribute to acute Tl^+ -induced OS and neurotoxicity, in this study we measured the metal concentration and the levels of lipid peroxidation (LP) in different brain regions (hypothalamus (Ht); cerebellum (Ce); striatum (S); hippocampus (Hc) and frontal cortex (Cx)) in possible correlation with the content of reduced glutathione (GSH), the activities of glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD), and the animal performance in behavioral tests, all evaluated after a single administration of thallium acetate (8 or 16 mg/kg, i.p.) to rats. Seven days after Tl^+ administration, the metal was homogeneously and dose-dependently accumulated in all regions evaluated. LP was increased in Ht, Ce and S, while GSH was depleted in S. Cu,Zn-SOD activity was also decreased in Ht and S. All these changes occurred with 16 mg/kg dose and at 7 days after treatment. In addition, Tl^+ -treated animals exhibited general hypokinesia, but no changes were observed in spatial learning. Our findings suggest that a delayed response of the brain to Tl^+ may be the result of its residual levels. Also, despite the regional alterations produced by Tl^+ in LP and the limited changes in endogenous antioxidants, there is a correlation between the Tl^+ -induced oxidative damage and the affected behavioral tasks, suggesting that, although still moderate, Tl^+ evokes neurotoxic patterns under the experimental conditions tested.

INDICE GENERAL

	Página
I. ANTECEDENTES	
1. GENERALIDADES DEL TALIO	1
2. INTOXICACION POR TALIO	4
3. SINTOMATOLOGÍA	6
4. ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES	7
5. MECANISMOS DE ACCION	8
6. TALIO Y DAÑO OXIDATIVO CELULAR	9
7. PEROXIDACION DE LIPIDOS Y ESTRES OXIDATIVO	11
8. GLUTATION COMO SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	15
9. GLUTATION PEROXIDASA	16
10. SUPEROXIDO DISMUTASA	16
11. EVALUACION DE LOS NIVELES DE TALIO EN TEJIDO CEREBRAL	18
12. ALTERACIONES CONDUCTUALES POR TALIO	22
JUSTIFICACIÓN	23
II. HIPÓTESIS	26
III. OBJETIVO GENERAL	27
IV. OBJETIVOS PARTICULARES	27
V. METODOLOGÍA	28
SECCION DE REACTIVOS	28
SECCION DE ANIMALES	28
1. Peroxidación de lípidos	29
2. Glutación reducido	30
3. Glutación peroxidasa	31
4. Superóxido dismutasa	32
5. Concentración de talio	33
6. Aprendizaje espacial	34
7. Actividad locomotora espontánea	36
8. Análisis estadísticos	37
VI. RESULTADOS	38
1. Peroxidación de lípidos	38
2. Glutación reducido	39
3. Glutación peroxidasa	40
4. Superóxido dismutasa	41
5. Concentración de talio	43

6. Aprendizaje espacial	44
7. Actividad locomotora espontánea	45
VII. DISCUSIÓN	46
Hallazgos generales	46
Talio y estrés oxidativo	48
Concentraciones de talio en el cerebro	54
Talio y conducta	58
Mecanismos de toxicidad del talio	61
Talio y apoptosis	63
Talio y ambiente	66
COMENTARIOS FINALES	69
VIII. CONCLUSIONES	70
IX. REFERENCIAS	71
X. ANEXO	82

INDICE DE FIGURAS, TABLAS (CUADROS) Y GRAFICAS.

	Página
Figura 1. Tabla Periódica de los elementos	1
Figura 2. Esquema de fuentes de obtención del talio	2
Figura 3. Esquema de formas de liberación de talio al ambiente	3
Figura 4. Esquema de las formas de ingreso del talio al organismo	5
Figura 5. Fotografía de paciente intoxicado crónicamente por talio	7
Figura 6. Esquema de la mitocondria	8
Figura 7. Esquema de la ATPasa Na^+/K^+	9
Figura 8. Esquema de la formación de radicales libres	12
Figura 9. Esquema de peroxidación de lípidos	13
Figura 10. Cuadro de los diferentes sistemas antioxidantes	14
Figura 11. Esquema de la acción del glutati6n	15
Figura 12. Esquema de producci6n de radicales y su remoci6n	18
Figura 13. Esquema de prueba conductual del laberinto acuático	36
Figura 14. Fotografía del equipo para evaluar la actividad locomotora espontánea	37
Gráfica 1. Efecto de talio sobre la peroxidaci6n de lípidos	38
Gráfica 2. Efecto de talio sobre el contenido de glutati6n (GSH)	39
Gráfica 3. Efecto de talio sobre la actividad de glutati6n peroxidasa (GPx)	40
Gráfica 4. Efecto de talio sobre la actividad de la superoxido dismutasa (SOD)	41

Gráfica 5. Efecto de talio sobre la actividad de la SOD- Cu, Zn	42
Gráfica 6. Efecto de talio sobre la concentración cerebral del metal	43
Gráfica 7. Efecto de talio sobre la latencia media de escape	44
Gráfica 8. Efecto de talio sobre la frecuencia de movimientos Espontáneos	45
Figura 15. Esquema de los posible mecanismos de toxicidad del talio	65

ANTECEDENTES

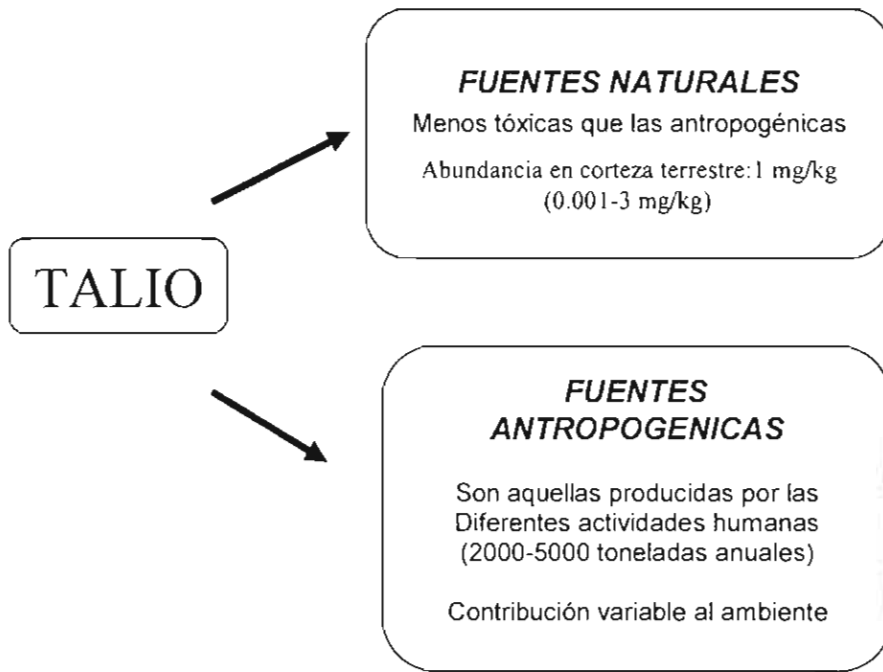
1. GENERALIDADES DEL TALIO

El talio (Tl^+) es un metal pesado que se encuentra clasificado en el grupo IIIA de la tabla periódica (Figura 1). Desde su descubrimiento accidental en 1861 por Crookes (Prick, 1979) y hasta la fecha, ha causado intoxicaciones de diversos tipos: accidentales, intencionales, ocupacionales y ambientales (Reed et al., 1963; Liem et al., 1984).

	Metales Alcalinos		Metales Alcalinoterreos				Metales de transición		Lantánidos		Actínidos		Otros Metales		No Metales		Gases Nobles	
Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	IA	IIA	IIIB	IVB	VB	VIB	VII B	VIII B			IB	II B	IIIA	IVA	VA	VIA	VIIA	VIIIA
Periodo																		
1	1 H																	2 He
2	3 Li	4 Be										5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne	
3	11 Na	12 Mg										13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar	
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba	*	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra	**	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn	113 Nh	114 Fl	115 Mc	116 Lv	117 Ts	118 Og
Lantánidos	*	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu		
Actínidos	**																	

Figura 1. Tabla Periódica de Elementos. Ubicación de Talio. Grupo IIIA

Este metal es liberado al ambiente tanto por fuentes naturales como por fuentes antropogénicas, contribuyendo a la contaminación ambiental y a la posible intoxicación humana (Figura 2).



Figuras 2. Esquema de las fuentes de obtención del talio.

El talio es obtenido como subproducto durante el proceso de refinación de hierro, cadmio y zinc, así como en la industria cementera y ladrillera (Figura 3) liberándose como contaminante al ambiente. El polvo obtenido en este tipo de industria es procesado posteriormente para recuperar cantidades comercialmente importantes del metal (Brockhaus, 1981). A pesar de que no se producen más de 15 toneladas de talio anualmente a nivel mundial, se estima que entre 2000-5000 toneladas de este metal se movilizan en diversos procesos industriales (Kazantzis,

2000). El Tl^+ es usado como catalizador de ciertas aleaciones, para la fabricación de lentes, joyería de imitación, termómetros de baja temperatura, semiconductores, pinturas, pigmentos y contadores de centelleo (Marmo et al., 1987). También fue empleado con fines terapéuticos (contra la sífilis, gonorrea y tiña) y dermatocosmetológicos (eliminación del vello excesivo) con poco éxito, ya que se originaban intoxicaciones. Algunas sales de talio son utilizadas como rodenticidas e insecticidas, a pesar de la recomendación hecha en 1973 por la Organización Mundial de la Salud de prohibir su uso. Así, a pesar de su gran toxicidad, los compuestos de Tl^+ siguen estando disponibles en muchos países a través de las fuentes mencionadas (Galván-Arzate y Santamaría, 1998).

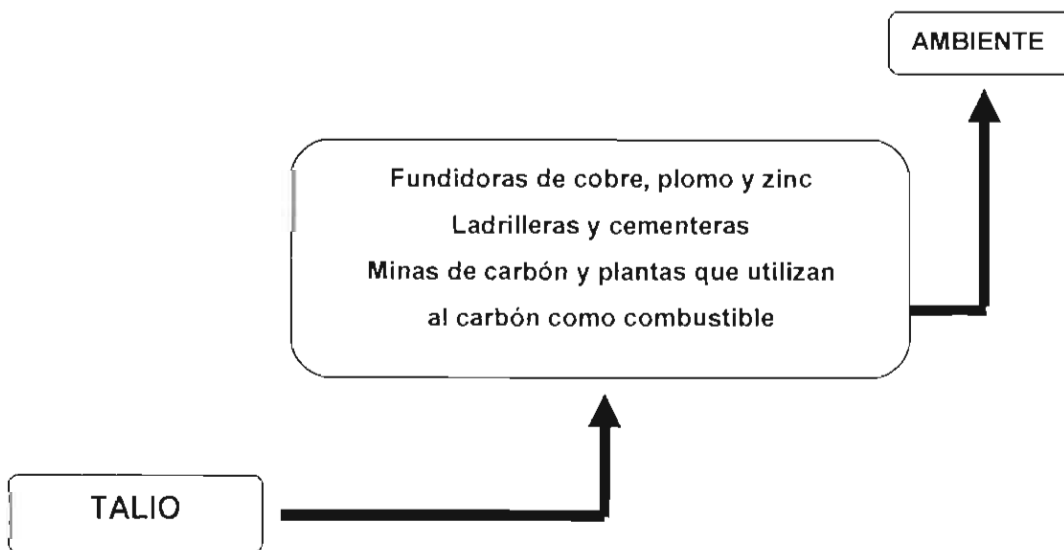


Figura 3. Esquema de las formas como se libera el talio al ambiente.

2. INTOXICACION POR TALIO

La intoxicación por Tl^+ aparece después de la entrada del metal al organismo a través de inhalación, ingestión o por contacto dérmico (Figura 4). Pueden presentarse diversas manifestaciones clínicas (agudas, subagudas o crónicas) de acuerdo al tipo de exposición, dosis y edad del individuo (Rossi et al., 1987). Es importante señalar que cualquier cantidad de Tl^+ en el cuerpo debe ser considerada como anormal, ya que no se trata de un elemento traza esencial. De acuerdo al Programa Internacional de Seguridad Química de la Organización Mundial de la Salud, se considera que en población general la ingesta total de talio debe ser menor a 5 μg por día principalmente proveniente de alimentos, y así esto no constituye una amenaza para la salud (Peter y Viraraghavan, 2005). Existen algunas estimaciones sobre la dosis letal mínima en humanos, siendo en promedio para el sulfato de talio entre 10-15 mg/kg (aunque se han reportado muertes con dosis de 8 mg/ks) (Moeschlin, 1980). Aunque desde 1943 Gettler y Weiss habian propuesto una dosis letal mínima de 14-15 mg/kg para sales solubles de talio en adultos. Mas recientemente se han reportado muertes con 2 mg/kg (NIOSH, 1992). Este elemento extremadamente tóxico se distribuye rápidamente en el organismo, cruzando tanto la barrera hematoencefálica como la placentaria (Ziskoven et al., 1983) y la testicular en su caso. El Tl^+ se acumula en todos los órganos, pero presenta mayor afinidad por el Sistema Nervioso Central, y dentro de éste su mayor acumulación se observa en áreas subcorticales del

cerebro (Ríos et al., 1989; Galván-Arzate y Ríos, 1994). El Tl^{+} se elimina por heces, orina, bilis, saliva, leche y lágrimas (Rossi et al., 1987).

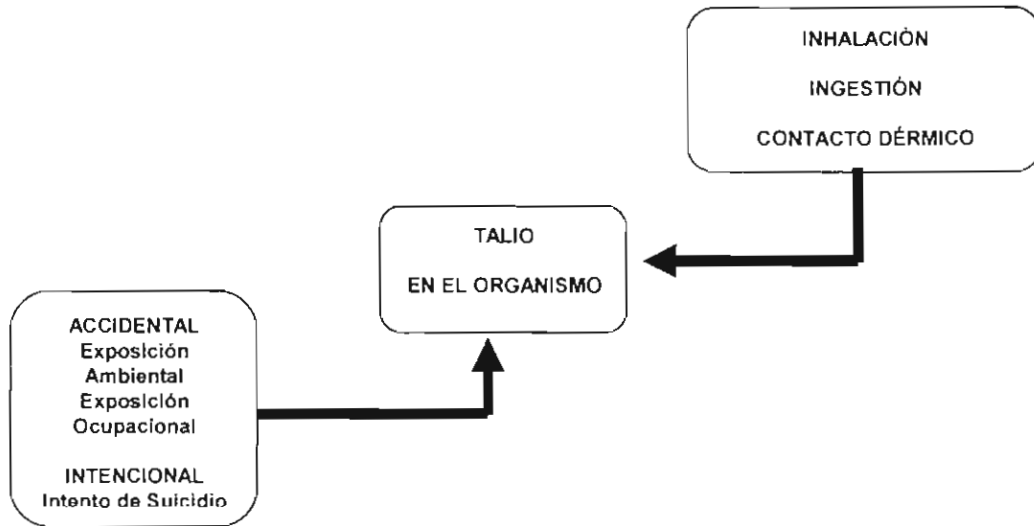


Figura 4. Esquema de las formas de ingreso del talio al organismo.

La distribución del talio se da en un modelo tridimensional de 3 fases (Rauws, 1974). En la primera fase, que dura aproximadamente cuatro horas, el Tl^{+} se distribuye en el compartimento central, constituido de sangre, órganos y tejidos bien irrigados, concentrándose en las células sanguíneas. La segunda fase, que va de 4 a 48 horas comprende una completa distribución del metal por todo el cuerpo con especial acumulación en el órgano blanco que es el cerebro. La tercera fase comprende la consecuente eliminación del tóxico, donde se presenta un intensivo ciclo enteroenteral entre la absorción y secreción, por lo que el intestino se considera

como el tercer compartimento. Sin tratamiento para removerlo este metal puede recircular repetidamente, generando así una continua intoxicación (Nriagu, 1998).

3. SINTOMATOLOGIA

La sintomatología presentada por un paciente intoxicado por talio, aunque es muy variada, presenta generalmente algunos elementos "típicos" que son los que le proporcionan al médico indicios de que se trata de una intoxicación por el metal: algunas semanas después del envenenamiento o intoxicación puede presentarse pérdida de cabello, llegando en algunos casos a una calvicie completa, que incluye la caída del vello púbico y axilar (Figura 5). Entre los signos tempranos después de su ingestión oral están alteraciones gastrointestinales (náuseas, vómito, diarrea, estreñimiento, problemas de absorción, etc.). También se presentan trastornos en el Sistema Nervioso Central (SNC) y Periférico (SNP) que abarcan dolor en el abdomen, espalda y extremidades, particularmente en las piernas, sensibilidad extrema en las plantas de los pies, ataxia, debilidad, parálisis, temblores, corea, convulsiones, períodos de confusión, letargo, insomnio, delirio, alucinaciones y coma. Otros aspectos que pueden verse alterados incluyen efectos sobre el Sistema cardio-vascular (taquicardia, pulso irregular, hipotensión, etc.) y el riñón puede verse dañado por la continua excreción del metal (puede llegar a detectarse albuminuria y hematuria) (Reed et al., 1963; Hasan et al., 1978; Moeschlin, 1980).



XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACIÓN
PRIMERA PLANTA

Figura 5. Fotografía de paciente intoxicado crónicamente por talio. Se aprecia la alopecia característica y la atrofia muscular. (Tomado de Prick, J.J., 1979 Handbook of Clinical Neurology)

4. ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES

A nivel subcelular, una de las alteraciones más importantes observadas por la acción tóxica del Tl^+ es el daño a las mitocondrias (Figura 6), las cuales se encuentran considerablemente alargadas, su matriz presenta edema y existe una destrucción general en su integridad estructural; todo lo anterior se ve reflejado en el mal funcionamiento o en el impedimento de los procesos biológicos asociados a este organelo (Woods y Fowler, 1986).

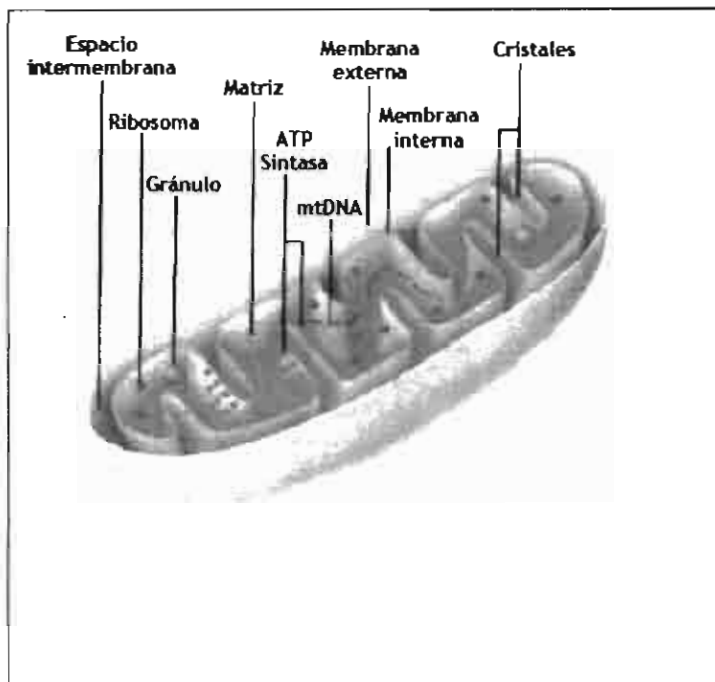


Figura 6. Esquema de la mitocondria, organelo donde tiene su efecto tóxico mayor el talio.

5. MECANISMOS DE ACCION

Hasta el momento, el mecanismo más conocido para explicar la toxicidad del Tl^+ está relacionado con la interferencia que produce este metal en todos los procesos metabólicos dependientes de potasio (K^+), incluidos la sustitución del potasio en la $ATPasa\ Na^+/K^+$ (Figura 7) y su afinidad especial por los grupos sulfhidrilos de proteínas y otras biomoléculas (Aoyama et al., 1988). Debido a que el Tl^+ y el K^+ son iones con la misma carga y radio iónico similar, el Tl^+ es capaz de mimetizar al potasio en su movimiento y acumulación intracelular. Esta capacidad de los iones de Tl^+ es atribuida a la incapacidad de la membrana celular de distinguir entre ambos iones (Mulkey y Oehme, 1993).

También se ha observado que el talio puede reemplazar al potasio en la activación de enzimas (por ejemplo, la piruvato cinasa- PK), la estabilización de ribosomas, e incluso en funciones fisiológicas como la contracción muscular (Douglas et al., 1990).

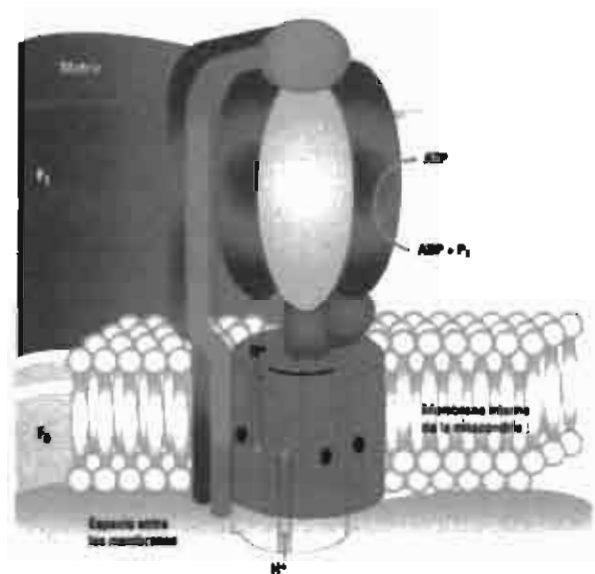


Figura 7. Esquema de ATPasa Na^+/K^+ . El talio compite con el K^+ presentando mayor afinidad para ingresar a la célula y acumularse en ella.

6. TALIO Y DAÑO OXIDATIVO CELULAR

El efecto del Tl^+ sobre la peroxidación de lípidos (un índice confiable para evidenciar el daño oxidativo a las membranas celulares) fue probado por primera vez por Hasan y Ali en 1981 y comparado contra una administración de níquel y cobalto. Estos autores encontraron un aumento significativo en la peroxidación de lípidos en cerebro, cerebelo y tallo cerebral para todos los tratamientos.

