



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO NEUROCONDUCTUAL EN EL ROEDOR *Peromyscus melanophrys* EXPUESTO A JALES DE HUAUTLA, MORELOS

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L Ó G O

P R E S E N T A:

ANA RAQUEL PÉREZ RÍOS

DIRECTORES

Dra. PATRICIA MUSSALI GALANTE

Dra. ISELA HERNÁNDEZ PLATA

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO, 2021.

**“Somos lo que hacemos día a día.
De modo que la excelencia,
entonces, no es un acto sino un
hábito”**

-Aristóteles

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A mis directoras de tesis:

Dra. Patricia Mussali Galante por brindarme la oportunidad de formar parte del equipo de trabajo del Laboratorio de Investigaciones Ambientales, así como proponerme metas desde el primer día y por el apoyo en la dirección de este proyecto. Sin duda por ser una ejemplo de tutora e investigadora.

Dra. Isela Hernández Plata por compartir conmigo sus conocimientos con la paciencia suficiente desde un inicio, haciendo posible este proyecto. Por supuesto a impulsarme a mejorar académica y profesionalmente todo el tiempo.

Por supuesto a los sinodales quienes estudiaron mi tesis y la aprobaron:

Dr. Efraín Tovar Sánchez por las críticas constructivas al proyecto que han servido para mejora, así como las observaciones en los exámenes para mi crecimiento académico y profesional. Sin duda por brindarme un gran equipo de trabajo, mis compañeros.

Biol. Justina Leticia Peña Camacho por las observaciones que han ayudado a mejorar el escrito, por supuesto a mí académicamente y sin duda por los ánimos siempre presentes.

M. en B. Carolina Abarca Camacho por las observaciones detalladas para mejora del escrito, por supuesto de los cuestionamientos durante el desarrollo del proyecto que me impulsaron prepararme mucho mejor.

Dra. Mariana Romero por las observaciones y cuestionamientos en el examen.

También muy importante a...

Dra. Verónica Rodríguez Córdova y a la ***Biol. María Soledad Mendoza Trejo*** del Instituto de Neurobiología-UNAM por las facilidades y apoyo técnico para realizar la técnica de inmunohistoquímica.

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros del Laboratorio de Investigaciones Ambientales y del Laboratorio de Marcadores Moleculares que conforman el gran equipo donde obtuve grandes amigos, en especial a...

M. BIByC. Miguel Galván por ser la primera persona en brindarme apoyo. Enseñándome todo sobre la técnica de trampeo, identificación, por supuesto a facilitar y hacer amenas todas las salidas a campo, incluso cuando los trampeos no eran muy favorables. Las mejores salidas a campo.

M. en B. Anaid Fuentes por ser una de las primeras personas en brindarme apoyo y sin duda por la gran experiencia de mi primer trampeo en donde fuiste una gran anfitriona. Sin olvidar mencionar los buenos momentos y risas en el Laboratorio, que alegría.

Alexis García futuro biólogo, por los buenos días en el laboratorio y desayunos juntos haciéndolos muy amenos, las aventuras en campo, las grandiosas fotos y finalmente por convertirse en un gran amigo para disociar tantas cosas. Me pregunto, ¿serás científico o finalmente poeta?

Dr. Miguel Santoyo por el gran apoyo en el material de laboratorio necesario para realizar este proyecto, sin duda por los ánimos y buenos comentarios que me motivaron en días un poco complejos.

Dra. Ana Karen Flores por las facilidades y apoyo en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales para poder realizar exitosamente mis objetivos. Por supuesto por los buenos momentos en el laboratorio y por ayudarme a despejar mis dudas.

M. BIByC. Joel Casta e Ing. Juan Ramírez por el gran apoyo para el transporte y trabajo en campo. Así como la gran ayuda y paciencia para despejar mis dudas. Sin duda, muchas gracias por llevarnos a la meta.

Biol. Marcos Rosas y Lic. Sofia Catalán por los grandes momentos, sobre todo en los días donde el laboratorio se convirtió en nuestra segunda casa admirando el día y la noche desde las ventanas en días de arduo trabajo. Sobre todo por despejar mis dudas y aprender de ustedes.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A la Facultad de Ciencias Biológicas donde aprendí y me maravillé...

A mis grandiosos amigos Katia Alatorre, Héctor Maruri y Adrian Piña

Por ser pieza fundamental en mi paso por la carrera, especialmente durante el desarrollo de este proyecto donde fueron ese gran refugio en el cual descansé, reí, aprendí, experimenté y los hice mis mejores amigos en la uni.

Analista FQ Ahide Contreras

Por ser la primer persona a la quien yo anclé mis metas desde niña. Por haber sido mí maestra tantas veces y motivarme a ser mejor hasta ahora.

A ti en especial

Que cuando leas esto, recuerdes los buenos y los no tan buenos días que tuvieron que pasar para que lograra escribir estas líneas, a ti por todo el apoyo.

A mi familia

Por todo el apoyo infinito, por hacer suyos mis desvelos y calmar mi intranquilidad en momentos de exámenes y avances.

A mi directora de tesis Dra. Isela

No puedo sino sentirme agradecida y afortunada por todo lo que aprendí a lo largo de la realización de este proyecto, esto gracias a su gran paciencia, pasión por la ciencia, el tema y desde luego por la puntual guía. Convirtiendose importante en mi formación academica. Me llevo también los buenos momentos donde me brindó un oído y posibles soluciones ante situaciones que me genararon inquietud, incluso en trabajar mis debilidades.

Evidentemente por el apoyo en la coordinación de las salidas a campo, la técnica de inmunohistoquímica y la mejora imparable del escrito.

Por la enseñanza de un tema asombroso.

E. Ríos Manzanarez

A mi mamá...

*Mil gracias se tornarían insuficientes para
sonreír a tu lado, maestra y amiga. Por tu
dedicación, regaños a tiempo y apoyo
invaluable que me ha llevado tan y cada vez
más alto sin desistir a lo que soy...*

*Por la compañía, elogios y gran amor
inquebrantable que me ha hecho querer
comerme al mundo o tocar las estrellas...*



ÍNDICE

	Págs
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Minería en México	1
a) Minería en Morelos: Jales de Huautla	2
1.2 Metales pesados	4
a) Mecanismos de toxicidad de los metales pesados.....	6
1.3 Sistema nervioso central: Vías dopaminérgicas	8
a) Metabolismo del neurotransmisor dopamina.....	10
b) Anatomía de las vías dopaminérgicas.....	15
c) Conductas asociadas a las vías dopaminérgicas.....	16
1) Control motor:	17
2) Actividad exploratoria:	17
3) Aprendizaje y Memoria.....	18
2. ANTECEDENTES	21
2.1 Efecto de los metales pesados sobre las vías dopaminérgicas en roedores de laboratorio.	21
2.2 Estudios sobre el efecto de los metales pesados sobre la flora y fauna de Huautla, Morelos.	28
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVOS	36
6. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	37
7. MATERIALES Y MÉTODOS	39
7.1 Descripción del sitio de estudio: Huautla, Morelos.	39
7. 2 Colecta de individuos	41
a) Biología del roedor <i>Peromyscus melanophrys</i>	41
b) Muestreo	44
7.3 Aplicación de instrumentos para evaluación de control motor y actividad exploratoria: Campo abierto	44
a) Laberinto Campo Abierto	45
7.4 Aplicación de instrumento de aprendizaje y memoria: Laberinto acuático de Morris	47
b) Laberinto acuático de Morris.....	47
7.5 Inmunohistoquímica para detectar células positivas a la enzima tirosina-hidroxilasa	51

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	56
9. RESULTADOS.....	57
9.1 Evaluación del control motor y actividad exploratoria a través del campo abierto.....	57
9.2 Evaluación de aprendizaje y memoria a través del Laberinto Acuático de Morris.....	62
a) Adquisición de información durante el entrenamiento: Fase de aprendizaje	62
b) Evocación de información posterior al entrenamiento: Prueba de memoria	64
9.3 Evaluación del número de células positivas a la enzima tirosina hidroxilasa ...	67
10. DISCUSIÓN.....	70
a) Control motor y actividad exploratoria	70
b) Aprendizaje y memoria.....	74
c) Número de células positivas a TH.....	78
d) Consideraciones finales	80
11. CONCLUSIONES.....	81
12. PERSPECTIVAS	82
13. REFERENCIAS.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras principales del sistema nervioso central en rata.	9
Figura 2. Síntesis y degradación del neurotransmisor dopamina.	13
Figura 3. Liberación de dopamina al espacio sináptico y su unión a los receptores dopaminérgicos.	14
Figura 4. Principales vías dopaminérgicas en la rata.	16
Figura 5. Diseño experimental para evaluar la conducta y un neuromarcador dopaminérgico en los roedores silvestres de <i>Peromyscus melanophrys</i> .	38
Figura 6. Sujeto de estudio: roedor <i>Peromyscus melanophrys</i> .	42
Figura 7. Dimensiones y vista superior del campo abierto para evaluar control motor y actividad exploratoria en el roedor <i>Peromyscus melanophrys</i> .	45
Figura 8. Dimensiones del laberinto acuático de Morris (A) señales visuales externas utilizadas en el laberinto (B).	48
Figura 9. Laberinto acuático de Morris para evaluar aprendizaje y memoria en el roedor <i>Peromyscus melanophrys</i> .	50
Figura 10. Cortes coronales anterior, medial y posterior en la rata.	55
Figura 11. Número de incorporaciones en la prueba de campo abierto del roedor <i>Peromyscus melanophrys</i> que habita una zona testigo y una zona minera.	58
Figura 12. Número de cuadros visitados en la prueba de campo abierto del roedor <i>Peromyscus melanophrys</i> que habita una zona testigo y una zona minera.	59
Figura 13. Tiempo promedio en el centro de la caja en la prueba de campo abierto del roedor <i>Peromyscus melanophrys</i> que habita una zona testigo y una zona minera.	60
Figura 14. Número promedio de visitas al centro de la caja en la prueba de campo abierto del roedor <i>Peromyscus melanophrys</i> que habita una zona testigo y una zona minera.	61

Figura 15. Tiempo de llegada a la plataforma en la fase de entrenamiento y prueba de memoria en el laberinto acuático de Morris en el roedor *Peromyscus melanophrys* que hábita una zona testigo y una zona minera. _____ **64**

Figura 16. Número de cruzamientos en el cuadrante donde estaba la plataforma durante la prueba de memoria (PM) en el laberinto acuático de Morris en el roedor *Peromyscus melanophrys* que habita una zona testigo y una zona minera. _____ **66**

Figura 17. Tiempo en el cuadrante donde estaba la plataforma durante la prueba de memoria (PM) en el laberinto acuático de Morris en el roedor *Peromyscus melanophrys* que habita una zona testigo y una zona minera. _____ **67**

Figura 18. Señalamiento en líneas punteadas de las áreas dopaminérgicas cuantificadas en un corte cerebral coronal del roedor *Peromyscus melanophrys*. _____ **68**

Figura 19. Celúlas positivas a la enzima tirosina hidroxilasa en un corte cerebral coronal del roedor *Peromyscus melanophrys*. _____ **69**

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Pruebas o paradigmas utilizados para el análisis conductual en animales de laboratorio _____ **20**
- Tabla 2.** Efectos sobre la actividad locomotora y actividad exploratoria en roedores de laboratorio expuestos a metales pesados. _____ **22**
- Tabla 3.** Efectos sobre el aprendizaje y memoria en roedores de laboratorio expuestos a metales pesados _____ **24**
- Tabla 4.** Efectos neuroquímicos en roedores de laboratorio expuestos a metales pesados. _____ **26**
- Tabla 5.** Promedio de la biodisponibilidad (mg/kg) de metales pesados en los jales de Huautla, Morelos _____ **29**
- Tabla 6.** Efectos de metales pesados en suelo, agua, flora y fauna de Huautla, Morelos. _____ **32**
- Tabla 7.** Resumen de las variables analizadas en la prueba de campo abierto en el roedor *Peromyscus melanophrys* que habita una zona testigo y una zona minera. _____ **62**
- Tabla 8.** Número de células positivas a la enzima tirosina hidroxilasa en el mesencéfalo del roedor *Peromyscus melanophrys* que habita una zona testigo y una zona minera. _____ **70**

ABREVIATURAS

μL:	Microlitros
3-MTT:	3-metoxitiramina
5-HIAA:	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT:	5-hidroxitriptamina
AAAD:	Aminoácidos aromáticos
ABC:	Avidina biotina peroxidasa
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
Ag:	Plata
As:	Arsénico
Au:	Oro
AVT:	Área tegmental ventral
B6:	Piridoxal fosfato
Ba:	Bario
BHE:	Barrera hematoencefálica
Ca:	Calcio
CA3 y CA1:	Áreas cerebrales del hipocampo
Cd:	Cadmio
CdCl₂:	Cloruro de Cadmio
cm:	Centímetros
Co:	Cobalto
CO₂:	Bióxido de carbono
COMT:	Catecol O-metiltransferasa
Cr:	Cromo
Cu:	Cobre
D1:	Receptores de dopamina tipo D1
D2:	Receptores de dopamina tipo D2
DAB:	Diaminobencidina
DOPAC:	Ácido 3,4 dihidroxifenilacético
EPT's:	Elementos potencialmente tóxicos
Fe:	Hierro
H₂O:	Agua
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
Hg:	Mercurio
HgCl₂:	Cloruro de Hg
HgCl₂:	Cloruro de Hg
HVA:	Ácido homovanílico
K:	Potasio
kg:	Kilogramo
km:	Kilometro
KPBS:	Solución salina tamponada con fosfato
LAM:	Laberinto acuático de Morris
L-DOPA:	L-dihidroxifenilalanina
L-Tyr:	Aminoácido tirosina
m:	Metros
M:	Molar
MAO:	Monoamino oxidasa

Mg:	Manganeso
mg:	Miligramo
mL:	mililitros
Mn(CH₃CO₂)₂·:	Acetato de Manganeso
Mn:	Manganeso
Mo:	Molibdeno
MP:	Metales pesados
Na:	Sodio
Na₃AsO₃:	Metarsenito de Sodio
Na₃AsO₄:	Metarseniato de Sodio
Ni:	Níquel
nNos:	Óxido nítrico sintasa
O²⁻:	Anión superóxido
Pb(C₂H₃O₂)₄:	Acetato de Plomo
Pb:	Plomo
PbCO₃:	Carbonato de Plomo
PBP:	Núcleo parabraquial pigmentoso
PM:	Prueba de memoria
PN:	Núcleo paranigral
PND:	Día postnatal al nacimiento
ppm:	Partes por millón
REBIOSH:	Reserva Biosfera Sierra de Huautla
RLi:	Línea rostral del rafe
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
SAM:	S-adenosil metionina
Sn:	Estaño
SNC:	Sistema Nervioso Central
SNpc:	Substancia nigra pars compacta
SNpl:	Substancia nigra pars lateralis
SNr:	Substancia nigra reticular
Sr:	Estroncio
TH:	Tirosina hidroxilasa
VMAT2:	Transportador vesicular de monoaminas tipo 2
Zn:	Zinc

Pérez-Ríos AR. 2021. Estudio neuroconductual en el roedor *Peromyscus melanophrys* expuesto a jales de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

RESUMEN

La industria minera es importante para el desarrollo económico de un país. Sin embargo, la extracción de minerales genera residuos llamados jales. Los cuales contienen mezclas de elementos potencialmente tóxicos (EPT), como por ejemplo los metales pesados (MP). Estos se bioacumulan en órganos, tejidos y sistemas de los organismos y a su vez se biomagnifican a través de la cadena trófica. Particularmente, en Huautla, Morelos la explotación metalúrgica generó aproximadamente 780, 000 toneladas de residuos depositados a la intemperie contaminando los factores bióticos como la vegetación y fauna. En particular, se ha documentado que las especies de roedores establecidas en los jales bioacumulan MP en sus tejidos y causan daño genotóxico y efectos sobre su morfología.

El presente estudio se enfocó en el sistema dopaminérgico, principalmente a las vías nigroestriatal y mesolímbica. Las cuales están asociadas a la regulación de conductas como control motor y actividad exploratoria y a funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria. Se sabe que los MP se bioacumulan en áreas cerebrales dopaminérgicas en animales de laboratorio y modifican dichas conductas y funciones cognitivas. Sin embargo, en roedores silvestres se desconoce si la exposición a MP tiene efectos conductuales y neuroanatómicos. Para ello, en la especie de roedor centinela *Peromyscus melanophrys* fue evaluado el control motor y actividad exploratoria a través de la prueba campo abierto y el aprendizaje y la memoria a través de la prueba Laberinto Acuático de Morris. También fue cuantificado el número de células positivas a la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en el mesencéfalo a través de la técnica de inmunohistoquímica. En dicha área cerebral se encuentran los cuerpos neuronales de las vías dopaminérgicas. TH es importante para la síntesis de dopamina. Los individuos de la especie *P. melanophrys* fueron colectados de una zona testigo y una zona expuesta a residuos mineros en Huautla, Morelos. En la muestra de ambas zonas se equilibraron las variables de género y edad, es decir, que ambas variables estuvieran representadas de igual forma en ambos grupos. Los resultados en el campo abierto

mostraron que los individuos de la zona minera presentan signos de hiperactividad y ansiedad en comparación a los individuos de la zona testigo. También se encontró que a pesar de que los individuos de la zona minera están expuestos a metales pesados no presentan cambios en las funciones cognitivas como el aprendizaje y memoria. Sin embargo, se encontró disminución en el número de células positivas a la enzima TH del 52% y 35% en la sustancia nigra pars reticular (SNpr) y en el núcleo paranigralis (PN), respectivamente. Este estudio mostró que en el roedor silvestre *P. melanophrys* considerado especie centinela se pueden detectar cambios conductuales y neuroanatomicos inducidos por la exposición a metales pesados presentes en los jales. Además, la actividad locomotora y el número de células positivas a TH podrían ser considerados marcadores de efecto en dicha especie.

Palabras clave: *Jales, roedor silvestre, dopamina, biomarcador, conducta.*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Minería en México

La minería es una actividad económica que ha estado presente en el proceso histórico de México. Por ejemplo, existen vestigios de la época de los aztecas que indican la elaboración de herramientas de sílice para facilitar actividades de sobrevivencia y objetos de turquesa para fines religiosos. La minería prehispánica en México elaboraba láminas labradas en Oro (Au), Plata (Ag), Cobre (Cu) y Estaño (Sn) para ser utilizadas en santuarios religiosos. En el centro del país, por ejemplo, en Querétaro, explotaban cinabrio para actividades ornamentales, lo que muestra que la minería estuvo presente antes de la llegada de los españoles (Sánchez *et al.*, 2003; Mendoza-Amezquita *et al.*, 2006; Medel-Reyes *et al.*, 2008; Gongora, 2013).

En la época de la conquista española (1546), en la Sierra de Zacatecas, se originaron las primeras minas. Dichas zonas en pocos años quedaron deforestadas ya que fueron un punto de partida para la expansión de nuevos lugares de explotación por los siguientes 25 años. En los subsecuentes años se explotaron minas en Taxco, Zumpango, Tlalpujahuá, Pachuca y Guanajuato, impulsando la economía del país. Actualmente, México es un país importante para la inversión minera, ocupando el 1er lugar en Latinoamérica y 4to lugar a nivel mundial (Sánchez *et al.*, 2003; Monreal-Saavedra y Hernández, 2015; Secretaría de Economía, 2020).

