

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura Química Farmacéutica Biológica

Informe de Servicio Social

**Determinación del cambio epigenético en ratón adulto ocasionado por la
exposición a plomo desde la gestación y su asociación con la ansiedad**

Como requisito para obtener el grado de Lic. Química Farmacéutica Biológica

Proyecto genérico correspondiente:

**Estudio del mecanismo de daño de la exposición a plomo en la conducta en
roedores**

Alumna:

Sabrina Guadalupe López Toledo



Asesora Externa: Dra. Francisca Pérez Severiano



Asesora Interna: Dra. Beatriz Godínez Chaparro

Periodo: 30 de mayo de 2022 al 28 de noviembre de 2022

1.- ANTECEDENTES.....	1
1.1 Plomo	1
1.2 Exposición al Pb	3
1.3 Relación del Pb y la serotonina en la ansiedad	4
1.4 Cambios epigenéticos y su relación con la exposición al Pb.....	6
1.4.1 Epigenética:	6
1.4.2 Epigenética y su relación con el Pb	8
2. JUSTIFICACION DEL TRABAJO.....	9
3. HIPOTESIS.....	9
4.- OBJETIVOS	9
4.2 GENERAL	9
4.3 ESPECÍFICOS	10
5. DISEÑO DEL ESTUDIO	10
6. MÉTODOS.....	13
6.1 Evaluación de la conducta tipo ansiedad	13
6.1.1 Luz-oscuridad	13
6.1.2 Enterramiento defensivo.	14
6.1.3 Prueba enterramiento de canicas.....	15
7. Evaluación de la metilación del ADN	16
7.1 Disección del tejido cerebral.....	16
7.2 Fundamento de la técnica de extracción de ácidos nucleicos	17
7.3 Tratamiento con bisulfito de sodio a las muestras del DNA extraído	18
9. RESULTADOS	21
9.1 El Pb altera la conducta de tipo ansiedad en roedores.....	21
9.1.1 Luz-Oscuridad	21
9.1.2 Enterramiento defensivo	21
9.1.3 Enterramiento de canicas.....	24
9.1.4 Extracción de tejidos para evaluación epignética	24
10.- DISCUSIÓN	30
10.1 Efecto de la exposición a Pb en los ratones.....	30
10.2.- El Pb y la conducta de tipo ansiosa.....	30
10.3 Modificaciones epigenéticas.....	36

11. CONCLUSIÓN.....	37
12.- REFERENCIAS	38

1.- ANTECEDENTES

1.1 Plomo

El plomo (Pb) es un metal caracterizado por ser blando, gris azulado, estable y resistente, por lo cual es utilizado en diversas áreas de la industria formando así parte de nuestra vida cotidiana (Hanna-Attisha *et al.*, 2018). Dicho metal se presenta en dos formas (inorgánica y orgánica), la forma inorgánica se encuentra presente en pinturas, tierra, polvo y productos de manufactura mientras que la forma orgánica del metal se encuentra en los gases de combustión, siendo este tipo de compuestos, los absorbidos con mayor facilidad por el organismo, por lo que resulta ser más tóxico que la forma inorgánica. El Pb es excretado del organismo principalmente por la orina o a través de la bilis en forma de heces, de las formas en que se presenta, la más común, la inorgánica, no es metabolizada en el hígado, mientras que, el Pb orgánico se absorbe casi en su totalidad y es metabolizado por el hígado, sin embargo la porción no excretada tiene la capacidad de permanecer por periodos prolongados y se intercambia entre tres principales compartimientos los cuales son: sangre, hueso y dientes, sin embargo está presente en otros tejidos como son: el hígado, los riñones, pulmones, cerebro, bazo, músculos y corazón (*figura 1*) (Poma, 2008). Las concentraciones de Pb presentes en el organismo tienen la capacidad de alterar funciones dando lugar a diversas complicaciones donde resaltan los efectos adversos en el sistema nervioso central (SNC), como son múltiples trastornos neurológicos,

encontrándose la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre otras (Fracchia *et al.*, 2003; Landrigan, 1994).

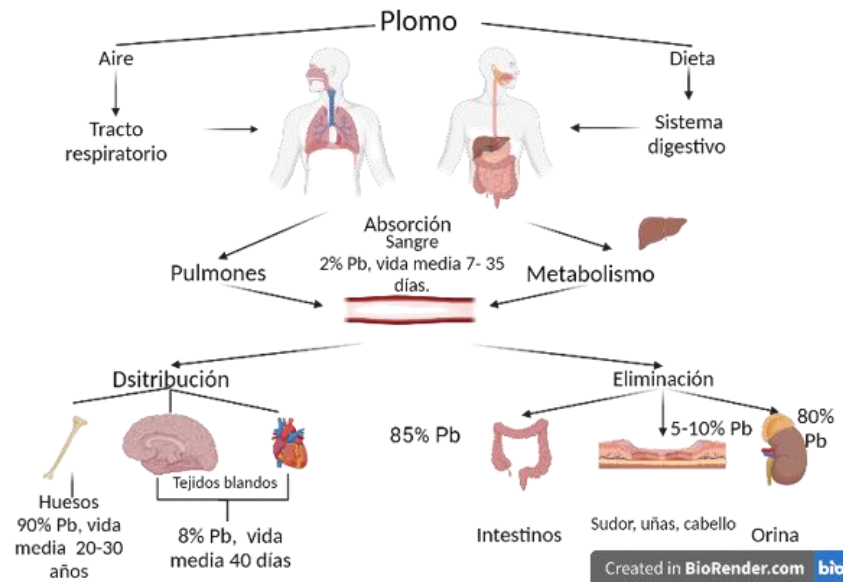


Figura 1.- Absorción, distribución y eliminación del Pb.

Las altas concentraciones de Pb conducen a un estrés oxidativo lo cual lleva a diversas complicaciones multiorgánicas, como las mencionadas anteriormente y otras descritas en la *figura 2*. El Consejo de Salubridad General reporta que concentraciones de Pb en la sangre superiores a 5 $\mu\text{g/dL}$, es considerado tóxico dando lugar a las alteraciones mencionadas, sin embargo, la bibliografía consultada revela que inclusive a concentraciones menores, se pueden presentar efectos adversos sobre el organismo (Poma 2008; Azcona-Cruz *et al.*, 2015).