Particularmente en el caso del Tl^+ , el efecto mayor se observó en cerebelo, mientras que para los otros dos metales el aumento fue mayor en tallo cerebral. Ellos también encontraron una correlación entre la peroxidación de lípidos y el depósito de un pigmento de envejecimiento similar a la lipofuscina después de la intoxicación. Por su parte, Aoyama y col. (1988) estudiaron la inducción de la acción peroxidativa del Tl^+ en diferentes tejidos de hamster, y encontraron un aumento de la lipoperoxidación particularmente en el riñón, con una disminución marcada en NPSH ("non-protein sulfhydryls") como un indicador de los niveles de glutatión (GSH), así como una disminución en la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx), sugiriendo así que el daño inducido por Tl^+ puede ser asociado a procesos de estrés oxidativo (EO). Recientemente, nuestro grupo investigó también el proceso de lipoperoxidación producido por el Tl^+ , pero bajo un esquema subcrónico de intoxicación a ratas (Galván-Arzate et al., 2000), en donde empleamos dosis de 0.8 y 1.6 mg/kg de peso (que corresponden a subdosis a partir de la DL_{50} establecida para talio en ratas y que es de 32 mg/kg) administrándolo vía i.p. durante 30 días y analizamos un índice de fluorescencia proporcional a la producción de lípidos peroxidados en diferentes regiones cerebrales como marcador de la peroxidación de lípidos (PL). Con la dosis menor sólo encontramos aumentos significativos en la PL en cuerpo estriado y cerebelo, mientras que con la dosis mayor se observaron incrementos significativos en todas las regiones estudiadas (hipotálamo, cerebelo, corteza, hipocampo y cuerpo estriado). Estos resultados sugieren una susceptibilidad aparentemente preferencial del cuerpo estriado y del cerebelo al EO producido por el Tl^+ , aún a

dosis bajas, hecho que se puede explicar por los valores basales bajos de PL exhibidos por ambas regiones, así como por su especial vulnerabilidad al ataque por radicales libres. A pesar de estos hallazgos, permanecen aún por explicar muchos otros eventos relacionados con la acción pro-oxidante del talio, como es el efecto de este metal sobre biomarcadores específicos de EO.

7. PEROXIDACION DE LIPIDOS Y ESTRES OXIDATIVO

El papel de la PL en la patogénesis aguda causada por metales pesados ha sido investigada de forma general, pero no se ha analizado en su totalidad el efecto del Tl^+ sobre marcadores de EO en el Sistema Nervioso Central de ratas, por lo que es interesante enfatizar la participación de las especies reactivas del oxígeno (ERO) en el mecanismo de toxicidad del Tl^+ .

El Sistema Nervioso (SN) tiene una gran actividad redox reflejada en su metabolismo celular alto y en su consumo constante de oxígeno. Cuando la actividad redox basal del SN se incrementa por efecto de factores potencialmente patógenos que afectan el empleo del oxígeno, el metabolismo celular se orienta a la expresión del estrés oxidante, el cual se define como el incremento tóxico en la actividad redox de cualquier sistema biológico mediado por la acción oxidante de los radicales libres y de otras ERO y/o ERN (especies reactivas del nitrógeno). A su vez, un radical libre se define como una molécula cuya característica fundamental es la de presentar uno o más electrones desapareados en alguno de sus orbitales moleculares, lo que le confiere una reactividad alta y una potencia desestabilizadora sobre la estructura de otras moléculas (Figura 8). Los radicales

tienen su acción sobre diversos sustratos biológicos tales como proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Halliwell y Gutteridge, 1985).

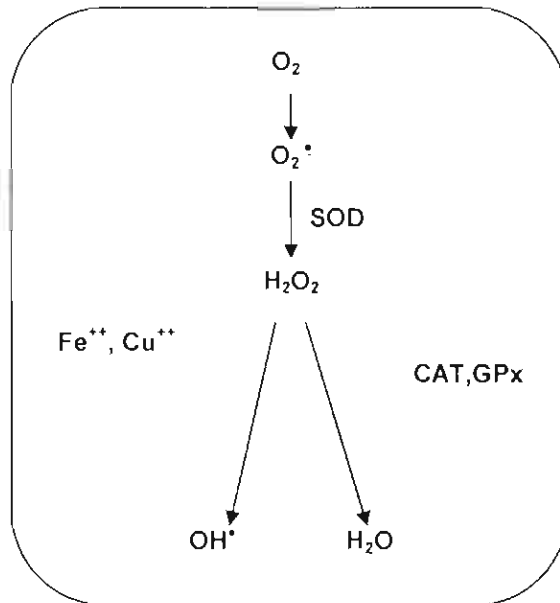


Figura 8. Esquema representando la formación de radicales libres.

Por otro lado, el EO es un complejo de eventos nocivos que llevan a la célula a la muerte después de una cascada de estímulos tóxicos. La PL es una expresión común del EO que involucra la reacción directa de ERO y ERN con ácidos grasos poli-insaturados de la membrana para formar radicales libres intermedios y peróxidos semi-estables. La PL es dañina debido a las reacciones subsecuentes de los radicales libres (principalmente radicales peroxi e hidroxilo) que son producidos durante la cadena de eventos oxidantes (Figura 9). Se ha sugerido que la PL juega un papel importante en los procesos de envejecimiento, en daño celular por contaminación ambiental, por radiación, por agentes químicos, así como por toxicidad del oxígeno. Debido a su alto contenido de lípidos insaturados y

a la falta evidente de efectividad de sus sistemas de defensa antioxidante (atraptadores de radicales libres, metaloproteínas y enzimas detoxificadoras como la superóxido dismutasa), el SN es especialmente susceptible al ataque por radicales libres y a la peroxidación de lípidos (Halliwell y Gutteridge, 1985).

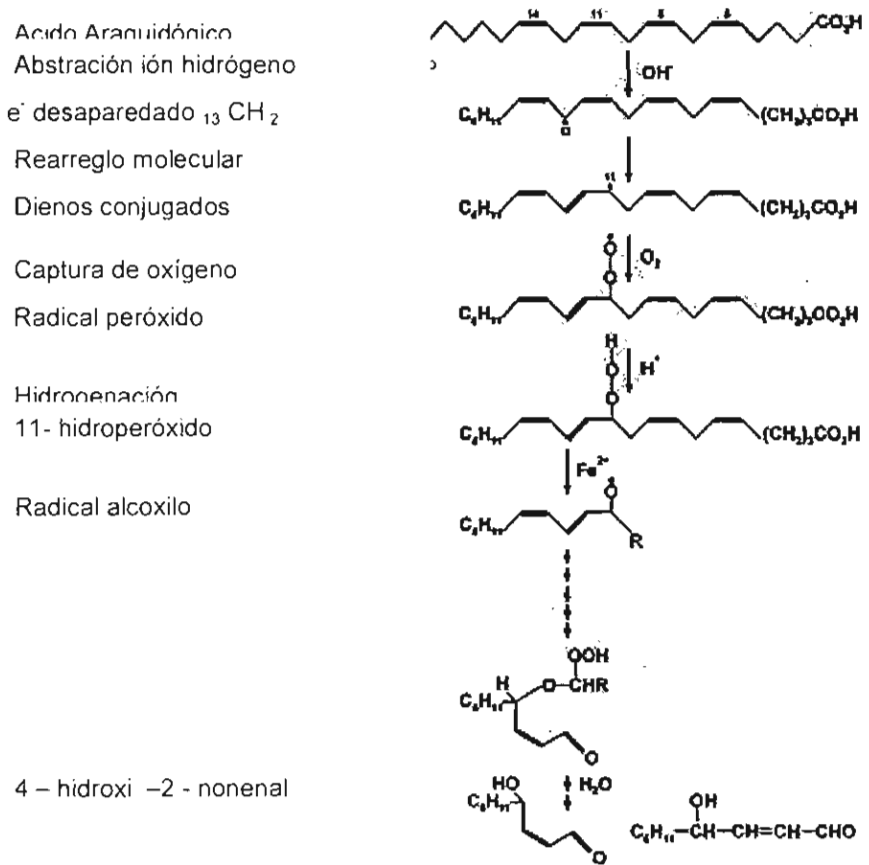


Figura 9. Esquema general de la peroxidación de lípidos (modificado de Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C.. 1985. Free Radical in Biology and Medicine).

Los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno o del nitrógeno, aunque potencialmente tóxicos, son productos metabólicos normales en el organismo. El superóxido y el peróxido de hidrógeno son producidos durante la reducción del oxígeno por la mitocondria, a partir de enzimas tales como la xantina

oxidasa y por las células fagocíticas. Algunos componentes fisiológicos se autooxidan o son sustratos para enzimas que generan radicales. El óxido nítrico es un radical producido tanto como mensajero en el cerebro y en la vasculatura, así como defensa contra patógenos (Winterbourn, 1995).

Los sistemas biológicos de defensa antioxidante mantienen estos procesos oxidativos bajo control. Esto es considerado generalmente necesario para prevenir el daño oxidativo, pero puede ser igualmente importante para el control regulatorio de las vías que dependen de las reacciones redox. Los sistemas enzimáticos y los captadores no enzimáticos contribuyen a la defensa antioxidante (Figura 10). A continuación se mencionan los más importantes para el Sistema Nervioso Central.

DEFENSAS ANTIOXIDANTES	
ENZIMATICAS	NO-ENZIMATICAS
Superóxido dismutasa (SOD)	Glutación reducido (GSH)
Glutación peroxidasa (GPx)	Ácido ascórbico
Glutación reducido (GSH)	Vitamina E
Catalasa (CAT)	Carotenoides
	Ácido úrico
	Ubiquinona

Figura 10. Cuadro que muestra los diferentes Sistemas Antioxidantes en el organismo (Tomado de Winterbourn, C.C. 1995. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology).

8. GLUTATION COMO SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Uno de los sistemas endógenos de defensa antioxidante más importante en el SNC es el glutatión, un tripéptido formado por ácido glutámico, glicina y cisteína (que contiene un grupo sulfhidrilo). El glutatión existe en dos formas: la oxidada (GSSG) y la más común, la reducida (GSH). El GSH (Figura 11) es el responsable de la inactivación directa de algunas ERO y ERN, así como del consecuente mantenimiento del balance redox del cerebro (Halliwell y Gutteridge, 1985). La evaluación de las concentraciones de GSH en tejido constituye un marcador confiable de los niveles de actividad oxidativa en los sistemas biológicos.

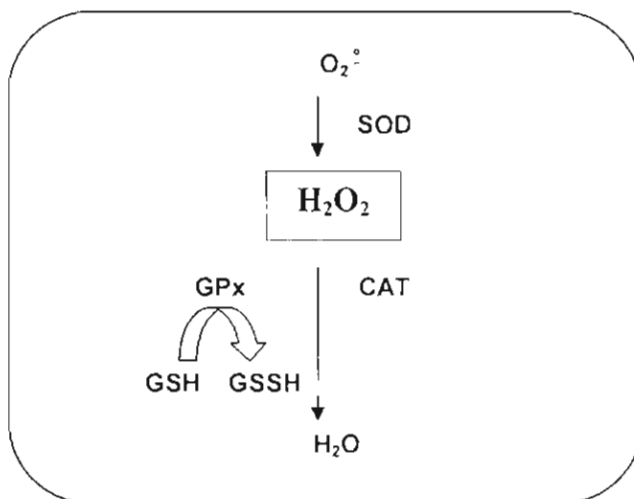


Figura 11. Esquema que representa la acción del glutatión

9. GLUTATION PEROXIDASA

La glutatión peroxidasa (GPx) fué descubierta en 1957 (en tejidos animales). Generalmente no está presente en bacterias o plantas superiores, aunque ha sido reportada en algunas algas y hongos. Se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos animales en concentraciones variables.

La glutatión peroxidasa consiste de cuatro subunidades proteínicas, cada una de las cuales contiene un átomo de selenio (Se) en su sitio activo. Se requieren cantidades traza de Se en la dieta de los animales ya que juegan un papel importante como cofactor de la familia de enzimas glutatión peroxidasa.

Básicamente se reconocen cuatro tipos de glutatión peroxidasa: GPx clásica o citosólica (cGPx), GPx hidroperóxido fosfolipídica (PHGPx), GPx plasmática (pGPx) y la GPx gastrointestinal (GPx-GI).

La glutatión peroxidasa (Figura 12) es una enzima importante dentro de los sistemas de defensa antioxidante. Es un componente del ciclo del GSH, ya que éste cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la GPx (Baker, 1993). Durante este mismo ciclo, el GSH se regenera por la acción de la glutatión reductasa (GSSGred) .

10. SUPEROXIDO DISMUTASA

La enzima superóxido dismutasa (SOD) acelera la reacción de dismutación del radical superóxido (O_2^-) a H_2O_2 (Figura 12). También impide la formación de peroxinitrito (un derivado altamente citotóxico del óxido nítrico) por competencia del óxido nítrico con el O_2^- .

La SOD se encuentra virtualmente en todas las células eucariotas incluyendo bacterias, plantas y animales. Se han purificado tres tipos de SOD humana: Cu, Zn-SOD, Mn-SOD y SOD extracelular. (Nakazawa et al., 1996)

La SOD dependiente de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD) tiene un peso molecular de 32,000 y consiste de dos subunidades protéicas. Cada unidad tiene un sitio activo que contiene un ión cobre y un ión zinc. El ión Cu sirve como un sitio redox activo y el de Zn mantiene la estructura de la proteína. La Cu, Zn-SOD se localiza abundantemente en el citosol celular, y se ha encontrado incluso en el núcleo (Nakazawa et al., 1996)

La SOD dependiente de manganeso (Mn-SOD), se encuentra en la matriz mitocondrial (Noack et al., 1998). Tiene cuatro subunidades con Mn en cada subunidad. El peso molecular es de 40,000-80,000.

La SOD extracelular está presente en el plasma, unida a sulfato de heparina en la superficie de células endoteliales. Esta SOD es una glicoproteína tetramérica que contiene Cu y Zn. La presencia de SOD en varios compartimentos de nuestro cuerpo permite que la SOD dismute el O_2^- inmediatamente en el sitio en que es formado (Nakazawa et al., 1996).

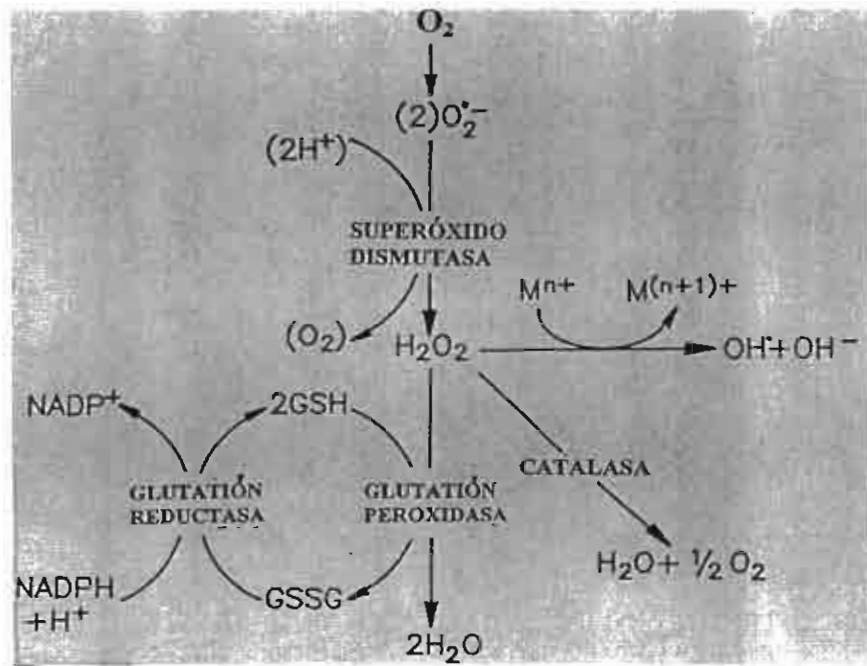


Figura 12. Esquema mostrando la producción de especies reactivas y su remoción por vías que involucran reacciones con glutatión (GSH), glutatión peroxidasa (GPx), y superóxido dismutasa (SOD). (Tomado de Winterbourn, C.C. 1995. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology).

11. EVALUACION DE LOS NIVELES DE TALIO EN TEJIDO CEREBRAL

En algunos casos de taliotoxicosis humana, la evidencia clínica no es específica de tal intoxicación, por lo que se hace difícil el diagnóstico (Meggs et al., 1994). Por eso, la diagnosis diferencial debe probarse por medio de mediciones que comprueben la presencia de Tl^+ en sangre y orina. Adicionalmente, el monitoreo de la concentración del metal en los fluidos corporales es importante no sólo por el manejo de un paciente intoxicado, sino también por la posibilidad de la

exposición ambiental al Tl^+ , así como por las cuantificaciones de este metal en estudios experimentales con animales (Ríos y Monroy-Noyola, 1992).

El Tl^+ se ha cuantificado en distintas muestras biológicas, como la sangre, cabello y orina, siendo esta última la más común. Los métodos desarrollados para determinar los niveles del metal en orina son los siguientes: electroquímicos (Liem et al., 1984), espectrográficos (Achenbach et. al., 1980; Mauras et. al., 1993) y de absorción atómica con y sin flama (Chandler y Scott, 1984; Ríos et al., 1989). Algunos de los métodos más recientes requieren de procedimientos de extracción previos al análisis para evitar interferencias o para concentrar al elemento. El análisis directo del Tl^+ se logra por medio de la espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito. Debido a la alta sensibilidad de este método, fué el que se utilizó en el presente trabajo. Dicho método analítico se basa en el principio que señala que si un haz de luz de determinada longitud de onda incide sobre un átomo libre en su estado basal, éste puede absorber energía radiante y pasar al estado excitado (Martínez, 2000).

En el caso de los metales, la energía de la mayoría de las transiciones se encuentra en las regiones ultravioleta y visible del espectro. La característica de interés en las mediciones por absorción es la cantidad de luz a la longitud de onda de resonancia que es absorbida cuando ésta pasa a través de una nube atómica. Conforme el número de átomos se incrementa en el paso de la luz, la cantidad absorbida aumentará en forma predecible. La nube de átomos requerida para las mediciones en absorción atómica es producida por la aplicación de suficiente

energía térmica a la muestra para la disociación de los compuestos químicos en átomos libres (Martínez, 2000).

En la espectrofotometría de absorción atómica, la muestra por analizar se transforma en un vapor atómico en el que la mayor parte de los átomos están en su estado fundamental. Esta técnica de atomización con horno de grafito tiene la posibilidad de contar con un programa de control de temperaturas. Básicamente, las fases de este programa son tres: en la primera etapa del programa, llamada del SECADO, se pretende eliminar el agua de la muestra, por ebullición. En la segunda etapa, la de CALCINACION, se elimina la matriz de la muestra, por ejemplo, materia orgánica si se trata de un material biológico. La tercera fase, la de ATOMIZACION, es la de producción de vapor atómico (Martínez, 2000).

En trabajos previos realizados por nuestro grupo hemos reportado las concentraciones de Tl^+ en diferentes regiones cerebrales empleando distintos esquemas de administración. Usando ratas adultas que recibieron diferentes dosis de sulfato de Tl^+ (16, 32 y 48 mg/kg) y sacrificadas 24 h después del tratamiento, encontramos una distribución diferencial en todas las regiones cerebrales. La concentración más alta fue encontrada en hipotálamo y de manera decreciente le siguieron mesencéfalo, hipocampo, tálamo, puente, cerebelo, cuerpo estriado y corteza, siendo similar el patrón de distribución con las tres dosis comparadas. Con respecto a la entrada del metal al parénquima cerebral, los datos obtenidos mostraron que en el estudio del curso temporal del Tl^+ se produjo una entrada más rápida en hipotálamo que en otras regiones, particularmente la corteza, sugiriendo diferencias de entrada al tejido nervioso dependiendo de la región. Otro dato

importante fue el establecimiento de un comportamiento dosis-dependiente en cuanto a la concentración del metal encontrada en las regiones cerebrales y la dosis administrada en los animales (Ríos et al., 1989).

Posteriormente, en otro estudio se utilizaron ratas en diferentes etapas de desarrollo (desde recién nacida hasta 20 días de edad) empleando dosis de 16 mg/kg de acetato de Tl^+ . Los resultados mostraron que el cerebro de los animales adultos es menos permeable al metal que el de los animales en desarrollo, sugiriendo que el transporte reducido de Tl^+ en el cerebro se relaciona al establecimiento de la barrera hematoencefálica en las ratas. También se encontraron diferencias entre los animales lactantes y los recién nacidos en relación a la distribución regional del metal. En el caso de las ratas de mayor edad, se observó una distribución dependiente de la región, mientras que los neonatos presentaron un contenido homogéneo del Tl^+ en todas las regiones. La participación aparentemente activa de la barrera hematoencefálica en el transporte del Tl^+ en el parénquima cerebral sugiere una alta susceptibilidad de los efectos tóxicos del Tl^+ en función de la edad (Galván-Arzate y Ríos, 1994).

Finalmente, en nuestro estudio más reciente, se evaluaron también las concentraciones de Tl^+ en regiones cerebrales. Este se realizó en ratas adultas que recibieron dosificaciones del metal durante 30 días. Las dosis probadas fueron de 0.8 y 1.6 mg/kg de acetato de Tl^+ . De acuerdo a lo esperado, las concentraciones cerebrales más altas se observaron en los animales que recibieron la dosis más alta del tóxico. Por otro lado, de manera sorpresiva, no se encontró una distribución diferencial en las regiones cerebrales analizadas para ninguna de las

dosis empleadas; estos interesantes hallazgos pueden deberse a que los niveles detectados muestran procesos de excreción del metal de la fase de eliminación del tóxico (Galván-Arzate et al., 2000).

12. ALTERACIONES CONDUCTUALES POR TALIO

En casos de intoxicación aguda por Tl^+ la recuperación puede requerir meses y de hecho, puede no ser completa (Repetto et al., 1988). Las secuelas más comunes e importantes pueden ser mareo, falta de concentración, dolor de cabeza intenso, fallas de memoria y alteraciones emocionales frecuentemente asociadas con el decaimiento gradual de la inteligencia (Manzo y Sabbioni, 1988). Los hallazgos más comunes en niños intoxicados son anormalidades mentales y cognitivas (retardo y psicosis), reflejos anormales, ataxia y temblor (Reed et al., 1963).

Con respecto a la intoxicación subaguda o crónica, las cuales se asocian con la acumulativa retención de Tl^+ en los tejidos, se ha observado que el daño en el Sistema Nervioso Central causa cambios mentales severos, psicosis, desorientación, alucinaciones, demencia y deterioro en la función intelectual (Thompson et al., 1988). Se ha observado conducta histérica al final de la primera semana después de la ingestión. La sed excesiva y la vigilia intratable parecen deberse al efecto del Tl^+ en el SNC, más que al dolor que pueden llegar a sentir los pacientes (Cavanagh et al., 1974). También puede producirse insomnio, dolor de cabeza, ansiedad, irritabilidad y excitabilidad (Herrero et al., 1995). Se han

encontrado muchos tipos de secuelas como el retardo mental, la psicosis y los reflejos anormales (Dumitru y Kalantri, 1990).