Los *jales* son apilamientos de rocas molidas generadas después de la extracción de metales de interés, provocando daños irreversibles al medio ambiente, ya que los jales contienen elementos altamente tóxicos (EPT), entre ellos los metales pesados (MP) (Volke *et al.*, 2005; Mussali-Galante, 2013).

En el país, se registran yacimientos mineros (antiguos y otros actuales), activos y no activos a lo largo de distintas entidades federativas. El número de jales producto de la actividad minera no ha sido documentado. Por ejemplo, en el caso del poblado de Huautla, Morelos, no existe un número exacto de la cantidad y situación de los residuos mineros (jales) abandonados en la zona (Romero *et al.*, 2011).

a) Minería en Morelos: Jales de Huautla

A finales del siglo XVII, las empresas mineras en el Estado de Morelos explotaron yacimientos a lo largo del estado. A pesar de ello, se considera un estado propiamente agrícola y no minero. Particularmente en Huautla, que se ubica al sur del estado de Morelos y pertenece al municipio de Tlaquiltenango, se explotaron yacimientos de Plata (Ag), Plomo (Pb) y Zinc (Zn) (Sánchez *et al.*, 2003).

Actualmente, las zonas mineras en Huautla están inactivas debido a la disminución en el precio de la plata. A partir de 1993, dichas zonas quedaron dentro de un área de conservación ecológica. Esta área natural protegida fue denominada a partir del 8 de septiembre de 1999 como la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (CONANP, 2019).

En general, la extracción de elementos metálicos como Pb, Zn, Cu, Arsénico (As) y Cadmio (Cd) genera depósitos de desechos conocidos también como colas (tailings), relaves o jales (Romero *et al.*, 2007; Mussali-Galante, 2013). Los jales contienen EPT's que se generan tras la obtención de minerales metalíferos. Los jales contienen generalmente agentes químicos, hidrocarburos y mezclas de MP, como pirita (FeS_2), pirrotina (FeS), galena (PbS), esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS_2), arsenopirita (FeAsS) (Rodríguez y García, 2006; Romero *et al.*, 2007). Todos ellos al ser vertidos a la intemperie afectan a la salud humana y al medio ambiente (Sánchez, 2003; Mussali-

Galante, 2013). Generalmente, los EPT's son metales como el As, Cd, Pb, Cu, Zn, Hierro (Fe), Mercurio (Hg), Niquel (Ni), Cromo (Cr), entre otros (Volke et al., 2005; Remon *et al.*, 2005; Bautista-Cruz y Arnaud-Viñas, 2006; Romero *et al.*, 2007).

En el caso de Huautla, Morelos, los jales que se generaron son de forma sólida y fueron apilados a la intemperie facilitando su dispersión eólica e hídrica. Estos depósitos tienen un impacto en los suelos, ya que los metales antes mencionados se acumulan en los sedimentos afectando la estructura de los suelos (Volke *et al.*, 2005; Puga *et al.*, 2006). Además, los MP pueden ser bioacumulados en los organismos dando como resultado un proceso de biomagnificación. En este proceso las concentraciones de las sustancias tóxicas como los MP, aumentan conforme el nivel de la cadena trófica es mayor, es decir, los organismos del inicio de la cadena (productores primarios) presentan bajas concentraciones pero las concentraciones son mayores a medida que asciende la cadena trófica. En la biomagnificación, las sustancias tóxicas se incorporan a lo largo de las cadenas tróficas a través de diversos mecanismos de acción, provocando distintos problemas a la salud de los organismos (López-Vera, 2006; Escobar, 2010; Rebollo-Salinas, 2019). Los efectos en los individuos dependen del tipo de metal al que están expuesto, a las concentraciones de los metales, tiempo de exposición, características fisicoquímicas de los compuestos, entre otros factores (Medel-Reyes *et al.*, 2008; Ramos-Gómez *et al.*, 2012; Mussali-Galante, 2013).

1.2 Metales pesados

Los MP se encuentran de forma natural en los organismos por ejemplo Fe, Zn, Cu, Manganeso (Mn) y en la corteza terrestre haciéndolos presentes en distintas concentraciones en los sedimentos. Sin embargo, fuentes antropogénicas pueden facilitar y aumentar la exposición a tales metales, como la actividad industrial, la minería, agricultura, consumo masivo y emisión desechos urbanos (Alarcón-Corredor; 2009; Jaishankar *et al.*, 2014). Los metales pesados son comunmete considerados como aquellos elementos que tienen densidad específica mayor a 5 g/cm^3 , tales como Cd, Cu, Cr, Fe, Pb y Zn (Järup 2003). Por otra parte los metales se definen por sus propiedades fisicoquímicas, como: a) elementos que a temperatura ambiente se encuentran en estado sólido, b) alta reflectividad, lo que otorga a los metales el característico brillo debido a la formación de una nube electrónica por continuo traslado de electrones de átomos a átomos, c) alta conductividad eléctrica, lo que describe que no ofrecen resistencia alguna al flujo de energía, d) alta conductibilidad térmica que describe el movimiento cinético de electrones por un gradiente de temperatura, e) ductilidad lo que les permite ser manipulados sin romperse es decir, resistencia mecánica, f) impenetrabilidad generando resistencia a que otro cuerpo ocupe su lugar y g) divisibilidad lo que permite que se fraccionen en partículas más pequeñas (Livshits *et al.*, 1982; Domínguez y Ferrer, 2017).

La bauxita, austenita, pirita, cementita y sorbita son formaciones minerales (menas) y combinaciones químicas en las que se pueden encontrar a la mayoría de los metales en la naturaleza. A excepción del Cu, Ag y Au que son poco reactantes,

encontrándose sin combinar en su estado natural (Volke *et al.*, 2005; Mendoza-Amezquita *et al.*, 2006).

Algunos metales son esenciales en cantidades suficientes para funciones bioquímicas y fisiológicas, tales como el Calcio (Ca), importante en mamíferos para el mantenimiento de la estructura ósea (Solomon *et al.*, 2001; Tresguerres, 2003; Quezada y Sosa, 2011). Otro ejemplo es el Fe, empleado en funciones enzimáticas y distribución en sangre (Cascante-Burgos, 1999; Rivillas, 2018). En el caso del Zn, éste participa en el funcionamiento del sistema inmune, división y crecimiento celular (Rubio *et al.*, 2007). En general, se consideran 15 metales esenciales para los organismos, tanto en plantas como en animales: Fe, Ca, Zn, Cr, Cu, Ni, Sodio (Na), Potasio (K), Magnesio (Mg), Manganeso (Mn), Estroncio (Sr), Bario (Ba), Molibdeno (Mo), Cobalto (Co), Estaño (Sn) (Pacheco *et al.*, 1980). Sin embargo, en concentraciones elevadas pueden ser nocivos, al actuar como agentes potencialmente tóxicos. La toxicidad depende de la dosis absorbida, la vía de exposición y la química del metal (Jaishankar *et al.*, 2014). Un ejemplo es el Mn, el cual es un elemento que nutricionalmente es esencial en concentraciones bajas y tóxicas en concentraciones elevadas. El Mn es un elemento importante para funciones enzimáticas en las cuales funciona como activador (Pacheco *et al.*, 1980). El manganeso es transportado directamente al cerebro antes de ser metabolizado en el hígado, su acumulación en el cerebro puede derivar en trastornos neurológicos permanentes como Parkinson, dificultad motora, temblores y espasmos en músculos faciales (Dydak *et al.*, 2011).

a) Mecanismos de toxicidad de los metales pesados

La exposición de MP a concentraciones elevadas se asocia con múltiples efectos tóxicos en los organismos. Lo anterior, se debe a distintos mecanismos celulares, tales como: 1) la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), 2) sustitución de biomoléculas o a la mimetización de metales esenciales, y 3) daño al ácido desoxirribonucleico (ADN). En cuanto al primer mecanismo, los MP participan en reacciones que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el anión superóxido (O^{2-}), el radical hidroxilo (OH^*) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las altas concentraciones de ROS celulares pueden causar daño oxidante afectando a distintos organelos, proteínas, lípidos y ADN (Volke *et al.*, 2005; Mussali-Galante, 2013). En cuanto al segundo mecanismo, los metales como Pb, Cd y Mn pueden reemplazar a los metales esenciales como Zn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Mg^+ de los sitios activos de las proteínas y/o enzimas, lo que deriva de un cambio conformacional de las mismas afectando su función (Jaishankar *et al.*, 2014). Por ejemplo, el Cd utiliza este mecanismo de desplazamiento uniéndose a grupos tiol (-SH) libres, catalizando la oxidación del lado amino de la cadena, interfiriendo en el plegamiento de la estructura terciaria, lo que conlleva a un mal funcionamiento de las proteínas. Otro ejemplo es el Pb, un metal ubicuo, detectable en todas las fases del medio ambiente y sistemas biológicos. El mecanismo de toxicidad del Pb ocurre debido a la capacidad de sus iones para sustituir cationes divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} y los cationes monovalentes como Na^+ , los cuales participan en el metabolismo de la célula. Una vez que el Pb ha sido absorbido puede acumularse en huesos, dientes, hígado, pulmón, riñón, cerebro y bazo.

Asimismo, el Pb es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y placenta. El Pb a nivel celular puede sustituir al calcio y afectar a la proteína cinasa C reguladora de la excitación neural y el almacenamiento de memoria. Dicho mecanismo de toxicidad puede causar cambios en distintos procesos biológicos como; plegamiento de la proteína, apoptosis, regulación enzimática y lanzamientos de neurotransmisores. Otro ejemplo es la anhidrasa carbónica II, la cual es una metaloenzima que contiene en su sitio activo a una molécula de Zn que al ser remplazada por una molécula de Pb provoca que su actividad sea deficiente (Flora *et al.*, 2012). Otro ejemplo es el As, el cual se puede encontrar de manera natural en la superficie terrestre y por fuentes antropogénicas en fábricas, manufactura y en la elaboración y aplicación de pesticidas. El As posee propiedades tóxicas y cancerígenas relacionadas con cáncer de hígado, pulmón, vesícula y piel, siendo sus formas inorgánicas como el arsenito y arsenato los compuestos más letales para el medio ambiente y los seres vivos. El mecanismo de toxicidad involucra bloquear directamente los grupos sulfhidrilos libres de proteínas y enzimas, provocando una disminución en la función de señalización intracelular. Dicho efecto puede modificar el sistema de neurotransmisores en algunas regiones cerebrales tales como cerebelo, tallo cerebral e hipotálamo (Nava-Ruiz *et al.*, 2012; Jaishankar *et al.*, 2014).

Con respecto al tercer mecanismo de toxicidad de los metales, daño al ADN conocido como efecto genotóxico, los MP causan rompimiento a la cadena doble/sencilla del ADN, mutaciones, aberraciones cromosómicas, alquilación de bases nitrogenadas y formación de aductos en humanos (Weinstein, 1988; Mussali-Galante *et al.*, 2013), en modelos animales y en roedores silvestres (Da Silva *et al.*, 2000; Mussali-

Galante *et al.*, 2012). La genotoxicidad se genera de forma directa e indirecta. En la vía directa de la genotoxicidad consisten en la formación de aductos de ADN, siendo la unión covalente de un MP con átomos de nitrógeno u oxígeno de las bases nitrogenadas del ADN. La alquilación de bases involucra la unión de un grupo alquilo a un átomo de nitrógeno de la guanina. También relacionada con entrecruzamiento de cadena (Vullo, 2002; Jaishankar *et al.*, 2014). Mientras que la genotoxicidad indirecta es través de la generación de ROS, previamente mencionado.

Los MP tienen efectos negativos en la salud de los organismos debido a la alteración de las funciones bioquímicas y fisiológicas en distintos sistemas y órganos del cuerpo. Entre los sistemas más afectados por la toxicidad de MP se encuentran: sistema renal, respiratorio, músculo-esquelético, inmunológico y el sistema nervioso (Nava-Ruíz y Méndez-Armenta, 2011; Jaishankar *et al.*, 2014; Londoño-Franco *et al.*, 2016; Rodríguez, 2017).

1.3 Sistema nervioso central: Vías dopaminérgicas

El sistema nervioso se divide en central y periférico. En general, en vertebrados, el sistema nervioso central (SNC) está constituido por el encéfalo y la médula espinal. Funcionalmente el SNC posee siete regiones (Médula espinal, Bulbo raquídeo, Puente de Varolio, Cerebelo, Diencefalo, Mesencefalo y Telencefalo) como se muestra en la Figura 1. En el presente estudio nos enfocaremos al estudio del SNC, particularmente a las áreas denominadas mesencefalo y telencefalo.

El mesencefalo está situado por encima del puente de Varolio y controla funciones motoras y sensitivas. Mientras que el telencefalo está constituido por los hemisferios

cerebrales compuestos por la corteza cerebral (estructura plegada externa) y tres estructuras en su profundidad: *Ganglios basales* encargados de regular el control motor, *hipocampo* involucrado en el almacenamiento de recuerdos y *núcleos amigdalinos* que participa en estados emocionales, respuestas autónomas y endocrinas (Kandel *et al.*, 2001).

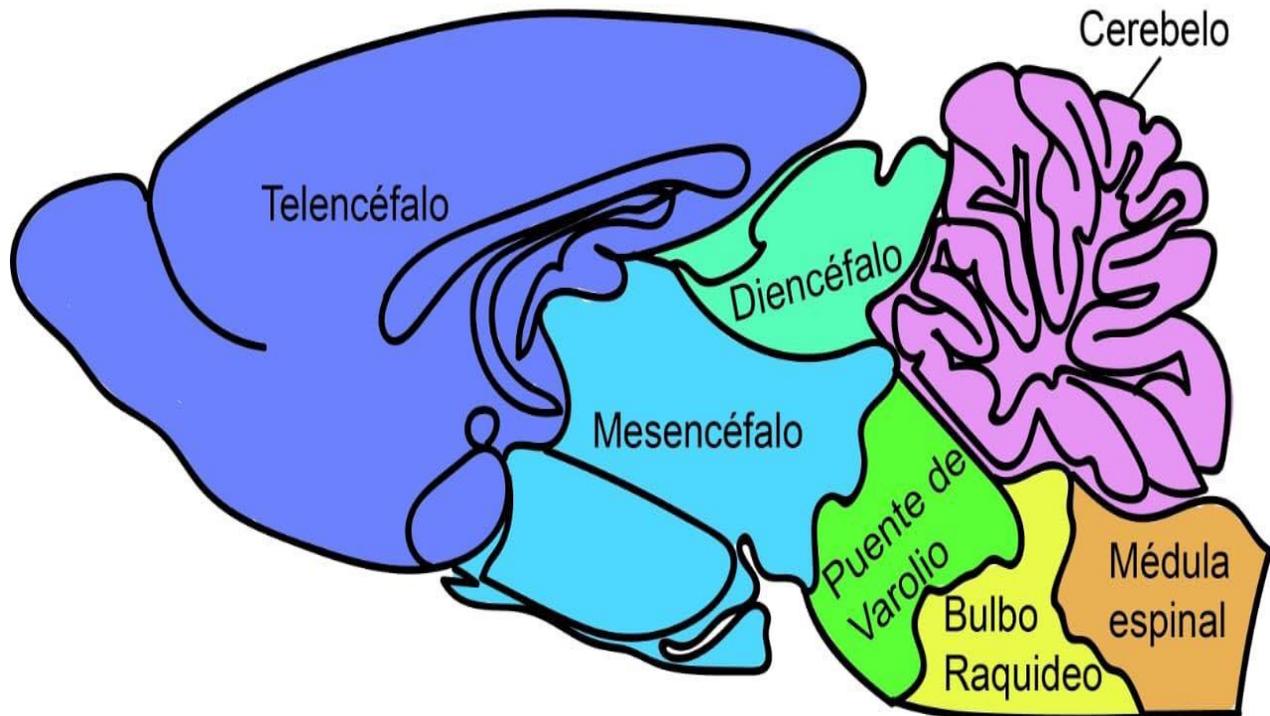


Figura 1. Estructuras principales del sistema nervioso central en rata (Modificada de Paxinos y Watson, 2005)

El encéfalo se encuentra protegido por una barrera anatómica, descubierta en 1855 por el bacteriólogo Paul Ehrlich llamada barrera hemato-encefálica (BHE). Ésta es una interface entre la sangre y el cerebro y está constituida por células endoteliales de la red capilar. Asimismo, BHE es caracterizada por su alta selectividad, regulando el intercambio bidireccional entre la sangre circundante y el tejido nervioso. La protección

del SNC por la BHE evita los efectos deletéreos de agentes neurotóxicos que circulan en la sangre. Sin embargo, ciertos metales pueden cruzar fácilmente dicha barrera (P. ej. el Pb, Zn, Mn, Fe, entre otros) sin necesidad de pasar por un proceso previo de metabolización, provocando daño a las membranas celulares, alteraciones en las vías de señalización, bloqueo de los canales dependientes de voltaje y bloqueo de la liberación de neurotransmisores (Davson y Segal, 1996).

En general, los neurotransmisores son biomoléculas sintetizadas por las neuronas, encargados de la transmisión de señales entre una neurona y otra. Un neurotransmisor debe cumplir con los siguientes criterios: a) ser sintetizado en la neurona, b) estar presente en la terminal presináptica, liberándose en cantidades suficientes para ejercer su acción definida en el receptor, c) activar los canales iónicos o vía de segundo mensajero en la célula postsináptica con concentraciones razonables al ser suministrado como fármaco, d) presentar un mecanismo específico para la eliminación de su lugar de acción. Entre los neurotransmisores más importantes se encuentran; acetilcolina, glutamato, glicina, GABA, noradrenalina, adrenalina, serotonina, histamina y dopamina (Kandel *et al.*, 2001).

a) Metabolismo del neurotransmisor dopamina

En el caso de la dopamina, éste es un neurotransmisor catecolaminérgico producido en las neuronas dopaminérgicas, por ejemplo en el área tegmental ventral de la sustancia nigra del mesencéfalo. La dopamina está formada por un núcleo catecol ($C_6H_6O_2$) y un anillo bencénico (C_6H_6) 3,4 dihidroxilado (Webster, 2001).