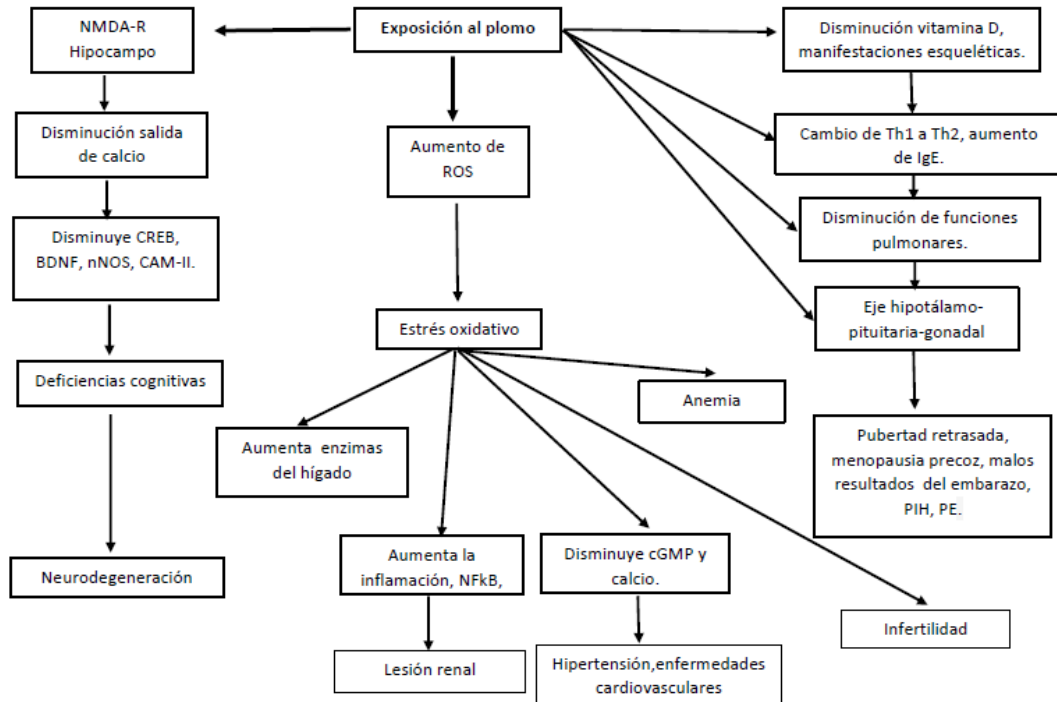


Figura 2. Exposición al plomo conduce al estrés oxidante y da como resultado alteraciones en las funciones de diversos órganos. Tomada del artículo de Mitra *et al.*, 2017.

1.2 Exposición al Pb

La exposición al Pb es más común de lo que parece, y tiene la capacidad de dañar a todo individuo debido a la gran cantidad que el organismo es capaz de asimilar, los infantes, son la población más afectada por este metal, absorben el 40% y retienen el 30%, no así en los adultos, quienes de la cantidad ingerida lo absorben entre un 5 y 10% y sólo retienen el 5% (Salas-Marcial, 2019). En un estudio realizado en trabajadores que estuvieron en contacto con el Pb, se demostró que existe una correlación positiva entre la exposición a Pb y las alteraciones hematológicas, psiquiátricas y respiratorias, encontrándose la ansiedad entre

estas (Lobaina *et al.*, 2000). La ansiedad es definida como un estado de agitación e inquietud desagradable caracterizado por la anticipación del peligro, predominio de síntomas psiquiátricos y la sensación de catástrofe o de peligro inminente, manifestando una reacción de sobresalto, donde el individuo trata de buscar una solución al peligro (Sierra *et al.*, 2003). Diversos estudios han mostrado y buscan demostrar que este metal es uno de los causantes de diversas alteraciones que dan lugar a desarrollar dicha conducta.

1.3 Relación del Pb y la serotonina en la ansiedad

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5HT), es un neurotransmisor que forma parte del grupo de las aminas el cual se encuentra distribuida ampliamente en el organismo, siendo principalmente las células endocrinas y la neuronas serotoninérgicas sus únicos depósitos (García-Zaragoza *et al.*, 2001), a través del tiempo la 5HT ha tomado importancia debido a que estudios han demostrado que este neurotransmisor se ve íntimamente relacionado con diversas conductas como: ansiedad, irritabilidad, inestabilidad emocional, baja autoestima y agresividad relacionándolo con una disminución de este neurotransmisor (Charney *et al.*, 1987; Zmudzka 2018). La ansiedad es una conducta que además de estar modulada por la 5HT, está relacionada con la exposición a ciertos metales pesados como el Pb. Se reporta que concentraciones límites para el Pb se consideran de 5 µg/dL en la sangre, 0.01 mg/L en agua y 0.5 µg/m³ en el aire.

Kala y Jadhav, en 1995 reportaron que la exposición de 25 y 50 ppm de Pb a roedores, causó disminución del 5HT en el núcleo acumbens (NA), corteza frontal (FC) y tronco encefálico (BS), sin cambios en cuerpo estriado (ST), hipotálamo (HY) e hipocampo (HIP). De igual forma encontraron que los niveles del metabolito de 5HT (ácido acético 5-hidroxiindol (5HIAA)) disminuyó solo en FC, mientras que Naqvi y colaboradores en 2010 mencionan que existe una fuerte relación entre la exposición al Pb y la disminución de la 5HT relacionándolo con una interrupción de las reservas de almacenamiento de 5-HT, lo que lleva a una mayor degradación de 5-HT dentro de las neuronas por las enzimas correspondientes.

El neurotransmisor 5HT se ha relacionado con el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), este factor es una proteína sintetizada en el cerebro mayormente en la región del hipocampo y corteza, su principal función se centra en la neurogénesis, es decir, es la síntesis de las neuronas, su estructura y su correcto funcionamiento (Silvia, et al., 2016). El BDNF regula la expresión de genes implicados en el funcionamiento serotoninérgico, como el transportador de serotonina y el triptófano hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de 5HT (Castillo-Quan, J., et al., 2010). Durante las últimas décadas el poder conocer y explicar que sucede a nivel neurológico en los diferentes trastornos conductuales (depresión, ansiedad y conductas suicidas) en el ser humano, así como la relación que éstas tienen con la 5HT y el BDNF, ha tomado importancia, debido a su posible función como biomarcadores, es decir, contribuyen a poder ser un factor que permita diagnosticar dichos trastornos. De acuerdo con Silvia, et al., 2015, estudios *post mortem* han demostrado que existe una disminución en los niveles

de estos en individuos con trastorno depresivo y ansiedad en regiones del el hipocampo y corteza cerebral.

1.4 Cambios epigenéticos y su relación con la exposición al Pb

1.4.1 Epigenética:

La epigenética es una rama de la genética que es definida como: Cambios heredables mitótica y meoíticamente en la expresión génica que no implican una alteración en la secuencia del ADN. La metilación del ADN, las modificaciones de histonas y los miRNA, tienen efectos sobre el control de la expresión génica; es decir los errores en el proceso epigenético, como modificar el gen incorrecto o no agregar un compuesto a un gen, ocasionan una actividad o inactividad genética anormal, dichos cambios tienen la capacidad de poder causar trastornos genéticos y enfermedades neurodegenerativas (Chuang y Jones, 2007).

Los principales mecanismos epigenéticos son: Metilación del ADN, modificaciones a histonas, los microRNAs.

1.4.1. 1 Metilación del ADN: Es un proceso que consiste en la unión covalente de grupos metilo de citosinas que se encuentran principalmente en el dinucleótido 5'-CpG-3', el proceso se encuentra mediado por un grupo de enzimas denominadas DNA metiltransferasas (DNMT) siendo tres enzimas las encargadas de llevar a cabo el proceso de metilación: • DNMT 3A y 3B son metiltransferasas *de novo*, es

decir son las responsables de establecer el patrón de metilación de ADN no metilado mientras que la DNMT1 es la DNMT de mantenimiento la cual asegura que los patrones de metilación se copien fielmente a lo largo de cada división celular interactuando entre sí para establecer y mantener los patrones de metilación del ADN célula (LandGrave-Gómez *et al.*, 2015; Khalid y Abdollahi, 2019).

1.4.1.2 Modificaciones de histonas: Son modificaciones postraduccionales en los cuales ocurren cambios químicos de los aminoácidos de la cola amino terminal amino realizadas por enzimas que alteran la estructura de la cromatina silenciando o activando regiones enteras del cromosoma y de los genes situados allí. Dichas modificaciones pueden ocurrir por diversas reacciones: acetilación, metilación, fosforilación, (Chuang y Jones, 2007; LandGrave-Gómez *et al.*, 2015, Khalid y Abdollahi, 2019).

1.4.1.3 miRNAs (MicroRNA): Son pequeñas moléculas de 18 a 25 nucleótidos los cuales no cuentan con la capacidad para codificar, pero tienen una función reguladora, participando en procesos fundamentales del desarrollo, de diferenciación, proliferación, supervivencia y de muerte celular. Está reportado que la expresión de éstos está desregulada en el cáncer y son capaces de modificar el fenotipo de las células malignas (Chuang y Jones, 2007; LandGrave-Gómez *et al.*, 2015, Khalid y Abdollahi, 2019).