El mecanismo más importante por medio del cual el ambiente modifica la conducta en humanos es el aprendizaje. El aprendizaje se define como el proceso de adquisición de conocimiento sobre el entorno. La memoria por su parte es la retención o almacenamiento de ese conocimiento. El estudio del aprendizaje nos permite conocer con mayor detalle las capacidades lógicas del cerebro (para adquirir y guardar información) y nos ha provisto de una poderosa herramienta para evaluar el procesamiento mental (Kupfermann, 1991). El aprendizaje puede estudiarse suministrando al sujeto experiencias de aprendizaje repetidas y observando los cambios progresivos en su desempeño. En consideración a estos antecedentes, en este trabajo se realizó una prueba conductual para evidenciar a un nivel más fisiológico, el daño por EO inducido por Tl^+ y su efecto integral sobre el organismo de los animales expuestos al metal.

JUSTIFICACIÓN

En general, la importancia de elementos traza en el ambiente como contaminantes y su impacto para la salud humana ha sido establecidos para elementos tales como fluor, arsénico y selenio, así como para metales pesados como cadmio, mercurio y plomo. Sin embargo, aún no está disponible un estudio completo que proporcione evidencia de los procesos de contaminación del Tl^+ , el cual puede representar serias consecuencias para la salud humana.

A pesar de ser un elemento altamente tóxico, el talio ha sido estudiado en un grado mucho menor que otros elementos tóxicos. Esto es principalmente debido a que el Tl^+ es difícilmente detectado por métodos analíticos convencionales que generalmente tienen menos sensibilidad por este metal que por otros elementos. Adicionalmente, la importancia económica del talio no es tan grande como la de otros elementos tales como el cromo, níquel o zinc. Sin embargo, la importancia ecotoxicológica del talio se deriva de su alta toxicidad aguda sobre los organismos vivos, comparable a la del plomo y del mercurio. Actualmente existe una creciente demanda por el Tl^+ en la tecnología de vanguardia. Más aún, desde su descubrimiento como componente de conductores de alta temperatura, el Tl^+ ha atraído una gran atención como fuente potencial de contaminación a gran escala en el futuro. Si bien la toxicidad de Tl^+ puede no tener gran importancia global por el momento, puede ser un problema suficientemente grave en ciertas regiones industriales y de ahí que sea necesario reducir sus niveles en el ambiente debido al riesgo potencial que representa para la salud pública.

En trabajos previos a este estudio hechos por diversos grupos (incluyendo el nuestro), se han investigado los efectos del talio sobre la peroxidación de lípidos y el estrés oxidativo empleando diferentes tejidos, especies animales y esquemas de administración. Los hallazgos derivados de estas investigaciones han demostrado que la toxicidad del Tl^+ se puede relacionar con la formación de especies reactivas del oxígeno, lo cual constituye un factor de riesgo importante para el daño celular, la disfunción orgánica y el impedimento de las funciones biológicas esenciales. La mayoría de estas investigaciones han probado esquemas subcrónicos o crónicos

de intoxicación; sin embargo una administración única del Tl^{+} puede presentar efectos tóxicos para el hombre aún desconocidos pero de potencial riesgo neurotóxico. Por esto, es importante realizar estudios más detallados que ayuden a esclarecer el papel del estrés oxidativo en los procesos tóxicos producido por el ingreso de este metal al organismo, y de manera simultánea caracterizar los cambios producidos en los diferentes sistemas antioxidantes, poniendo especial atención en aquellos efectos ocurridos de manera temprana pero con efectos tardíos. Para cumplir este propósito, en este trabajo se emplearon diferentes técnicas espectrofotométricas (uv-visible, fluorométricas y absorción atómica) y conductuales que pondrán en evidencia las alteraciones a los sistemas antioxidantes endógenos producidos por el talio en diferentes regiones cerebrales de rata siete días después de su administración, empleando para ello dos dosis diferentes del tóxico con fines comparativos.

II. HIPOTESIS

Dado que una parte importante de la acción tóxica del Tl^+ bajo diversos esquemas de administración es mediada a través de la generación de ERO y ERN que originan estrés oxidante, y debido a que asumimos que aún una única administración del Tl^+ a los animales podría iniciar una respuesta regional asociada al estrés oxidante, dicho proceso podrá ser evidenciado en este estudio a partir del análisis de diferentes marcadores de daño oxidativo y conductuales bajo un esquema de administración aguda del metal. De esta manera y a través del estudio de la respuesta de los sistemas antioxidantes endógenos, se caracterizarán algunos de los mecanismos específicos responsables del daño oxidativo producidos por el Tl^+ en SNC como parte de su patrón selectivo de neurotoxicidad y se correlacionarán con alteraciones conductuales mayores.

III. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del Tl^+ sobre diferentes marcadores de estrés oxidativo y las respuestas de antioxidantes endógenos en el Sistema Nervioso Central de ratas expuestas a un esquema de administración aguda y correlacionarlo con alteraciones conductuales, aportando así información esencial para la caracterización de su patrón de neurotoxicidad.

IV. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Medir los niveles de peroxidación de lípidos en diferentes regiones cerebrales de ratas (hipotálamo, cerebelo, corteza, hipocampo y cuerpo estriado) 7 días después de la administración sistémica única de acetato de Tl^+ .
- b) Analizar los niveles de GSH en las mismas regiones cerebrales y bajo las mismas condiciones experimentales.
- c) Cuantificar la actividad de la GPx y de ambas isoformas de la SOD (Cu-Zn y Mn dependientes) bajo el mismo protocolo experimental.
- d) Estimar las concentraciones de Tl^+ en diferentes regiones cerebrales propuestas en el mismo esquema experimental.
- e) Evaluar el daño producido por el Tl^+ a nivel fisiológico integrativo por medio de pruebas conductuales relacionadas a tareas motoras y de aprendizaje y su posible correlación con los datos derivados de los marcadores de estrés oxidativo.

V. METODOLOGIA

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del Departamento de Neuroquímica y Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" de la Secretaría de Salud, empleándose los reactivos, materiales y equipos de los mismos.

Asimismo, algunas determinaciones (actividades enzimáticas de SOD) se realizaron en colaboración con el Laboratorio que dirige el Dr. José Pedraza Chaverri en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

SECCION DE REACTIVOS

Todos los reactivos empleados fueron de las marcas comerciales internacionales (SIGMA, Aldrich, Mallinckrodt, etc.) y nacionales (Merck, Baker, etc.) cumpliendo con estándares de calidad de grado analítico y/o grado HPLC.

Para la elaboración de soluciones en todos los casos fue utilizada agua desionizada.

SECCION DE ANIMALES

Se emplearon ratas machos adultos de la cepa Wistar de 250 a 300 g, las cuales se administraron por vía intraperitoneal con dosis de 8 o 16 mg/kg de peso de acetato de Tl^+ (que de acuerdo a Ríos y Monroy-Noyola, 1992, corresponden respectivamente a la cuarta parte y a la mitad de la DL_{50} previamente establecida para nuestras condiciones de trabajo. Se utilizan para probar toxicidad del talio sin comprometer la sobrevivencia de los animales) o volúmenes equivalentes de

vehículo (agua desionizada) para los animales controles. Siete días después de la exposición al metal, los animales se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron por disección las siguientes regiones cerebrales: hipotálamo (Ht), cerebelo (Ce), corteza (Cx), hipocampo (Hc) y cuerpo estriado (E), siguiendo la técnica descrita por Glowinski e Iversen (1966). Las muestras de tejido obtenidas fueron procesadas inmediatamente, o bien, fueron preservadas en congelación (-70 °C) hasta su procesamiento. A partir del tejido obtenido, se realizaron las determinaciones correspondientes siguiendo el protocolo de cada técnica en particular. Animales tratados bajo las mismas condiciones fueron preservados con vida y destinados a las pruebas conductuales.

1. Peroxidación de lípidos (PL): El tejido se homogenizó en solución salina (pH 7.0), de donde se tomó una alícuota de 1 ml para el análisis de los productos lipídicos fluorescentes de la peroxidación (Triggs y Willmore, 1984), guardándose un volumen menor para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry y col. (1951). A la alícuota de 1 ml se le agregaron 4 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1). Estas muestras se agitaron y enfriaron en hielo por 30 min protegidas de la luz para que se realice la separación de fases. La fluorescencia se midió en la fase clorofórmica a una longitud de onda de excitación de 370 nm y una longitud de onda de emisión de 430 nm. Empleando para ello un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer modelo LS50B. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia por mg de proteína (Santamaría y Ríos, 1993).

2. Glutación reducido (GSH): Las muestras del tejido de las diferentes regiones cerebrales se homogenizaron en relación 9:1 (peso/vol) con amortiguador de fosfatos-EDTA + HPO_3 (al 25%). Se centrifugaron a 15,000 r.p.m. durante 15 min y el sobrenadante se empleó para evaluar los niveles de GSH siguiendo la técnica de Hissin y Hilf (1976). A 0.5 ml del sobrenadante se le agregaron 4.5 ml de amortiguador de fosfatos-EDTA y 100 μl de esta dilución se hicieron reaccionar con 1.8 ml de amortiguador + 100 μl de O-ftaldialdehído (OPA); esta nueva mezcla se incubó a temperatura ambiente y la señal de fluorescencia obtenida de la reacción se leyó a longitudes de onda de excitación de 350 nm y 420 nm de emisión. Para estas cuantificaciones se uso un espectrofotómetro de UV-VIS Perkin-Elmer modelo Lambda 20. La técnica claramente diferencia las concentraciones de GSH y GSSG debido a que las muestras se procesan por separado y para el caso de GSSG se emplea un reactivo adicional (N-etil-maleimida) además de que en las diluciones finales en lugar de amortiguador se emplea una solución de NaOH (0.1N). Los resultados se expresan como $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco tomando como referencia a una curva de calibración de concentraciones conocidas de GSH.

3. Glutación peroxidasa (GPx): Para la determinación de la actividad enzimática de la GPx se empleó la técnica reportada en 1974 por Hafeman y col. Esta técnica permite valorar de manera indirecta la actividad de GPx que después de la reacción enzimática degrada una concentración inicial conocida de GSH a una concentración final desconocida que es comparada con una curva de calibración procesada simultáneamente. El tejido obtenido se homogenizó en amortiguador de fosfatos (pH = 7.4). Se tomaron 30 μ l del homogenado y se incubaron con 0.5 ml de GSH (2 mM) + 0.5 ml de buffer de fosfatos 0.04 M (con 0.0004 M de EDTA), pH=7.0 + 0.25 ml de NaN_2 (0.01M), llevando con agua desionizada hasta un volumen final de 2 ml. Esta mezcla se agitó durante 5 min a 37°C y se le agregó 1 ml de H_2O_2 (1.25 mM) preincubado a la misma temperatura durante 3 min más. Posteriormente, se sustrajo 1 ml de la mezcla incubada y se le mezcló con 4 ml de ácido metafosfórico (1.67 g de ácido metafosfórico glacial + 0.2 g de EDTA + 30 g de NaCl), esta nueva mezcla se centrifugó a 3,500 r.p.m. durante 15 min; el GSH libre de proteínas se determinó usando 1 ml del centrifugado + 1 ml de amortiguador + 0.5 ml de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzónico). Después de 2 min, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm. . Para estas cuantificaciones se usó un espectrofotómetro de UV-VIS Perkin-Elmer modelo Lambda 20. Los resultados de actividad se expresaron como U/mg de proteína.

4. Superóxido dismutasa (SOD): La actividad total de la SOD en los homogenados de tejido se realizó siguiendo la técnica de Oberley (1984). El ensayo de inhibición competitiva se realizó usando el sistema xantina-xantina oxidasa para reducir NBT (nitroazul de tetrazolio), empleando una mezcla de reacción conteniendo una concentración final de EDTA (0.122 mM), NBT (30.6 μ M), xantina (0.122 mM), albumina de suero bovino (0.006 %) y carbonato de sodio (49 mM). A 500 μ l del homogenado (1:100) se les agregaron 2.45 ml de la mezcla antes descrita y 50 μ l de xantina oxidasa (2.8 U/l) y se incubaron a 27°C durante 30 min. La reacción se detuvo con cloruro de cobre (0.08 mM) y las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 560 nm en un espectrofotómetro UV-Visible. La cantidad de proteína que inhibió la reducción de NBT al 50 % se definió como una unidad de actividad de SOD. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína. Para medir la actividad específica de la SOD-Mn, la SOD-Cu,Zn se inhibió con DDC (dietil-ditiocarbamato). Para el ensayo de la actividad de SOD-Mn, la muestra se incubó con DDC (50 mM) a 30°C durante 1 hora y entonces se dializó por 3 h con tres cambios de 400 vol. de amortiguador de fosfatos (5 mM, pH = 7.4) y EDTA (0.1 mM). La actividad de SOD-Cu,Zn se obtuvo restando la actividad de las muestras tratadas con DDC de la actividad total de SOD previamente medida.

5. Concentración de Tl^+ en tejido: Para la cuantificación por Tl^+ por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, se colocaron las distintas regiones cerebrales en tubos de polipropileno (previamente lavados con ácido nítrico suprapur 0.5 % y enjuagados con agua desionizada), registrando el peso fresco de cada muestra. A dichos tubos se les agregaron volúmenes diferentes de ácido nítrico suprapur concentrado, dependiendo de la cantidad de tejido (0.2 ml para Ht; 0.5 ml para E y Hc, y 1.0 ml para Ce y Cx), para digerir el tejido cerebral. Se colocaron en baño maría con agitación continua a 60°C durante 60 min para acelerar la reacción. El tejido digerido se dejó enfriar a temperatura ambiente y se guardó en refrigeración hasta su análisis. El contenido de Tl^+ de cada muestra se determinó por duplicado en alícuotas de 20 μ l de las diluciones de las muestras con la solución modificadora de matriz, en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 3110 con horno de grafito HGA-600 y automuestreador AS-60. La utilización de la solución modificadora de matriz sirvió para aumentar la estabilidad térmica del talio, lo que permitió realizar las determinaciones usando temperaturas más altas en el horno de grafito, sin pérdida de material (Ríos y Galván-Arzate, 1998). Se corrieron curvas de calibración hechas a partir de una solución estándar de 1 p.p.m. de Tl^+ , de modo que las diluciones hechas para las muestras se ajustaran a los valores de nuestra curva. Los valores de concentración de Tl^+ en las muestras se expresaron como μ g/g de tejido fresco después de hacer los cálculos necesarios para tomar en cuenta la dilución de la

muestra, el volumen de ácido nítrico empleado para la digestión del tejido y el peso del mismo.

6. Aprendizaje espacial: Ratas Wistar macho de 250-300 g tratadas con vehículo o talio (8 0 16 mg/kg). Fueron valoradas siete días después de la exposición al Tl^+ , las ratas por medio de un laberinto acuático de acuerdo a los reportes previos hechos por Stewart y Morris (1993), y Castillo y col. (2000). El laberinto acuático consistió de una alberca de 1.5 m de diámetro con paredes laterales de 40 cm de alto. La alberca se llenó con agua a una temperatura entre 23 y 28°C, a la cual se le agregó leche para hacerla opaca. Se empleó una plataforma de escape de 10 cm de diámetro que se colocó en uno de los cuadrantes de la alberca y se mantuvo fija durante todas las mediciones. El nivel del agua era de 1 a 2 cm por arriba de la plataforma para cubrirla completamente. La posición del observador fue siempre la misma, aproximadamente a 1 m de distancia de la alberca. El día de habituación (día 6 después de la intoxicación) se colocó al azar a cada uno de los animales durante 1 min, dejándolos nadar libremente en la alberca (este día el agua estaba clara y no había plataforma). El día de evaluación (día 7 después de la exposición a Tl^+) se realizaron las valoraciones que consistieron en cuatro intentos para cada rata, cada uno de los cuales tenía como tiempo máximo 5 min, y la finalidad era que el animal localizará la plataforma y se subiera a ella para "escapar" del agua. Se evaluaron tres parámetros durante el ensayo del laberinto acuático: se

contó el tiempo que tardaba la rata en alcanzar la plataforma, los fracasos al no encontrar la plataforma y el número de cruces que hacía cada animal en la alberca. Para cada uno de los intentos se colocó al animal suavemente en la superficie del agua, viendo hacia las paredes de la alberca desde diferentes localizaciones alrededor de la misma, escogiendo el sitio al azar, y a partir de ahí se tomaban los cinco minutos de cada intento. Cuando la rata alcanzaba la plataforma, el cronómetro se detenía y se dejaba descansar al animal durante 30 seg. en la plataforma; si la rata no encontraba la plataforma (lo cual se contaba como fracaso), se le sacaba del agua, se le colocaba en la plataforma y se le dejaba descansar ahí durante 1 min antes del siguiente intento. Cuando el animal abandonaba la periferia de la alberca o se sumergía de un punto a otro de la circunferencia, describiendo una línea geométrica o atravesando completamente la alberca, se contaba un cruce.

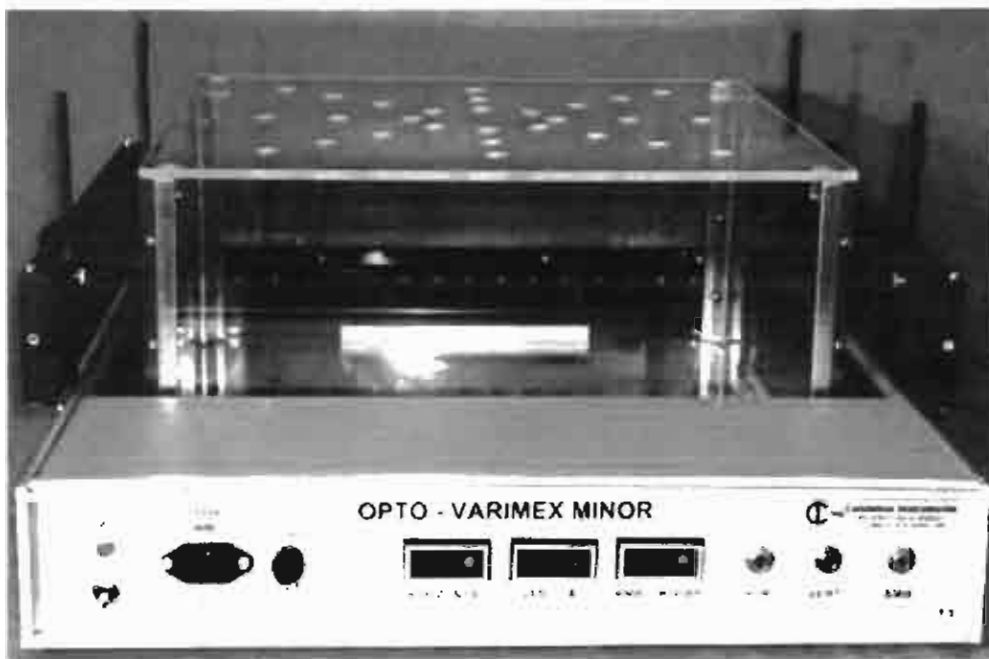
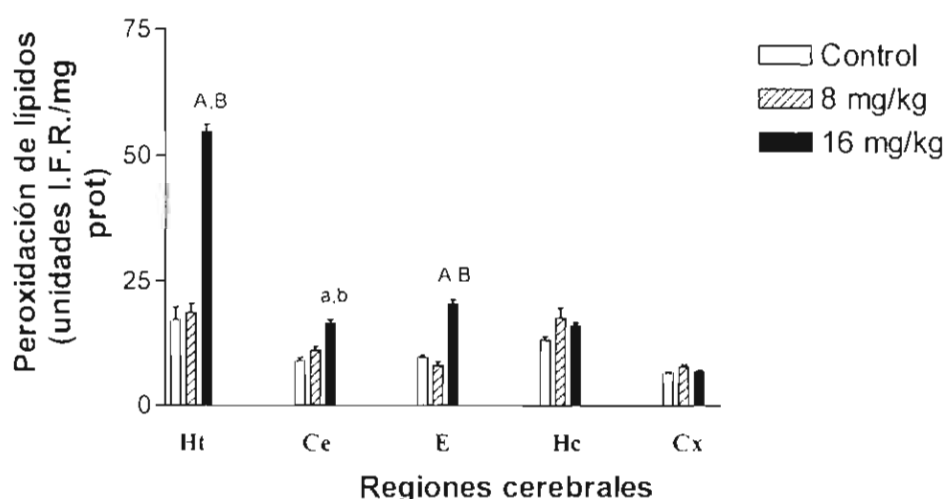


Figura 14. Fotografía mostrando el aparato para evaluar conducta del movimiento espontáneo (Electronic Motility Meter 40 Fc; Motron Products, Stockholm, Sweden).

8. Análisis estadísticos: Todos los resultados son presentados como promedio \pm S.E.M. A excepción de los datos obtenidos de las pruebas conductuales (analizadas por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y cuando fue necesario seguida de la U de Mann-Whitney), todos las demás fueron procesados por un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de una prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados con significancia estadística.

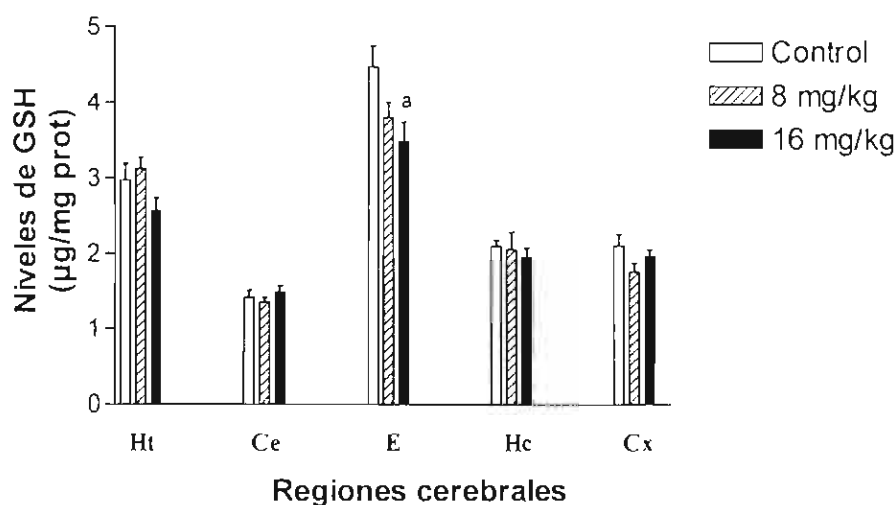
VI. RESULTADOS

1. Efecto del Tl^+ sobre la peroxidación lipídica en regiones cerebrales: La Gráfica 1 muestra el efecto del Tl^+ (8 y 16 mg/kg) sobre la PL en diferentes regiones cerebrales 7 días después de su administración. El orden de los niveles basales de PL fue el siguiente: $Cx < Ce < E < Hc < Ht$. Los resultados obtenidos con la dosis de 8 mg/kg no mostraron cambios significativos con respecto al control. Con respecto a la dosis de 16 mg/kg, el Tl^+ aumentó la PL en Ht (215 %), Ce (85 %) y E (112 %) cuando se comparan contra valores control. Los valores de PL producidos por esta dosis también resultaron significativamente más altos que aquellos generados por la dosis de 8 mg/kg en las mismas regiones.