La dopamina es sintetizada a partir del aminoácido L-tirosina a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), por la enzima tirosina-hidroxilasa (TH) que utiliza como sustrato a la tetrahidrobiopterina y oxígeno molecular (O_2) (Figura 2). Cabe resaltar que

para la síntesis de dopamina, la enzima TH es esencial para catalizar la conversión de aminoácidos a su precursor L-DOPA (Dix *et al.*, 1987; Pérez-De la Cruz, 1995). La enzima TH es un péptido de 498 aminoácidos correspondiente a la familia de las hidroxilasas de aminoácidos aromáticos, considerada la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de catecolaminas (Chetty *et al.*, 2001; Kandel *et al.*, 2001). Una vez que L-DOPA es sintetizada por la enzima TH, la enzima descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos (AAAD) utiliza al piridoxal fosfato (B6) para romper el enlace del último carbono, liberando CO₂ y una molécula de agua (H₂O), produciendo así una molécula de dopamina. Posteriormente, las moléculas de dopamina son almacenadas en vesículas sinápticas citoplasmáticas a partir de la activación de los transportadores de monoaminas (VMAT2) presentes en las membranas de las vesículas sinápticas. Después, la activación de canales de iones Ca⁺² en la membrana extracelular, permite que las vesículas sinápticas que contienen dopamina se fusionen con la membrana extracelular liberando su contenido al espacio sináptico. Posteriormente, las moléculas de dopamina serán captadas por los receptores dopaminérgicos presentes en la neurona presináptica y/o postsináptica como se muestra en la Figura 3 (Bahena *et al.*, 2001, Siegel, 2012).

La dopamina liberada al espacio sináptico o que no se almacena en vesículas es degradada a través de dos enzimas: a) Monoamino oxidasa (MAO) localizada en la membrana externa de las mitocondrias de neuronas presinápticas y b) Catecol O-metiltransferasa (COMT) localizada en la membrana extracelular de neuronas postsinápticas. Con respecto a la enzima MAO, ésta produce una reacción química en el grupo amino transformando a las moléculas de dopamina intracelular de neuronas presinápticas a ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC) que se difunde al espacio

sináptico. Por el contrario, COMT transfiere un grupo metilo (CH₃-) del co-sustrato S-adenosil metionina (SAM) al núcleo de catecol de DOPAC, transformándolo a ácido homovanílico (HVA) como se muestra en la Figura 2 (Yu, 1986; Kaakola *et al.*, 1987; Webster, 2001).

El ácido homovanílico (HVA) es el metabolito que se produce como resultado de la metilación de la dopamina por la enzima COMT al producir 3-metoxitiramina (3-MTT) en el espacio sináptico. Las moléculas de 3-MTT pueden ingresar a neuronas presinápticas y por acción de la MAO producir HVA, del mismo modo que la metilación de DOPAC produce también HVA (Kandel *et al.*, 2001; Webster, 2001; Siegel, 2012).

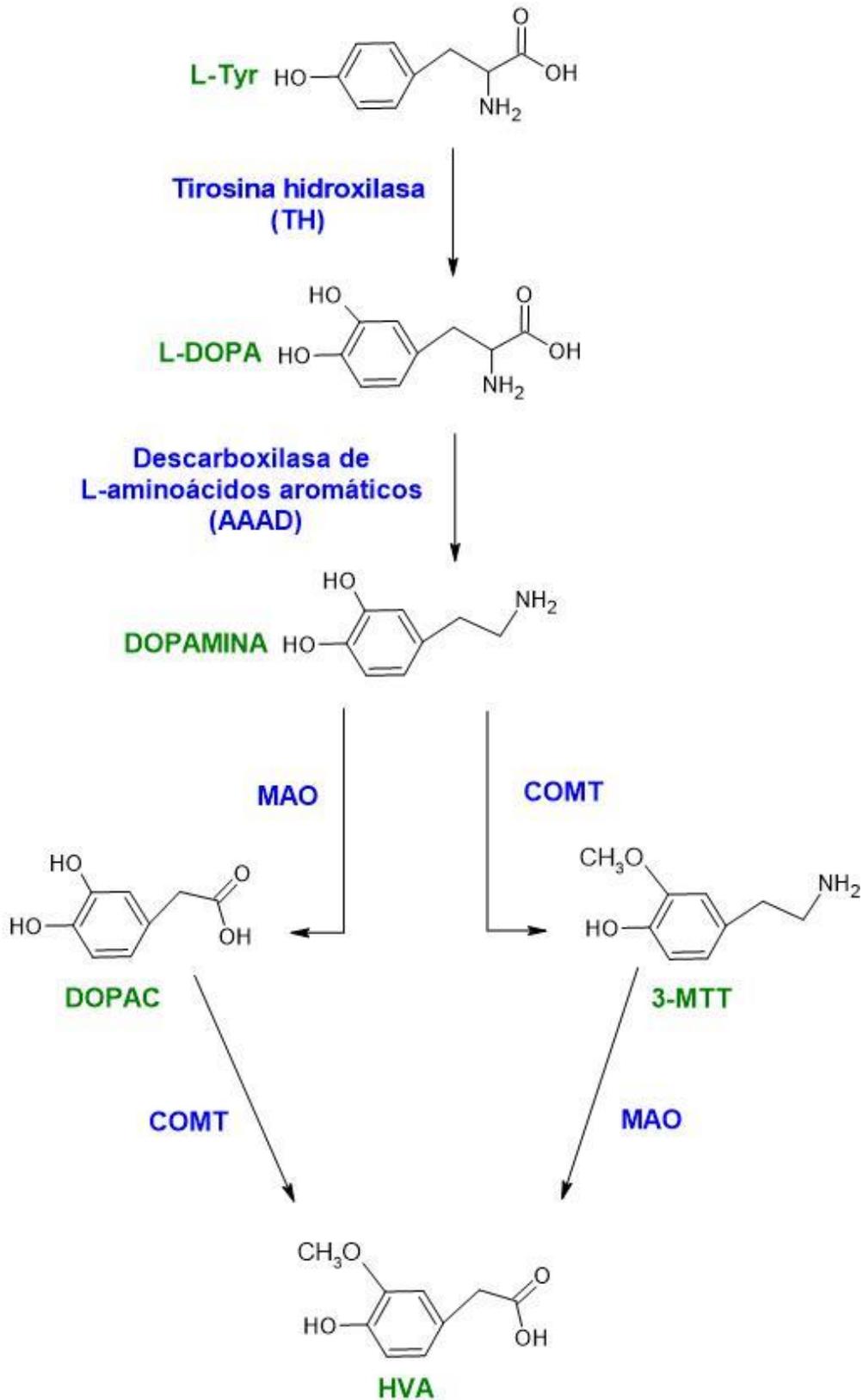


Figura 2. Síntesis y degradación del neurotransmisor dopamina. L-Tyr= aminoácido Tirosina, L-DOPA= L- 3,4 dihidroxifenilalanina, MAO= enzima monoamino oxidasa, COMT= enzima Catecol- O- metiltransferasa, 3-MTT= 3-metoxitiramina, HVA= Ácido homovanílico, DOPAC= ácido 3,4 dihidroxifenilacético (Modificado de Webster, 2001).

La dopamina liberada en la sinapsis actúa sobre los receptores dopaminérgicos, los cuales se han descrito cinco receptores celulares, agrupados en dos familias: a) los receptores tipo D1 están integrados por receptores D1 y D5 acoplados a proteínas G y estimulan la formación de AMP cíclico, b) los receptores tipo D2 integrados por los receptores D2, D3 y D4 acoplados también a proteínas G e inhiben la formación de AMP cíclico (Figura 3). La familia de receptores D1 son considerados los más abundantes y tienen efecto de activación o excitación a través de la apertura de canales de sodio o inhibición a partir de la apertura de canales de potasio. La familia de receptores tipo D2 están involucrados en la inhibición presináptica o postsináptica de la neurona y son los segundos receptores más abundantes en el sistema nervioso en mamíferos (Bahena *et al.*, 2001; Siegel, 2012; Ayano, 2016).

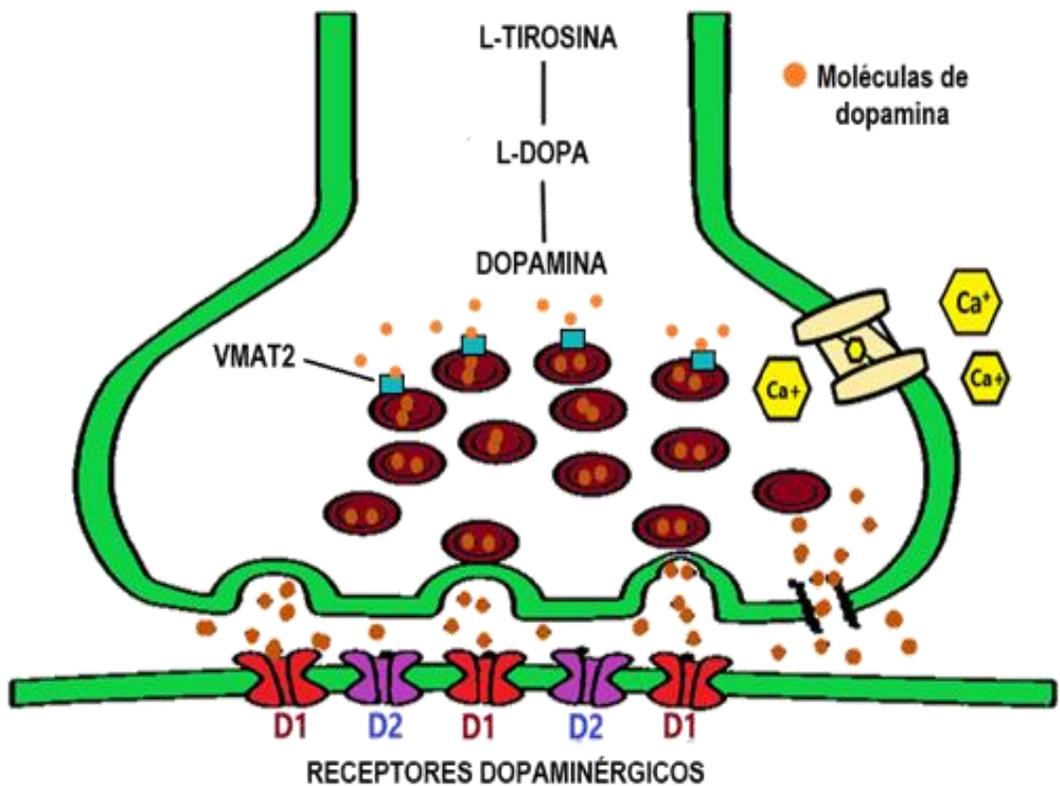


Figura 3. Liberación de dopamina al espacio sináptico y su unión a los receptores dopaminérgicos. VMAT2= Transportador vesicular de monoaminas, L-DOPA= L-3,4 dihidroxifenilalanina (Modificada de Cooper *et al.*, 2003).

b) Anatomía de las vías dopaminérgicas

Las vías dopaminérgicas son neuronas que sintetizan dopamina y conectan regiones cerebrales a través de sus axones y dendritas. En general, las vías dopaminérgicas pueden clasificarse de acuerdo a la longitud, por el origen y destino de sus proyecciones (Andén *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 2003). En cuanto al origen y destino de sus proyecciones existen cuatro sistemas (Figura 4): 1) Vía nigroestriatal en la que el conjunto de células de la sustancia nigra pars compacta (SNpc) localizadas en el mesencéfalo proyectan rostralmente hacia los ganglios basales, incluido el cuerpo estriado, 2) Vía mesolímbica cuyas neuronas se localizan en el mesencéfalo en el área tegmental ventral (AVT) y proyectan hacia el núcleo accumbens, amígdala, hipocampo y finalmente a la corteza prefrontal, 3) Vía mesocortical sus cuerpos neuronales también se localizan en AVT y proyectan hacia la corteza prefrontal, 4) Vía tuberoinfundibular, esta vía tiene origen en el hipotálamo mediobasal “región tuberal” y sus axones se proyectan a la región infundibular (Lindvall *et al.*, 1974; Andén *et al.*, 1966; Andén *et al.*, 1966b; Cooper *et al.*, 2003). En el presente trabajo nos enfocaremos a las neuronas dopaminérgicas que se encuentran en el mesencéfalo particularmente en las regiones A9 (sustancia nigra) y A10 (área ventral tegmental = VTA) que dan origen a las vías nigroestriatal, mesolímbica y mesocortical (Andén *et al.*, 1966; Galiñanes, 2010) (Figura 4). La región A8 (región retrorubral) se localiza cerca de las regiones A9 y A10.

Alteraciones en las vías dopaminérgicas se han asociado directa o indirectamente con algunos trastornos, tales como la enfermedad de Parkinson, trastornos psicóticos que incluyen a la esquizofrenia y la dependencia a drogas (Bahena *et al.*, 2001; Escobar *et al.*, 2007).

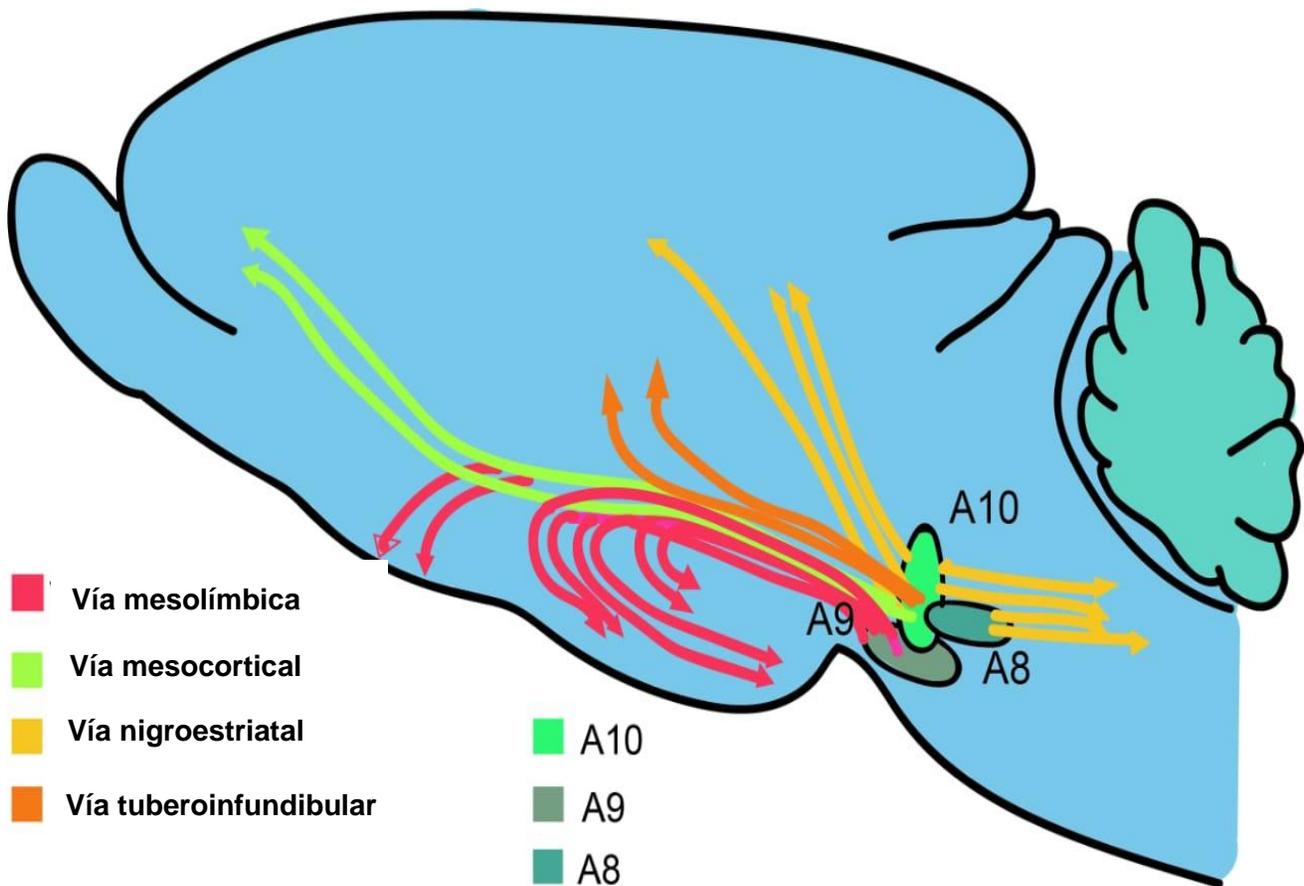


Figura 4. Principales vías dopaminérgicas en la rata. Los cuerpos neuronales que se encuentran en las regiones A8 (región retrorubral), A9 (sustancia nigra), A10 (área ventral tegmental) dan origen a algunas vías dopaminérgicas tales como Vía mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal y tuberoinfundibular (Modificada de Webster 2001).

c) Conductas asociadas a las vías dopaminérgicas

Dentro de las conductas asociadas a las vías dopaminérgicas, se encuentran las conductas motoras, conductas de emotividad, efectividad y de recompensa, tales como la conducta de juego y la conducta materna. Si bien cada vía difiere en su participación en las diversas conductas, en general, las vías se han asociado con algunas conductas y/o funciones cerebrales, tales como: a) la vía nigroestriatal participa en el control de los movimientos, b) la vía mesolímbica está involucrada en los delirios, alucinaciones y en la euforia de las drogas de abuso, c) la vía mesocortical desempeña un papel en los

síntomas cognitivas y negativos de la esquizofrenia y d) la vía tuberoinfundibular está asociada a alteraciones que modifican la liberación de hormonas hipofisarias provocando problemas metabólicos y de fertilidad (Artigas, 2004; Pérez-Millán, 2010).

En el presente proyecto evaluaremos conductas y funciones cognitivas asociadas a las vías dopaminérgicas, tales como, el control motor, actividad exploratoria, el aprendizaje y la memoria.

1) Control motor:

El control motor es la integración de la información sensorial que proviene del medio interno (cuerpo) y externo (medio ambiente). Dicha integración permite organizar, coordinar músculos y finalmente ejecutar movimientos. El SNC selecciona, controla y ejecuta movimientos para realizar tareas que le permitan al individuo desenvolverse en el entorno tales como caminar, correr, buscar y comer alimento, comunicación intra e interespecífica y así obtener éxito en la sobrevivencia (Albaine-Pons, 1987; McDermott *et al.*, 2001). El control motor puede ser evaluado a través de la prueba de campo abierto. Mientras que la coordinación motora puede ser evaluada a través de la prueba de rotarod (Tabla 1). La prueba de la barra transversal es una prueba que evalúa el déficit motor por ejemplo a través del tiempo de demora el animal en recorrer la barra de inicio a fin o con el número de errores del animal al realizar cada paso de la marcha.

2) Actividad exploratoria:

La conducta exploratoria es un comportamiento evocado por estímulos novedosos, que consiste en actos y posturas que permiten la recopilación de información sobre nuevos objetos y partes desconocidas del medio. La conducta exploratoria se considera una

expresión de curiosidad natural y necesidad de explorar el entorno para la búsqueda de rutas de escape, búsqueda de alimento, búsqueda de pareja y exploración de zonas seguras para formar nidos. La conducta exploratoria puede ser evaluada a través de la prueba de holeboard. También pueden ser utilizadas pruebas de interacción social y el laberinto radial con brazos abiertos y cerrados. Cabe mencionar que estas pruebas también se utilizan para evaluar ansiedad (Martínez-Riera *et al.* 2001) (Tabla 1).