Las modificaciones realizadas en la secuencia de ADN a través de los mecanismos epigenéticos tienen la característica de ser sumamente estables o incluso de persistir en la próxima generación, lo que es conocido como epigenética transgeneracional, de igual forma dan lugar a la inhibición a largo plazo de la expresión génica, este evento lleva a la manifestación de "programación fetal, inicio tardío" de múltiples enfermedades neurodegenerativas, y destaca la importancia primordial de los reguladores epigenéticos en la patogénesis (LandGrave-Gómez *et al.*, 2015).

1.4.2 Epigenética y su relación con el Pb

Los mecanismos epigenéticos se han visto relacionados en el desarrollo de ciertas patologías cuando existe una alteración de estos, siendo la metilación del ADN el mecanismo principalmente estudiado. De acuerdo con Khalid y Abdollahi en su estudio realizado en 2019 donde expusieron a ratones al Pb, reportar que existe una alteración en la expresión de las DNMT, ocasionando una hiper/hipo metilación de genes, es decir las metiltransferasas, son enzimas que a través de sus funciones son importantes para el desarrollo del sistema nervioso, su función y maduración, por lo que una deficiencia de estas da lugar a una plasticidad sináptica, y a un defecto en el aprendizaje y memoria.

De igual forma dichos autores concluyen que el Pb por lo diversos mecanismos epigenéticos, afecta a casi todos los sistemas de órganos causando resultados fisiopatológicos indeseables. Sin embargo, se necesita mayor investigación para revelar con mayor exactitud la relación entre estos mecanismos epigenéticos y moleculares (Khalid y Abdollahi, 2019).

2. JUSTIFICACION DEL TRABAJO

A la fecha no se han descrito completamente los procesos que relacionan el efecto de la exposición a Pb con cambios de comportamiento y alteraciones bioquímicas y epigenéticas, por lo que es de importancia encontrar la relación en modelos experimentales y enfocarla como un blanco terapéutico para revertir el daño.

3. HIPOTESIS

La metilación de regiones promotoras de factores neurotróficos como BDNF, se relacionó con la presencia de conducta depresiva, ansiosa o suicida por lo que es posible que la exposición a Pb en roedores desde el desarrollo, presenten la conducta de tipo ansiosa en la etapa adulta y se correlacione con metilaciones en promotores de los receptores de serotonina.

4.- OBJETIVOS

4.2 GENERAL

Comprobar si la exposición temprana a Pb, es la causa de la conducta tipo ansiedad en ratones adultos.

4.3 ESPECÍFICOS

- Establecer el protocolo de exposición a Pb en el agua de bebida a ratones desde el día 1 de la gestación hasta la adultez.
- Evaluar si la exposición a Pb, desde la gestación afecta la conducta de tipo ansiedad.
- Establecer el protocolo de sacrificio para realizar la disección de regiones específicas del cerebro (Hipocampo, corteza prefrontal y tallo cerebral).
- Evaluar el mecanismo epigenético de metilación en los promotores de 5HT1A Y 5HT2 en las áreas de interés y su relación con la ansiedad.

5. DISEÑO DEL ESTUDIO

Los ratones c57black hembra, una vez que quedaban preñadas, se les administró acetato de Pb (250 ppm) en el agua de bebida, en el periodo de destete (21 días) los ratones se separaron por sexo y se continuó administrando acetato de Pb en el agua de bebida hasta que cumplieron 75 días de edad. A partir de los 75 días, se realizaron pruebas para evaluar la conducta tipo ansiedad (hembras, n = 7; machos, n = 9) (Posteriormente, a los animales se les extrajo sangre y tejido cerebral. Se formaron dos grupos denominados Pb, expuestos a 250 ppm de plomo en el agua de bebida; y el grupo control expuesto a agua corriente. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 062-

ZOO-1999, que regula las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

DISEÑO EXPERIMENTAL

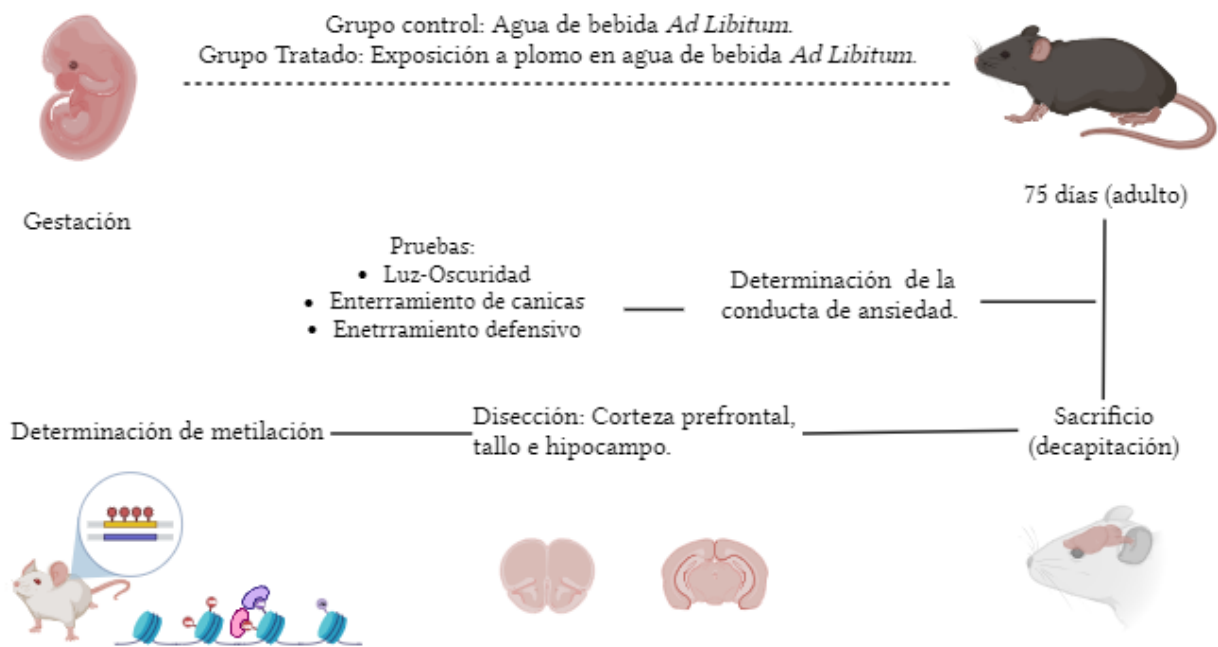


Figura 3.- Esquema del diseño experimental.

Luz-Oscuridad

Grupo de 75 días. 30 minutos antes de la prueba son transferido al cuarto para aclimatarse. Son colocados en el lado iluminado. Videograbado 10 minutos. Medición de los parámetros.

Enterramiento de canicas

Grupo de 75 días. 30 minutos antes de la prueba son transferido al cuarto para aclimatarse. Colocados en la cama de aserrín que contiene las canicas. Videograbado 8 minutos. Medición de los parámetros.

Enterramiento defensivo

Grupo de 75 días. 30 minutos antes de la prueba son transferido al cuarto para aclimatarse. Son colocados en la caja que tiene un electrodo. Videograbado 10 minutos. Medición de los parámetros.

Figura 4.- Descripción del diseño experimental de las pruebas conductuales realizadas en el presente estudio.

6. MÉTODOS

6.1 Evaluación de la conducta tipo ansiedad

Para el análisis de la relación que existe entre la exposición a Pb y la conducta tipo ansiedad, el grupo de ratones de 75 días expuestos a Pb desde la gestación, y el grupo control fueron sometidos a tres pruebas: 1) luz-oscuridad, 2) enterramiento defensivo y 3) enterramiento de canicas.