Gráfica 1. Efecto del talio (Tl^+) sobre la peroxidación de lípidos. Las ratas recibieron agua como vehículo (controles) o una sola administración de acetato de talio (8 o 16 mg/kg) Siete días después, los animales de todos los grupos fueron sacrificados y las siguientes regiones cerebrales se obtuvieron hipotálamo (Ht), cerebelo (Ce), estriado (E), hipocampo (Hc), y corteza (Cx) La peroxidación de lípidos en las diferentes regiones cerebrales fue evaluada por un método fluorométrico. Se presentan los promedios \pm S.E M. de 6 ratas de grupos independientes. ^a($p < 0.05$) y ^A($p < 0.01$) fueron estadísticamente diferentes del control, ^b($p < 0.05$) y ^B($p < 0.01$) son diferencias entre la dosis de 16 mg/kg con respecto a la de 8 mg/kg (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey)

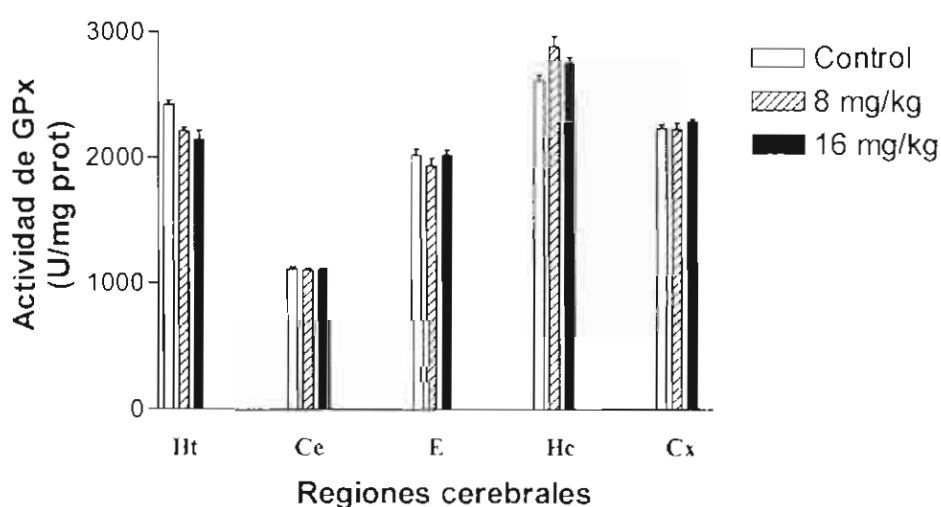
2. Efecto del Tl^+ sobre los niveles de GSH en regiones cerebrales: Los niveles de GSH en diferentes regiones cerebrales de ratas control y ratas tratadas con Tl^+ 7 días después de la administración del metal se muestran en la Gráfica 2. El orden de los niveles basales de GSH en las regiones estudiadas fue: $Ce < Hc < Cx < Ht < E$. Los niveles de GSH fueron disminuidos significativamente sólo en E (-22 %) a la dosis de 16 mg/kg, cuando se compara contra los controles. No se encontraron otras diferencias significativas.



Gráfica 2. Efecto del talio (Tl^+) sobre el contenido de GSH en regiones cerebrales de rata. Los animales recibieron agua como vehículo (controles) o una sola administración de acetato de talio (8 o 16 mg/kg). Siete días después, las ratas de todos los grupos fueron sacrificadas y las siguientes regiones cerebrales se obtuvieron: hipotálamo (Ht), cerebelo (Ce), estriado (E), hipocampo (Hc), y corteza (Cx). El contenido de GSH en las diferentes regiones cerebrales fue evaluado por un método fluorométrico. Se presentan los promedios \pm S.E.M. de 6 ratas de grupos independientes. ^a($p < 0.05$) (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey)

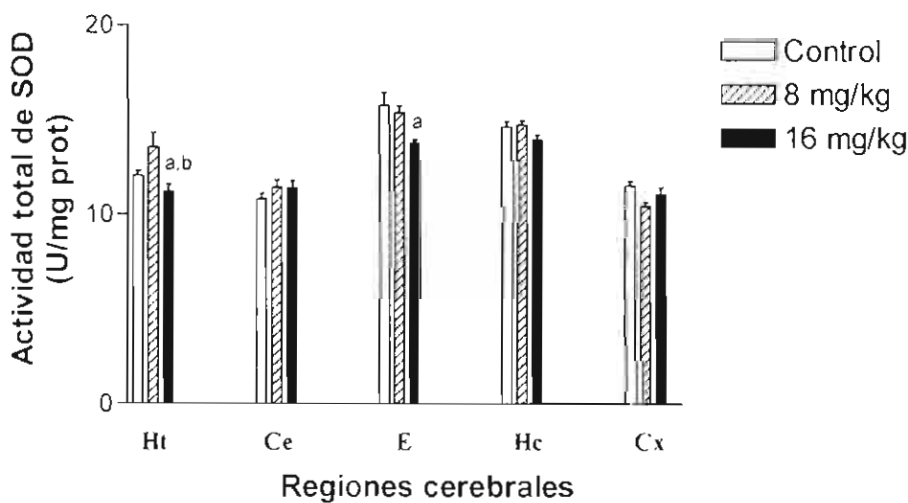
3. Efecto del Tl^+ sobre la actividad de la GPx en regiones de cerebro de rata:

El efecto de Tl^+ en la actividad cerebral regional de la GPx después de 7 días de su administración sistémica se muestra en la Gráfica 3. El orden de los niveles basales de GPx fue el siguiente: $Ce < E < Cx < Ht < Hc$. El Tl^+ no tuvo efectos significativos sobre la actividad de la GPx en ninguna de las regiones estudiadas cuando se comparó contra los valores de los animales controles.



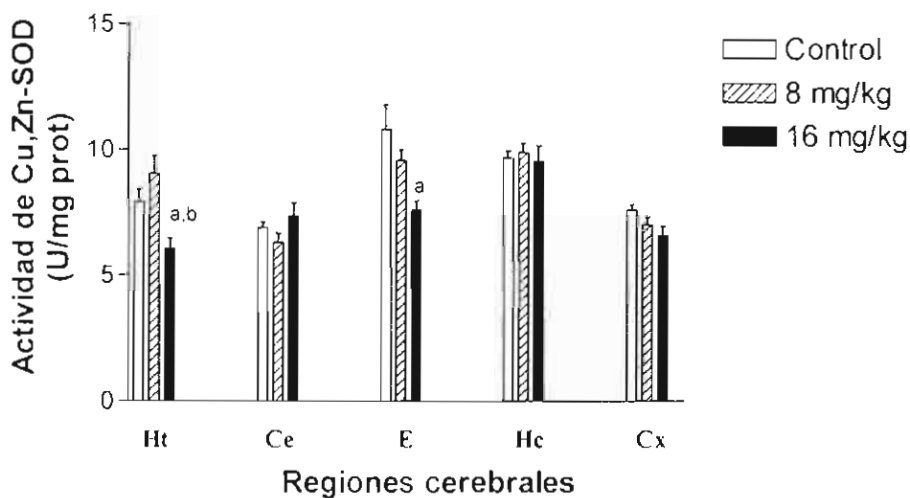
Gráfica 3. Efecto del talio (Tl^+) sobre la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en regiones cerebrales de rata. Los animales recibieron agua como vehículo (controles) o una sola administración de acetato de Tl^+ (8 o 16 mg/kg). Siete días después, las ratas de todos los grupos fueron sacrificadas y las siguientes regiones cerebrales se obtuvieron: hipotálamo (Ht), cerebelo (Ce), estriado (E), hipocampo (Hc), y corteza (Cx). La actividad de la GPx en las diferentes regiones cerebrales fue caracterizada por un método espectrofotométrico. Se presentan los promedios \pm S.E.M. de 6 ratas de grupos independientes. No se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos.

4. Efecto del TI⁺ sobre la actividad total de la SOD en regiones cerebrales de rata: La actividad total de la SOD en regiones cerebrales de ratas control y administradas con TI⁺ 7 días después de la exposición al metal se muestran en la Gráfica 4. El orden regional de actividad basal de la SOD total fue: Ce<Ht<Cx<Hc<E. Solo se encontraron diferencias significativas en la actividad total en Ht (-25 %) y E (-30 %) a la dosis de 16 mg/kg, cuando se compararon contra valores control.



Gráfica 4. Efecto del talio (TI⁺) sobre la actividad total de la superóxido dismutasa (SOD) en regiones cerebrales de rata. Los animales recibieron agua como vehículo (controles) o una sola administración de acetato de TI⁺ (8 o 16 mg/kg). Siete días después, las ratas de todos los grupos fueron sacrificadas y las siguientes regiones cerebrales se obtuvieron: hipotálamo (Ht), cerebelo (Ce), estriado (E), hipocampo (Hc), y corteza (Cx). La actividad total de la SOD en las diferentes regiones cerebrales fue evaluada por un método espectrofotométrico. Se presentan los promedios ± S.E.M de 6 ratas de grupos independientes ^a(p<0.05) fue estadísticamente diferente del control; ^b(p<0.05) corresponde a diferencias entre la dosis de 16 mg/kg con respecto a la de 8 mg/kg (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey)

5. Efecto del TI⁺ sobre la actividad de la Cu,Zn-SOD en regiones cerebrales de rata: La actividad cerebral regional de la Cu,Zn-SOD en ratas control y administradas con TI⁺ 7 días después de la exposición al metal se muestran en la Gráfica 5. Básicamente, se encontraron tendencias similares a las observados para la SOD total. El orden en los niveles basales de actividad de la Cu,Zn-SOD fue: Ce<Ht<Cx<Hc<E. Solamente se encontraron diferencias significativas en la actividad de la Cu,Zn-SOD en Ht (-25 %) y E (-30 %) a la dosis de 16 mg/kg cuando se hacen comparaciones contra el control.

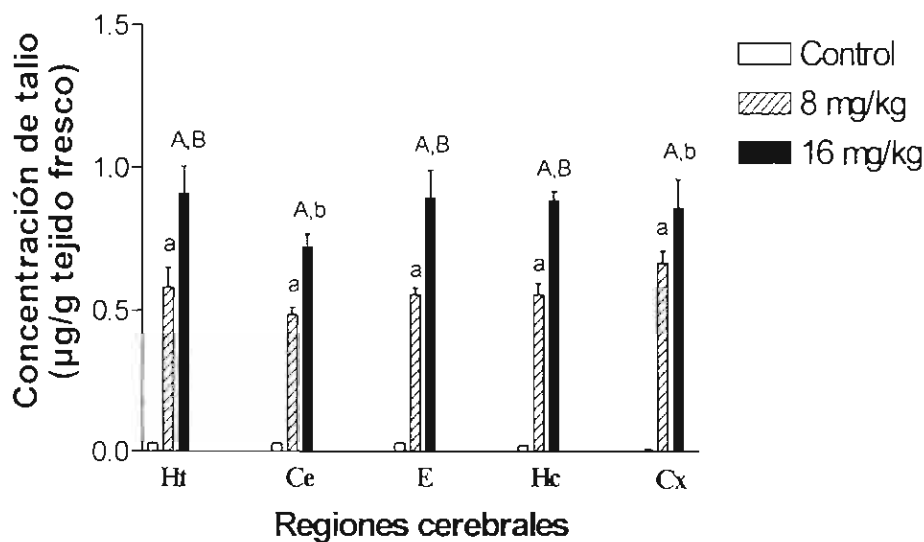


Gráfica 5. Efecto del talio (TI⁺) sobre la actividad de la superóxido dismutasa Cu,Zn dependiente (Cu,Zn-SOD) en regiones cerebrales de rata. Los animales recibieron agua como vehículo (controles) o una sola administración de acetato de TI⁺ (8 o 16 mg/kg). Siete días después, las ratas de todos los grupos fueron sacrificadas y las siguientes regiones cerebrales se obtuvieron: hipotálamo (Ht), cerebelo (Ce), estriado (E), hipocampo (Hc), y corteza (Cx). La actividad de la Cu,Zn-SOD en las diferentes regiones cerebrales fue evaluada por un método espectrofotométrico. Se presentan los promedios ± S.E M. de 6 ratas de grupos independientes. ^a(p<0.05) fue estadísticamente diferente del control; ^b(p<0.05) corresponde a diferencias entre la dosis de 16 mg/kg con respecto a la de 8 mg/kg (ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey).

No se encontraron efectos del TI⁺ sobre la actividad de la Mn-SOD en ninguna de las regiones estudiadas ni a ninguna de las dosis probadas (datos no mostrados)

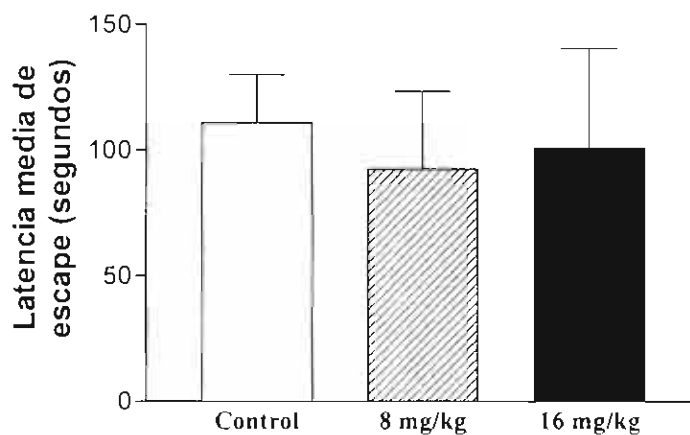
6. Efecto del Tl^+ sobre la concentración de Tl^+ en regiones cerebrales de rata:

La distribución de Tl^+ en las diferentes regiones cerebrales analizadas de los animales control y de los tratados con las dosis de 8 y 16 mg/kg de Tl^+ se muestran en la Gráfica 6. No se encontraron niveles significativos de Tl^+ en las regiones de ratas control. En contraste, todas las regiones analizadas de animales administrados con las dosis de 8 y 16 mg/kg exhibieron aumentos significativos de Tl^+ con respecto a valores control y entre sí, y estos cambios resultaron ser dosis-dependientes. Los porcentajes de aumento entre las dos diferentes dosis del metal fueron: 56 % para Ht, 49 % para Ce, 61 % para E, 29 % para Hc y 29 % para Cx. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de Tl^+ cuando se compararon las diferentes regiones entre sí dentro de una misma dosis.



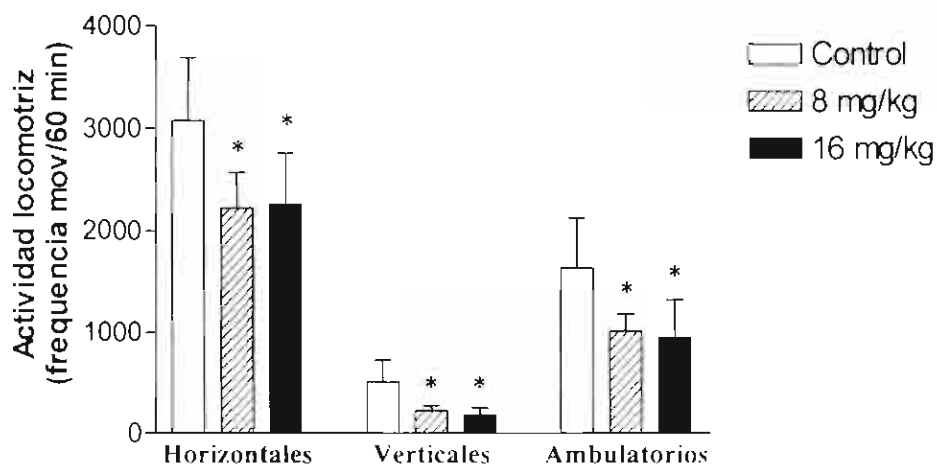
Gráfica 6 Cuantificación de la concentración regional cerebral de Tl^+ en ratas. Los animales recibieron agua como vehículo (controles) o una sola administración de acetato de Tl^+ (8 o 16 mg/kg) Siete días después, las ratas de todos los grupos fueron sacrificadas y las siguientes regiones cerebrales se obtuvieron: hipotálamo (Ht), cerebelo (Ce), estriado (E), hipocampo (Hc), y corteza (Cx). El contenido de Tl^+ fue medido por espectrofotometría de absorción atómica. Se presentan los promedios \pm S.E.M. de 6 ratas de grupos independientes. ^a($p < 0.05$) y ^A($p < 0.01$) fueron estadísticamente diferentes del control; ^b($p < 0.05$) y ^B($p < 0.01$) corresponden a diferencias entre la dosis de 16 mg/kg con respecto a la de 8 mg/kg (ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey).

7. Efecto del TI⁺ sobre el aprendizaje espacial en ratas: Ninguna de las habilidades probadas en el aprendizaje espacial de las ratas tratadas con TI⁺ (8 y 16 mg/kg) por medio del uso del laberinto acuático mostraron cambios significativos cuando se compararon con los animales control. Ni la latencia media de escape en el día siete (Gráfica 7) ni otros parámetros tales como el número de fracasos para alcanzar la plataforma / número de intentos o el número de cruces del tanque / min, resultaron afectados por la administración del tóxico a las ratas (datos no mostrados).



Gráfica 7. Efecto del talio (TI⁺) sobre la latencia media de escape de ratas como prueba de aprendizaje. Los animales recibieron agua como vehículo (controles) o una sola administración de acetato de TI⁺ (8 o 16 mg/kg). Siete días después, las ratas de todos los grupos fueron sometidas a la prueba del laberinto acuático. Se presentan los promedios \pm S.E.M. de 6 ratas de grupos independientes. Los datos se analizaron a través de un ANOVA de Kruskal-Wallis seguido por una prueba U de Mann-Whitney. No se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos.

8. Efecto del Tl^+ sobre la actividad locomotora espontánea en ratas: Se registraron tres variables locomotoras en ratas tratadas con las dos diferentes dosis de talio 8 o 16 mg/kg de Tl^+ siete días después de su administración: movimientos horizontales, verticales y ambulatorios. Las frecuencia de dichos movimientos revelaron que a las dos dosis del tóxico probadas se produce una disminución significativa en la actividad locomotora en las diferentes variables evaluadas (Gráfica 8). La frecuencia en los movimientos horizontales disminuyó en un 28% y 27% en las dosis de 8 y 16 mg/kg respectivamente cuando se compararon contra los animales controles, mientras que en el caso de los movimientos verticales la disminución encontrada fue de 56% y 64% respectivamente. La actividad ambulatoria también disminuyó en un 38% y 41% respectivamente.



Gráfica 8 Efecto del talio (Tl^+) sobre la frecuencia de movimientos espontáneos horizontales, verticales y ambulatorios en ratas. Los animales recibieron agua como vehículo (control) o una sola administración de acetato de Tl^+ (8 o 16 mg/kg). Siete días después, las ratas de todos los grupos fueron evaluadas durante 60 min. Para valorar los movimientos espontáneos, se empleó el equipo automatizado Electronic Motility Meter 40 Fc. Se presentan los promedios \pm S.E.M. de 6 ratas de grupos independientes. * ($p < 0.05$) fue estadísticamente diferente del control. Se realizó un ANOVA Kruskal-Wallis seguido de una prueba U de Mann-Whitney.

VII. DISCUSION

Hallazgos generales

En este trabajo se caracterizó el perfil de actividad de diversos antioxidantes endógenos y la consecuente ocurrencia de marcadores de estrés oxidante en diferentes regiones cerebrales de ratas 7 días después de un esquema de exposición única al acetato de talio en dos dosis diferentes. Se observaron alteraciones selectivas a nivel regional destacando aquellas del estriado, sugiriendo que aún cuando los animales fueron expuestos a una sola administración del metal, éste tuvo secuelas bioquímicas que podrían resultar eventualmente en graves alteraciones a los sistemas de defensa antioxidante, tanto en su actividad como en su expresión (por probar en el futuro). Adicionalmente, aún cuando moderadas, estas alteraciones pueden relacionarse con el déficit conductual en los animales intoxicados con Tl^+ , evidenciado como una disminución en la actividad motora o patrón hipocinético, un índice fisiopatológico que nos habla de la integridad de los sistemas de neurotransmisión y su afectación por agentes tóxicos que alteran el SNC. La relación establecida entre los criterios bioquímicos y los conductuales nos arroja una interesante observación: la respuesta tardía de algunas regiones del cerebro (en términos de su capacidad de hacer frente al estrés oxidante) debido a la toxicidad aguda del Tl^+ . Los elementos que sustentan esta hipótesis son discutidos más adelante.

Es importante señalar que a partir de estos resultados podemos considerar puntos importantes para la continuación de este proyecto: al inicio del mismo se

observó una gran mortalidad al probar la dosis de 32 mg/kg (datos no mostrados) por lo que su empleo dificultaría obtener suficientes datos con dicha dosis, por lo cual puede obviarse en la realización de futuros estudios. Con respecto a la dosis de 8 mg/kg, no encontramos suficiente potencia pro-oxidante del metal, por lo que puede considerarse de poca utilidad en futuros estudios bioquímicos, pero debido a que sí fue capaz de generar cambios en los estudios conductuales puede postularse como una dosis útil en bioensayos conductuales.

Por su parte, la dosis de 16 mg/kg mostró una potencia oxidante aceptable para nuestras condiciones de trabajo, además de que el número de muestras que pudimos reunir fue el necesario para nuestros fines, por lo que se considera como la dosis ideal a emplear para las siguientes etapas de evaluaciones bioquímicas de este proyecto, al mismo tiempo que proporcionó datos interesante en las pruebas conductuales.

Las dos dosis de Ti^{+} usadas en este trabajo son menores a las estimadas en ciertas regiones del mundo como el área Lanmuchang en China, en donde la ingesta promedio en humanos (establecida para un adulto con peso promedio de 70 kg) es superior a 27 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, que es 50 veces superior al rango de ingesta del metal (0.04 $\mu\text{g}/\text{día}$) en personas que viven en lugares libres de contaminación de fondo con talio. Este alto rango de ingesta también es 1000 veces mayor que el promedio mundial diario (2 $\mu\text{g}/\text{día}$) indicado por Sabbioni et al., 1984, y de igual manera se encuentra muy por encima de la dosis de referencia oral de 0.056 mg/día proporcionada por RAIS (Risk Assesment Information System) en el 2003. De acuerdo a un reporte de la EPA (Environmental Protection Agency) de 1992 en

los Estados Unidos el valor límite promedio para Tl^+ en el aire para un lugar de trabajo es de 0.1 mg/m^3 en el contexto de que cualquier exposición adicional sobre piel puede ser peligrosa (Repetto et al., 1988). Estos datos deben considerarse seriamente, ya que como se muestra en este trabajo, aún dosis menores bajo esquemas de administración única pueden provocar alteraciones fisiológicas.