3) Aprendizaje y Memoria

El aprendizaje de acuerdo a Tobin (2007) es un proceso mediante el cual las experiencias modifican el sistema nervioso y por lo tanto nuestra conducta. Dicha modificación ocurre a partir de procesos que varían a lo largo del tiempo y que se producen en el entorno (Aguado-Aguilar, 2001). Estas modificaciones o adaptaciones neuronales en general llamada plasticidad es el reflejo que caracteriza a las neuronas y al sistema nervioso de los organismos. Cuanta más plasticidad tiene su sistema nervioso más posibilidades de aprendizaje tiene un animal. Por tanto, el aprendizaje puede considerarse como un cambio en el sistema nervioso que resulta de la experiencia y que origina cambios duraderos en la conducta de los organismos (Morgado-Bernal, 2005). El aprendizaje espacial permite orientarse dado que se establecen asociaciones entre las señales del entorno y/o estímulos del ambiente. En la memoria participa una red compleja de diferentes áreas cerebrales interrelacionadas cuyo propósito es almacenar y evocar (*recordar*) la información adquirida relevante a través de la experiencia (Kandel *et al.*, 2001; Aguado-Aguilar, 2001). La memoria permite retener información sobre experiencias pasadas y expresar conductas más elaboradas a partir de la experiencia adquirida. Por ejemplo, evitar exponerse a rutas de

alto riesgo para el individuo, ubicar zonas para anidar o alimentarse. De manera que el aprendizaje y la memoria son dos funciones cognitivas importantes para la sobrevivencia y reproducción de los individuos. Ambas funciones cognitivas pueden ser evaluadas a través del laberinto acuático de Morris, el laberinto en T y el laberinto de Cincinnati (Tabla 1) (Moreira *et al.*, 2001; Méndez-López *et al.*, 2013; Vorhees *et al.*, 2014).

Tabla 1. Pruebas o paradigmas utilizados para el análisis conductual en animales de laboratorio (Modificada del Instituto de Neurociencias del Principado de Asturias, 2018).

Prueba	Descripción
Laberinto Acuático de Morris	Permite evaluar el aprendizaje y la orientación espacial haciendo uso de diversos tipos de memoria: a corto plazo y largo plazo y memoria de trabajo.
Campo abierto (Open field)	Permite obtener una medida cuantitativa y cualitativa para evaluar la actividad locomotora general y exploratoria. Así como la habituación al ambiente. También permite evaluar la conducta de ansiedad en función del tiempo empleado en el centro del campo, según el número de defecaciones y el tipo de actividad en los primeros minutos de exploración.
Laberinto radial	Permite evaluar dos tipos de memoria de referencia y memoria de trabajo.
Rotarod	Permite observar las habilidades de coordinación motora.
Laberinto de Cincinati	Permite evaluar el aprendizaje y orientación espacial haciendo uso de diversos tipos de memoria: memoria a corto y largo plazo, así como memoria de trabajo.
Holeboard	Permite medir los niveles de neofilia, es decir la capacidad exploratoria en un entorno desconocido, en función a la frecuencia y duración de la exploración de cada orificio.
Laberinto en T	Permite evaluar el aprendizaje espacial y la memoria de trabajo.
Barra transversal	Permite evaluar el déficit motor a través del tiempo de demora en que se alcanza el extremo opuesto al de salida.

2. ANTECEDENTES

2.1 Efecto de los metales pesados sobre las vías dopaminérgicas en roedores de laboratorio.

Como bien se ha explicado, las concentraciones elevadas o exposiciones crónicas de metales pesados pueden generar graves afectaciones, siendo los órganos y sistemas más afectados: riñón, pulmón, hígado, sistema gastrointestinal, hematopoyético, nervioso central y periférico. En estos últimos las afectaciones pueden no ser visibles sino hasta después de un periodo de tiempo extenso e incluso puede confundirse con desordenes neurodegenerativos relacionados con la edad como; Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, demencias, depresión, ansiedad, entre otras (Nava-Ruiz y Méndez-Armenta, 2011; Rodríguez, 2017).

Diversos sistemas de neurotransmisión son afectados por la exposición a metales, pero en el presente proyecto nos enfocaremos a las vías dopaminérgicas. En animales de laboratorio, existen diversos estudios que han mostrado que la exposición individual o a mezclas de metales pesados modifican conductas relacionadas con dichos sistemas, tales como; actividad locomotora, coordinación motora (Tabla 2), la memoria y el aprendizaje (Tabla 3) y/o la neurotransmisión dopaminérgica por ejemplo, síntesis y degradación de dopamina, actividad de TH, niveles de receptores dopaminérgicos, entre otros (Tabla 4). Sin embargo, es importante notar que algunos estudios también muestran que a pesar de la exposición a metales individuales o a mezclas de ellos no se observan cambios conductuales ni neuroquímicos en los animales (Tabla 2, 3 y 4). Cabe mencionar que los estudios que analizan las exposiciones a mezclas de metales sobre el sistema nervioso son escasos (Moreira *et al.*, 2001; Rai *et al.*, 2010).

Tabla 2. Efectos sobre la actividad locomotora y actividad exploratoria en roedores de laboratorio expuestos a metales pesados.

Metal	Sujeto de estudio	Administración	Resultados	Autor
Pb	Ratas Sprague-Dawley	1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ en agua de bebida durante la gestación y lactancia, hasta el PND21.	Aumento sobre la actividad locomotora en individuos expuestos de manera crónica a Pb.	Ma <i>et al.</i> , 1999
Pb	Ratas adultas macho y hembra Wistar	300 y 500 ppm de $PbCO_3$ en agua de bebida durante 30 días.	Aumento en la actividad exploratoria y control motor en los animales expuestos a ambas dosis de Pb.	Sauerhoff y Michaelson, 1973.
Pb	Ratas crías macho y hembra Wistar	220 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ en agua de bebida durante la gestación y lactancia.	Aumento en la actividad exploratoria y control motor durante los 60 minutos de habituación en los animales expuestos.	Virgolini <i>et al.</i> , 2004.
Pb y Mn	Ratas crías macho y hembra Wistar	10 mg/mL de $Pb(C_2H_3O_2)_2$, 2 mg/mL $MnCl_2$ y en mezcla de 10 mg/mL de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ and 2 mg/mL $MnCl_2$ en agua de bebida individual y en mezcla desde la gestación y lactancia hasta PND 21.	Las crías machos expuestos a Mn individual presentaron hiperactividad.	Betharia y Maher, 2012.
Pb	Ratas adultas macho y hembra Wistar.	0.5 mg de $PbCO_3$ granulado en dieta	Aumento en la actividad exploratoria y control motor, al recorrer mayor número de cuadros desplazados en comparación a los animales control.	Mallo <i>et al.</i> , 2007

Continuación Tabla 2. Continuación efectos sobre la actividad locomotora y actividad exploratoria en roedores de laboratorio expuestos a metales pesados

Pb y As	Ratas hembra gestantes y crías Wistar.	Individual: 50 ppm Na_3AsO_4 . $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ 0.2%. En mezcla: 25 ppm de Na_3AsO_4 y 0.1% de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ a través de agua de bebida desde el primer día de gestación hasta el día PND21.	Disminuye la actividad locomotora y la actividad exploratoria en animales juveniles de 21 días expuestos a la combinación de Pb y As.	Saritha <i>et al.</i> , 2018
Pb	Ratas juveniles macho y hembra Sprague- Dawley.	5 y 50 ppm $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_4$ en agua de bebida. Evaluadas al PND 40.	Disminuye la actividad locomotora en ambas dosis de Pb.	Reiter <i>et al.</i> , 1975
Cd	Ratas crías macho y hembra Long-Evans.	1, 2 y 4 mg/kg de CdCl_2 inyectado a partir del PND 5 de las crías hasta el PND 21.	Disminuye la actividad locomotora de las crías expuestas 4 mg/kg de Cd en los días 15 a 21 postnatal. Las crías expuestas 4 mg/kg de Cd presentaron hiperactividad a partir del día 20 de exposición.	Ruppert <i>et al.</i> , 1984.
Pb	Ratas crías macho Sprague- Dawley	1 y 8 mg/kg de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ a través de inyecciones peritoneales durante la gestación y hasta el día PND 21 en las crías.	Disminuye la actividad locomotora en animales expuestos. Disminuye la actividad de crianza en animales expuestos a Pb. Aumentaron los niveles de Pb en el cerebro de los animales expuestos a dosis de 8 mg/kg de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$.	Luthman <i>et al.</i> , 1992.
Pb	Ratas hembra Wistar de 70 días.	0.3 mM de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ en agua de bebida	Disminuye la conducta de congelación y deambulación de individuos expuestos.	Trombini <i>et al.</i> , 2001.

$\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ = Acetato de Pb, PbCO_3 = Carbonato de Pb, Na_3AsO_3 = Metarsenito de Na, $\text{C}_4\text{H}_6\text{MnO}_4$ = Acetato de Mn, CdCl_2 = Cloruro de Cd, PND= Día postnatal al nacimiento, MnCl_2 = Cloruro de Manganeso, Na_3AsO_4 = Arseniato de Na.

Tabla 3. Efectos sobre el aprendizaje y memoria en roedores de laboratorio expuestos a metales pesados

Metal	Sujeto de estudio	Administración	Resultados	Autor
Pb	Ratas adultas de la cepa Wistar	250 y 500 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) en agua de bebida.	El grupo expuesto a 500 ppm no mostró aprendizaje. Pequeñas diferencias en el aprendizaje se observaron en el grupo expuesto a 250 ppm de Pb.	Cory-Slechta, 1995
Hg	Ratas macho y hembra de la cepa Wistar	12.45 mg/kg, 24.90 mg/kg y 49.80 mg/kg de HgCl ₂ en agua de bebida PND21.	En el grupo expuesto a 49,80 mg/kg de Hg no hubo aprendizaje. El tiempo de llegada aumentó significativamente conforme pasaron las semanas de evaluación.	Sadeeq <i>et al.</i> , 2013
Pb	Ratas de la cepa Sprague-Dawley	1000 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ en agua de bebida durante la gestación y permanentemente.	A pesar de la exposición crónica del Pb, el aprendizaje no mostró cambios. La memoria de trabajo y de referencia no mostró deterioro significativo tras la exposición crónica a Pb.	Ma <i>et al.</i> , 1999
Pb	Ratas macho de la cepa Wistar	1500 ppm de Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ en agua de bebida durante la gestación y 21 días de lactancia.	En los grupos experimentales el aprendizaje no mostró cambios, incluido el grupo tratado con Pb. Sin embargo, la latencia media se prolongó significativamente en el grupo expuesto a Pb.	Cao <i>et al.</i> 2008

Tabla 3. Continuación efectos sobre el aprendizaje y memoria en roedores de laboratorio expuestos a metales pesados

Pb	Ratas adultas macho de la cepa Wistar	65, 125, 250 y 500 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ en agua de bebida durante 14 días después del PND1.	En los individuos expuestos a 250 y 500 ppm el aprendizaje mostró cambios en la latencia de llegada. La memoria mostró cambios específicamente en la evocación, donde el grupo expuesto requiere un mayor tiempo de llegada.	García-Arenas <i>et al.</i> , 2004
Pb	Ratas adultas macho de la cepa Sprague-Dawley	25mg/kg, 50 mg/kg y 100 mg/kg de nanopartículas de PbS intragástrico durante 6 semanas.	Los individuos expuestos a 50 y 100 mg/kg mostraron cambios en el aprendizaje al requerir un mayor tiempo de latencia de llegada. La memoria en los individuos expuestos a 100 mg/kg de Pb mostró cambios en la evocación.	Cao <i>et al.</i> , 2019
Pb	Ratas adultas macho de la cepa Wistar	125, 250 y 500 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ en agua de bebida durante 30 días.	El aprendizaje no mostró cambios entre los grupos. La memoria mostró cambios específicamente en la evocación de información, al necesitar un mayor tiempo de latencia de llegada a la plataforma en los grupos tratados con 250 Y 500 ppm de Pb.	Nava-Ruíz <i>et al.</i> , 2012
Pb	Ratas crías macho de la cepa Long-Evans	50 y 250 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ en agua de bebida.	En ningún grupo expuesto a Pb el aprendizaje mostró cambios.	Cory-Slechta, 1995

$Pb(C_2H_3O_2)_2$ = Acetato de Pb, PbS= Sulfuro de Pb, $CdCl_2$ = Cloruro de Cd, $HgCl_2$ = Cloruro de Hg, PND= Día postnatal, ppm= Partes por millón.

Tabla 4. Efectos neuroquímicos en roedores de laboratorio expuestos a metales pesados.

Metal	Sujeto de estudio	Administración	Resultados	Autor
Pb	Ratas macho de la cepa Wistar	2 nM de $Pb(C_2H_3O_2)_4$ en agua de bebida	Reducción en la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y sobre la actividad locomotora.	Meredith <i>et al.</i> , 1988.
Pb y Cd	Ratas crías macho de la cepa Wistar	300 mg/kg de $Pb(C_2H_3O_2)_4$ y 10mg/kg de acetato de Cd en mezcla en agua de bebida durante la gestación y hasta el PND 21	Los niveles de DOPAC fueron mayor en cerebelo de individuos expuestos a la mezcla. Serotonina (5-HT) y su metabolito 5-HIAA aumentaron significativamente en cerebelo en individuos expuestos PND 21.	Antonio <i>et al.</i> , 2002
Pb	Ratas crías machos de la cepa	0.2% de Acetato de Pb en agua de bebida durante la gestación y PND 21, 4, 12 y 18 meses.	La exposición a Pb en machos aumentó los niveles de DA, epinefrina y noradrenalina	Basha <i>et al.</i> , 2013
Pb	Ratas ambos sexos de la cepa Sprague-Dawley	1000 ppm de $Pb(C_2H_3O_2)_4$ en agua de bebida expuesta durante la gestación, lactancia PND21 y hasta el PND 84.	Los receptores D1 no mostraron cambios significativos en las regiones cerebrales examinadas. La exposición crónica a Pb disminuyó significativamente la unión a receptores D2 en áreas corticales, pero no cambios en caudado, putamen, núcleo accumbens y tálamo.	Ma <i>et al.</i> , 1999
Pb	Ratas macho Sprague-Dawley	0.2% de $Pb(C_2H_3O_2)_4$ en agua de bebida durante la gestación, PND 21 y 35.	La actividad de la enzima óxido nítrico sintasa se redujó significativamente en PND 21 y 35 en cerebelo e hipocampo en individuos expuestos a Pb.	Chetty <i>et al.</i> , 2001

Pb y As	Ratas adultos machos de la cepa BALB/c.	13.8 mg/kg de As y 116.4 mg/kg de Pb intraperitoneal c/u. En mezcla por entubación gástrica durante 6 semanas.	As disminuye los niveles de dopamina y serotonina y sus metabolitos.	Mejía <i>et al.</i> , 1997
As	Ratas macho de la cepa Wistar.	5 mg/kg de residuos mineros en gránulos de comida 25 mg/kg de arsenito de sodio en gránulos de comida durante 2 semanas.	Disminución en los niveles de la liberación dopaminérgica. La concentración de los metabolitos DOPAC y HVA disminuye en los individuos expuestos a 5mg/kg de residuos mineros en donde el As fue el metal más abundante.	Rodríguez <i>et al.</i> , 1998
As y Pb	Ratas hembra gestantes y crías de la cepa Wistar	50 ppm de Na ₃ AsO ₃ . Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₄ al 0.2%. En combinación As: 25 ppm y Pb 0.1% a través de agua de bebida desde el primer día de gestación hasta el PND 28 y 3 meses	La actividad de la enzima MAO disminuyó en la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo en grupos expuesto individualmente a As y Pb. Individuos expuestos a la combinación de As y Pb mostraron una disminución de los niveles de DA, noradrenalina y epinefrina.	Saritha <i>et al.</i> , 2018.
Hg	Ratas adultas macho y hembra de la cepa Wistar.	12, 45 mg/kg, 24, 90 mg/kg y 49,80 mg/kg de HgCl ₂ en agua de bebida durante 21 días.	Las células piramidales del hipocampo mostraron degeneración y reducción en el número de células piramidales a partir de la dosis 24.90 mg/kg a 49.80 mg/kg.	Sadeeq <i>et al.</i> , 2013

Pb(C₂H₃O₂)₄= Acetato de Pb, HgCl₂= Cloruro de Hg, Na₃AsO₃= Metarsenito de Na, PND= Día post-natal, ppm= Partes por millón, 5-HT= 5-hidroxitriptamina, 5-HIAA= ácido 5-hidroxiindolacético, DA= Dopamina, D1= Receptor de dopamina tipo D1, D2= Receptor de dopamina tipo D2, nNos=Óxido nítrico sintasa, DOPAC= ácido 3,4-dihidroxifenilacético, HVA= Ácido homovanílico, MAO= Monoamino oxidasa, NaAsO₂= Arsenito de sodio

2.2 Estudios sobre el efecto de los metales pesados sobre la flora y fauna de Huautla, Morelos.

Si bien es cierto que en animales de laboratorio se conocen ampliamente los efectos de los metales pesados sobre el metabolismo de la dopamina y algunas conductas. En animales silvestres esta información es escasa, así como las implicaciones ecológicas que representan para la población de roedores.

En México, la problemática en Huautla, Morelos es alarmante debido a las concentraciones de MP biodisponibles en los tres jales que se encuentran en la zona. Solís (2016) evaluó el porcentaje de metales biodisponibles en los dos de los tres jales presentes en Huautla (Tabla 5). Dicho estudio mostró que la biodisponibilidad de los metales es heterogénea entre jales y entre metales. Por tal motivo, en Huautla, Morelos se han realizado estudios para conocer los efectos de la exposición a residuos mineros sobre la vegetación (Tabla 6). Particularmente en *Acacia farnesiana* se encontró que el tejido foliar de individuos expuestos a MP mostraron mayor daño genotóxico en comparación con los individuos de la zona testigo (Santoyo 2016). También en *Vachelia campechiana*, 17 de los 18 caracteres morfológicos evaluados disminuyeron en plantas expuestas a Pb, Cu y Fe, incluso mostraron un factor de bioconcentración mayor en las raíces y hojas en comparación a individuos creciendo en sustrato testigo (Santoyo *et al.*, 2020). Otras especies analizadas han sido *Prosopis laevigata* (Murillo, 2015; Hernández, 2015) y *Sanvitalia procumbens*, donde se encontró que a mayor tiempo de exposición de MP, la concentración de clorofila disminuye y se documentó el siguiente patrón de bioacumulación Fe>Pb>Zn>Cd (Rosas, 2018).

Tabla 5. Promedio de la biodisponibilidad (mg/kg) de metales pesados en los jales de Huautla, Morelos (Modificada de Solís 2016).

Metal	Jale 1	Jale 2
Pb	58.66	62.73
Cd	22.26	32.63
Fe	18.43	20.83
Cu	80.66	78.00
Zn	32.15	39.34
Mn	42.76	47.96

En cuanto a la fauna, González (2015) estimó el efecto de un gradiente de contaminación por MP sobre la comunidad de artrópodos asociados a la vegetación, enfatizando en el orden *Araneae* y encontró que la riqueza de especies de artrópodos es mayor en sitios alejados al jale.