6.1.1 Luz-oscuridad. Se utilizó una caja de acrílico de 44 x 21 x 21 cm, la cual tenía la mitad oscurecida con pintura negra y con una puerta de aproximadamente 13x5 cm que separa la zona sombreada de la zona sin pintar, que fue iluminada con una lámpara de 22W (Rejón-Orantes, *et al.*, 2011). El animal se colocó en la parte oscura y fue videograbado durante 10 minutos. Los parámetros que se evaluaron fue el tiempo de permanencia, así como el número de entradas en el lado iluminado. Aunque los roedores pueden explorar con libertad ambos compartimientos muestran una clara preferencia a permanecer en el lado oscuro debido al miedo que presentan por la conducta de tipo ansiedad, lo que un aumento en el número de transiciones entre el lado oscuro y brillante, o un incremento en el tiempo de permanencia en el lado iluminado, se considera como un indicativo de la reducción en la ansiedad (Bourin y Hascoët, 2003).



Figura 5. Ilustración de la caja empleada para la prueba luz-oscuridad. Imagen realizada en BioRender.

6.1.2 Enterramiento defensivo. Para esta prueba se utilizó una caja de acrílico la cual contenía un electrodo de 7 cm de largo, en un costado de la caja, que emergía 2 cm por encima de una cama de aserrín. Cada vez que el animal tocaba el electrodo recibió una descarga eléctrica de 0.3 mA (mili amperes). La sesión fue grabada durante 10 min para posteriormente medir los parámetros correspondientes: latencia de enterramiento, tiempo de enterramiento, número de exploraciones, número de choques, total de exploraciones, y número de *rearings* (exploraciones).

Los indicativos de una reducción de ansiedad en esta prueba se presentan cuando hay una disminución del tiempo de enterramiento, un aumento de la latencia de enterramiento y un aumento del número de exploraciones (López-Rubalcava, *et al.*, 2009).

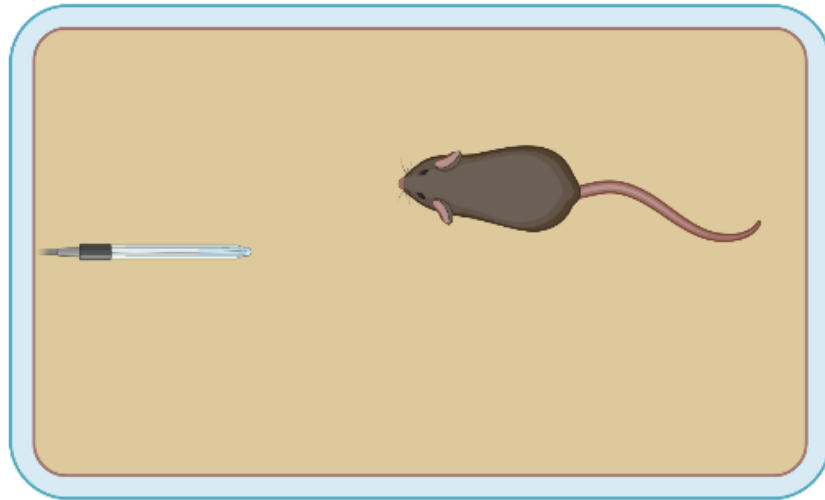


Figura 6.- Ilustración del aparato utilizado en la prueba enterramiento defensivo. Imagen realizada en BioRender.

6.1.3 Prueba enterramiento de canicas. La prueba implica el llenado de jaulas de acrílicos limpias (27 × 16,5 × 12,5 cm) con una cama de aserrín en la que fueron colocadas 20 canicas de vidrio- mármol (15 mm de diámetro) equidistantes en un arreglo de 4 × 5, la prueba fue videograbada durante 8 min.

Al finalizar las pruebas se contó el número de canicas que fueron enterradas. Una disminución del enterramiento de canicas es un indicativo de la disminución de la conducta tipo ansiedad (Angoa-Pérez, *et al.*, 2013).

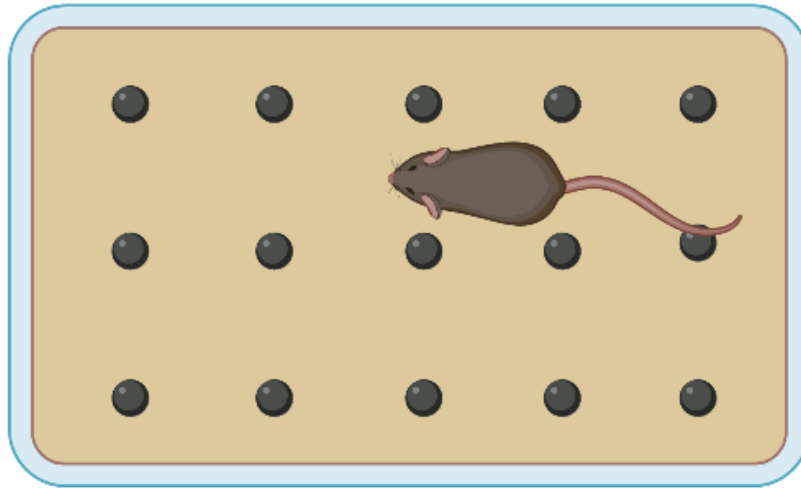


Figura 7.- Ilustración de la prueba enterramiento de canicas. Imagen realizada en BioRender.

7. Evaluación de la metilación del ADN

7.1 Disección del tejido cerebral. Los ratones de los diferentes grupos fueron sacrificados por decapitación. Posteriormente se tomó la cabeza para obtener el cerebro del animal. Se extrajo el cerebro con ayuda de una espátula y se colocó sobre papel filtro puesto sobre un vidrio de reloj incrustado en hielo. Con pinzas tipo relojero se obtuvo el hipocampo, corteza prefrontal y tallo. Las distintas regiones fueron colocadas en tubos de 1.5 mL y se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

7.2 Fundamento de la técnica de extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ADN se puede llevar a cabo con técnicas que se basan en solventes orgánicos, precipitación con sales o en membranas de sílica. La extracción del tejido se llevó a cabo mediante un kit, los cuales usan membranas de sílica en el proceso de extracción. *DNeasy Blood and Tissue* de QIAGEN®, es un kit comercial muy utilizado, basado en el uso de tecnología de membranas, este método permite lograr una lisis con proteinasa K, el pH se ajusta con diferentes soluciones amortiguadoras para lograr la máxima fijación de ADN a la membrana, y los contaminantes e inhibidores enzimáticos son removidos por centrifugación.

La extracción se llevó a cabo siguiente los pasos del kit empleado para la extracción del ADN (*DNeasy Blood and Tissue kit*):

- Colocar el tejido en un vial de 1.5 mL.
- Adicionar 180 µL de Buffer ATL.
- Adicionar 20 µL de Proteinasa K.
- Homogenizar en por agitación en un *vortex*.
- Incubar a 56° C hasta lisar completamente el tejido.
- Homogenizar en agitación en un *vortex* por 15 segundos.
- Adicionar solución amortiguadora AL y homogenizar en un *vortex*.
- Adicionar etanol 96°-100° y homogenizar en *vortex*.
- Pasar todo el contenido a la columna DNeasy mini Spin y colocar la columna en un vial de 2 mL (del kit) 8000 rpm por un minuto.
- La columna es colocada en un nuevo vial de colección de 2 mL

- se agregan 500 mL de buffer AW1 centrifugar a 8000 rpm un minuto.
- La columna es colocada en un nuevo tubo de colección de 2 mL.
- Se añade 500 mL de solución amortiguadora AW2 centrifugar a 14,000 rpm tres minutos.
- Colocar la columna en un vial de 1.5 mL o 2mL.
- Agregar 200 µL de solución amortiguadora AE.
- Incubar a temperatura ambiente durante un minuto.
- Centrifugar por un minuto a 8000 rpm.
- Almacenar los tubos colectados.
- Cuantificar en NanoDrop.