Talio y estrés oxidativo

El primer elemento caracterizado en el presente trabajo fue el proceso de peroxidación de lípidos (PL) como marcador general de daño oxidante sobre las membranas celulares, tanto de neuronas como de glía. La PL producida en distintas regiones cerebrales de ratas expuestas a las dos diferentes dosis de Tl^+ revelaron la susceptibilidad preferencial de Ht, Ce y E a estos eventos (Gráfica 1). A este respecto, nuestros hallazgos pueden relacionarse con resultados previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo (Galván-Arzate et al., 2000) en relación directa al aumento en la PL observado en la mayoría de las regiones cerebrales estudiadas comparándolas contra las de animales control empleando dosis diferentes de Tl^+ (0.8 y 1.6 mg/kg) bajo un esquema de administración diferente (30 días) En este caso el proceso crónico de intoxicación evidenció la capacidad prooxidante del metal. De manera similar a la observada con el talio, existen diferentes reportes que establecen la capacidad de otros metales para generar estrés oxidativo medido por su capacidad de aumentar la PL. En el caso del arsénico, existen evidencias recientes de la inducción de estrés oxidativo en el cerebro de ratas crónicamente administradas con dosis bajas de arsénico en el

agua de bebida, en donde el aumento en la PL está acompañado de la reducción de actividad de algunas enzimas antioxidantes (Rodríguez et al., 2003). De manera similar, se ha establecido que uno de los efectos producidos por el cadmio es el aumento en la PL (Méndez-Armenta et al., 2003). La intoxicación con cadmio aumenta los niveles de PL en diferentes órganos, incluyendo el cerebro en animales adultos. Por su parte, los animales jóvenes son más susceptibles al cadmio y consecuentemente más sensibles a los efectos dañinos del metal debido a que la barrera hematoencefálica no está totalmente desarrollada. La actividad de los sistemas de defensa antioxidante también es inhibida o disminuida en ratas en desarrollo expuestas a cadmio (Méndez-Armenta et al., 2003).

La PL es un proceso que afecta los componentes lipídicos de las membranas celulares del SNC, produciendo cambios en sus propiedades fisicoquímicas y una eventual disminución en sus funciones, interrumpiendo así la conducción nerviosa, el proceso de liberación de neurotransmisores, la actividad de receptores y las funciones de canales iónicos, y llevando eventualmente a la muerte celular. Aunque la PL es un proceso que ocurre espontáneamente en el cerebro y otros órganos como parte de los procesos de envejecimiento celular, ésta se expresa como un fenómeno patogénico cuando la formación de las ERO es exacerbada y no puede ser controlada por los sistemas antioxidantes endógenos. Como evento de daño, la PL ha sido involucrada en diversas enfermedades neurodegenerativas tales como Parkinson, Alzheimer, Huntington, ELA, etc., así como también en exposiciones ambientales a metales, radiación UV, y agentes químicos (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Por su parte, el GSH, el antioxidante endógeno no enzimático más importante del cerebro, es requerido para una gran variedad de reacciones biosintéticas en las células de mamíferos (Meister y Anderson, 1983); entre los procesos celulares normales se incluyen transporte de aminoácidos y detoxificación de xenobióticos (Cossum y Rickert, 1987), así como la ya mencionada participación como protector contra daño pro-oxidante (Kinuta et al., 1989). Existen reportes que indican que el GSH no se encuentra distribuido de manera homogénea en el cerebro, de hecho ni siquiera entre los diferentes componentes celulares; la distribución desigual entre la glía y las neuronas del SNC cambian marcadamente la percepción de los mecanismos de estrés oxidativo en las poblaciones celulares que son blanco de xenobióticos. El cuerpo celular neuronal contiene menores niveles de GSH mientras que las concentraciones en astrocitos, epéndimo, oligodendrocitos y células endoteliales vasculares son relativamente altas (Lowndes et al., 1995). Similarmente, la capacidad del tejido nervioso para conjugarse enzimáticamente el GSH a varios sustratos está distribuida heterogéneamente por región, tipo celular y organelo (Abramovitz et al., 1988).

Al Ti^{+} se le ha atribuido una gran afinidad por los grupos SH, lo cual se utiliza para explicar parte de su toxicidad (Hasan y Haider, 1989). Reportes previos establecen una disminución en la concentración de GSH en diferentes tejidos de roedores (Aoyama et al., 1988), pero existe controversia sobre la importancia del GSH en la toxicidad del Ti^{+} debido a que para órganos como el riñón, aparentemente no existe una relación directa entre la nefrotoxicidad producida por el metal y las concentraciones de GSH (Appenroth y Winnfeld, 1999)

Recientemente (2004), Villaverde et al. encontraron que en condiciones *in vitro* el Tl^+ afecta el sistema de defensa antioxidante dependiente del GSH, al menos en cuatro niveles: este metal reduce la cantidad de GSH, principalmente debido a su oxidación; en condiciones normales los niveles de GSH son restaurados por la acción de la glutatión reductasa (GRed), lo cual es impedido por el Tl^+ . Este metal también limita la detoxificación del hidroperóxido a través de la inhibición de la enzima GPx, y finalmente reduce la cantidad de NADPH, un cofactor de un gran número de otras enzimas oxido-reductasas. De este modo, hasta la fecha no ha quedado completamente establecido el efecto del talio sobre los niveles de GSH cerebrales.

En nuestro caso, empleando dosis de Tl^+ de 8 y 16 mg/kg, no se encontraron cambios en las concentraciones de GSH en las diferentes regiones estudiadas; únicamente encontramos diferencias significativas al comparar la dosis de 16 mg contra el control en el E (Gráfica 2). Estos cambios discretos pueden explicarse por las diferencias previamente mencionadas en cuanto a concentración, utilización y manejo específico que las diferentes regiones cerebrales hacen del GSH en base a su composición celular. Podemos sugerir que no encontramos elementos que nos hagan suponer una gran participación del sistema de defensa del GSH contra la neurotoxicidad producida por el talio en este estudio.

Por otra parte, la glutatión peroxidasa (GPx) reduce hidroperóxidos a través del tripéptido GSH. Consiste de una triada catalítica constituida por selenocisteína, glutamina y triptófano. El grupo selenol de la selenocisteína es activado cuando se une a un hidrógeno reactivo de un H_2O_2 u otros hidroperóxidos solubles. La

peculiaridad de la GPx es que en presencia de GSH, reduce hidroperóxidos sin la generación de radicales libres. Bajo el esquema de tratamiento sistémico con una sola administración de dosis de talio de 8 o 16 mg/kg no se encontraron cambios significativos en la actividad de GPx en las diferentes regiones cerebrales estudiadas (Gráfica 3). Únicamente encontramos tendencias al cambio al comparar los tratamientos contra el control para el caso de las regiones Ht y Hc con la dosis de 8 mg/kg de talio. Estos ligeros cambios pueden explicarse por las diferencias en cuanto a concentración, utilización y manejo específico que las diferentes regiones cerebrales hacen de la enzima GPx en base a su composición celular.

Con respecto a los resultados obtenidos para la actividad de la superóxido dismutasa realizando tres valoraciones (SOD-total (Gráfica 4), SOD-manganeso dependiente y SOD-Cu,Zn dependiente (Gráfica 5)), encontramos sólo algunos cambios significativos. Para la SOD-total se encontraron diferencias significativas al comparar la dosis de 16 mg/kg Tl^+ contra el control en las regiones Ht y E. También se observó una diferencia significativa cuando se compararon las dos dosis en el Ht. Para el caso de la SOD-Cu,Zn (que es el tipo citosólico) también se observaron cambios significativos en Ht y E, al comparar contra el control. De igual manera se encontraron cambios cuando se compararon las dos dosis de Tl^+ en el Ht. Finalmente para las regiones Hc y Cx no se encontraron diferencias que resultaran ser significativas en ninguno de los casos de la SOD, a pesar de observarse ligeros cambios.

Podemos mencionar que no encontramos elementos que nos hagan suponer una participación determinante del sistema de defensa de la GPx contra la

neurotoxicidad producida por el Tl^+ en este estudio, pero los datos sugieren que la SOD, y especialmente la SOD-Cu,Zn, está relacionada a los procesos oxidativos producidos por las diferentes dosis de Tl^+ , especialmente la más alta. Estos resultados son muy interesantes, ya que establecen la relación de los procesos de daño (generación de especies reactivas) asociados al Tl^+ con daño bioquímico directamente ligado con el estrés oxidativo. A pesar de que directamente estas alteraciones no las podemos relacionar con cambios conductuales, lo que si podemos afirmar es que el mal funcionamiento de la SOD por mutaciones se ha asociado a padecimientos neurodegenerativos tales como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) Familiar (Fridovich, 1998). Dicho reporte establece que el reemplazo de 50 diferentes aminoácidos en la secuencia de la proteína encontrado en pacientes con ELA y las actividades de esta enzima mutante se encuentran entre 0.1 a 100% con respecto a lo normal. Este rango de actividades, así como la dominancia genética de la ELA ocasionan el siguiente problema: la actividad de la SOD presenta una ganancia tóxica de la función que posteriormente se pierde (Fridovich, 1998).

El Tl^+ , bajo nuestro esquema experimental, tuvo un comportamiento diferente al reportado para otros metales. Se sabe que el arsenito administrado en forma aguda inhibe la glutatión reductasa (GRed) y disminuye el nivel intracelular del GSH, mientras que su ingesta crónica reduce la actividad antioxidante de la SOD y de la GPx (Rodríguez et al., 2003). Con respecto al cadmio, se ha reportado que en ratas en desarrollo intoxicadas se inhibe la actividad de la GRed y de la SOD (Méndez-Armenta et al., 2003).

Concentraciones de talio en el cerebro

En este trabajo también se demostró la acumulación de Tl^+ en las diferentes regiones cerebrales analizadas comparando dos dosis diferentes del tóxico (8 y 16 mg/kg). Las cuantificaciones corresponden a tejido obtenido de animales sacrificados siete días después de haber sido intoxicados con Tl^+ . Los niveles encontrados son menores a los reportados por nosotros en trabajos previos (Ríos et al. 1989; Galván-Arzate et al., 2000), analizando dosis de Tl^+ mayores (16 y 32 mg/kg de peso) y a diferentes tiempos (3, 6 18 y 24 hrs), lo cual puede explicarse principalmente por los procesos de excreción del organismo.

Los resultados de concentración (Gráfica 6) en las diferentes regiones cerebrales que corresponden a la dosis de 8 mg/kg se encuentran en promedio en 0.55 $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco, y no se evidencian diferencias al analizar la concentración entre las regiones cerebrales. Con respecto a la dosis de 16 mg/kg, el promedio de concentración cuantificada en las diferentes regiones es de 0.9 $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco. El grupo de la dosis mayor mostró el mismo comportamiento que el observado para el grupo administrado con 8 mg/kg de acetato de talio, por lo que en la acumulación del metal por regiones no hubo diferencias significativas. Estos hallazgos son similares a los reportados previamente por nosotros (Galván-Arzate et al., 2000), en donde no encontramos diferencias de concentración entre las regiones (se describió una distribución homogénea del tóxico en todas las áreas), pero sí observamos una respuesta en la concentración dependiente de la dosis debida al tratamiento administrado a los animales. A partir de nuestros trabajos previos (Ríos et al. 1989;

Galván-Arzate et al., 2000), sabemos que después del tercer día de intoxicación, los niveles detectados del metal en diferentes regiones cerebrales disminuyen y se reducen las diferencias de concentración que existen entre ellas, en comparación al primer día, lo cual es debido principalmente a los procesos de eliminación, por lo que sugerimos que siete días después, como es en este caso, este comportamiento se mantiene.

Nuestros resultados también sugieren un efecto tóxico tardío del metal en el cerebro, tanto en términos de daño oxidativo como en los cambios moderados en los antioxidantes endógenos, siendo más evidentes en el caso de la dosis más alta. Nosotros sugerimos que esta respuesta tardía puede ser el resultado de niveles residuales de Tl^+ en el cerebro. Se sabe que debido al gran volumen de distribución del metal (de 3.6 a 5.6 L/Kg en humanos), la vida media de eliminación es larga. La vida media estimada en humanos reportada es muy variable, con rangos de 1 a 3 días en dosis bajas y de 1 a 1.7 días durante terapia clínica intensiva después de la ingestión de una dosis potencialmente letal. Sin embargo, otros estudios dan un período de vida media de eliminación de 8 a 30 días, debido a que existen tejidos de depósito como la grasa y el hueso que permiten la permanencia del metal en el organismo (Repetto et al., 1988). A pesar de esto, la selectividad regional en los cambios observados (especialmente los de PL, GSH, y actividad de SOD-Cu,Zn), afectando principalmente Ht y E, puede estar reflejando una acumulación preferencial del tóxico en estas regiones durante los estadios tempranos de exposición

La evidencia presentada de que el E resultó la región más afectada en algunos de los marcadores bioquímicos evaluados (datos consistentes con los reportes previos de Hasan y Ali, 1981; Brown et al., 1985 y Galván-Arzate et al., 2000), revela la peculiar vulnerabilidad de tal región cerebral al efecto tóxico del metal, lo cual es un hallazgo relevante a la luz de las funciones integrativas a nivel neuroquímico y conductual de esta región. Lo anterior se apoya en estudios que establecen que entre las estructuras cerebrales que se encargan de determinar cuando deben activarse los diferentes programas que controlan las necesidades esenciales de locomoción, postura, respiración, movimiento de los ojos, alimentación, masticación, deglución y conductas motoras reproductivas, los ganglios basales, y en particular su capa de entrada, el estriado, tiene un papel fundamental en la actividad motora. Existe evidencia convincente de que el estriado juega un papel prominente en la selección de la conducta motora (Grillner et al., 2005). A simple vista no observamos ninguna alteración mayor en la conducta de nuestros animales, pero interesantemente al realizar los estudios conductuales se encontraron alteraciones que pueden asociarse a los efectos tóxicos producidos por el Tl^{+} sobre el E. Dichos resultados se comentan más adelante.

Los cambios discretos producidos por el Tl^{+} en términos generales en estos marcadores en las otras regiones sugieren una respuesta limitada del cerebro al insulto tóxico moderado de una sola administración del metal. lo que nos lleva a hipotetizar que bajo las condiciones empleadas en este trabajo el cerebro aún no necesita activar muchos de sus sistemas antioxidantes para encarar los efectos del tóxico.

Con respecto al Ht fue interesante encontrar cierta relación entre la PL y la disminución de la actividad de SOD-Cu,Zn. Nosotros sugerimos que la susceptibilidad de Ht a las especies reactivas del oxígeno puede ser al menos parcialmente debida a la falta de protección de esta región por la barrera hematoencefálica (Ríos et al., 1989; Galván–Arzate y Ríos, 1994), lo que la hace más vulnerable al cruce libre de moléculas tóxicas. En contraste, la posible explicación para todas aquellas regiones que resultaron menos alteradas por los efectos tóxicos del metal puede ser relacionada por un lado a la efectividad de sus sistemas antioxidantes bien preservados, o bien a su caracterizada tendencia a acumular menos Tl^+ (particularmente para el caso de Cx), como se mencionó en relación a trabajos reportados previamente por nuestro grupo (Ríos et al., 1989; Galván–Arzate y Ríos, 1994).

En términos generales, se requieren estudios adicionales que aclaren con mayor detalle el efecto de Tl^+ sobre los sistemas de defensa antioxidante, ya que sus alteraciones podrían parcialmente contribuir al daño oxidativo que ha sido asociado a la toxicidad de este metal. A través de estos mecanismos, el Tl^+ puede causar sus principales síntomas de envenenamiento (alopecia, cardiomiopatía, nefrotoxicidad y neurodegeneración), y todas estas patologías pueden relacionarse a cambios en el balance del metabolismo de GSH (Villaverde et al .2004).

Talio y conducta

A pesar de los reportes clínicos y evidencias que sugieren alteraciones conductuales (Manzo y Sabbioni, 1988) y daño en diferentes grados a nivel cognitivo, tanto en la memoria como en el aprendizaje de personas intoxicadas con Tl^{+} (Thompson et al., 1988), así como las secuelas importantes que muchas veces no logran superarse (Repetto et al., 1988), bajo nuestras condiciones experimentales y para el caso específico de la medición del aprendizaje de ratas intoxicadas con talio empleando la valoración del laberinto acuático no encontramos evidencias que sugieran alteraciones conductuales directamente relacionadas con el aprendizaje. A este respecto, es necesario ampliar esta parte del trabajo, ya que generalmente los estudios donde se evidencia más claramente la posible afectación sobre aprendizaje incluyen el uso de administraciones de dosis mayores o crónicas del agente tóxico. Adicionalmente esta herramienta permite valorar daño sobre los procesos de memoria y que no fueron considerados para este diseño experimental, pero que deben realizarse en un futuro.

Los dos grupos tratados tuvieron latencias promedio similares a las del grupo control para llegar a la plataforma (Gráfica 7). Los tiempos en los que los diferentes grupos alcanzaron la plataforma nos muestran comportamientos parecidos en todos los animales y una capacidad semejante de aprender, ya que prácticamente todos fueron exitosos en encontrar la plataforma. Adicionalmente, se observó una disminución en el número de fracasos de las ratas experimentales de manera concordante con el de los animales control (datos no mostrados), así como un aumento en el número de cruces que hacían todos como parte de la búsqueda de la

plataforma, y finalmente, una disminución evidente en las latencias al realizar los diferentes intentos para alcanzar la plataforma (datos no mostrados).

La falta de cambios en los parámetros del aprendizaje espacial evaluados en este estudio sugieren que la administración única de Tl^+ a ratas a las dos dosis probadas no tuvo ningún efecto tóxico, lo que implica que los mayores sistemas de neurotransmisión relacionados con las funciones cerebrales de aprendizaje aún permanecen, al menos en este punto, sin daño aparente. Es muy común que en otros reportes empleando el laberinto acuático de Morris, los cambios observados por otros agentes tóxicos, como los pesticidas endosulfán y paratión (Castillo et al., 2002), así como los metales arsénico (Rodríguez et al., 2003) y el plomo (García-Arenas et al., 2004), se relacionen a lesiones a nivel hipocampal a través de alteraciones de vías de neurotransmisión colinérgicas y serotoninérgicas. En este estudio, en donde el Hc no presentó cambios importantes en los parámetros de daño oxidativo, el no hallar cambios al evaluar aprendizaje concuerda con nuestros hallazgos bioquímicos. Sin embargo, estos datos experimentales no deben considerarse concluyentes en cuanto a que la intoxicación con talio no produce ningún daño en la capacidad de aprendizaje, ya que hay que tomar en cuenta que se trata de un modelo animal en el que se trabajó con un número reducido de animales empleando una administración única, por lo que no deben dejarse de lado los reportes clínicos que certifican severos daños y alteraciones importantes en la conducta y comportamiento, así como funciones tan finas como la capacidad verbal disminuida en pacientes intoxicados con talio (McMillan et al., 1997).

Con respecto a la valoración de movimientos espontáneos, sí encontramos cambios cuando se compararon a los animales intoxicados con talio contra los animales control. En las tres valoraciones realizadas (movimientos horizontales, verticales y ambulatorios) se observaron disminuciones significativas (Gráfica 8), siendo aún más marcadas las correspondientes a los movimientos verticales. Los cambios observados en los animales quizá guarden relación con los síntomas neurotóxicos descritos en pacientes intoxicados de manera aguda o crónica con talio, que incluyen ataxia progresiva, psicosis con paranoia, depresión, agresividad, alucinaciones y secuelas coreiformes (Brown et al., 1985).

Las alteraciones locomotoras en general son indicativas de funciones integrativas afectadas en el SNC principalmente como resultado de daño celular. A pesar del hecho de que el déficit locomotor observado en los animales tratados con Tl^+ es un indicador de cierto nivel de daño celular o bien de alteraciones de vías neuroquímicas específicas, la cuestión que queda por esclarecer es si el patrón hipocinético observado siete días después de la administración única del Tl^+ es un primer estadio de toxicidad o si es meramente el resultado de la progresión desde un estado hiperkinético preliminar, ya que se ha demostrado que un patrón de hipoactividad puede variar y puede cambiar fácilmente a hiperactividad (y viceversa) en modelos excitotóxicos en los cuales se ha evaluado la actividad locomotora (Borlogan et al., 1997), hecho que debe valorarse a mayor detalle posteriormente.

Mecanismos de toxicidad del talio

El mecanismo preciso de toxicidad del talio aún no es claro. Hasta ahora se sabe que, como muchos otros metales pesados, el talio se une a los grupos sulfhidrilo de las proteínas y de las membranas mitocondriales, inhibiendo así una serie de reacciones enzimáticas y conduciendo a un "envenenamiento" generalizado. De esta manera, entre los posibles mecanismos tóxicos del Tl^+ se incluyen la formación de complejos con proteínas que contienen grupos sulfhidrilo, la inhibición de la respiración celular, la interacción con riboflavinas y cofactores de las riboflavinas, así como la alteración de la homeostasis del calcio (Peter y Viraraghavan, 2005).

Otra de las propuestas para explicar la toxicidad de este metal es su bien conocida interferencia con todos los procesos vitales dependientes del potasio (Galván-Arzate y Santamaria, 1998). El Tl^+ sustituye al potasio en muchas reacciones bioquímicas debido a la similitud del radio iónico de ambos elementos, los cuales son 0.147 y 0.133 nm, respectivamente. Así, el Tl^+ produce alteraciones en los procesos fisiológicos normales tales como la neurotransmisión y la excitabilidad muscular (Repetto et al., 1988). La taquicardia, la hipertensión y ciertos desórdenes digestivos han sido interpretados como disfunciones neurogénicas relacionadas al daño tóxico del nervio vago del Tl^+ . La acción directa del metal en el miocardio y en el músculo de los intestinos grueso y delgado ha sido ampliamente documentada (Hasan y Ali, 1981).

Adicionalmente, algunas proteínas dependientes de K^+ presentan más afinidad por el Tl^+ que por el mismo K^+ . La piruvato cinasa (PK) un complejo

enzimático glicolítico es fuertemente inhibido por altas concentraciones de Tl^+ , posiblemente debido a la formación del complejo Tl^+ -ADP. El Tl^+ se une a la ATPasa Na^+/K^+ con una afinidad 10 veces mayor que el K^+ , mostrando inhibición a altas concentraciones del metal (Repetto et al., 1988). Esto conduce a la acumulación del Tl^+ en la célula a expensas del K^+ , impidiendo así la regulación osmótica y la generación del potencial de gradiente electroquímico responsable de la excitabilidad eléctrica de las células nerviosas y de la generación de la energía libre (Mulkey y Oehme, 1993). La inhibición de la ATPasa Na^+/K^+ causa "hinchazón" mitocondrial y vacuolización, que es un hallazgo común en microscopia electrónica de neuronas después de una intoxicación con Tl^+ . La acumulación activa del metal también desacopla la fosforilación oxidativa mitocondrial (Repetto et al., 1988).