Con respecto a los roedores silvestres, se han utilizado tres especies para evaluar los efectos de la exposición a MP de los jales (Tabla 6): *Peromyscus melanophrys*, *Baiomys musculus* y *Liomys irroratus*. Estas especies son las más abundantes en Huautla, Morelos. Además de que *Baiomys musculus* y *Peromyscus melanophrys* son consideradas especies centinelas. Esto se debe a que son relativamente fáciles de identificar, suficientemente estudiadas en cuanto a su ecología, el tamaño de su población no se considera en peligro y habitan un territorio dentro de áreas de monitorización o estudio por xenobióticos. Además de que los niveles de contaminantes en sus fluidos, tejidos y secreciones se relacionan con los niveles del medio, lo que permite conocer los efectos patológicos en estos individuos (Tovar-Sánchez *et al.*,

2012). Con respecto a *Liomys irroratus*, recientemente se realizó la propuesta de ser considerada como especie centinela (Hernández-Plata *et al.*, 2020). Puesto que además de cumplir con las características antes mencionadas, *L. irroratus* mostró ser una especie sensible que bioacumula MP en hígado y cerebro. Dicha bioacumulación posiblemente está asociada a los cambios encontrados en marcadores neuroquímicos y neuroanatomicos involucrados en la regulación de algunas conductas como el control motor y funciones cognitivas como el aprendizaje y memoria.

Con respecto a *P. melanophrys*, éste mostró bioacumulación de MP, mayores niveles de endogamia en individuos que habitan la zona minera (Mussali-Galante *et al.*, 2012). Mientras que en *B. musculus* se encontró que los MP se bioacumulan en el hígado y hueso de los animales que habitan los jales y presentan mayor rompimiento de cadena sencilla del ADN (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012). Tovar-Sánchez *et al.*, (2012) encontraron en el roedor *P. melanophrys* mayor nivel de daño genético en individuos que habitan el sitio expuesto en comparación a los testigo. En otro estudio, los animales de la especie *P. melanophrys* de la zona minera presentaron efectos poblacionales, tales como menor densidad, menor diversidad genética, mayor endogamia y menor flujo genético (Mussali-Galante *et al.*, 2013). Esteves-Aguilar (2018) encontró en individuos de *P. melanophrys* que habitan los jales de Huautla mayor daño genético y diferencias con respecto a la longitud y ancho de regiones craneales con respecto a los individuos control.

Como se ha mostrado, las tres especies de roedores que habitan la zona minera de Huautla, Morelos, presentan acumulación de metales, daño genotóxico y/o efectos negativos a nivel poblacional. Sin embargo, se desconoce sí los MP están causando problemas conductuales en las diferentes especies de roedores que habitan la zona

minera. A este respecto, en el roedor *Liomys irroratus* que habita la zona minera de Huautla, Morelos se encontraron altas concentraciones de Pb en el hígado y en algunas áreas cerebrales dopaminérgicas (estriado, núcleo accumbens, hipocampo y mesencéfalo) con respecto a los de la zona testigo (Hernández-Plata *et al.*, 2020). También se encontró que los individuos de la zona minera presentan menor actividad exploratoria que los de la zona testigo. En el proceso de memoria, los individuos de la zona minera mostraron mayor tiempo invertido en el cuadrante donde estaba la plataforma de escape en comparación a los individuos de la zona testigo (Hernández-Plata *et al.*, 2020). En cuanto a los mecanismos neuronales, en el roedor *Liomys irroratus* se encontró que el número de células positivas a la enzima tirosina hidroxilasa en animales expuestos a MP presentes en los jales tiene una tendencia a aumentar únicamente en el área cerebral AVT. En otras especies de roedores silvestres no se han analizado los efectos de la exposición a MP sobre la fisiología neuronal (Hernández-Plata *et al.*, 2020).

Tabla 6. Efectos de los metales pesados en el suelo, agua, flora y fauna de Huautla, Morelos.

Sujeto de estudio	Metales	Resultados	Autor	
Biodisponibilidad y suelo	Residuos mineros	Pb, Cd, Fe, Cu, Zn y Mn.	Las concentraciones totales de metales rebasan los límites máximos permitidos.	Solís, 2016.
	Suelo a 900 m a la periferia del jale.	Cu, Pb y Zn	Menor concentración de MP en el suelo conforme se alejan del jale.	Hernández, 2015
Agua	Población humana de Huautla, Morelos.	As	Mayor daño al ADN en la población expuesta a As en agua de bebida proveniente de la mina.	Tovar-Sánchez <i>et al.</i> 2016.
Artrópodos	Comunidad de artrópodos.	Cu, Pb, Zn y As.	Mayor riqueza y abundancia de especies de artrópodos asociados a la vegetación en sitios alejados al jale.	González, 2015.
Vegetación	<i>Prosopis laevigata</i>	Cu, Pb y Zn	Mayor daño genotóxico en individuos expuestos.	Murillo, 2015.
	<i>Vachelia campechiana</i>	Pb, Cu y Fe.	Mostraron un factor de bioconcentración mayor en las raíces y hojas. Cambios en 17 de los 18 caracteres morfológicos evaluados en plantas expuestas.	Santoyo, 2020.
	<i>Sanvitalia procumbens</i>	Pb, Cd, Fe y Zn.	Menor concentración de clorofila a mayor tiempo de exposición al Pb.	Rosas, 2018

Tabla 6. Continuación de los efectos de metales pesados en suelo, agua, flora y fauna de Huautla, Morelos.

	<i>Peromyscus melanophrys</i>	Zn, Ni, Fe y Mn.	Se presentó un efecto sobre el género, siendo las hembras de la zona minera quienes presentaron mayor daño genético.	Tovar-Sánchez <i>et al.</i> , 2012
	<i>Peromyscus melanophrys</i>	Al, Pb, Cu, As, Cd, Hg y Ni.	La densidad de la población disminuye en la zona más contaminada. La tasa de migración en poblaciones expuestas es <i>menor</i> con respecto a la zona testigo.	Mussali-Galante <i>et al.</i> , 2013.
Roedores	<i>Peromyscus melanophrys</i>	Pb, Cd, Fe, Cu, Zn y Mn.	Los individuos de la zona minera mostraron diferencias con respecto a la longitud y ancho de regiones craneales.	Esteves-Aguilar, 2018.
	<i>Liomys irroratus</i>	Pb, Zn, Mn y Ni	Las concentraciones de Pb son mayores en el hígado y en varias áreas del cerebro. Disminución en la actividad exploratoria de individuos de la zona minera con respecto a los de la zona testigo. Aumento de las células positivas a la enzima TH en AVT de individuos de la zona minera.	Hernández-Plata <i>et al.</i> , 2020.

MP= metales pesados, TH= enzima Tirosina-hidroxilasa, AVT= área tegmental-ventral.

3. JUSTIFICACIÓN

La industria minero-metalúrgica es una de las actividades de mayor tradición e importancia económica a nivel mundial. Sin embargo, a través de los años se han generado mezclas de desechos tóxicos provenientes de la molienda de rocas que se generan después de la extracción de metales de interés (*jales*). Estos contienen metales pesados (MP), los cuales pueden ser bioacumulados y ejercer efectos negativos en la salud y conducta de los organismos. Específicamente, en Huautla, Morelos existen concentraciones elevadas de MP biodisponibles como As, Pb, Cd, Fe, Cu, Zn y Mn que han causado efectos negativos en la biota y en la población humana. Sin embargo, se desconoce si la exposición a dichos MP generan cambios neuroanatómicos y neurofuncionales y si dichos cambios podrían tener un impacto sobre la conducta de los roedores silvestres. Así, el presente proyecto permitirá conocer si el roedor silvestre *Peromyscus melanophrys* expuesto crónicamente a residuos mineros en Huautla, Morelos, presenta alteraciones en un marcador de las vías dopaminérgicas y en conductas, y funciones cognitivas tales como la actividad locomotora, exploratoria, el aprendizaje y la memoria. Este proyecto permitirá proponer una batería de pruebas aplicadas en condiciones de laboratorio dirigido a animales silvestres e inferir sobre los efectos de la exposición crónica a MP sobre las conductas y funciones cognitivas tales como el control motor, actividad exploratoria, aprendizaje y memoria.

4. HIPÓTESIS

Sí los metales pesados tales como: Cd, Fe, Cu, Zn, Mn y Pb están biodisponibles, se bioacumulan y tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencéflica y placentaria en los roedores, incluso en los que habitan sitios mineros de Huautla, Morelos, entonces la actividad exploratoria y la actividad locomotora en el roedor *Peromyscus melanophrys* de la zona minera será diferente en comparación con los individuos de la zona testigo.

Sí los metales pesados tales como: Cd, Fe, Cu, Zn, Mn y Pb están biodisponibles, se bioacumulan y tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencéflica y placentaria en los roedores incluso en los que habitan sitios mineros de Huautla, Morelos, entonces el aprendizaje en el roedor *Peromyscus melanophrys* que habita una zona minera mostrará un déficit con respecto a los individuos de la zona testigo. Asimismo, el proceso de memoria disminuirá en individuos de la zona minera en comparación a individuos de la zona testigo.

Sí los metales pesados tales como: Cd, Fe, Cu, Zn, Mn y Pb se bioacumulan en áreas cerebrales dopaminérgicas del mesencéfalo y generan cambios en el número de células positivas a tirosina hidroxilasa (TH) en roedores que habitan sitios mineros en Huautla, Morelos, entonces el número de células positivas a la enzima a TH localizadas en el mesencéfalo del roedor *Peromyscus melanophrys* de la zona minera disminuirá en comparación a los individuos testigo.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar algunas conductas, funciones cognitivas y el número de células positivas a la enzima tirosina hidroxilasa como biomarcador en roedores silvestres de *Peromyscus melanophrys* que habitan una zona minera y una zona testigo.

Objetivos específicos

- Evaluar el control motor, actividad exploratoria, aprendizaje y memoria en los roedores silvestres de *Peromyscus melanophrys* de una zona minera y una zona testigo.
- Cuantificar el número de células positivas a tirosina hidroxilasa en el mesencéfalo de los roedores silvestres de ambos sitios de muestreo a través de la técnica de inmunohistoquímica.

6. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Para cumplir con los objetivos, en este proyecto se planteó el diseño experimental mostrado en la figura 5. Brevemente, se realizó la captura de roedores de la especie *Peromyscus melanophrys*. Los individuos capturados se trasladaron a una zona segura para su identificación, etiquetado y tuvieron un periodo de habituación de al menos 5 días en un ciclo luz/obscuridad invertido (12 x 12: 8 am-8 pm). Posteriormente, se aplicaron las pruebas conductuales: Campo abierto para la evaluación de actividad exploratoria y actividad locomotora y Laberinto acuático de Morris para evaluar aprendizaje y memoria. Finalmente, se realizó el sacrificio de los individuos para evaluar un marcador dopaminérgico: el número de células positivas a la enzima tirosina hidroxilasa en el área ventral tegmental y sustancia nigra.

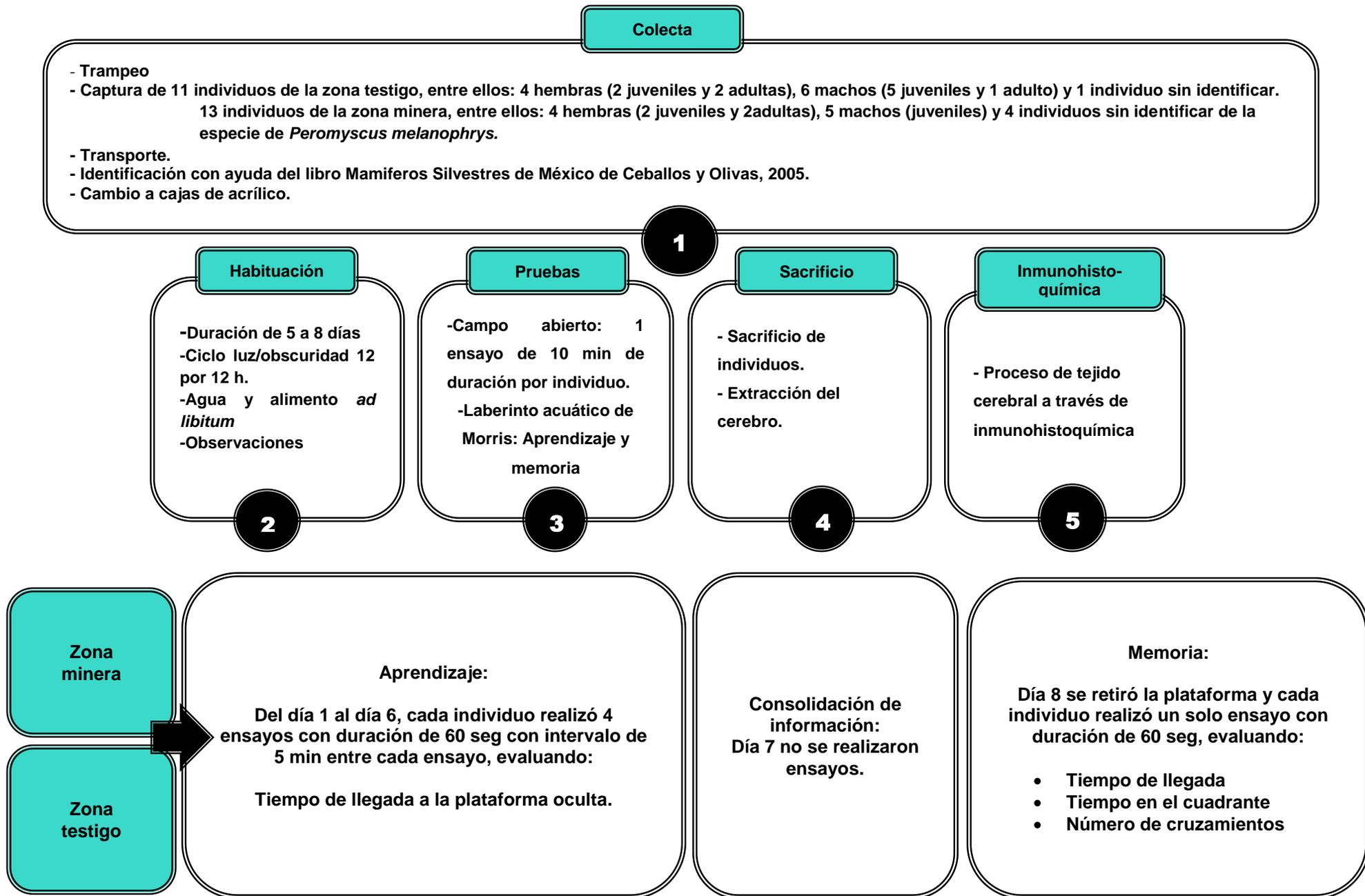


Figura 5. Diseño experimental para evaluar la conducta y un neuromarcador dopaminérgico en los roedores silvestres de *Peromyscus melanophrys*. 38

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Descripción del sitio de estudio: Huautla, Morelos.

Huautla es considerado un distrito minero metalúrgico en el estado de Morelos y la actividad de sus minas generó aproximadamente más de 780, 000 toneladas de desechos. En la actualidad, las minas están inactivas pero sus residuos permanecen en la zona y a la intemperie. La mayoría de ellos son ricos en Pb, Mn, Cd y As. Los cuales no han sido neutralizados y han provocado efectos genotóxicos en los pobladores, en la flora y fauna local (Mussali-Galante, 2008).

Para la realización de la presente investigación se establecieron dos zonas de estudio localizadas en el municipio de Tlaquiltenango, Morelos: una zona testigo y una zona minera.

Zona testigo:

La zona testigo se utilizó debido a la inexistencia de minas en el área cercana a la zona de estudio, Quilamula, Tlaquiltenango, Morelos, México sobre las coordenadas: 18° 30' 53.9"N-99° 00' 50.8" O y a 1101 m de altitud. No existen registros de contaminación por MP y sus características ecológicas y geográficas son similares a la zona minera. La zona testigo está localizada hacia el norte y a 11 km de la zona minera (Mussali-Galante, 2008; Mussali-Galante *et al.*, 2013).

Zona minera:

La zona minera se localiza dentro del polígono del área natural protegida Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH). La zona minera presenta residuos depositados tras la actividad de una red de minas que se encuentran a 500 m del poblado de Huautla, Tlaquilténango, Morelos, sobre las coordenadas: 18° 26´ 24.6" N-0.99° 01´57.8" O y a 974 m de altitud. Dichos depósitos se encuentran al aire libre generando un impacto en ríos, vegetación y fauna local, presentando concentraciones altas de Pb (2,298 mg/kg) y As (139 mg/kg) (Volke *et al.* 2005).

Huautla es localizada en el municipio de Tlaquilténango en el estado de Morelos a una altitud que desde los 800 a 1500 m. En 1993, las zonas mineras de Huautla quedaron dentro de una zona sujeta a conservación ecológica. Posteriormente, el 8 de septiembre de 1999 fue considerada como área natural protegida dentro de la REBIOSH (CONANP, 2019). En cuanto a fauna en la REBIOSH, ésta cuenta con un total de 62 especies de mamíferos: 33 murciélagos, 10 roedores, 13 carnívoros y 6 restantes pertenecientes a otros ordenes, 17 especies de anfibios, 1 especie de tortuga, 24 especies de lagartijas, 27 de serpientes y 180 especies conocidas de aves. Dentro de la cuenca existen especies con valor endémico (Dorado *et al.*, 2005; Dorado *et al.*, 2012).

La REBIOSH se encuentra entre 2 regiones fisiográficas; 1) Eje neo volcánico transmexicano al Oriente-Sur, 2) Sierra Madre del Sur al occidente, la cual cubre 59,030 ha y presenta un clima de tipo Awo (w)(i) g cálido subhúmedo, el más cálido de los subhúmedos con lluvias en verano y marcha de temperatura tipo Ganges, con 900 mm de precipitación anual (Dorado *et al.*, 2005). El tipo de vegetación en la selva baja caducifolia es determinada por estacionalidad climática con una época de lluvias en los

meses Junio-Septiembre y una temporada de secas en los meses Octubre-Mayo, las especies vegetales que no sobrepasan los 10-12 m de altura. Entre las familias vegetales más importantes se encuentran; *Fabaceae*, *Poaceae*, y *Asteraceae*, los cuales son de importancia cultural y económica para las poblaciones que habitan dentro de la reserva (Rzedowski, 1979; Dorado *et al.*, 2012).

7. 2 Colecta de individuos

a) Biología del roedor *Peromyscus melanophrys*

El género *Peromyscus* es el más abundante, siendo un género muy complejo desde una perspectiva filogenética, características morfológicas, ecológicas y variación molecular inter e intraespecífica (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012). Dentro del género, la especie *P. melanophrys* es abundante desde el centro de Canadá, Alaska al sur de Panamá, incluido México, donde se reconoce como endémico se distribuye desde Durango, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Morelos y hasta el estado de Chiapas, en Morelos se distribuye en todo el estado (Musser y Carleton, 2006).