7.3 Tratamiento con bisulfito de sodio a las muestras del DNA extraído

Se llevó a cabo a la cuantificación de todas las muestras mediante espectrofotometría. Posteriormente, se tomaron 500 ng de DNA de cada muestra para ser tratados con bisulfito de sodio utilizando el kit *EpiTect Bisulfite kit* (QIAGEN®).

Pasos:

- Preparar las reacciones de bisulfito de sodio en tubos de PCR de 200 µL.
- Mezclar los tubos con la reacción de bisulfito.
- Dejar a temperatura ambiente (15-25°C).
- Dejar la conversión con de bisulfito de sodio en un termociclador de acuerdo a las condiciones requeridas.

- Una vez completada la conversión con bisulfito pasar a las reacciones a un vial limpio de 1.5 mL.
- Agregar 560 μ L de buffer BL y 3 μ L de *carrier RNA*.
- Homogenizar por agitación en un *vortex*.
- Transferir la mezcla a las columnas EpiTec Spin y centrifugar por un minuto.
- Agregar 500 μ L de solución amortiguadora BW a cada columna.
- Centrifugar a máxima velocidad por un minuto y descartar el líquido.
- Añadir 500 μ L solución amortiguadora BD en cada columna.
- Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente 15-25 °C).
- Centrifugar a máxima velocidad por un minuto.
- Añadir 500 μ L de solución amortiguadora BW en cada columna.
- Centrifugar a máxima velocidad por un minuto.
- Repetir los dos pasos anteriores.
- Pasar las columnas en un tubo de 2 mL y centrifugar a máxima velocidad por un minuto.
- En viales de 1.5 mL colocar las columnas con las tapas abiertas e incubar a 56°C por cinco minutos.
- Añadir en las columnas 20 μ L de buffer EB y centrifugar a 12000 rpm durante un minuto.

El ADN modificado será cuantificado y mantenido a -70°C . Un proceso posterior de PCR es necesario para determinar el estado de metilación en los sitios blanco de interés mediante el uso de cebadores de metilación específicos.

8.- ANALISIS DE RESULTADOS

Las pruebas fueron realizadas de acuerdo al apartado de metodología descrito anteriormente, los resultados fueron comparados mediante el uso del programa GradPhad Prism 8.0.1 y Sigma Plot 12.0, utilizando como prueba estadística un Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido de una prueba *pos hoc* (Tukey), con un alfa de 0.05. Antes de realizar las pruebas, se llevó a cabo la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de los datos. Los resultados fueron reportados de acuerdo a la agrupación de los ratones los cuales se encontraban dos grupos (control y Pb) que a su vez estos se encontraban divididos en hembras y machos (hembras $n=7$, machos $n=9$).

9. RESULTADOS

9.1 El Pb altera la conducta de tipo ansiedad en roedores

9.1.1 Luz-Oscuridad

La prueba de luz/oscuridad permitió evaluar la conducta a través de los parámetros tiempo en luz y número de entradas, el ANOVA realizado demostró que en ambos parámetros medidos (*Figura 8*), no se presentaron diferencias significativas entre ambos grupos y sexos con sus respectivos grupos controles.

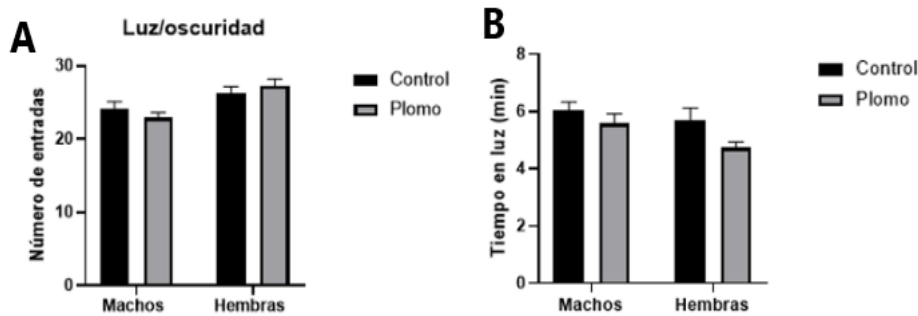


Figura 8.- Los gráficos muestran el efecto de la exposición crónica de Pb en la prueba Luz/oscuridad midiendo el número de entradas (gráfico A) y tiempo en luz (gráfico B). Se utilizó machos $n=9$ y hembras $n=7$, en grupos control y Pb. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M.

9.1.2 Enterramiento defensivo

La prueba enterramiento defensivo a través de sus diversos parámetros y el análisis estadístico permitió establecer si existe una relación entre la exposición al Pb y la conducta de tipo ansiosa. En la figura 9 se encontró diferencia significativa

para la latencia de enterramiento en hembras Pb respecto con su grupo control, de igual forma se encontró diferencia para el grupo de macho Pb con su respectivo grupo control. En cuanto al parámetro de tiempo de enterramiento se encontró únicamente diferencias significativas en hembras del grupo Pb con su respectivo grupo control, además de presentar diferencia significativa con el grupo de machos.

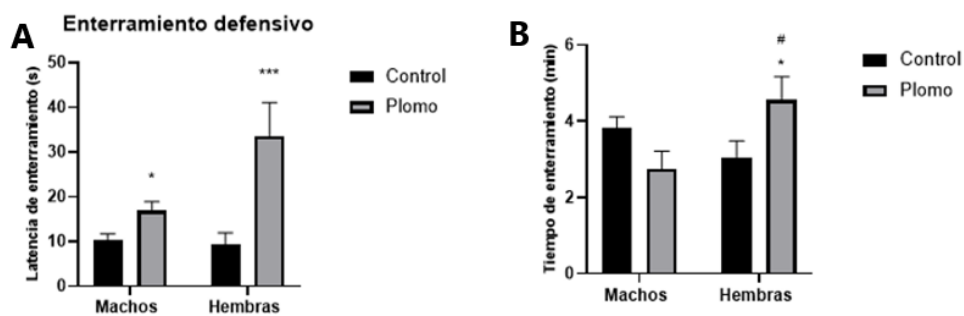


Figura 9.- Los gráficos muestran el efecto de la exposición crónica de Pb en la prueba enterramiento defensivo midiendo latencia de enterramiento (gráfico A) y tiempo de enterramiento (gráfico B). Se utilizó machos n=9 y hembras n = 7, en grupos control y Pb. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M, *p < 0,05, en Pb frente a controles.

Para los parámetros de número de exploraciones (gráfico A) y número total de exploraciones (gráfico B) (*Figura 10*), se encontraron diferencias significativas para el numero de exploraciones tanto en hembras como en machos del grupo Pb con su respectivo grupo control. Para el número total de exploraciones la diferencia fue encontrada en ambos grupos Pb respecto con sus controles.

La *Figura 11*, muestra el gráfico para el número de *rearings* donde no se presentan alguna diferencia significativa para los grupos.