A bajas concentraciones, el Tl^+ activa otras importantes enzimas dependientes de K^+ tales como la fosfatasa, la homoserina deshidrogenasa, L-treonina deshidratasa y la AMP desaminasa. Sin embargo, su presencia causa desestabilización progresiva y daño irreversible a ribosomas, inhibiendo la síntesis de proteínas y previniendo la queratinización, que en su momento contribuye a la alopecia (Repetto et al., 1988).

Talio y apoptosis

Como un importante mecanismo de inicio para la deleción celular en respuesta a estímulos fisiopatológicos, la apoptosis (o muerte celular programada) puede ser responsable de la muerte neuronal durante el metabolismo de agentes químicos que estimulan la generación intracelular de las ERO. La evidencia sugiere que las ERO, las cuales son generadas en cantidades traza por todas las células aeróbicas, pueden tener un papel activo en la mediación de la muerte celular por apoptosis, lo cual le confiere a las ERO un carácter tóxico adicional al clásicamente aceptado de generar estrés oxidativo: su capacidad de constituirse como moléculas de señalización de factores de transcripción pro-apoptóticos. En apoyo a esta idea, se ha reportado que los antioxidantes son capaces de bloquear la apoptosis, así como de prevenir la muerte celular por la expresión de el *Bcl2*, un proto-oncogen al cual se le ha atribuido la capacidad de suprimir las ERO celulares (Tsang et al., 1996).

Adicionalmente, en el SNC, se expresa constitutivamente el factor NF- κ B, tanto en neuronas como en glía. Aunque este factor algunas veces se describe como un agente de sobrevivencia, más bien constituye una molécula iniciadora pro-apoptótica. La liberación de este factor desde el dominio citosólico, donde normalmente permanece unido a su proteína de unión citosólica I κ B- α , puede provocarse por diferentes estímulos, incluyendo el estrés oxidativo, isquemia, depositación de β -amiloide y excitotoxicidad. Una vez que NF- κ B es translocado hacia el núcleo, se dispara una cascada de respuestas tóxicas (incluyendo

aquellas relacionadas con la activación de genes apoptóticos específicos), conduciendo así hacia la apoptosis y a la destrucción selectiva de neuronas (Santamaría et al., 2005).

Recientemente se ha reportado que el Tl^{+} es capaz de inducir la detención del ciclo celular y la apoptosis celular en células cultivadas de glioma C6. La exposición de estas células al Tl^{+} disminuyó la viabilidad celular. Así mismo, la incubación de las células a concentraciones μM detuvo la progresión del ciclo celular en la fase G(2)/M y causó apoptosis. La detención de G(2)/M fue asociada a una disminución en la expresión de la proteína CDK2 y a una desregulación de p53 y del inhibidor para CDK p21 (Cip 1). El talio no alteró los niveles de las proteínas ciclina A y B; ciclina D1, D2, y D3; y la expresión de CDK4 en las células del glioma C6. La incubación de las células con Tl^{+} sobre-regula la expresión de las proteínas pro-apoptóticas Bad y Apaf y sub-regula la expresión de proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL y Bcl-2. El impedimento de la progresión del ciclo celular puede disparar la activación de las vías mitocondriales y cambiar el balance en la familia de Bcl-2 a través de los miembros pro-apoptóticos, promoviendo la formación del apoptosoma y consecuentemente la apoptosis (Chia et al., 2005).

No debe dejar de reconocerse que dentro de la complejidad de la intoxicación producida por el talio, la peroxidación no es ni el único ni el más importante de los factores de daño, pero a manera de resumen se esquematizan algunos de los que se conocen hasta la fecha (Figura 15)

Es evidente que se requieren estudios más detallados tendientes a caracterizar los mecanismos de toxicidad del talio en el Sistema Nervioso y la participación del estrés oxidativo como mecanismo de daño celular.

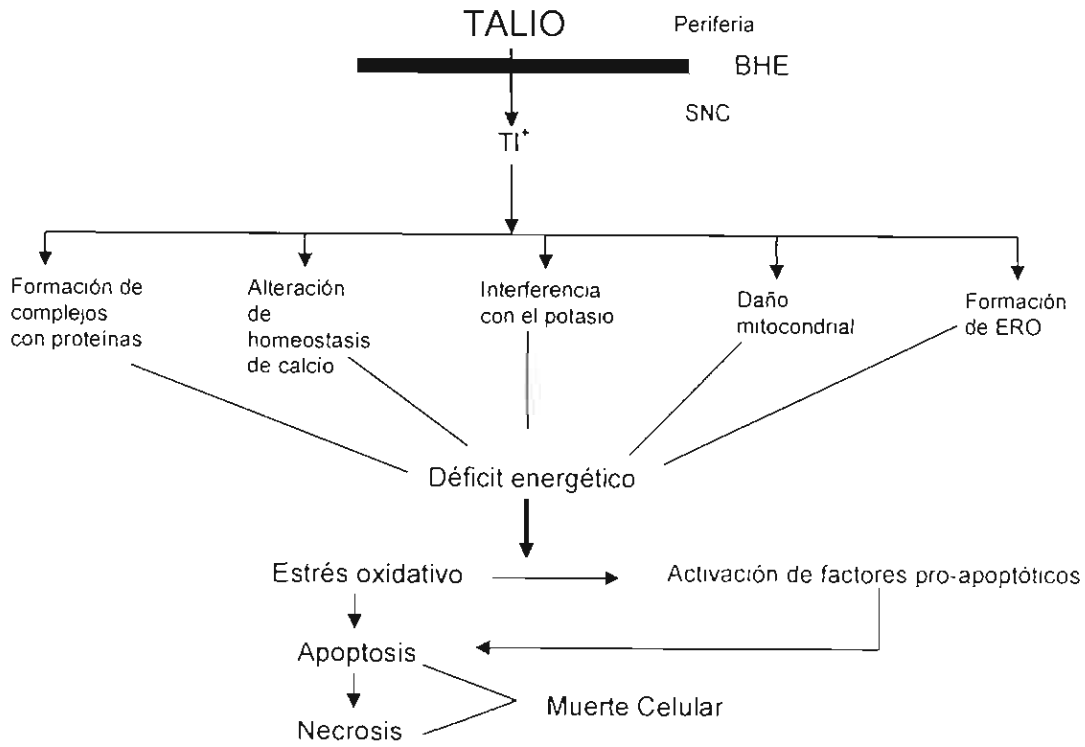


Figura 15. Esquema que integra los posibles mecanismos de toxicidad del talio que se conocen hasta ahora.

Talio y ambiente

El Tl^+ es un elemento raro pero ampliamente distribuido. Todas las formas del talio son suficientemente solubles para ser tóxicas para los organismos vivos. Este metal es más tóxico para los humanos que el mercurio, cadmio, cobre o zinc y ha sido responsable de intoxicaciones accidentales, ocupacionales, intencionales y terapéuticas desde su descubrimiento. Su conducta química nos recuerda por un lado a los metales pesados (plomo, oro y plata) y por el otro a los metales alcalinos (potasio, rubidio y cesio). Debido a su relativamente alta solubilidad el talio es rápidamente transportado a través de rutas acuáticas hacia el ambiente. El talio puede ser transferido fácilmente desde los suelos de cosecha y acumularse en los alimentos cosechados. Su comportamiento químico y su alto potencial tóxico hacen al talio y sus compuestos de particular interés científico y de importancia ambiental (Peter y Viraraghavan, 2005). Por ejemplo, la acumulación de talio en los grandes lagos debe ser vista con cierta preocupación. Estudios recientes muestran que la concentración de talio en las aguas de los grandes lagos es generalmente más alta que la de cadmio y ocasionalmente excedida a los niveles de plomo en algunas áreas contaminadas. Dichas concentraciones se han elevado por las actividades humanas y el desarrollo urbano. Las altas concentraciones encontradas recientemente en las truchas que habitan en los grandes lagos sugieren que el riesgo de una intoxicación con talio debido al consumo de pescado puede ser más grande que el que generalmente se reconoce (Peter y Viraraghavan, 2005).

Adicionalmente en 2004, Xiao y colaboradores reportaron altas concentraciones de talio en Lanmuchang en el suroeste del área Guizhou en China; el enriquecimiento del talio en partes comestibles de especies de cosecha disminuye en el siguiente orden en el área de estudio: col verde, zanahoria, chile, col china, arroz y maíz. El talio en las cosechas es especie-dependiente, acentuándose en la col verde por arriba de 500 mg/kg de peso seco, que sobrepasa el nivel del talio en el suelo donde se cosecha este vegetal (Peter y Viraraghavan, 2005).

El talio posee un alto potencial de riesgo para la salud en humanos a través de la cadena alimenticia debido tanto a procesos naturales como a las actividades humanas. En términos geoambientales, la planeación apropiada puede ser menos costosa que el beneficio de la población. Por ello, es esencial que el patrón de distribución del talio sea establecido. El nivel basal de sedimentos, aguas y suelos puede proporcionar una guía para el uso seguro de la tierra y servir para minimizar o prevenir los casos de intoxicación del talio (Xiao et al., 2004). Sin el establecimiento de guías adecuadas y específicas, la intoxicación por talio puede alcanzar proporciones epidémicas.

Debe considerarse que el índice acumulativo de "Chemical abstracts" de 1995 enlista más de 150 usos y aplicaciones potenciales para el talio y sus componentes (Peter y Viraraghavan, 2005), este hecho debe hacernos considerar todas las posibilidades en las que este elemento puede ser usado para valorar todos los trabajos y estudios que nos ayuden a entender mejor su toxicidad: A) a nivel industrial para producir muy diversos productos y que este hecho puede

ocasionar envenenamientos accidentales, ocupacionales o intencionales, B) el proceso industrial puede contribuir a la contaminación ambiental, afectando a diversos organismos que puede ser riesgosa incluso para la salud humana, C) la contribución de los depósitos naturales de este elemento que en algunas zonas pueden tener mucha importancia, como el caso de China, D) el empleo del metal a nivel clínico para pruebas de funcionamiento cardíaco y marcaje tumoral puede tener también su contribución para los puntos antes mencionados y que además puede ser considerado como “peligroso” tal y como se ha reportado por Iqbal et al. (2005) donde pacientes que han sido sometidos a diversos procedimientos médicos que incluyen el empleo de radioisótopos son detenidos en aeropuertos internacionales por dar falsas alarmas en los sistemas de seguridad y finalmente E) el mal uso que puede darse a este metal , ya que la deshumanización del hombre que es expresada a través de una plétora de herramientas para la guerra moderna y el terror que incluye el uso de armas químicas y biológicas con fines de asalto, desmoralización y letalidad, que ha sido documentado en la historia reciente tanto en el campo de batalla y el terror urbano contra civiles (Bismuth et al., 2004).

COMENTARIOS FINALES

La interpretación del aumento del daño por la peroxidación lipídica cerebral acompañado por moderadas alteraciones en antioxidantes endógenos después de la administración única de Tl^+ es simple y significativa: el riesgo potencial de daño que puede producirse en el cerebro aún con exposiciones pequeñas y en dosis bajas del tóxico.

El Tl^+ induce cambios en los patrones conductuales de ratas los cuales están relacionados con la susceptibilidad regional del cerebro al daño oxidativo celular y a las alteraciones neuroquímicas. Una exposición única a bajas concentraciones de Tl^+ puede tener modestas pero deletéreas consecuencias para el estado redox del cerebro, lo que a su vez puede provocar alteraciones en algunas conductas específicas.

VIII. CONCLUSIONES

- La administración única de una dosis de talio de 16 mg/kg produjo un aumento en la peroxidación de lípidos en Ht, E y Ce
- Se caracterizó una acumulación homogénea del metal en las regiones cerebrales estudiadas después de la administración de dos dosis del tóxico (8 y 16 mg/kg), presentando un comportamiento dosis-dependiente.
- La dosis de 16 mg/kg causó una disminución en los niveles de GSH en E.
- La actividad de la SOD-Cu,Zn disminuyó en Ht y E a la dosis más alta de talio.
- Se estableció un patrón hipocinético en los animales intoxicados con la dosis de 16 mg/kg de Tl^+ .
- La dosis de 8 mg/kg demostró ser suficiente para producir cambios en la actividad espontánea de los animales por lo que puede sugerirse como la adecuada para un bioensayo sensible para evaluar la intoxicación con talio.

IX. REFERENCIAS

- Abramovitz, M., Homma, H., Ishigaki, S., Tansey, F., Cammer, W. y Listowsky, I. (1988). Characterization and localization of glutathione-S-transferases in rat brain and bindings of hormones, neurotransmitters and drugs. *J. Neurochem.* 50: 50-57.
- Achenbach, C., Hauswirth, O., Heindrichs, C., Ziskoven, R., Köhler, F., Bahr, U., Heindrichs, A. y Schulten, H.R. (1980). Quantitative measurement of time-depend thallium distribution in organs of mice by field desorption mass spectrometry. *J. Toxicol. Environ. Health.* 6: 519-528.
- Appenroth, D. y Winnefeld, K. (1999). Is thallium-induced nephrotoxicity in rats connected with riboflavin and/or GSH? - Reconsideration of hypotheses on mechanism of thallium toxicity. *J. Appl. Toxicol.* 19: 61-66.
- Aoyama, H., Yoshida, M. y Yamamura, Y. (1988). Induction of lipid peroxidation in tissues of thallos malonate-treated hamster. *Toxicology.* 53: 11-18.
- Baker, R. D. Baker, S.S., La Rosa, K., Whitney, C., Newburger, P.E. (1993). Selenium regulation of glutathione peroxidase in human hepatoma cell line Hep 3B. *Arch. Biochim. Biophys.* 304: 53-57.
- Bismuth, C. Borron, S.W., Baud, F.J. y Barriot, P. (2004). Chemical weapons: documented use and compounds on the horizon. *Toxicol. Lett.* 149: 11-18.
- Borlogan, C.V., Koutouzis, T.K., Freeman, T.B., Hauser, R.A., Cahill, D.W., Sanberg, P.R. (1997). Hyperactivity and hipoactivity in a rat model of

- Huntington's disease: the systemic 3-nitropropionic acid model. *Brain Res. Protocols.* 1:253-257.
- Brockhaus, A., Dolgner, R., Ewers, U., Kramer, U., Soddemann, H., Wiegand, H. (1981). Intake and health effects of thallium among a population living in the vicinity of a cement plant emitting thallium-containing dust. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 48: 375-389.
- Brown, D.R., Callahan, B.G., Cleaves, M.A., y Schatz, R.A. (1985). Thallium induced changes in behavioral patterns: correlation with altered lipid peroxidation and lysosomal enzyme activity in brain regions of male rats. *Toxicol. Ind. Health.* 1: 81-98.
- Castillo, C.G., Montante, M., Dufour, L., Martínez, M.L. y Jiménez-Capdeville, M.E. (2002). Behavioral effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 24: 797-804.
- Cavanagh, J.B., Fuller, N.H., Johnson, H.R.M. y Rudge, P. (1974). The effects of thallium salts, with particular reference to the nervous system changes. *Q. J. Med.* 43: 293-319.
- Chandler, H.A. y Scott, M. (1984). Determination of low levels of thallium in urine using chelation with sodium diethyldithiocarbamate, extraction into toluene, and atomic absorption spectrophotometry with electrothermal atomization. *Atom Spectrosc.* 5: 230-233.
- Chia, C. F. , Chen, S C., Chen, C. S., Shih, C. M., Lee, H. M. y Wu, C. H. (2005). Thallium acetate induces C6 glioma cell apoptosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1042:523-530.

- Cossum, P.A. y Rickert, D.E. (1987). Metabolism and toxicity of dinitobenzene isomers in erythrocytes from Fisher 344 rats, rhesus monkeys and humans. *Toxicol. Lett.* 37: 157-163.
- Douglas, K.T., Bunni, M.A. y Baindur, S.R. (1990). Thallium in biochemistry. *Int. J. Biochem.* 22: 429-438.
- Dumitru, D. y Kalantri, A. (1990). Electrophysiologic investigation of thallium poisoning. *Muscle. Nerve.* 13: 433-437.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201:1203-1209.
- Galván-Arzate, S. y Ríos C. (1994). Thallium distribution in organs and brain regions of developing rats. *Toxicology.* 90: 63-69.
- Galván-Arzate, S. y Santamaria A. (1998) Thallium toxicity. *Toxicol. Lett.* 99: 1-13.
- Galván-Arzate, S., Martínez, A., Medina, E., Santamaria, A. y Rios, C. (2000). Subchronic administration of sublethal doses of thallium to rats: effects on distribution and lipid peroxidation in brain regions. *Toxicol. Lett.* 116: 37-43.
- García-Arenas, G., Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M.L., Ríos, C., y Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Cognitive deficits in adult rats by lead intoxication are related with regional specific inhibition of cNOS. *Behavioral Brain Res.* 149:49-59.
- Gettler y Weiss er, A. y Weiss, L. (1943). Thallium poisoning.III. Clinical toxicology of thallium. *Am. J. Clin. Pathol.* 13. 422-429.

- Glowinski, J. e Iversen, L.L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of ³H-norepinephrine, ³H-dopamine, and ³H-Dopa in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13: 6555-6569.
- Grillner. S., Hellgren, J., Ménard, A., Saitoh, K y Wikström, M.A. (2005). Mechanisms for selection of basic motor programs-roles for the striatum and pallidum. *TRENDS in Neurosciences* 28:364-370.
- Guo, N., McIntosh, C. y Shaw, C. (1992). Glutathione: new candidate neuropeptide in the central nervous system. *Neuroscience* 51: 835-842.
- Hafeman, D.G., Sunde, R.A. y Hoekstra, W.G. (1974). Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.* 104: 580-587.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M.C. (1989). *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press (Clarendon), Oxford, U.K.
- Hasan, M., Ali, S.F. y Tariq, M. (1978). Levels of dopamine, norepinephrine and 5-hydroxytryptamine in different regions of the rat brain in thallium toxicosis. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 43: 169-173.
- Hasan, M. y Ali, S.F. (1981). Effects of thallium, nickel and cobalt administration of the lipid peroxidation in different regions of the rat brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 57: 8-13.
- Hasan. M. y Haider, S.S. (1989). Acetyl-homocysteine thiolactone protects against some neurotoxic effects of thallium. *Neurotoxicology* 10: 257-261.
- Herrero, F., Fernández, E., Gómez, J., Pretel, L., Canizares, F., Frías, J. y Escribano, J.B. (1995). Thallium poisoning presenting with abdominal colic, paresthesia, and irritability. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 33: 261-264.

- Hissin, P.J. y Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74: 214-226.
- Iqbal, M.B., Sharma, R., Underwood, S.R., Kaddoura, S. (2005). Radioisotopes and airport security. *Lancet* 366: 342.
- Kazantzis, G. (2000). Thallium in the environment and health effects. *Environ. Geochem. Health* 22:275-280.
- Kinuta, Y., Kikuchi, H., Ishikawa, M., Kimura, M. y Itokawa, Y. (1989). Lipid peroxidation in focal cerebral ischemia. *J. Neurosurg.* 71(3):421-429.
- Kupfermann, I. (1991). Learning and Memory. In: Kandel, E.R., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (eds). *Principles of Neural Science*. Appleton & Lange, pp. 927-1008.
- Leslie, S.W., Brown, L. M., Trent, R.D., Lee, Y. H., Morris, J.L., Jones, T.W., Randall, P.K., Lau, S.S. y Monks, T.J. (1992). Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium entry into dissociated neurons by reduced and oxidized glutathione. *Mol. Pharmacol.* 41: 308-314.
- Liem, Y., Kaiser, G., Sager, M. y Tölg, G. (1984) The determination of thallium in rocks and biological materials at ng/g levels by differential-pulse anodic stripping voltammetry and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 158: 179-197.
- Lowndes, H.E., Philibert, M.A., Beiswanger, C.M., Kauffman, F.C., y Cooper, A. J. L. (1995). Xenobiotic metabolism in the brain as mechanistic bases for neurotoxicology. In *Handbook of Neurotoxicology* (L.W. Chang and R.S. Dyer, Eds), pp 1-27. Marcel Dekker, New York.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol.Chem.* 193: 265-275.
- Liu, Y.F. y Quirion, R. (1992). Modulatory role of glutathione on mu-opioid, substance P/neurokinin-1, and kainic acid receptor binding sites. *J. Neurochem.* 59: 1024-1032.
- Manzo, L. y Sabbioni, E. (1988). Thallium. In handbook on Toxicity of Inorganic Compounds. Seiler, H.G., Sigel, A. y Siegel, H. (eds). Marcel Dekker, New York, pp. 677-688.
- Marmo, E., Matera, M.G., Acampora, R. et al. (1987) Prenatal and postnatal metal exposure: effect on vasomotor reactivity development of pups: experimental research with antimony trichloride, thallium sulfate and sodium metavanadate. *Curr. Ther. Res.* 42(5): 823-838.
- Martínez, A. (2000). Cuantificación de la concentración de talio y de la peroxidación de lípidos en regiones cerebrales de rata después de su administración crónica. Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Mauras, Y., Premel-Cabic, A., Berre, S. y Allain, P. (1993). Simultaneous determination of lead, bismuth and thallium in plasma and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* 218: 201-205.
- McMillan, T.M., Jacobson, R.R. y Gross, M. (1997). Neuropsychology of thallium poisoning. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 63: 247-250.

- Meggs, W.J., Hoffman, R.S., Shih, R.D., Weisman, R.S. y Goldfrank, L.R. (1994).
Thallium poisoning from maliciously contaminated food. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 32: 723-730.
- Meister, A. y Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annu Rev. Biochem.* 52: 711-760.
- Méndez-Armenta, M., Villeda-Hernández, J., Barroso-Moguel, R., Nava-Ruiz, C., Jiménez-Capdeville, M.E., y Ríos C. (2003). Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone. *Toxicol. Lett.* 144: 151-157.
- Moeschlin, S. (1980). Thallium poisoning. *Clin. Toxicol.* 17: 133-146.
- Monks, T.J., Ghersi-Egea, J.F., Philbert, M., Cooper, A.J. y Lock, E.A. (1999).
Symposium Overview: the role of glutathione in neuroprotection and neurotoxicity. *Toxicol. Sci.* 51: 161-177.
- Mulkey, J.P. y Oehme, F.W. (1993). A review of thallium toxicity. *Vet. Human Toxicol.* 35(5): 445-453.
- Nakazawa, H., Genka, C. y Fujishima, M. (1996). Pathological aspects of active oxygen/free radicals. *Jpn J Physiol.* 46:15-32.
- NIOSH (1992). Registry of toxic effects of chemical substances. National Institute for Occupational Safety and Health. Cincinnati, OH.
- Nriagu, J.O.(1998). History, production and uses of thallium. In Nriagu, J. (ed.):
Thallium in the environment. *Advances in Environmental Science and Technology.* John Wiley & sons, Inc. U.S.A. p. 1-29.