Su distribución geográfica comprende una amplia variedad de hábitats, el roedor se ha descrito en bosques caducifolios, siendo más comunes en zonas áridas. Dicho roedor ha sido utilizado como un organismo centinela para diversos estudios de investigación presente en sitios contaminados y no contaminados (Mussali-Galante *et al.*, 2012; Tovar-Sánchez *et al.*, 2012; Mussali-Galante *et al.*, 2013; Esteves-Aguilar, 2018)

Peromyscus melanophrys (Rodentia: *Creticidae*) es un mamífero de amplia distribución desde el norte hasta el sur de México, siendo una de las especies más

grandes del género, ya que las medidas morfológicas en las hembras son de 220 a 275 mm y los machos son de 233 a 270 mm de longitud (Figura 6) (Merriam, 1892; Chavez y Espinosa, 2005; Tovar-Sánchez *et al.*, 2012).



Figura 6. Sujeto de estudio: roedor *Peromyscus melanophrys*.

También conocido como ratón de meseta, se caracteriza por su coloración dorsal que varía según el sustrato donde viva, que va desde gris, marrón, amarillento hasta canela. Las mejillas son de color blanco y vientre de color beige, siendo más oscuros en zonas volcánicas y en zonas áridas. La región temporal del cráneo es grande, nasales en paralelo y glóbulos oculares grandes lo que los diferencia fácilmente de las demás especies que comprende el género. Se sabe que este roedor emerge al atardecer para escalar árboles y alimentarse, el cual se asocia a zonas con vegetación de yucca, cholla, ocotillo y mesquite convirtiéndolo en granívoro, semi-arbóreo y nocturno. La asociación con esta vegetación ha demostrado la construcción de sus nidos (Coues, 1874; Baker, 1986). Entre los depredadores más destacados de *P. melanophrys* se encuentran las aves estrigiformes o aves rapaces nocturnas como (*Tyto alba*) lechuza blanca o lechuza de campanario como también se le conoce y (*Bubo virginianus*) conocido como búho cornudo o búho real americano (Terman, 1968).

La reproducción de *P. melanophrys* ocurre dos veces al año, durante los meses de Febrero-Mayo y Junio-Octubre. El tamaño de sus camadas oscila de 2 a 5 individuos (Coues 1874; Ceballos y Olivas, 2005).

La presente investigación fue realizada en *P. melanophrys* en Huautla, Morelos ya que es una de las especies más abundantes y está en contacto con el suelo, agua y eventos eólicos de la zona contaminada con metales pesados. La presencia de dicho roedor dentro y en zonas circundantes a las minas de Huautla, Morelos, lo convierte en un modelo adecuado para estudiar las exposiciones ante MP presentes en los jales generados por la extracción de metales de interés. Este organismo presenta interacción con los MP durante exposiciones prolongadas, desde su nacimiento hasta su adultez y

por generaciones (Mussali-Galante *et al.*, 2012; Tovar-Sánchez *et al.*, 2012; Mussali-Galante *et al.*, 2013).

b) Muestreo

Para la colecta de *P. melanophrys* se realizaron 3 transectos a lo largo de 100 m. En cada transecto, cada 2 metros se colocó directamente sobre el suelo una trampa Sherman. En cada día de muestreo se colocaron 132 trampas Sherman. Las trampas son de aluminio con un sistema de resorte cerrando la puerta de entrada. Para atraer a los roedores de la especie *P. melanophrys* se realizó un cebo a base de avena, cacahuate y vainilla. El cebo se colocó dentro de la trampa, siempre a la misma hora (18:00 horas) en ambos sitios de muestreo y revisadas por la mañana (9:00 horas).

Los individuos capturados fueron trasladados a la estación biológica de la UAEM en Quilamula para su posterior identificación, etiquetado, periodo de habituación y aplicación de pruebas conductuales para el análisis del control motor, actividad exploratoria, aprendizaje y memoria.

7.3 Aplicación de instrumentos para evaluación de control motor y actividad exploratoria: Campo abierto

Una vez que los individuos fueron trasladados a la estación de la UAEM en Quilamula, permanecieron al menos cinco días (entre 5 a 8 días) después de su captura en periodo de habituación. Es decir, en la estación estuvieron en cajas de acrílico limpias con aserrín. También estuvieron con agua y alimento disponible y con ciclo luz/oscuridad invertido (12 x 12: 8 am - 8 pm). Las pruebas conductuales se realizaron diariamente

entre 11 a.m. y 6 p.m. en la misma habitación en las que ellos permanecieron durante el periodo de habituación.

a) Laberinto Campo Abierto

El paradigma de campo abierto (*en inglés, Open Field Test*) fue propuesto por Hall (1934). Se utiliza para evaluar la actividad de locomoción general, la reacción de los sujetos a un acontecimiento estresante relacionado con la ansiedad en roedores. También, se utiliza para evaluar la actividad exploratoria, el cual es un comportamiento evocado por estímulos novedosos, que consiste en actos y posturas que permiten la recopilación de información sobre nuevos objetos y partes desconocidas del medio omitiendo el escape por barreras (Polanco *et al.*, 2011).

El campo abierto consiste en una caja de acrílico de 46 cm por 46 cm y 1.24 m de altura, con fondo blanco cuadriculado con 25 cuadros de 9 por 9 cm cada uno y un cuadro central de 22 por 22 cm (Figura 7. A). Las paredes son de color negro para evitar la visibilidad de cuerpos extraños para los roedores.

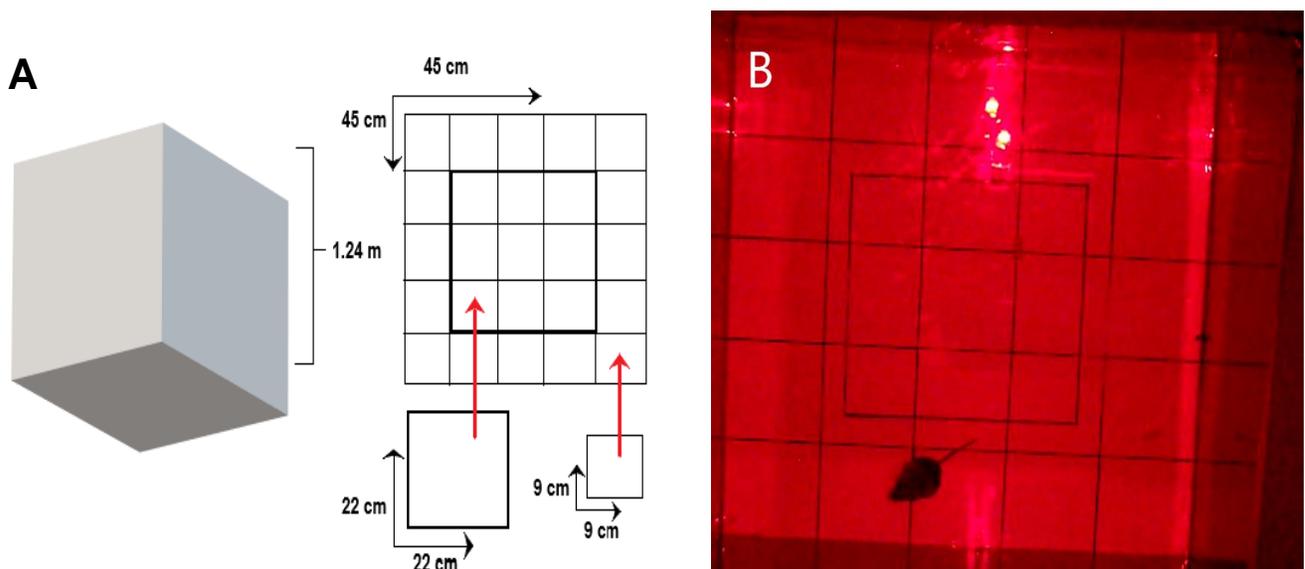
Figure 7 consists of two parts, A and B. Part A is a schematic diagram of the open field apparatus. On the left, a 3D perspective shows a rectangular box with a height of 1.24 m and a square base of 46 cm by 46 cm. To the right, a top-down view shows a 5x5 grid of squares. Each small square is 9 cm by 9 cm. In the center of the grid is a larger square measuring 22 cm by 22 cm. Red arrows point from the central square to the 9 cm by 9 cm squares, indicating the grid structure. Part B is a photograph of the apparatus, showing the grid pattern on a white background, illuminated by a red light source from above, creating a red glow on the grid lines.

Figura 7. Dimensiones y vista superior del campo abierto para evaluar control motor y actividad exploratoria en el roedor *Peromyscus melanophrys*. En A) se muestra un esquema de las dimensiones de la caja de acrílico. En B) se muestra una vista superior del campo abierto.

45

Todos los animales capturados (11 de la zona testigo y 13 de la zona minera) fueron colocados en el campo abierto para el registro del control motor y actividad exploratoria de los animales. Sin embargo, en el análisis estadístico solo fueron considerados 8 individuos por cada zona de estudio ya que solo estos individuos mostraron actividad durante la prueba, el resto permaneció inmóvil en las cajas. En el presente estudio el tamaño de la muestra no permitió hacer los análisis estadísticos por edad o género. Las pruebas se realizaron evitando sonidos, movimientos bruscos y olores penetrantes que interfiriera con la conducta del roedor. Antes de iniciar la prueba, la caja de acrílico fue limpiada con ácido acético al 1%. Posteriormente se colocaba al animal en el centro de la caja. Los individuos fueron colocados en la caja en una sola ocasión por 10 minutos. La prueba fue videograbada para su posterior análisis con una cámara colocada en la parte superior de la caja de acrílico a una altura de 1.5 metros (Padurariu *et al.*, 2010; Padurariu *et al.*, 2017).

En el campo abierto se pueden evaluar algunas variables tales como: a) la locomoción horizontal (número de veces que se cruza las líneas marcadas en el suelo y b) la frecuencia con la que el animal se dispone en posición vertical (incorporaciones) y, c) las actividades de aseo y movimientos profaciales (acicalamiento) tomando en cuenta la defecación y orina. Las variables consideradas en el presente estudio son número de cuadros visitados, número de incorporaciones, tiempo y número de visitas al cuadro del centro (22 × 22 cm).

7.4 Aplicación de instrumento de aprendizaje y memoria: Laberinto acuático de Morris

El laberinto acuático de Morris es una herramienta de laboratorio ampliamente utilizada en neurociencias para investigar el aprendizaje espacial y la memoria de ratas de laboratorio y fue desarrollada por Richard Morris en 1984 (Morris, 1984; D'Hoge y Deyn 2001; Young *et al.*, 2006).

El aprendizaje espacial es clave para la sobrevivencia ya que numerosas conductas como las alimenticias o las reproductivas dependen del conocimiento del entorno en el que habitan y recordar puntos específicos de supervivencia (Kandel *et al.*, 2001; Sampedro-Piquero *et al.*, 2013). En la aplicación de dicho instrumento fue considerado el protocolo descrito por Rodríguez *et al.*, (2013) y se utilizó una muestra de n= 10 individuos para la zona expuesta y n= 10 individuos para la zona testigo en la fase de entrenamiento (Figura 8 y 9).

b) Laberinto acuático de Morris

El laberinto consiste en una piscina circular de 94.2 cm de diámetro y 42 cm de alto llena de agua a la que le fue agregada Bióxido de Titanio al 16% para ocultar una plataforma de escape (30 cm de altura y en la superficie un cuadrado de 15 × 15 cm), dichas dimensiones se representan en la Figura 8. A. La temperatura del agua se mantuvo a una temperatura de 25-26°C. Posteriormente, se colocó una barrera blanca alrededor de la piscina, se dividió en 4 cuadrantes y en cada cuadrante se colocó una de las 4 señales externas elaboradas con foamy blanco y negro (Figura 8. B).

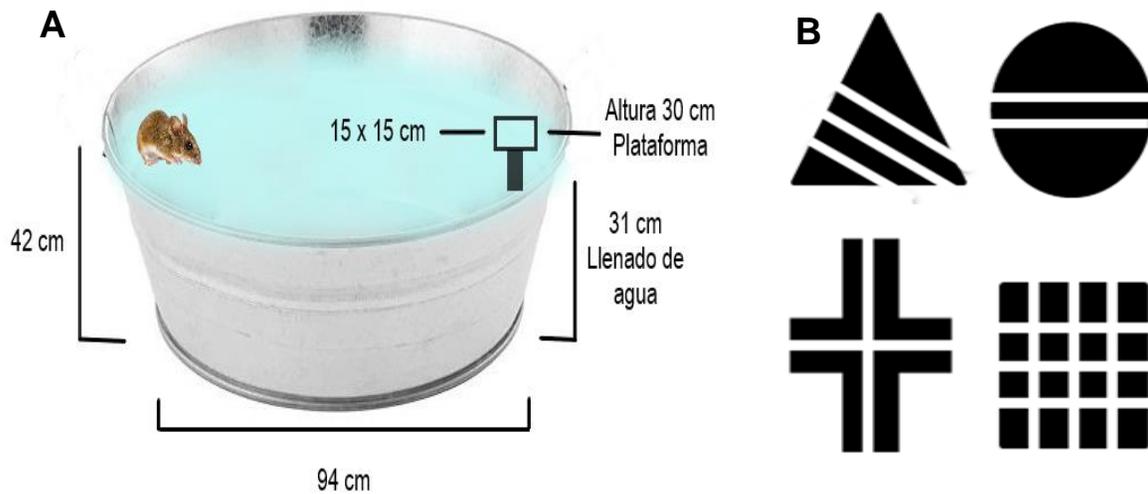


Figura 8. Dimensiones del laberinto acuático de Morris (A) y señales visuales externas utilizadas en el laberinto (B).

Una cámara fue colocada en la parte superior de la piscina para grabar el primer y último ensayo de los animales. La prueba se realizó durante 8 días y consistió en una fase de entrenamiento y en una prueba de memoria (Figura 9). La fase de entrenamiento tuvo una duración de seis días. En la cual, los individuos realizaron cuatro ensayos de 1 minuto de duración, con intervalos de 5 minutos entre ensayo. Cada día, el orden de los cuadrantes en el cual los roedores realizaron la prueba fue aleatorio, para evitar una estrategia egocéntrica. En la cual, el sujeto funciona como su propio punto de referencia central y enfocarse así en una estrategia de memorizar alocéntrica, es decir, desarrollar la capacidad del individuo para codificar, almacenar y evocar la información aprendida de la ubicación de destino en relación a la posición espacial de puntos de referencia ambientales, en este caso la señalización externa (figuras de foamy) (Roque, 2008; Carrillo-Mora *et al.*, 2010).

Una vez que el roedor llegó a la plataforma, permanecieron en ella por 15 seg. Sin embargo, cuando los individuos no encontraron la plataforma en 1 min, los ratones fueron tomados de la cola y se les dirigió hacia la plataforma y también permanecieron por 15 seg. Esto con la finalidad de que los individuos memorizarán de acuerdo al espacio externo y asociarán la ubicación de la plataforma oculta con la señal externa donde se encontraba la plataforma. Después de los seis días de entrenamiento, el día siete fue considerado como día para consolidar la memoria, proceso el cual es el paso de la información del sistema de memoria a corto plazo al sistema de memoria de largo plazo, comprendiendo una serie de cambios en propiedades químicas, físicas y anatómicas de las sinapsis que son responsables de la memoria (Carrillo-Mora *et al.*, 2010).

Los animales durante el proceso de consolidación no estuvieron en el laberinto acuático sí no que permanecieron en sus cajas con agua y comida. En el día ocho se realizó la prueba de memoria. En ese día, la plataforma fue removida del agua y los animales solo realizaron una vez la prueba, la cual fue videograbada. Durante la fase de entrenamiento y la prueba de memoria la variable registrada fue tiempo de llegada a la zona donde estaba la plataforma de escape. Además, durante la prueba de memoria también fue evaluado el número de cruzamiento en el cuadrante donde estaba la plataforma y el tiempo que invirtieron en ese cuadrante. A pesar de que todos los animales estuvieron en la fase de entrenamiento (n= 10 individuos de la zona expuesta y n= 10 individuos de la zona testigo) no todos mostraron el proceso de aprendizaje. Por lo que en el análisis estadístico de la prueba de memoria solo se consideraron 8

individuos de la zona testigo y 7 individuos de la zona minera. El esquema y una vista superior del sistema se muestran en la Figura 9.

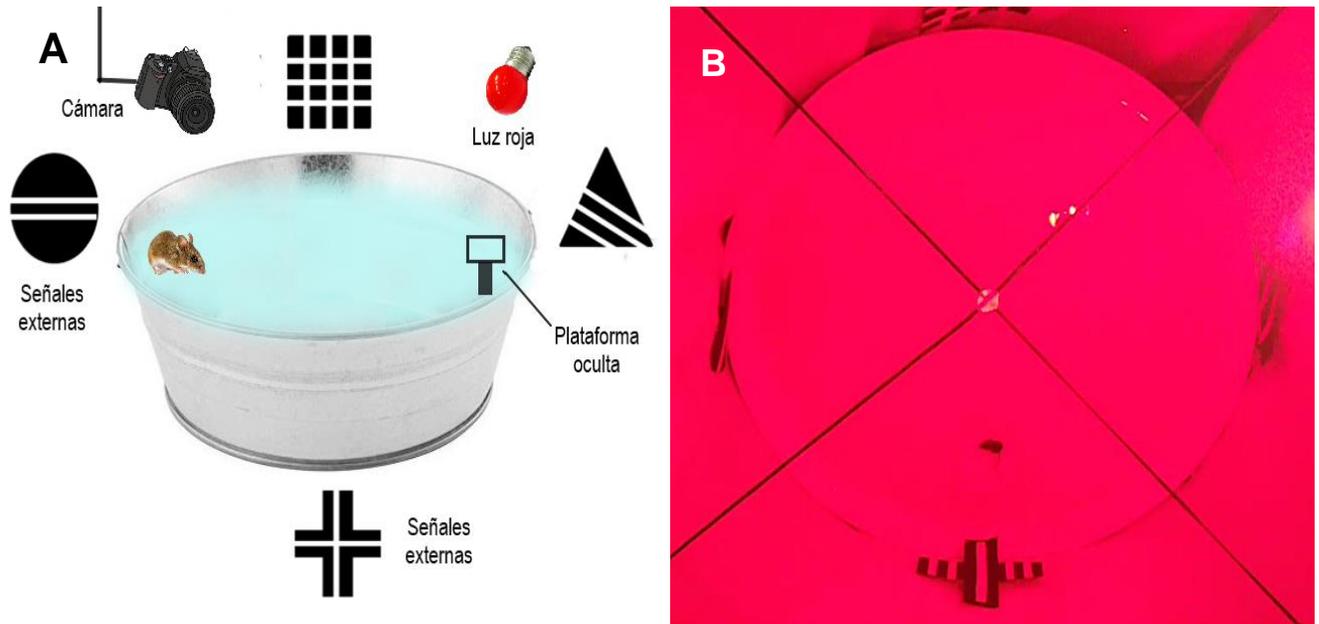


Figura 9. Laberinto acuático de Morris para evaluar aprendizaje y memoria en el roedor *Peromyscus melanophrys*. A) Esquema de la vista lateral del laberinto que muestra la colocación de las señales visuales externas. B) Fotografía de la vista superior del laberinto.

7.5 Inmunohistoquímica para detectar células positivas a la enzima tirosina-hidroxilasa

Para detectar y posteriormente cuantificar el número de células positivas a la enzima tirosina hidroxilasa (TH), se utilizó la técnica de inmunohistoquímica de Hoffman (2008) y solo fue procesado un hemisferio del cerebro de 6 individuos de la zona minera y 8 de la zona testigo. El otro hemisferio fue etiquetado y almacenado en tubos eppendorf a -70°C para futuros estudios. De igual forma, los cerebros completos de los otros individuos capturados fueron conservados para futuros estudios.