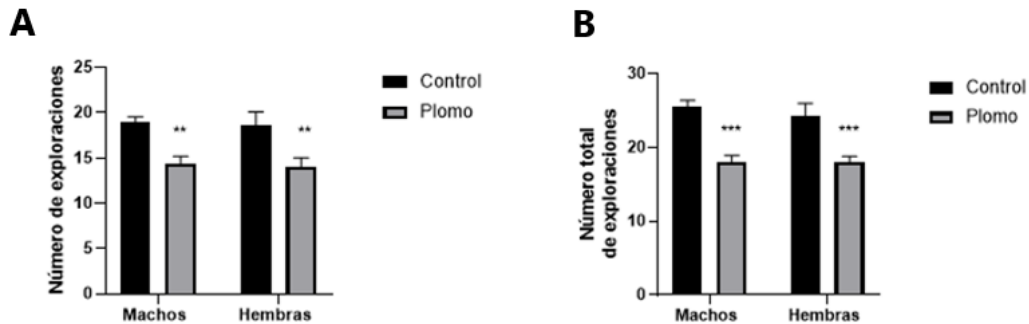


Figura 10.- Se muestra el efecto de la exposición crónica de Pb en la prueba enterramiento defensivo midiendo el número de exploraciones (gráfica A) y número total de exploraciones (gráfico B). Se utilizó machos n=9 y hembras n = 7, en grupos control y Pb. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M *p < 0,05, en Pb frente a controles.

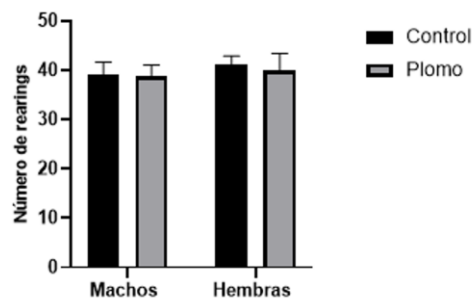


Figura 11.- Se muestra el efecto de la exposición crónica de Pb en la prueba enterramiento defensivo mostrando el parámetro de número de *rearings*. Se utilizó machos n= 9 y hembras n = 7, en grupos control y Pb. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M.

9.1.3 Enterramiento de canicas

Los gráficos realizados para la prueba de enterramiento de canicas (*Figura 12*) permitieron determinar a través del análisis estadístico una diferencia entre el grupo de hembras Pb con respecto a su grupo control, infiriendo que las hembras tratadas son más ansiosas que los machos.

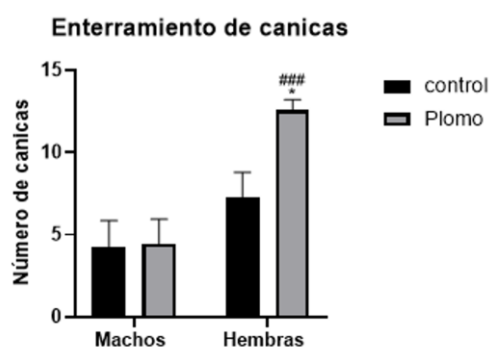


Figura 12.- Se muestra el efecto de la exposición crónica de Pb en la prueba de enterramiento de canicas midiendo el número de canicas enterradas. Se utilizó machos n= 9 y hembras n = 7, en grupos control y Pb. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M.

9.1.4 Extracción de tejidos para evaluación epigenética

Los tejidos diseccionados fueron almacenados con solución RNALater para evitar la degradación del DNA y RNA para posteriormente realizar de manera exitosa la extracción de ácidos nucleicos, mediante el Kit de DNeasy Blood and Tissue QIAGEN, los resultados de la extracción del DNA y la concentración obtenida mediante el NANODROP se presentan en la tabla 1.

Tabla 1.- Resultados obtenido de la concentración de DNA extraído en cada tejido diseccionado. (11, 12= grupos controles. Q, R= Grupos Pb. H= Hipocampo, C= corteza prefrontal, P= Puente, A= machos, B= Hembras).

Grupo	Numero de animal	Muestra	[DNA]
11	1	11 H1A	132.8
		11 C1A	263.4
		11 P1A	111.1
11	2	11 H2A	456.7
		11 C2A	423.9
		11 P2A	156.7
11	3	11 H3A	256.6
		11 C3A	173.1
		11 P3A	1120
11	4	11 H4A	456.7
		11 C4A	430
		11 P4A	320.1
11	5	11 H5A	765.1
		11 C5A	415.9
		11 P5A	110
11	6	11 H6A	405

		11 C6A	1212.4
		11 P6A	116.9
11	7	11 H7A	362.1
		11C7A	522.6
		11 P7A	446.2
11	1	11 H1B	576.4
		11C1B	728.6
		11 P1B	142.1
11	2	11 H2B	281.2
		11 C2B	843.4
		11 P2B	88.7
Q	1	Q H1A	41.8
		Q C1A	15
		Q P1A	129.9
Q	2	Q H2A	11.9
		Q C2A	18
		Q P2A	79.3
Q	3	Q H3A	17.1
		Q C3A	15.1
		Q P3A	35.8
Q	4	Q H4A	35.1
		Q C4A	156.8
		Q P4A	49.4

Q	1	Q H1B	25.6
		Q C1B	25.7
		Q P1B	107.7
Q	2	Q H2B	24.9
		Q C2B	60
		Q P2B	71.2
Q	3	Q H3B	19
		Q C3B	49.8
		Q P3B	59.4
Q	4	Q H4B	20.1
		Q C4B	45
		Q P4B	88.4
Q	5	Q H5B	32.7
		Q C5B	118.9
		Q P5B	12.9
Q	6	Q H6B	55.6
		Q C6B	33.8
		Q P6B	16.8
Q	7	Q H7B	48.6
		Q C7B	25.1
		Q P7B	20.9
12	4	12 H4A	123.5
		12 C4A	319.3

		12 P4A	250.8
12	5	12 H5A	72.5
		12 C5A	70.7
		12 P5A	80.9
12	6	12 H6A	155.1
		12 C6A	58.7
		12 P6A	225.4
12	1	12 H1B	42.2
		12 C1B	59.4
		12 P1B	308.4
12	2	12 H2B	38.5
		12 C2B	161.7
		12 P2B	110.7
12	3	12 H3B	59
		12 C3B	36
		12 P3B	88
12	4	12 H4B	94.4
		12 C4B	153.6
		12 P4B	110.5
12	5	12 H5B	54.6
		12 C5B	89.8
		12 P5B	260.8
R	1	R H1A	37.2

		R C1A	130.5
		R P1A	128.9
R	2	R H2A	129
		R C2A	30.6
		R P2A	55.2
R	3	R H3A	33.5
		R C3A	150.7
		R P3A	31.5
R	4	R H4A	34.4
		R C4A	255.7
		R P4A	143.7
R	5	R H5A	111.1
		R C5A	30.6
		R P5A	13.6
R	1	R H1B	58.4
		R C1B	60.7
		R P1B	32.8
R	2	R H2B	103.2
		R C2B	111.1
		R P2B	57.8
R	3	R H3B	63
		R C3B	112.3
		R P3B	265.8

R	4	R H4B	21.2
		R C4B	49.9
		R P4B	69.76
R	5	R H5B	120.8
		R C5B	135.8
		R P5B	145.8

10.- DISCUSIÓN

10.1 Efecto de la exposición a Pb en los ratones

La administración de Pb en el agua de bebida desde la gestación hasta la adultez, se realizó con el objetivo de alterar la conducta en los roedores, la dosis administrada fue 250 ppm, debido a que en los estudios revisados es una cantidad que ha dado resultados positivos a la alteración conductual. Estudios realizados por Yu, et al., 2021; Claudio y Wetmur, 1997; Ismael y Litchfield, 1988, llevaron a cabo la exposición a Pb con 250 ppm en modelos animales para evaluar la alteración a nivel genético, cognitivo y conductual (ansiedad).