- Noack, H., Lindenau, J, Rothe, F. Asayawa, K y Wolf, G. (1998). Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neural and glial compartments in the course of excitotoxically mediated neurodegeneration: relation to oxidative and nitregeric stress. *Glia*. 23: 285-297.
- Oberley, L.W. y Spitz, D.R. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol*. 105: 457-464.
- Ogita, K., Ogawa, Y., y Yoneda, Y. (1988). Apparent binding activity of [³H]-glutathione in rat central and peripheral tissues. *Neurochem. Int*. 13: 493-497.
- Peter, A.L.J. y Viraraghavan, T. (2005). Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environ. Int*. 31:493-501.
- Pileblad, E., Magnusson, T. y Fornstedt, B. (1989). Reduction of brain glutathione by L-buthionine sulfoximine potentiates the dopamine-depleting action of 6-hydroxy-dopamine in rat striatum. *J. Neurochem*. 52: 978-980.
- Prick, J.J.G. (1979). Thallium poisoning. In: Vinken, P.J. y Bruyn, G.W. (eds.). *Handbook of Clinical Neurology. Intoxications of the Nervous System, Vol. 36*. North-Holland, New York, pp. 239-278.
- Rauws, A. G. (1974). Thallium pharmacokinetics and its modification by Prussian blue. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 285:516-522
- Reed, D., Crawley, J., Faro. S.N., Pieper, S.J. y Kurland, L.T. (1963). Thallotoxicosis: acute manifestations and sequelae. *JAMA* 183 516-522.

- Repetto, G., Del Peso, A. y Repetto, M. (1988). Human Thallium Toxicosis. In: Nriagu, J. (ed). Thallium in the environment. Advances in environmental science and technology. John Wiley & Sons Inc. USA., pp. 167-199.
- Risk Assessment Information System (RAIS). Toxicity profiles (2003) Available at <http://risk.lsd.ornl.gov/tox/profiles>.
- Ríos, C., Galván-Arzate, S. y Tapia, R. (1989). Brain regional thallium distribution in rats acutely intoxicated with Tl_2SO_4 . Arch. Toxicol. 63: 34-37.
- Ríos, C. y Monroy-Noyola, A. (1992). D-Penicillamine and prussian blue as antidotes against thallium intoxication in rats. Toxicology 74: 69-76.
- Ríos, C. y Galván-Arzate, S. (1998). Analysis of thallium in biological samples. In Nriagu, J. (ed.): Thallium in the environment. Advances in Environmental Science and Technology. John Wiley & sons, Inc. U.S.A. p. 155-166.
- Rodríguez, V.M., Jiménez –Capdeville, M.E. y Giordano, M. (2003). The effects of arsenic exposure on the nervous system. Toxicol. Lett. 145:1-18.
- Rossi, F., Cazzola, M., De Santis, D., Lisa, M., Servodio, R., Guarino, V., Fici, F. y Marmo, E. (1987). Cardiovascular effects of thallium sulfate after intracerebroventricular administration in normotensive rats. Curr. Ther. Res. 42(5): 778-789.
- Sabbioni, E., Ceotz, L. y Bignoli, G. (1984). Health and environmental implications of trace metals released from coal-fired power plants:an assessment study of the situation in the European Community. Sci. Total Environ 40:141-154.

- Santamaria, A. y Rios, C. (1993). MK-801, an N-Methyl -D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci. Lett.* 159: 51-54.
- Santamaría, A. Vázquez-Román, B., Pérez-De la Cruz, V., González-Córtés, C., Trejo-Solis, Ma. C., Galván-Arzate, S., Jara-Prado, A., Guevara-Fonseca, J. y Ali, S.F. (2005). Selenium reduces the proapoptotic signaling associated to NF- κ B pathway and stimulates glutathione peroxidase activity during excitotoxic damage produced by quinolinate in rat corpus striatum. *Synapse*: 58258-266.
- Scheuhammer, A. M. y Cherian, G.M. (1986). Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82: 417-425.
- Stewart, C. A. y Morris, R.G.M. (1993). The watermaze. In: Sahgal, A. (ed.) *Behavioural Neuroscience*, Oxford Univ. Press, New York, pp. 107-122.
- Tsang, S. Y., Tam, S. C., Bremmer, I. y Burkitt, M. J. (1996). Copper-1, 10-phenanthroline induces internucleosomal DNA fragmentation in HepG2 cells, resulting from direct oxidation by the hydroxyl radical. *Biochem. J.* 317:13-16.
- Thompson, C., Dent, J. Saxby, P. (1988). Effects of thallium poisoning on intellectual function. *Br. J. Psychiatry* 153: 396-399.
- Triggs, W.J. y Willmore, L.J. (1984). *In vivo* lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe⁺⁺ injection. *J. Neurochem.* 42: 976-979.
- Villaverde, M.S., Hanzel, C. E. y Verstraeten, S.V. (2004) *In vitro* interactions of thallium with components of the glutathione-dependent antioxidant defense system. *Free Radical Res.* 38:977-984.

- Winterbourn, C.C. (1995). Free radical toxicology and antioxidant defense. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22:877-880.
- Woods, J.S. y Fowler, B.A. (1986). Alteration of hepatocellular structure and function by thallium chloride:ultrastructural, morphometric, and biochemical studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83: 218-229.
- Xiao, T., Guba, J., Boyle, D., Liu, C-Q., Zheng, B., Wilson, G.C., Rouleau, A. y Chen, J. (2004). Naturally occurring thallium: a hidden geoenvironmental health hazard?. *Environ. Int.* 30:501-507.
- Ziskoven, R., Achenbach, C., Schulten, H.R. y Roll, R. (1983). Thallium determinations in fetal tissues and maternal brain and kidney. *Toxicol. Lett.* 19: 225-231.

X. ANEXO



Delayed effects of thallium in the rat brain: Regional changes in lipid peroxidation and behavioral markers, but moderate alterations in antioxidants, after a single administration [☆]

Sonia Galván-Arzate ^{a,d}, José Pedraza-Chaverri ^b, Omar N. Medina-Campos ^b,
Perla D. Maldonado ^b, Beatriz Vázquez-Román ^c, Camilo Ríos ^a, Abel Santamaría ^{c,*}

^a Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, México D.F. 14269, México

^b Departamento de Biología, Facultad de Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México

^c Laboratorio de Aminoácidos Excitadores/Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, México D.F. 14269, México

^d Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F. 04960, México

Received 15 November 2004; accepted 15 February 2005

Abstract

Thallium (Tl⁺) toxicity has been related with the generation of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress (OS) in the central nervous system. Since changes in endogenous antioxidant systems might contribute to acute Tl⁺-induced OS and neurotoxicity, in this study we measured the metal concentration and the levels of lipid peroxidation (LP) in different brain regions (hypothalamus (Ht); cerebellum (Ce), striatum (S); hippocampus (Hc) and frontal cortex (Cx)) in possible correlation with the content of reduced glutathione (GSH), the activities of glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD), and the animal performance in behavioral tests, all evaluated after a single administration of thallium acetate (8 or 16 mg/kg, i.p.) to rats. Seven days after Tl⁺ administration, the metal was homogeneously and dose-dependently accumulated in all regions evaluated. LP was increased in Ht, Ce and S, while GSH was depleted in S. Cu,Zn-SOD activity was also decreased in Ht and S. All these changes occurred with 16 mg/kg dose and at 7 days after treatment, but not at 1 or 3 days. In addition, Tl⁺-treated animals exhibited general hypokinesia, but no changes were observed in spatial learning. Our findings suggest that a delayed response of the brain to Tl⁺ may be the result of its residual levels. Also, despite the regional alterations produced by Tl⁺ in LP and the limited changes in endogenous antioxidants, there is a correlation between the Tl⁺-induced oxidative damage and the affected behavioral tasks, suggesting that, although still moderate, Tl⁺ evokes neurotoxic patterns under the experimental conditions tested.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Thallium; Oxidative damage; Endogenous antioxidants; Brain regions; Neurotoxicity; Reactive oxygen species; Behavior

1. Introduction

Toxic patterns elicited by heavy metals and metalloids share a common cascade of events involving reactive oxygen species (ROS) formation and oxidative stress (OS). Under specific conditions, these agents induce a pro-oxidant state in biological systems, resulting in peroxidation of polyunsaturated fatty acids. The brain is particularly sensitive to oxidative damage

[☆] This work allowed Sonia Galván-Arzate to obtain her Ph.D. degree at the Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas from the Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (Mexico).

* Corresponding author. Tel.: +5255 5606 3822x2043; fax: +5255 5528 0195.

E-mail address: absada@vahoo.com (A. Santamaría).

because of its high levels of unsaturated lipids, as well as a high rate of oxidative metabolism (Chevalier et al., 1994; Goering et al., 2002). It is also known that endogenous antioxidants constitute a defense against cell damage induced by ROS in living systems. These complexes are mainly composed by metabolites such as reduced glutathione (GSH), and enzymatic scavengers such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). Approximately 4–5% of oxygen consumed will form superoxide anions, which can be readily dismutated by SOD to hydrogen peroxide and singlet oxygen. Hydrogen peroxide is then converted by GPx to H₂O and O₂. GSH, consumed during the GPx reaction, is converted back to its reduced form by glutathione reductase (GR). However, when the production of reactive oxygen intermediates exceeds the ability of the antioxidant systems to remove them, OS results (Somani et al., 1995). Therefore, SOD and GPx, as well as the content of GSH, are all critical for protection against ROS toxicity.

Thallium (Tl⁺) is a naturally distributed metal commonly found as a mineral compound, as well as in several inorganic salts. Tl⁺ can be released into the environment from industrial sources such as coal-fired power plants, smelting operations and cement factories, among others (Galván-Arzate and Santamaria, 1998). The most non-occupational sources of Tl⁺ exposure are the consumption of contaminated food (fruits and vegetables home-grown) (Borges and Daugherty, 1994) and living in the vicinity of industries, such as cement plants (Brockhaus et al., 1981). In addition, Tl⁺ produces one of the most complex and serious patterns of toxicity known to humans, involving a wide range of organs and tissues. The severity of symptoms depends on the time and level of exposure, the rate of absorption, age and individual susceptibility (Repetto et al., 1998). Acute exposure to Tl⁺ produces damage in central, peripheral, and autonomic nervous systems in humans, whereas chronic exposure results in alteration of the brain, spinal cord, and peripheral nerves.

Several groups (Hasan and Ali, 1981; Brown et al., 1985; Aoyama et al., 1988; Galván-Arzate et al., 2000) have investigated the effects of Tl⁺ on lipid peroxidation (LP) in various tissues using different schemes of administration, as well as distinct animal species. Findings of these reports have demonstrated that Tl⁺ toxicity is closely related with increased ROS formation, which in turn constitute an important risk factor for tissue damage and organ dysfunction. However, most of these investigations have been performed under chronic or subchronic conditions of Tl⁺ administration. Moreover, given that even a single exposure to Tl⁺ for humans may represent a risk factor for neurotoxicity and since much of the consequences of a single acute exposure to Tl⁺ are still unknown, more detailed studies are needed to clarify the precise role of ROS and OS, bringing special

attention to the early changes occurring in antioxidant systems as possible causes of the late toxic features of Tl⁺. Therefore, the aim of this study was to investigate whether a single systemic administration of Tl⁺ to rats may produce significant changes in the course of days in lipid peroxidation as indicator of oxidative damage in correlation with alterations in endogenous antioxidant systems, in order to provide further information on the relevance of the toxic patterns evoked by this metal. In addition, we evaluated whether such effects, if occur, may affect behavioral tasks as general indicators of neurotoxicity. Thus, this study represents a logic extension of that performed by Brown and coworkers on the effects of Tl⁺ on biochemical and behavioral markers.

2. Materials and methods

2.1. Animals and treatment

Adult male bred-in-house Wistar rats (250–300 g) were used throughout the study ($N = 130$). Rats were housed 6 per cage and provided with water and Purina chow pellets *ad libitum*. Lighting (12:12 light:dark cycles), temperature (25 ± 3 °C) and humidity ($50 \pm 10\%$) conditions were maintained constant. All experiments were carried out with approval of the Local Bioethics Committee. Animals were randomly assigned to different experimental groups and received a single administration of thallium acetate at two different doses (8 or 16 mg/kg *i.p.* dissolved in water). Additional groups of rats were administered with similar volumes of deionized water as vehicle and considered as controls. One, 3 and 7 days after Tl⁺ administration, rats were killed by decapitation and their brains were rapidly removed and placed on ice. Five regions were dissected according to the method described by Glowinski and Iversen (1966): hypothalamus (Ht), cerebellum (Ce), frontal cortex (Cx), hippocampus (Hc) and striatum (S).

These regions were selected on the basis of previous works demonstrating their selective vulnerability to the noxious effects of Tl⁺ and capability to accumulate the metal (Rios et al., 1989; Galván-Arzate et al., 2000), as well as their well-known susceptibility to oxidative stress (reported elsewhere).

Tissue samples were then stored at -75 °C until processed for each experimental purpose. Animals used for behavioral purposes were similarly administered with Tl⁺ or vehicle and maintained alive until the corresponding tests were performed.

2.2. Thallium analysis

Tissue samples were digested in 5–1.0 ml of concentrated HNO₃ Suprapur (Merck, Mexico City), handled

and analyzed as previously described (Rios and Galván-Arzate, 1998) using graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. A Perkin-Elmer 3110 spectrophotometer with HGA 600 graphite furnace and AS-60 autosampler (Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT) and a Tl^+ hollow cathode lamp (276.8 nm wavelength and slit 0.7 nm) were used. Continuous nitrogen flow (10 ml/min) served as the purge gas for all analysis. Results were expressed as μg of Tl^+ per g of wet tissue.

2.3 Assay of lipid fluorescent products

The formation of lipid-soluble fluorescent products was measured by the technique originally described by Triggs and Willmore (1984) and modified by Santamaria and Rios (1993), using a luminescence spectrometer LS50B (Perkin-Elmer, Co., Norwalk, CT) at 370 nm of excitation and 430 nm of emission wavelengths. Briefly, tissue samples were homogenized in 3 ml of sterile saline. One-ml aliquots were then added to 4 ml of a chloroform-methanol mixture (2:1, v/v). After vortexing (10 s), the mixture was ice-cooled for 30 min to allow phase separation and the fluorescence of the chloroform layer was measured. The sensitivity of equipment was adjusted to 300 units of fluorescence with a quinine standard solution (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Results were expressed as units of relative fluorescence intensity per mg of protein.

2.4 Fluorometric assay of reduced glutathione (GSH)

For measurement of GSH levels, we used a method previously described by Hissin and Hill (1976). Briefly, tissue samples were homogenized in 3.75 ml EDTA-phosphate buffer (pH 8.0) plus 1 ml HPO_3 (25%). Homogenates were centrifuged at $3000 \times g$ for 15 min and supernatants were separated. Five hundred μl of supernatant aliquots were added to 4.5 ml of phosphate buffer plus 100 μl of *o*-phthalaldehyde (OPA). The mixtures were incubated at room temperature for 15 min and their fluorescent signals were recorded in the luminescence spectrometer at 420 nm of emission and 350 nm of excitation wavelengths. Final results were expressed as μg GSH per mg of protein.

2.5. Measurement of glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was determined by a method based on the non-enzymatic oxidation of reduced glutathione (GSH) previously reported by Hafeman et al. (1974) and modified by us (Rodríguez-Martínez et al., 2003; Santamaria et al., 2003b). Tissue samples were homogenized in phosphate buffer (pH 7.4). Aliquots (30 μl) were incubated at 37 °C in 0.4 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) also containing 0.4 mM EDTA, 2.0 mM GSH and 0.01 M NaN_2 (final volume 2.0 ml). After 5 min,

1 ml of 1.25 mM H_2O_2 was added to the incubation medium, and 3 min later, 1 ml of the mixture was removed and added to 4.0 ml of metaphosphoric acid. Samples were centrifuged at $1500 \times g$ for 15 min and supernatants (1 ml) were added to phosphate buffer (pH 7.0) plus EDTA also containing 0.5 ml 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). Optical density was determined at 512 nm in a Perkin-Elmer Lambda 20 spectrometer 2 min after the addition of DTNB. A standard curve was constructed using increasing concentrations of GSH + phosphate buffer/EDTA + DTNB. An enzyme unit of activity was defined as a 50% decrease of GSH per 60 min after the decrease in GSH from the non-enzymatic reaction had been subtracted. Results were expressed as Units of activity per mg of protein.

2.6. Measurement of superoxide dismutase (SOD) activity

Total SOD activity in tissue samples was assayed spectrophotometrically (560 nm) by a method previously reported (Pedraza-Chaverri et al., 2000b) using nitroblue tetrazolium as the indicator reagent. To measure manganese-SOD (Mn-SOD), copper,zinc-SOD (Cu,Zn-SOD) was inhibited with diethyldithiocarbamic acid (Pedraza-Chaverri et al., 2000b). Results were expressed as Units of activity per mg of protein.

2.7 Western blot for SOD

Tissue samples were homogenized in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) with protease inhibitors. Homogenates were centrifuged at $1000 \times g$ and 4 °C for 10 min. Twenty-five μg of protein were fractionated at 100 V on a 12.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel with a 5% stacking gel in SDS-Tris glycine running buffer, and then electroblotted to a nitrocellulose membrane. Immunodetection was performed using specific primary antibodies against Mn-SOD or Cu,Zn-SOD. Hybrids were visualized by chemiluminescence, using an ECL detection system, and then, the densitometric analysis was performed according to previous reports (Pedraza-Chaverri et al., 2000a,b; Santamaria et al., 2003a).

2.8 Protein measurement

Protein content in tissue samples from all experiments was measured by the Folin and Ciocalteu's phenol reagent (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (Lowry et al., 1951).

2.9. Water maze test

The water maze behavioral test represents a suitable tool for monitoring spatial learning (Stewart and

Morris, 1993). We performed our behavioral experiments according to those parameters previously reported by Castillo et al. (2002). Briefly, we used a 2-m-diameter pool with 40 cm-side walls filled with milk-opaque water (25 °C). The pool also contained a 10-cm-diameter escape platform with a Plexiglas surface hidden 2 cm beneath the water surface. Platform was fixed in one of the pool quadrants. Room conditions and the position of the observer were always the same. Seven days after Tl^{+} administration (one day after habituation), four trials were given to each animal. Performance was evaluated through three different parameters: escape latency, number of failures to reach the platform/number of trials and number of times crossing the tank/min. Animals were placed on the water surface facing the wall of the pool at random locations. The escape latency was evaluated by registering the time needed to reach the platform. At the end of each trial, rats were allowed to stay 30 s on the platform before the next trial. A failure was scored for those animals unable to reach the platform in 300 s. A crossing was scored when rats abandoned the point where they were originally placed to reach another wall of the pool.

2.10. Spontaneous movements test

Rats were tested for motor activity using an automated system (Electronic Motility Meter 40Fc; Motron Products, Stockholm, Sweden). Seven days after Tl^{+} administration (one day after habituation), animals were individually placed in a clear acrylic box cage, and then the horizontal and vertical movements (rearing up onto their back legs), as well as the ambulatory movements were all automatically recorded for one single 60 min session for each rat. Results were expressed the total number of movements per 60 min.

2.11. Statistical analysis

All results are presented as mean \pm SEM. Except for the data obtained from behavioral tests (analyzed by non-parametric means), all other results were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Thallium content

Since we have previously reported changes in the brain regional levels of Tl^{+} from Tl^{+} -treated rats at different times after a single dose administration of the metal (Rios et al., 1989), and also considering that the changes observed in other markers evaluated in this

study were evident only 7 days after Tl^{+} administration, we present data on the brain levels of Tl^{+} only at 7 days after treatment. Tl^{+} distribution among all brain regions analyzed from control, 8 and 16 mg/kg Tl^{+} -treated rats is shown in Fig. 1. No significant levels of Tl^{+} were detected in brain regions from control rats. In contrast, all regions analyzed exhibited dose-dependent increased Tl^{+} concentrations after 8 and 16 mg/kg Tl^{+} administration to rats when compared with controls and between them (56% in Ht, 49% in Ce, 61% in S, 60% in Hc and 29% in Cx, percentages of increase when comparing 16 vs. 8 mg/kg doses). No statistical differences were found in Tl^{+} distribution among regions from 8-mg/kg treated rats, nor from 16-mg/kg treated rats.

3.2. Lipid peroxidation

Fig. 2 shows the effect of thallium (8 and 16 mg/kg) on LP in different rat brain regions at 7 days after Tl^{+} administration. No significant changes in regional LP were observed at 1 (data not shown), nor at 3 days (data not shown) after Tl^{+} administration, when compared with control levels. Regarding the experiments lasting 7 days, the order of basal levels of LP was as follows: $Cx < Ce < S < Hc < Ht$. 16 mg/kg dose of Tl^{+} significantly increased LP in Ht (215%), Ce (85%) and S (112%) when compared with control. Values of LP produced by 16 mg/kg also resulted significantly higher than those generated by 8 mg/kg dose in the same regions.