Una vez terminadas las pruebas conductuales, los animales fueron sacrificados de la siguiente manera: Con ayuda de guantes de carnaza, los individuos fueron colocados sobre la mesa de trabajo, donde fueron sacrificados por dislocación cervical. Éste es un método de sacrificio humanitario que requiere de habilidad manual, produciendo inconsciencia inmediata y muerte causada por lesiones al tronco encefálico. Considerado un método humanitario, siendo menos angustioso para el roedor y el beneficio de no presencia de químicos que contaminen el tejido, el evitar el estrés al roedor implica parte de la técnica y así mismo del reconocimiento y confirmación de la muerte. La separación de vértebras cervicales y cráneo se produce al situar el dedo medio e índice en la base del cuello junto a la base del cráneo y jalar rápidamente la base de la cola. Posteriormente, con ayuda de unas tijeras, se realizó la decapitación del roedor, enseguida se realizaron 3 cortes precisos: 2 laterales justo debajo de las orejas cortando la piel y parte de la estructura ósea y 1 en el centro del cráneo cortando la piel hasta llegar a los bulbos olfatorios. Con ayuda de la apertura de la piel y un equipo de disección se fracturó los huesos del cráneo: Occipitales, temporales y parietales, evitando algún daño sobre el cerebro, puesto que fue el tejido de interés.

Tras su extracción un hemisferio se depositó en tubos eppendorf a -70°C para estudios posteriores, mientras que el otro hemisferio se colocó en tubos falcón con 10 ml de paraformaldehído a 4°C para su conservación. Posteriormente, los cerebros se colocaron por 3 días en una solución crioprotectora de sacarosa al 30%. Después se realizaron cortes coronales de 30 micras de los cerebros en tres series. Las tres series fueron guardadas en anticongelante por al menos ocho días. Sólo una serie fue utilizada en la inmunohistoquímica, las otras 2 series fueron de reserva para posteriores análisis.

En general, la técnica consta de un lavado, permeabilización, bloqueo, remoción de solución de bloqueo, incubación con anticuerpo primario, remoción del anticuerpo primario, incubación con anticuerpo secundario, remoción de anticuerpo secundario, desarrollo de la reacción y revelado. A continuación se describen algunos detalles de las etapas de la técnica:

Se inició con un lavado con KPBS al 0.05 M por seis veces por 10 minutos, posteriormente se incubaron las muestras con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 0.3% en KBPS durante 15 minutos, para realizar un lavado en seguida tres veces durante 10 minutos con KPBS al 0.05 M.

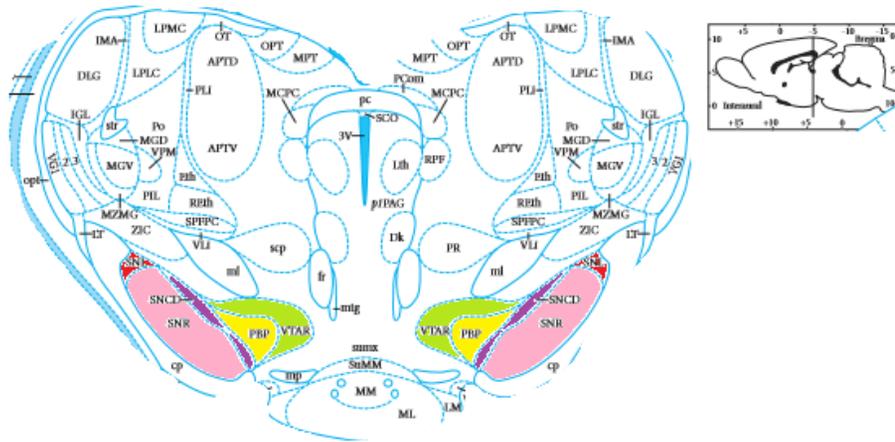
El anticuerpo primario fue incubado a temperatura ambiente por tres días. Para la preparación del anticuerpo se realizó una solución estándar con 4 μL de tritón X-100, 30 μL de suero de caballo, 966 μL de KPBS al 0.05 M y 0.3 μL del anticuerpo primario para 1 ml. Transcurrido el tiempo, los cortes fueron lavados 6 veces por 10 minutos con KBPS 0.05 M. Después, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente por 1 hora. Para preparar el anticuerpo secundario se realizó una

solución (para 1 ml) que contenía 4 μL de tritón X-100, 1.25 μL anticuerpo secundario y 994.75 μL de KPBS al 0.05 M. Transcurrido el tiempo de incubación, los cortes fueron lavados 5 veces por 10 minutos con KBPS al 0.05 M. Previo a la incubación se preparó un complejo de avidina biotina peroxidasa (ABC) por cada 10 mL; se agregaron 30 μL de la solución A, 30 μL de la solución B, 40 μL de triton X-100, 10 μL de KPBS al 0.05 M. Posteriormente, los cortes fueron incubados con dicha solución por 1 hora a temperatura ambiente. En seguida, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con KPBS al 0.05 M y 3 lavados de 5 minutos cada uno con acetato de sodio al 0.175 M. Después, los cortes fueron incubados con diaminobencidina (DAB) durante 20 minutos, el cual se preparó para 10 mL: 4 mg de DAB, 10 mL de acetato de sodio 0.175 M y 1.5 μL de H_2O_2 al 3% que se agregó al final. Finalmente, los cortes fueron lavados 3 veces por 5 minutos cada uno con acetato de sodio al 0.175 M y 3 veces por 5 minutos con KPBS al 0.05 M. Los cortes fueron guardados en KPBS al 0.05 M a -4°C . Posteriormente, los cortes fueron colocados en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar a temperatura ambiente por al menos cinco días. Después, los cortes fueron cubiertos con Permont y un cubreobjetos. Las laminillas se dejaron secar por al menos cinco días. Después se realizó el conteo de células con ayuda del atlas para rata de Paxinos y Watson (2005).

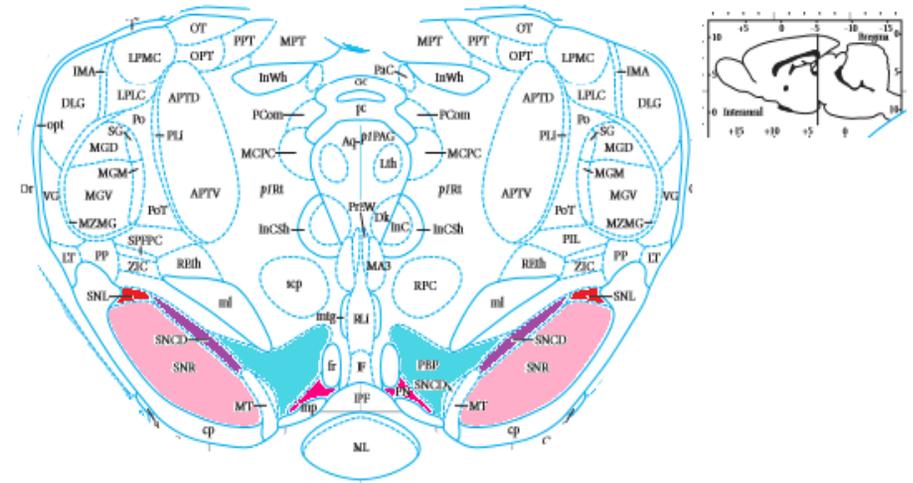
Para la evaluación del número de células positivas a la enzima tirosina-hidroxilasa se analizaron cortes cerebrales coronales del hemisferio izquierdo desde Bregma -4.36 a -6.80 (Paxinos y Watson 2005). En dichos cortes se localizaron las áreas dopaminérgicas: *substancia nigra pars lateralis* (SNpl), *substancia nigra pars reticular* (SNpr), *substancia nigra pars compacta* (SNpc), área tegmental ventral (AVT), núcleo

parabraquial pigmentoso (PBP) y núcleo paranigral (PN) en los que se cuantificó a través de un microscopio óptico con el objetivo 10X, donde se identificaron los cortes anteriores, mediales y posteriores correspondientes al mesencéfalo (Figura 10).

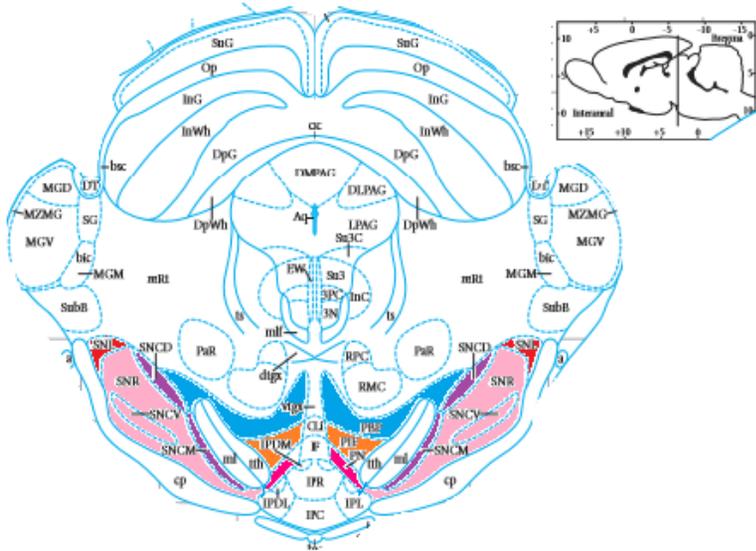
Corte anterior (Bregma -4.80 mm)



Corte medial (Bregma -5.16 mm)



Corte posterior (Bregma -6.24 mm)



Corte posterior (Bregma -6.72 mm)

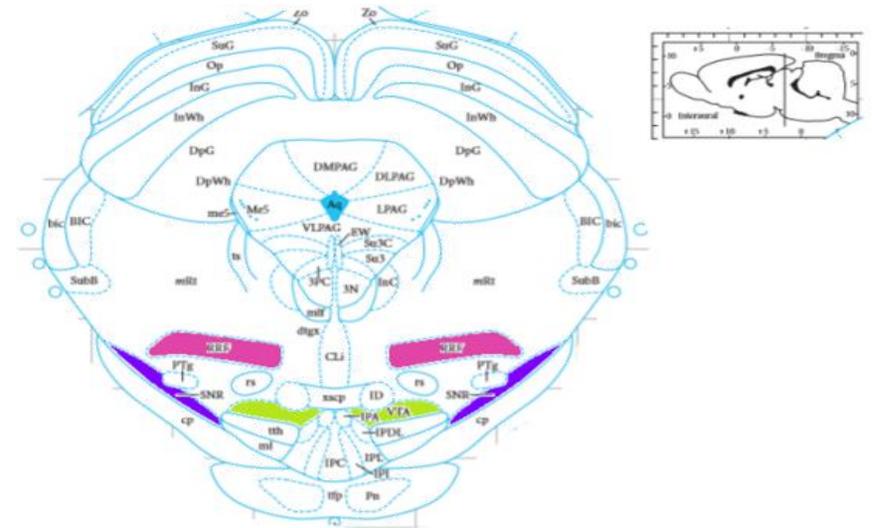


Figura 10. Cortes coronales anterior, medial y posterior en la rata. En la figura se muestran las áreas analizadas en el presente proyecto: Sustancia nigra reticular (SNr), Sustancia nigra lateralis (SNI), Sustancia nigra pars compacta (SNc), Área ventral tegmental (VTA), Línea rostral del rafe (RLi), Núcleo parabraquial pigmentoso (PBP) y Núcleo paranigral (PN) (Modificada de Paxinos y Watson, 2005). En el extremo superior derecho se muestran el corte sagital

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En todos los datos se aplicaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnof) y homogeneidad de varianzas (prueba de F) para determinar si los datos eran paramétricos o no paramétricos. Dependiendo de los resultados de estas pruebas, posteriormente se aplicaron pruebas de t de Student para datos no pareados o una prueba de U Mann-Whitney. Dichas pruebas fueron utilizadas para los datos de actividad locomotora, actividad exploratoria, aprendizaje y memoria. Cabe mencionar que para los datos de aprendizaje se aplicó una ANOVA de medidas repetidas considerando el sitio como factor de tratamiento, los días de entrenamiento como factor de tiempo y la interacción (tratamiento \times tiempo).

Se utilizó el programa de *GraphPad InStat* para prueba de normalidad de datos (Kolmogorov-Smirnof). El programa *StatView* fue utilizado para aplicar la prueba de F , ANOVA de medidas repetidas, t -student para datos no pareados y la prueba U -Mann Whitney. Mientras que el programa de *SigmaPlot 14* fue utilizado para realizar las gráficas correspondientes. Fue considerado un valor de significancia de $p \leq 0.05$. Los datos se muestran en promedio \pm error estándar (EE).

9. RESULTADOS

9.1 Evaluación del control motor y actividad exploratoria a través del campo abierto.

En los ensayos en campo abierto se analizaron cuatro variables durante 10 minutos para evaluar control motor y actividad exploratoria (Tabla 7). Los 10 minutos de la prueba fueron analizados en los periodos de 0 a 5 minutos, de 5 a 10 minutos y el tiempo total de 0 a 10 minutos. El análisis estadístico mostró que el número de incorporaciones fue significativamente mayor en los animales de la zona minera (24 ± 6) con respecto a los individuos de la zona testigo (8 ± 2) en el periodo de 5 a 10 min ($U=23.000$, $p=0.02$) (Figura 11).

Del mismo modo, el número total de cuadros visitados fue estadística y significativamente diferente entre grupos, siendo el grupo de la zona minera (63 ± 14) quienes recorren mayor número de cuadros en el periodo de 5 a 10 min ($U=24.5$, $p=0.03$) en comparación a los animales de la zona testigo (22 ± 7) (Figura 12).

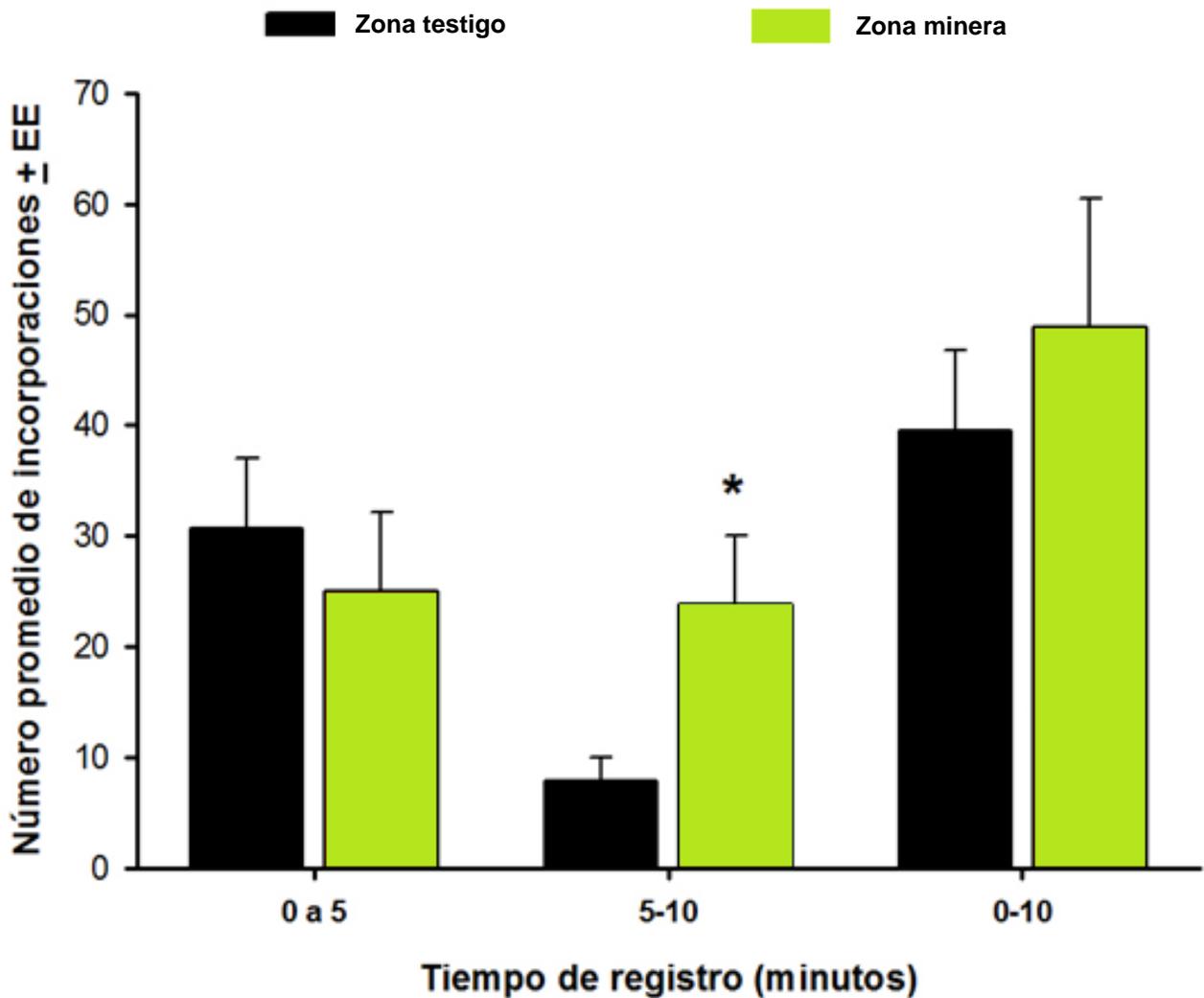


Figura 11. Número de incorporaciones en la prueba de campo abierto del roedor *Peromyscus melanophrys* que habita una zona testigo y una zona minera. La prueba consistió en un periodo de evaluación de 10 minutos, los cuales fueron divididos en dos periodos: 0 a 5, 5 a 10 y el total de 0 a 10 min. Se muestra promedio \pm EE. * $p < 0.05$. Zona testigo: $n = 7-8$, Zona minera: $n = 8$.

Por otro lado, en ninguno de los dos periodos analizados (0-5 y de 5-10 min) el tiempo en el centro ni el número de visitas al cuadro del centro mostraron cambios significativos en ambos grupos experimentales. Sin embargo, esta última mostró diferencias marginalmente significativas ($t_{19} = 1.8$, $p = 0.08$). Estos resultados se muestran en la Figura 13 y 14, respectivamente. En la tabla 7 se muestra un resumen de las cuatro variables analizadas.