10.2.- El Pb y la conducta de tipo ansiosa

El estudio de la alteración conductual ocasionada por la exposición de Pb comenzó décadas atrás, por lo que existen diversos trabajos que corroboran esto. De acuerdo con la bibliografía revisada, la mayor cantidad de trabajos publicados,

utilizan diversos modelos animales; sin embargo, la rata es el modelo animal que mayormente destaca (Tabla 1), por lo que se espera que los resultados obtenidos pudieran diferir con los ya publicados como demostró Fracchia, y colaboradores en 2010, estudiaron en un modelo animal de ratón (C3H, machos), administraron 0.5 ppm de acetato de Pb (desde el destete hasta los tres meses de edad), sin embargo los resultados obtenidos a pesar de la intoxicación ocasionada no mostraron diferencia significativa en la prueba conductual evaluada, por lo que fueron clasificados como “no ansiosos”. Los roedores suelen enterrar objetos que consideran amenazantes, por lo que se espera que, para la prueba de enterramiento de canicas, estas generen aversión; sin embargo, Thomas, *et al.*, 2009, nos presenta en su investigación que las canicas no representan un factor de estrés que desencadene la conducta tipo ansiosa debido a que su estudio realizado con diversos modelos animales, no presentaron diferencias significativas para las pruebas realizadas. Por otra parte, Angoa-Pérez, *et al.*, 2013 da a conocer que el enterramiento de canicas más que ocasionar una respuesta a la conducta de tipo ansiedad nos presenta un indicativo de un comportamiento repetitivo y compulsivo en roedores.

De acuerdo con los resultados obtenidos y presentados anteriormente, la prueba de enterramiento de canicas mostró una diferencia significativa entre el grupo de hembras Pb con respecto a su control, por lo que se infiere que existe una alteración conductual, desconociendo si es del tipo ansiosa o únicamente un comportamiento repetitivo/compulsivo, siendo las hembras expuestas a Pb las que enterraron más con respecto a su grupo control.

Por otra parte, los resultados correspondientes a la prueba de enterramiento defensivo mostraron diferencias para los parámetros de latencia de enterramiento, siendo el tiempo en que tarda el ratón en comenzar a enterrar después de recibir la primera descarga por parte del electrodo, en dicho parámetro se encontró una diferencia significativa en ambos grupos (Pb y control) y en ambos sexos. Además para el tiempo de enterramiento, el cual hace referencia al tiempo total de la prueba en la que el ratón se dedica a enterrar el electrodo, se encontró únicamente diferencias significativas en el grupo de hembras Pb con sus respectivo control, el número de exploraciones es el parámetro el cual indica las veces en que el animal se acerca al electrodo sin que este reciba una descarga, las diferencia encontradas en dicho parámetro se encontraron en ambos grupos (Pb y control) y en ambos sexos. El total de exploraciones indica la suma de número de choques más el número de exploraciones, encontrándose diferencias nuevamente en ambos grupos y sexos. Los resultados obtenidos en al aumento en la latencia de enterramiento y el tiempo de enterramiento y la disminución del número de exploraciones y total de exploraciones, son parámetros indicativos de un comportamiento de tipo ansioso, por lo que nos llevan a inferir que los roedores presentaron una conducta de tipo ansiosa. Sin embargo el mecanismo de daño por el cual el Pb tiene la capacidad de generar dichas alteraciones a nivel conductual es muy complejo y aún no se conoce con exactitud, pero las principales vías que se han visto relacionadas debido a que son muy susceptibles al estrés son las especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la muerte celular neuronal inducida por la peroxidación lipídica (LP), por lo que a pesar de ser una investigación que comenzó décadas atrás hasta la fecha sigue en investigación.

Tabla 2.- Estudios que muestran la relación del Pb con la ansiedad.

Estudios de ansiedad			
Modelo animal	Nombre del estudio	Resultados	Referencia
Ratas Wistar	Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour	Las ratas intoxicadas mostraron un aumento en los índices de ansiedad en el laberinto en cruz elevado	19
Ratas wistar	Intermittent low-level lead exposure provokes anxiety, hypertension, autonomic dysfunction and neuroinflammation	La exposición intermitente al plomo causa efectos adversos para la salud, es decir, hipertensión, aumento de la frecuencia respiratoria y sensibilidad quimiorrefleja, deterioro del barorreflejo, ansiedad, disminución de la actividad sináptica, neuroinflamación y gliosis reactiva	31
Ratas wistar	Effects of chronic lead intoxication on rat serotonergic system and anxiety	a exposición al plomo posiblemente puede inducir un aumento de la ansiedad como	30

	behavior	consecuencia de los cambios en el contenido neuronal de 5-HT en la DRN.	
Ratas wistar	Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term	Los resultados del presente informe demostraron que la exposición a Pb durante el embarazo y la lactancia induce hiperactividad en los cachorros destetados, disminución del comportamiento exploratorio y deterioro del aprendizaje y la memoria	23
Sprague-Dawley	Changes in Behavior and Learning Ability of Rats Intoxicated with Lead	Se puede concluir que hubo cambios de comportamiento debido a la exposición al plomo	11
Wistar	Developmental lead exposure impairs contextual fear conditioning and reduces adult	Nuestros resultados demuestran que la exposición al plomo durante el desarrollo induce la inhibición	14

	hipocampal neurogenesis in the rat brain	persistente de la neurogénesis y altera el patrón de diferenciación de las células recién nacidas en la circunvolución dentada del hipocampo de rata, lo que podría, al menos en parte, contribuir a las deficiencias cognitivas y conductuales observadas en la edad adulta.	
Kumming	<i>Effects of meso-2,3- dimercaptosuccinic acid, potassium iodide and chlorophyllon lead accumulation in male mice</i>		35

10.3 Modificaciones epigenéticas

La exposición a Pb puede causar un cambio a nivel del ADN, de acuerdo con diversos autores (Naqvi, et al., 2010; Charney et al., 1987; Zmudzka 2018), en sus estudios realizados demostraron que la exposición al Pb ocasiona una disminución de la concentración plasmáticas de serotonina (5HT), relacionándolo con alteraciones neuroconductuales; sin embargo, conocer cómo se lleva a cabo el mecanismo de acción exacto de esto, sigue siendo tema investigación hasta la fecha. Se conoce que dentro de los principales procesos biológicos en la conducta de la ansiedad se involucra la 5HT, la cual está sumamente ligada con el estado de ánimo, por lo que una alteración en dicho gen y sus receptores puede influir en la conducta y demás (Naqvi, et al., 2010). Uno de los mecanismos propuestos a lo largo del tiempo es la epigenética la cual a través de uno de sus principales mecanismos la metilación en los promotores de 5HT, se cree que este proceso ocasiona una hipermetilación del gen, es decir que hay una disminución en la síntesis de este por lo que la densidad del neurotransmisor se podría ver afectada.

Además de la relación que se ha visto con la conducta de tipo ansiedad también se ha encontrado que esta exposición al plomo no únicamente puede afectar a quien está en contacto con este, sino que dicha alteración epigenética puede llegar a influir de manera transgeneracional, lo que es conocido como epigenética transgeneracional; sin embargo, es un tema de investigación hasta el momento. De acuerdo con la información consultada y con nuestros objetivos principales del trabajo, posterior al término de las pruebas conductuales, los ratones fueron

sacrificados, mediante decapitación, para extraer el cerebro para diseccionar las regiones de interés (corteza prefrontal, tallo cerebral e hipocampo) con la intención de que en pruebas futuras sean utilizadas para medir el mecanismo epigenético de metilación en los promotores de los 5HT1 y 5HT2.

11. CONCLUSIÓN

La exposición a plomo es un tema estudiado hace décadas, sin embargo, sigue causando interés en la actualidad, por ello a través de los resultados obtenidos se pudo encontrar que la exposición a este metal en el periodo desde la gestación hasta una vida adulta llega ocasionar una alteración a nivel de conducta, esperando encontrar una alteración a nivel epigenético de igual manera en las pruebas futuras.