3.3. GSH levels

The levels of GSH in different brain regions from control and Tl^{+} -treated rats at 7 days after Tl^{+} administration are shown in Fig. 3. No significant changes in

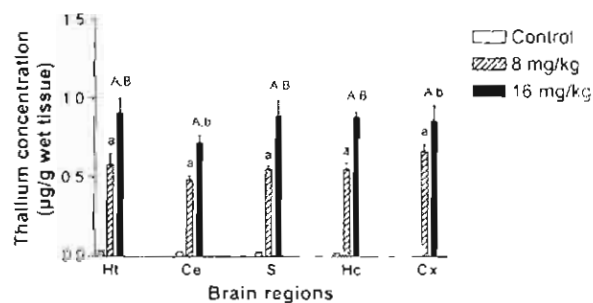


Fig. 1. Effect of thallium (Tl^{+}) on its brain regional concentrations. Rats received either water as vehicle (controls) or a single administration of thallium acetate (8 or 16 mg/kg, i.p.). Seven days later animals from all groups were sacrificed and the following brain regions were obtained: hypothalamus (Ht), cerebellum (Ce), striatum (S), Hippocampus (Hc) and cortex (Cx). Tl^{+} contents were measured by atomic absorption spectrophotometry. Mean values \pm SEM of 6 rats per group are presented. ^a($P < 0.05$) and ^b($P < 0.01$) are differences from control; ^c($P < 0.05$) and ^d($P < 0.01$) are differences of 16 mg/kg from 8 mg/kg doses (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

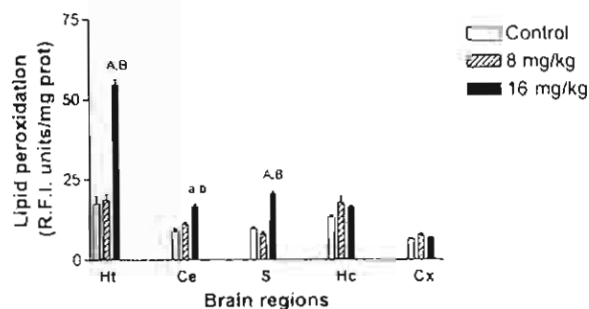


Fig. 2. Effect of thallium (Tl^+) on the regional lipid peroxidation (LP). Rats received either water as vehicle (controls) or a single administration of thallium acetate (8 or 16 mg/kg, i.p.). Seven days later, animals from all groups were sacrificed and the following brain regions were obtained: hypothalamus (Ht), cerebellum (Ce), striatum (S), Hippocampus (Hc) and cortex (Cx). LP was measured in brain regions by a fluorometric method. Mean values \pm SEM of 6 rats per group are presented. ^A($P < 0.05$) and ^B($P < 0.01$) are differences from control; ^a($P < 0.05$) and ^b($P < 0.01$) are differences of 16 mg/kg from 8 mg/kg doses (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

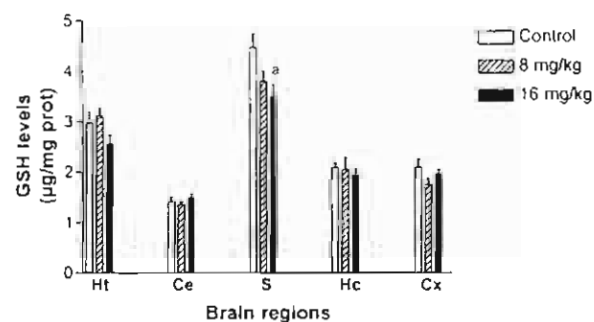


Fig. 3. Effect of thallium (Tl^+) on the brain regional content of reduced glutathione (GSH). Thallium acetate was administered i.p. to rats at two different doses (8 or 16 mg/kg). Seven days later, animals from all groups were sacrificed and their brain regions were dissected. GSH was measured in brain regions by a fluorometric method. Mean values \pm SEM of 6 rats per group are presented. ^a($P < 0.05$) are differences from control (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

GSH regional levels were found at 1 (data not shown), nor at 3 days (data not shown) after Tl^+ administration when compared with control values. Regarding the experiments lasting 7 days, the order of basal GSH levels in all regions tested was $Ce < Hc < Cx < Ht < S$. GSH was significantly decreased only in S (-22%) at 16 mg/kg dose when compared with control levels. No other differences were found.

3.4 GPx activity

The effect of Tl^+ on the brain regional activity of GPx was measured at 1, 3 and 7 days after its systemic administration. The order of baseline values of GPx activity at all times tested was as follows: $Ce < S < Cx < Ht < Hc$. Tl^+ had no significant effects in GPx

activity when compared with control values (data not shown).

3.5 SOD activity

The brain regional activity of Cu,Zn-SOD from control and Tl^+ -treated rats measured 7 days after Tl^+ administration is shown in Fig. 4. No significant changes in Cu,Zn-SOD activity were found at 1 (data not shown), nor at 3 days (data not shown) after Tl^+ administration. In addition, nor total SOD, neither Mn-SOD activities are presented since the changes observed in the first were entirely due to the Cu,Zn-SOD form, as Mn-SOD exhibited no alterations in its activity at all times tested (1, 3 and 7 days).

Basal levels of Cu,Zn-SOD activity were found in the following order: $Ce < Ht < Cx < Hc < S$. Significant changes in Cu,Zn-SOD activity from Tl^+ -treated rats were found only in Ht and S at 16 mg/kg dose (-25% and -30%, respectively) when compared with control values.

3.6 SOD expression

The expression of both isoforms of SOD was evaluated 7 days after Tl^+ administration as an additional index of possible changes in this antioxidant system. However, the contents of Mn-SOD and Cu,Zn-SOD in all brain regions analyzed from Tl^+ -treated rats remain unchanged when compared with their respective controls (data not shown), as evidenced by densitometric analysis of the corresponding blots.

3.7 Spatial learning

None of the skills tested in spatial learning in Tl^+ treated rats by the use of the water maze showed

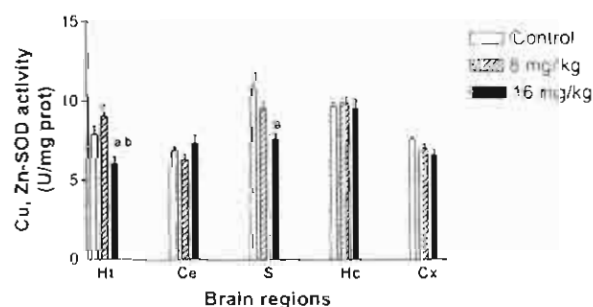


Fig. 4. Effect of thallium (Tl^+) on the brain regional activities of Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD). Thallium acetate was administered i.p. to rats at two different doses (8 or 16 mg/kg) and 7 days later, animals from all groups were sacrificed and their brain regions were dissected. Cu,Zn-SOD activity was measured by a spectrophotometric method. Mean values \pm SEM of 6 rats per group are presented. ^a($P < 0.05$) are differences from control; ^b($P < 0.05$) are differences of 16 mg/kg from 8 mg/kg doses (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

significant changes when compared with control animals. Nor the mean escape latency from day seven (shown in Fig. 5), neither other parameters such as the number of failures to reach the platform/number of trials or the number of times crossing the tank/min, resulted affected by Tl^{+} administration to rats (data not shown)

3.8 Locomotor spontaneous activity

Three locomotor variables were recorded in Tl^{+} -treated rats 7 days after its administration: horizontal, vertical and ambulatory movements. The frequency counts revealed that Tl^{+} , at both doses tested, produced a significant decrease in locomotor activity from all the variables evaluated (Fig. 6). The frequency of horizontal movements was reduced in 28% and 27% by 8 and 16 mg/kg doses, respectively, when compared with control

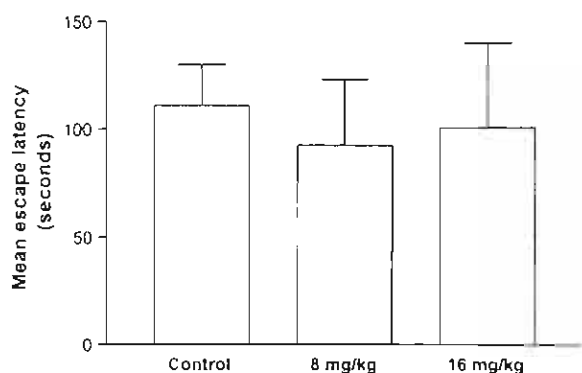


Fig. 5. Spatial learning skills in animals administered with Tl^{+} . Rats received either water as vehicle (Control) or a single administration of thallium acetate (8 or 16 mg/kg, i.p.). Seven days later, animals from all groups were challenged in a water maze testing. Mean escape latency is shown. Mean values \pm SEM of 6 rats per group are presented. Data were analyzed by Kruskal–Wallis ANOVA. No statistical differences among groups were found.

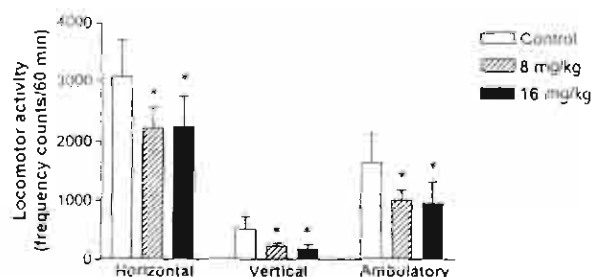


Fig. 6. Effect of thallium (Tl^{+}) on horizontal, vertical and ambulatory activities. Rats received either water as vehicle (controls) or a single administration of thallium acetate (8 or 16 mg/kg, i.p.). Seven days later, animals from all groups were challenged during 60 min for spontaneous movements through an automated Electronic Motility Meter 40Fc box equipment. Mean values \pm SEM of 6 rats per group are presented. (* $P < 0.05$) are differences from control; Kruskal–Wallis ANOVA followed by Mann–Whitney's U test.

values, whereas the vertical movements were found decreased in 56% and 64%, respectively. Ambulatory activity was also decreased in 38% and 41%, respectively.

4. Discussion

4.1. Thallium, lipid peroxidation and endogenous antioxidants

Findings of this work demonstrate that a single administration of Tl^{+} to rats resulted in homogeneous and dose-dependent accumulation of this metal in all regions evaluated at seven days after the exposure. The homogeneous distribution of Tl^{+} suggest that most of the metal has been excreted in the course of days, and so, any early differential distribution might be masked by the elimination phase, as we have previously discussed for a subchronic scheme of administration (Galván-Arzate et al., 2000). Our results also suggest a delayed toxic effect of the metal in the brain both in terms of oxidative damage (LP) and moderate changes in endogenous antioxidants, but these changes were evident only at the higher dose tested and up to 7 days after Tl^{+} injection to rats. Thus, we suggest that this delayed response may be the result of residual levels of Tl^{+} in the brain. Nevertheless, the regional selectivity in the observed changes (specially those of LP, GSH and Cu,Zn-SOD activity) affecting S, Ht and Ce, might be reflecting a preferential accumulation of the toxicant in these regions during the early stages of exposure in what it seems to be a late toxic effect of Tl^{+} , given the evidence that a differential regional distribution of Tl^{+} already occurs in the course of few days after its administration (Rios et al., 1989).

In addition, both Tl^{+} brain levels and LP responded in a dose-dependent manner. Moreover, as LP demonstrates the regional deleterious effects produced after ROS formation by Tl^{+} exposure, these changes are likely to be related with a variety of region-by-region potential mechanisms such as those previously mentioned by Brown et al. (1985): a lipid component sensitive to Tl^{+} which triggers LP, or differential protective properties of each region.

The presented evidence that S resulted the most affected region of all in the biochemical markers evaluated reveals a particular vulnerability of such a brain region to the toxic effects of the metal, a quite relevant finding in light of the integrative neurochemical and behavioral functions of this region, and such a vulnerability of S to LP is consistent with that of a previous report of Brown et al. (1985) and others (Hasan and Ali, 1981; Galván-Arzate et al., 2000). However, the moderate changes that Tl^{+} produced in general terms on these markers in other regions (except for S and Ht) at all times tested, as well as the lack of changes in SOD expression, still suggest a limited response of the brain to the moderate

toxic insult that a single Tl^+ administration represents, leading us to hypothesize that, under the conditions employed in this work, the brain probably still do not “compromise” many of its antioxidant systems to face the toxicant effects. Thus, it seems that 7 days after the single administration of Tl^+ represent only the “beginning” in the expression of residual Tl^+ toxicity, an issue deserving further investigation.

Interestingly, another region resulting susceptible to LP was Ht, which was in correlation with its decreased Cu,Zn-SOD activity. We suggest that the vulnerability of Ht to ROS could be, at least partially, the result of an evident lack of blood–brain barrier (Rios et al., 1989; Galván-Arzate and Rios, 1994), which makes it more sensitive to the free crossing of all kind of toxic molecules and metabolites. In contrast, the explanation for those less affected regions by Tl^+ might be related with the effectiveness of their well-preserved antioxidants and/or, in the particular case of Cx, its proved tendency to accumulate less Tl^+ during the first stages of exposure (Rios et al., 1989; Galván-Arzate and Rios, 1994).

Different groups (including our own) have discussed the role of ROS formation and OS in different tissues exposed to Tl^+ (Hasan and Ali, 1981; Brown et al., 1985; Aoyama et al., 1988; Galván-Arzate et al., 2000), as well as the potential implication of affected antioxidant systems (Hasan and Ali, 1981) for Tl^+ -induced toxicity under different schemes of administration and in distinct animal species. Results from these studies have shown that Tl^+ -induced tissue damage and organ dysfunction are closely related with oxidative damage. For instance, important dose-dependent correlations between LP, changes in behavioral patterns and the activation of beta-galactoside (as an index of neurotoxicity) in selected brain regions, have been reported by Brown et al. (1985), suggesting a regional susceptibility to the effects of this metal. Moreover, non-protein sulfhydryls have been reported as indicators of GSH levels as well as GPx activity in hamster kidney and liver after Tl^+ exposure, emphasizing the redox alterations produced by this metal once into the body (Aoyama et al., 1988). Furthermore, an important contribution to the understanding of the toxic effects that Tl^+ exerts on membrane lipids has been recently achieved by Villaverde and Verstraeten (2003), through the demonstration that the metal increases the membrane surface potential, changes the membrane fluidity and promotes the rearrangement of lipids, and all these features may significantly affect the neuronal cell structure and function, thus contributing to neurotoxicity. Therefore, the meaning of enhanced brain lipid oxidative damage even accompanied by moderate alterations in endogenous antioxidants after a single administration of Tl^+ is yet simple and significant: the potential risk that even short exposures to low doses of the toxicant may evoke in the nervous system

4.2. Thallium, oxidative damage and behavior

The lack of changes observed in the different parameters of spatial learning evaluated in this study by the water maze device suggest no effect of a single Tl^+ administration to rats at both doses tested, thus implying that major neurotransmitter systems related with learning functions of the brain still remain, at this point, unaffected by the toxicant. Since the changes in navigation tasks monitored during the Morris water maze test in several other reports have been commonly related with hippocampal lesions through the alteration of neurotransmitter pathways (i.e., cholinergic and serotonergic systems) produced by different toxins (Castillo et al., 2002), it is likely that the single administration of Tl^+ to rats produced no important neurochemical changes in this region as it resulted unaffected by Tl^+ in those biochemical parameters of oxidative damage. In contrast, locomotor activity evaluated through an automated EMM system (equivalent to an open-field testing) resulted in hypokinetic behavioral patterns in Tl^+ -treated animals, evidenced as decreased horizontal, vertical and ambulatory movements. Locomotor deficits are indicative of affected integrative functions in the CNS mainly as a result of cellular damage at cortical, striatal and cerebellar levels. At the experimental conditions employed in this study, both S and Ce resulted affected by lipid peroxidation, resembling the susceptibility of these two regions to oxidative damage produced by Tl^+ previously reported by Brown et al. (1985), and thus giving support to a correlation between selective regional oxidative damage and altered behavioral patterns. Moreover, this akinesia-like (hypoactivity) pattern has been demonstrated to vary and be easily turned into hyperactivity—and vice versa—in excitotoxic models evaluating locomotor activity (Borlongan et al., 1997), and these changes depend on the manipulation of the systemic injections of the toxins employed and its schedules, suggesting that these dual changes in behavior may result from the progression of different stages of activity. Therefore, despite the fact that the observed behavioral deficits in Tl^+ -treated animals is indicative of certain level of cell damage or alterations of specific neurochemical pathways, the question of whether the hypokinetic pattern elicited seven days after a single administration of the metal is a first stage of toxicity or is merely the result of the progression from a preliminary hyperkinetic stage (not evaluated in this work) remains to be explored in further studies. Furthermore, in a remarkably complex and well-designed study, Brown et al. (1985) described changes in behavioral patterns in Tl^+ -treated rats when compared with control animals. These authors reported that, “. . . after thallium, although the overall frequency of occurrences of activity elements increases, the structure of the behavior pattern generally decreases (i.e., behavior becomes

more random).” They considered behavioral components such as grooming, exploratory and attention, being one of the most significant finding the one concerning the loss in structure of exploratory behavior, in association with neurochemical changes and oxidative damage in the brainstem and cerebellum. We therefore hypothesize that the hypoactivity found in the animals treated with a single Tl^{+} administration might be a preliminary stage of behavioral deficits that eventually would be turned into an affected structure of the behavioral pattern, such as that reported by Brown and coworkers in rats treated daily with Tl^{+} during 6 days at a similar dose. Nevertheless, although the behavioral parameters evaluated by Brown’s group do not precisely parallels those that we found in Tl^{+} treated animals (probably due to the nature of the tests employed and the schedule of Tl^{+} administration), a major common conclusion can be achieved from both reports: Tl^{+} induces changes in behavioral patterns in rats which are related with the regional susceptibility of the brain to oxidative cell damage and neurochemical alterations.

4.3. Final remarks

This study describes some oxidative events probably accounting for Tl^{+} toxicity, providing some evidences of the involvement of free radical formation on the early regional alterations of antioxidants in the brain. Since many reports in the literature have only investigated the effects of Tl^{+} at higher doses or under subchronic or chronic schemes of administration, our findings on Tl^{+} -induced alterations after a single administration, although yet moderate, becomes relevant. We therefore conclude that, even a single exposure to low concentrations of Tl^{+} may have limited but deleterious consequences for brain redox status, which in turn may evoke alterations in some specific behavioral tasks. Other neurochemical modifications produced by Tl^{+} through metabolic and/or molecular cell disruption in the brain remain to be tested in further studies under the present and other experimental conditions.

Acknowledgements

The authors wish to express gratitude to Dr. Maria Esther Jiménez-Capdeville and Dr. Carlos Torner for their valuable comments, as well as to Letícia Andrés-Martínez for her excellent technical assistance.

References

- Aoyama, H., Yoshida, M., Yamamura, Y., 1988. Induction of lipid peroxidation in tissues of thallous malonate-treated hamster. *Toxicology* 53, 11–18.
- Borges, T., Daugherty, M.L., 1994. RAIS (Risk Assessment Information System) Toxicity Summary for Thallium. In: Chemical Hazard Evaluation Group, Biomedical and Environmental Information Analysis Section, Health Sciences Research Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee.
- Borlongan, C.V., Koutouzis, T.K., Freeman, T.B., Hauser, R.A., Cahill, D.W., Sanberg, P.R., 1997. Hyperactivity and hypoactivity in a rat model of Huntington’s disease: the systemic 3-nitropropionic acid model. *Brain Research Protocols* 1, 253–257.
- Brown, D.R., Callahan, B.G., Cleaves, M.A., Schatz, R.A., 1985. Thallium induced changes in behavioral patterns correlation with altered lipid peroxidation and lysosomal enzyme activity in brain regions of male rats. *Toxicology and Industrial Health* 1, 81–98.
- Brockhaus, A., Dolgner, R., Ewers, U., Kramer, U., Soddemann, H., Wiegand, H., 1981. Intake and health effects of thallium among a population living in the vicinity of a cement plant emitting thallium containing dust. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 48, 375–389.
- Castillo, C.G., Montante, M., Dufour, L., Martínez, M.L., Jiménez-Capdeville, M.E., 2002. Behavioral effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats. *Neurotoxicology and Teratology* 24, 797–804.
- Chevalier, G., Ricard, A.C., Manca, D., 1994. Age-related variations of lipid peroxidation in cadmium-treated rats. *Toxicology and Industrial Health* 10, 43–51.
- Galván-Arzate, S., Rios, C., 1994. Thallium distribution in organs and brain regions of developing rats. *Toxicology* 90, 63–69.
- Galván-Arzate, S., Santamaria, A., 1998. Thallium toxicity (Minireview). *Toxicology Letters* 99, 1–13.
- Galván-Arzate, S., Martínez, A., Medina, E., Santamaria, A., Rios, C., 2000. Subchronic administration of sublethal doses of thallium to rats: effects on distribution and lipid peroxidation in brain regions. *Toxicology Letters* 116, 37–43.
- Glowinski, J., Iversen, L.L., 1966. Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of 3H -norepinephrine, 3H -dopamine, and 3H -DOPA in various regions of the brain. *Journal of Neurochemistry* 13, 655–669.
- Goering, P.L., Morgan, D.L., Ali, S.F., 2002. Effects of mercury vapor inhalation on reactive oxygen species and antioxidant enzymes in rat brain and kidney are minimal. *Journal of Applied Toxicology* 22, 367–372.
- Haefliger, D.G., Sunde, R.A., Hoekstra, W.G., 1974. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *Journal of Nutrition* 104, 580–587.
- Hasan, M., Ali, S.F., 1981. Effects of thallium, nickel and cobalt administration on the lipid peroxidation in different regions of the rat brain. *Toxicology and Applied Pharmacology* 57, 8–13.
- Hissin, P.J., Hill, R., 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry* 74, 214–226.
- Lewis, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Olivares-Corichi, I.M., Granados-Silverstein, M.A., Hernández-Pando, R., Ibarra-Rubio, M.F., 2000a. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radical Biology and Medicine* 29, 602–611.
- Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O.N., Granados-Silverstein, M.A., Maldonado, P.D., Olivares-Corichi, I.M., Hernández-Pando, R., 2000b. Garlic ameliorates hyperlipidemia in chronic aminoglycoside nephrosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 211, 69–77.
- Rios, C., Galván-Arzate, S., 1998. Analysis of thallium in biological samples. In: Niagu, J. (Ed.), *Thallium in the Environment*.

- Advances in Environmental Science and Technology. Wiley, USA, pp. 155–166.
- Rios, C., Galván-Arzate, S., Tapia, R., 1989. Brain regional thallium distribution in rats acutely intoxicated with Tl_2SO_4 . *Archives of Toxicology* 63, 34–37.
- Repetto, G., Del Peso, A., Repetto, M., 1998. Human thallium toxicity. In: Nriagu, J. (Ed.), *Thallium in the Environment*. Advances in Environmental Science and Technology. Wiley, USA, pp. 167–199.
- Rodríguez-Martínez, E., Camacho, A., Maldonado, P.D., Pedraza-Chaverri, J., Santamaría, D., Galván-Arzate, S., Santamaría, A., 2000. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Research* 858, 436–439.
- Santamaría, A., Rios, C., 1993. MK-801, an *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neuroscience Letters* 159, 51–54.
- Santamaría, A., Flores-Escartín, A., Martínez, J.C., Osorio, L., Galván-Arzate, S., Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Jiménez-Capdeville, M.E., Manjarez, J., Rios, C., 2003a. Copper blocks quinolinic acid neurotoxicity in rats: contribution of antioxidant systems. *Free Radical Biology and Medicine* 35, 418–427.
- Santamaría, A., Salvatierra-Sánchez, R., Vázquez-Román, B., Sauti-ago-López, D., Villeda-Hernández, J., Galván-Arzate, S., Jiménez-Capdeville, M.E., Ali, S.F., 2003b. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *Journal of Neurochemistry* 86, 479–488.
- Somani, S.M., Ravi, R., Rybak, L.P., 1995. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 50, 635–639.
- Stewart, C.A., Morris, R.G.M., 1993. The water maze. In: Sahgal, A. (Ed.), *Behavioural Neuroscience*. Oxford Univ. Press, New York, pp. 107–122.
- Triggs, W.J., Willmore, L.J., 1984. In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe^{2+} injection. *Journal of Neurochemistry* 42, 976–979.
- Villaverde, M.S., Verstraeten, S.V., 2003. Effects of thallium(I) and thallium(III) on liposome membrane physical properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 417, 235–243.