12.- REFERENCIAS

1. Angoa-Pérez, M., Kane, M.J., Briggs, D.I., Francescutti, D.M., Kuhn, D.M. Marble Burying and Nestlet Shredding as Tests of Repetitive, Compulsive-like Behaviors in Mice. *J. Vis. Exp.* (82), e50978, doi:10.3791/50978 (2013).
2. Azcona-Cruz, M. I., Ramírez, R., & Vicente-Flores, G. (2015). Efectos tóxicos del plomo. *Revista de especialidades médico-quirúrgicas*, 20(1), 72-77.
3. Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 55-65.
4. Castillo-Quan, J. I., Barrera-Buenfil, D. J., Pérez-Osorio, J. M., & Álvarez-Cervera, F. J. (2010). Depresión y diabetes: de la epidemiología a la neurobiología. *Rev Neurol*, 51(6), 347-359.
5. Charney, D.S., Woods, S.W., Goodman, W.K. et al. Función de la serotonina en la ansiedad. *Psicofarmacología* 92, 14–24 (1987).
6. Chuang, J. C., & Jones, P. A. (2007). Epigenetics and microRNAs. *Pediatric research*, 61(7), 24-29.
7. Claudio, L., Lee, T., Wolff, M. S., & Wetmur, J. G. (1997). Un modelo murino de susceptibilidad genética a la bioacumulación de plomo. *Toxicología fundamental y aplicada*, 35(1), 84-90.
8. Fracchia, L. N., & Riera, N. M. (2010). Behavior Alterations of Contaminated Lead Mice Exposed to Anxiogenic Stimulus. *Revista Neuropsicología, Neuropsiquiatría y Neurociencias*, 10(1), 23-33.

9. Fracchia, L., Martínez Riera, N., Soria, N., Gandur, M. J., & Riera, N. (2003). Agresión e interacción social en ratones contaminados con plomo. *Revista de la Facultad de Medicina*, 4(1), 23-27.
10. García-Zaragozá, E., Moreno, L., & Esplugues, J. V. (2001). Importancia farmacológica y clínica de los receptores serotoninérgicos del tracto gastrointestinal. *Gastroenterología y Hepatología*, 24(2), 70-76.
11. Goma, A., & Mahrous, U. E. (2013). Changes in Behavior and Learning Ability of Rats Intoxicated with Lead. *International Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 7(12), 1096-1102.
12. Hanna-Attisha, M., Lanphear, B., & Landrigan, P. (2018). Envenenamiento por plomo en el siglo 21: La epidemia silenciosa continúa. *Revista americana de salud pública*, 108(11), 1430. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2018.304725>
13. Ismael, J., & Litchfield, M. H. (1988). Toxicidad crónica y evaluación carcinogénica de la permetrina en ratas y ratones. *Ciencias Toxicológicas*, 11(1), 308-322.
14. Jaako-Movits, K., Zharkovsky, T., Romantchik, O., Jurgenson, M., Merisalu, E., Heidmets, LT y Zharkovsky, A. (2005). La exposición al plomo en el desarrollo afecta el condicionamiento del miedo contextual y reduce la neurogénesis del hipocampo adulto en el cerebro de la rata. *Revista Internacional de Neurociencia del Desarrollo*, 23 (7), 627-635.
15. Kala SV, Jadhav AL. Region-specific alterations in dopamine and serotonin metabolism in brains of rats exposed to low levels of lead. *Neurotoxicology*. 1995 ;16(2):297-308. PMID: 7566689.

16. Khalid, M., & Abdollahi, M. (2019). Epigenetic modifications associated with pathophysiological effects of lead exposure. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 37(4), 235-287.
17. Landgrave-Gómez, J., Mercado-Gómez, O., & Guevara-Guzmán, R. (2015). Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 58.
18. Landrigan, P. J., & Todd, A.C. (1994). Saturnismo. *The Western journal of medicine*, 161(2), 153–159.
19. Leret, M. L., San Millán, J. A., & Antonio, M. T. (2003). Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. *Toxicology*, 186(1-2), 125-130.
20. Lobaina, E. G., Rivero, D. M., Hernández, J. R., Hernández, P. A., & Ortiz, J. A. C. (2000). Trastornos psicomaticos y exposicion a neurotoxicos. *Revista Cubana de Psicología*, 17(2), 114-
21. López-Rubalcava, C., Rogel-Salazar, G., & Paez-Martinez, N. (2009). The conditioned defensive burying test in rats: an animal model of fear/anxiety. *Models of Neuropharmacology. Transworld Research Network, Kerala, India*, 133-147.
22. Mitra, P., Sharma, S., Purohit, P., & Sharma, P. (2017). Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 54(7-8), 506-528.
23. Moreira, E. G., Vassilieff, I., & Vassilieff, V. S. (2001). Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. *Neurotoxicology and Teratology*, 23(5), 489-495.

24. Naqvi, S. H., Rongqiao, H., Haleem, D. J., & Naqvi, S. W. (2010). Effect of serotonin and dopamine in Pb induced behavioral deficits in rats. *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 43(1), 19-22.
25. Poma, Pedro A. (2008). Intoxicación por plomo en humanos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 69(2), 120-126.
26. Poma, Pedro A. (2008). Intoxicación por plomo en humanos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 69(2), 120-126.
27. Rejón-Orantes, J., Perdomo, D. P., & Roldán, G. (2011). Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. *Universitas medica*, 52(1), 78-89.
28. Rodríguez Yunta, E. (2007). Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioethica*, 13(1), 25-40.
29. Salas-Marcial, C., Garduño-Ayala, M. A., Mendiola-Ortiz, P., Vences-García, J. H., Zetina-Román, V. C., Martínez-Ramírez, O. C., & Ramos-García, M. D. (2019). Fuentes de contaminación por plomo en alimentos, efectos en la salud y estrategias de prevención. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 20(1).
30. Sansar, W., Bouyatas, M. M., Ahboucha, S., & Gamrani, H. (2012). Effects of chronic lead intoxication on rat serotonergic system and anxiety behavior. *Acta histochemica*, 114(1), 41-45.
31. Shvachiy, L., Geraldés, V., Amaro-Leal, Â., & Rocha, I. (2018). La exposición intermitente al plomo en niveles bajos provoca ansiedad, hipertensión, disfunción autonómica y neuroinflamación. *Neurotoxicología*, 69, 307-319.

32. Sierra, J. C., Ortega, V., & Zubeidat, I. (2003). Ansiedad, angustia y estrés: tres conceptos a diferenciar. *Revista mal-estar e subjetividade*, 3(1), 10-59.
33. Silva, D., Vicente, B., & Valdivia, M. (2015). Factor neurotrófico derivado del cerebro como marcador de conducta suicida en pacientes con trastorno depresivo mayor. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 53(1), 44-52.
34. Thomas, A., Burant, A., Bui, N., Graham, D., Yuva-Paylor, L. A., & Paylor, R. (2009). El entierro de mármol refleja un comportamiento repetitivo y perseverante más que la ansiedad inducida por la novedad. *Psicofarmacología*, 204, 361-373.
35. Xie, Y., & Zhou, G. (2017). Effects of meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid, potassium iodide and chlorophyll on lead accumulation in male mice. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 30(1), 87
36. Yu, C., Pan, S., Zhang, J., Li, X., & Niu, Y. (2021). Ferulic acid exerts Nrf2-dependent protection against prenatal lead exposure-induced cognitive impairment in offspring mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 91, 108603.
37. Zmudzka, E., Sałaciak, K., Sapa, J. y Pytka, K. (2018). Receptores de serotonina en la depresión y la ansiedad: Perspectivas de estudios en animales. *Ciencias de la vida*, 210, 106-124.