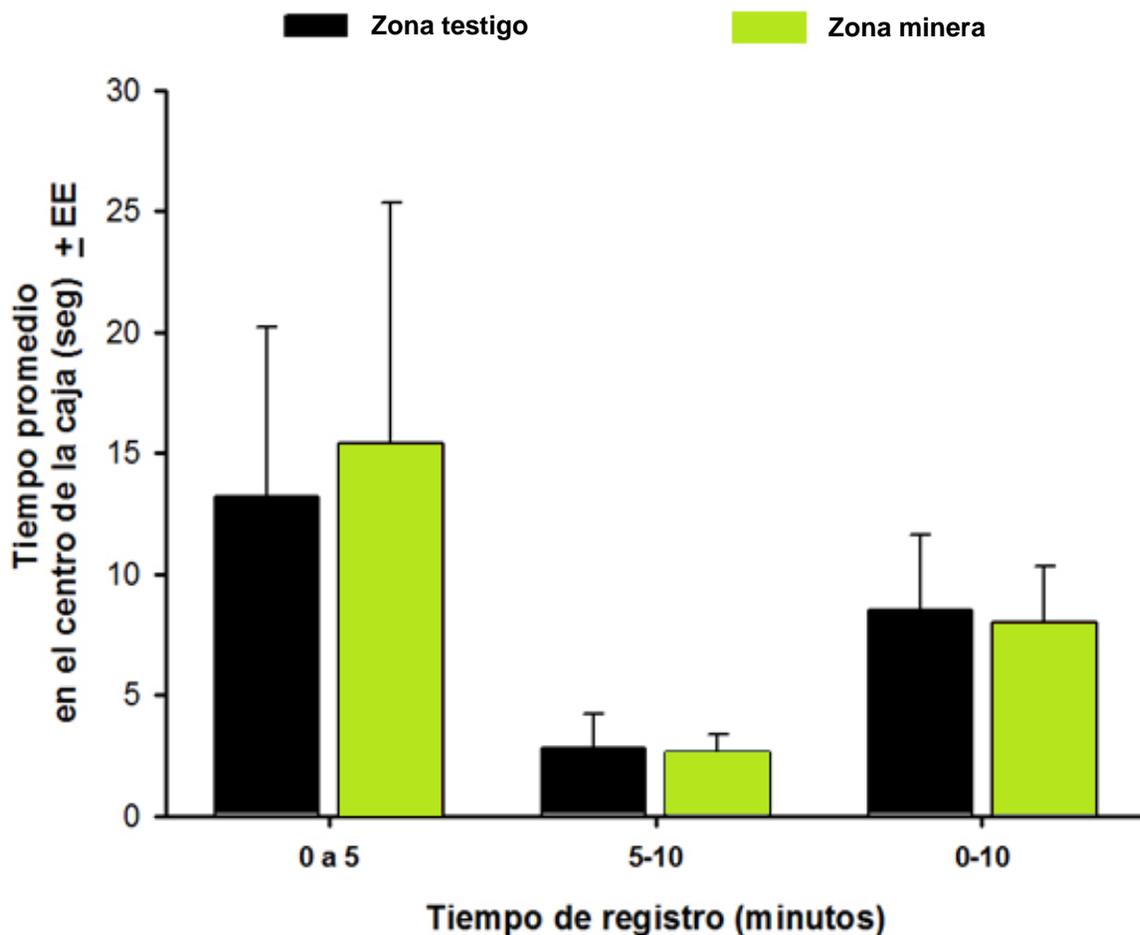


Figura 13. Tiempo promedio en el centro de la caja en la prueba de campo abierto del roedor *Peromyscus melanophrys* que habita una zona testigo y una zona minera. La prueba consistió en un periodo de evaluación de 10 minutos, los cuales fueron divididos en 2 periodos: 0 a 5, 5 a 10 y el total de 0 a 10 min. Se muestra promedio \pm EE. * $p < 0.05$. Zona testigo: $n = 7-8$, Zona Minera: $n = 8$.

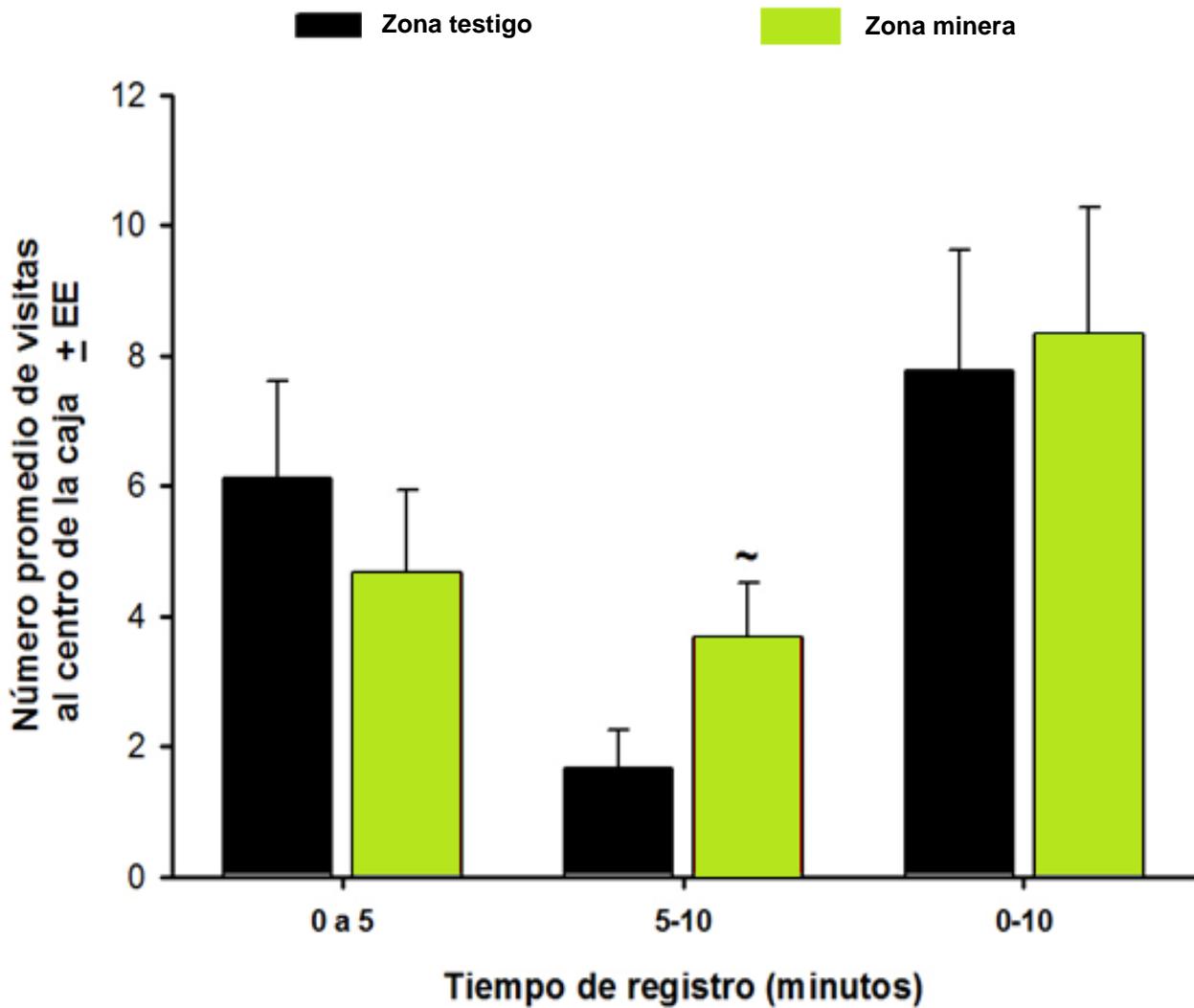


Figura 14. Número promedio de visitas al centro de la caja en la prueba de campo abierto del roedor *Peromyscus melanophrys* que habita una zona testigo y una zona minera. La prueba consistió en un periodo de evaluación de 10 minutos, los cuales fueron divididos en 2 periodos: 0 a 5, 5 a 10 y el total de 0 a 10 min. Se muestra promedio \pm EE. $\sim p < 0.08$. Zona testigo: $n=7$, zona Minera: $n=8$.

Tabla 7. Resumen de las variables analizadas en la prueba de campo abierto en el roedor *Peromyscus melanophrys* que habita una zona testigo y una zona minera.

Variable	Tiempo de registro (min)			
	Zona	0-5	5-10	0-10
Número de incorporaciones	testigo	31 ± 6	8 ± 2	39 ± 7
	minera	25 ± 7	24 ± 6 *	49 ± 12
Número total de cuadros visitados	testigo	83 ± 14	22 ± 7	105 ± 17
	minera	63 ± 15	63 ± 14 *	126 ± 25
Tiempo cuadro del centro (s)	testigo	13 ± 7	2.7 ± 1.5	8.5 ± 3
	minera	15 ± 10	2.6 ± 0.7	8 ± 2.3
Número de visitas al cuadro del centro	testigo	6 ± 1	2 ± 1	8 ± 2
	minera	5 ± 1	4 ± 1 ~	8 ± 2

Se muestra promedio ± EE. * $p < 0.05$, ~ $p = 0.08$. Zona testigo: n= 7-8, zona minera: n= 8. En color rojo se muestran las diferencias estadísticas en las dos variables de individuos de la zona minera.

9.2 Evaluación de aprendizaje y memoria a través del Laberinto Acuático de Morris

a) Adquisición de información durante el entrenamiento: Fase de aprendizaje

En la fase de entrenamiento, registrada durante seis días, el análisis estadístico mostró que el tiempo de llegada a la plataforma fue similar entre los individuos de la zona testigo y los de la zona minera a residuos mineros ($F_{1,18} = 0.278, p = 0.6045$) (Figura 15). Sin embargo, el tiempo de llegada disminuyó a través del tiempo en los individuos de ambos sitios, es decir hubo un efecto significativo del tiempo ($F_{1,18} = 11.613, p = 0.0001$). No hubo efecto de interacción (tratamiento \times tiempo; $F_{5,18} = 0.485, p = 0.7865$). En la Figura 15 se puede observar que el tiempo de llegada a la plataforma en los animales de ambas zonas de estudio disminuyó a lo largo de los seis días de entrenamiento de 35 ± 18 segundos en el día 1 hasta 15 ± 8 segundos en el día 6.

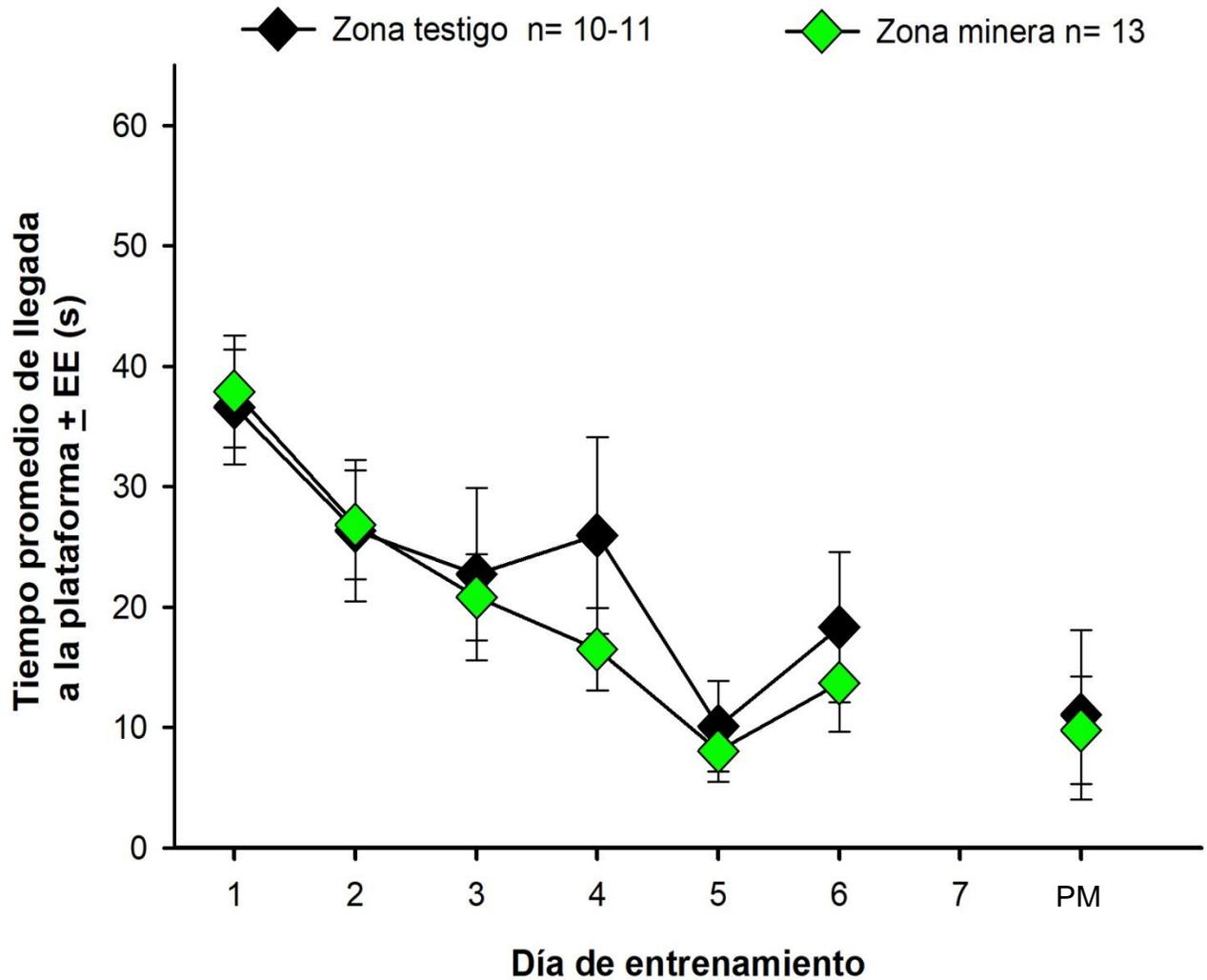


Figura 15. Tiempo de llegada a la plataforma en la fase de entrenamiento y prueba de memoria en el laberinto acuático de Morris en el roedor *Peromyscus melanophrys* que habita una zona testigo y una zona minera. La fase de entrenamiento corresponde a los días 1 al 6. La prueba de memoria (PM) se realizó 48h después del último día de entrenamiento. Se muestra promedio \pm EE. Aprendizaje: Zona Testigo: n= 10, Zona Minera: n= 10. Memoria: Zona Testigo: n=8, Zona Minera: n= 7

b) Evocación de información posterior al entrenamiento: Prueba de memoria

Después de la fase de entrenamiento, la prueba de memoria (PM) se realizó 48 horas después del último día de aprendizaje. En PM se evaluó tiempo de llegada al sitio de la plataforma, cabe recordar que para la aplicación de esta prueba, la plataforma fue retirada. También se evaluó el número de cruzamientos y el tiempo invertido en el cuadrante donde estaba la plataforma.

El análisis estadístico en la prueba de memoria mostró que en las tres variables analizadas, tiempo de llegada a la plataforma de escape ($t_{14} = -0.155$, $p = 0.88$) (Figura 15, PM), número de cruzamiento al cuadrante objetivo ($t_{15} = 0.306$, $p = 0.7636$) (Figura 16) y tiempo de permanencia en la zona de la plataforma ($t_{15} = -0.869$, $p = 0.3986$) (Figura 17) no hubo diferencias estadísticas entre los individuos de la zona testigo y los de la zona minera.

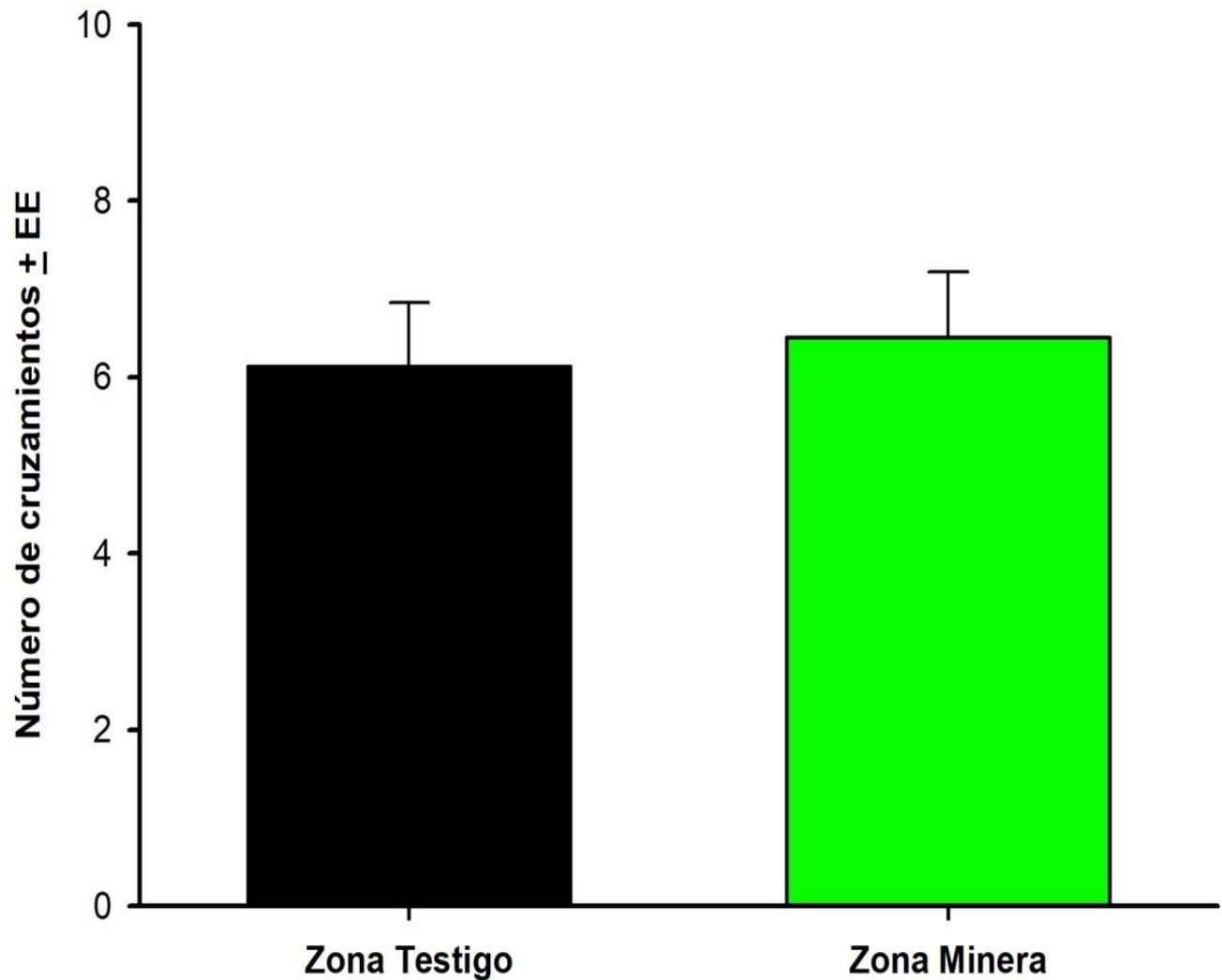


Figura 16. Número de cruzamientos en el cuadrante donde estaba la plataforma durante la prueba de memoria (PM) en el laberinto acuático de Morris en el roedor *Peromyscus melanophrys* que habita una zona testigo y una zona minera. Se muestra promedio \pm EE. Mediana de la Zona Testigo: 6.1, Mediana de la Zona Minera: 6.4. Zona Testigo n= 8, Zona Minera n= 7 (U= 20.500, p= 0.3854).

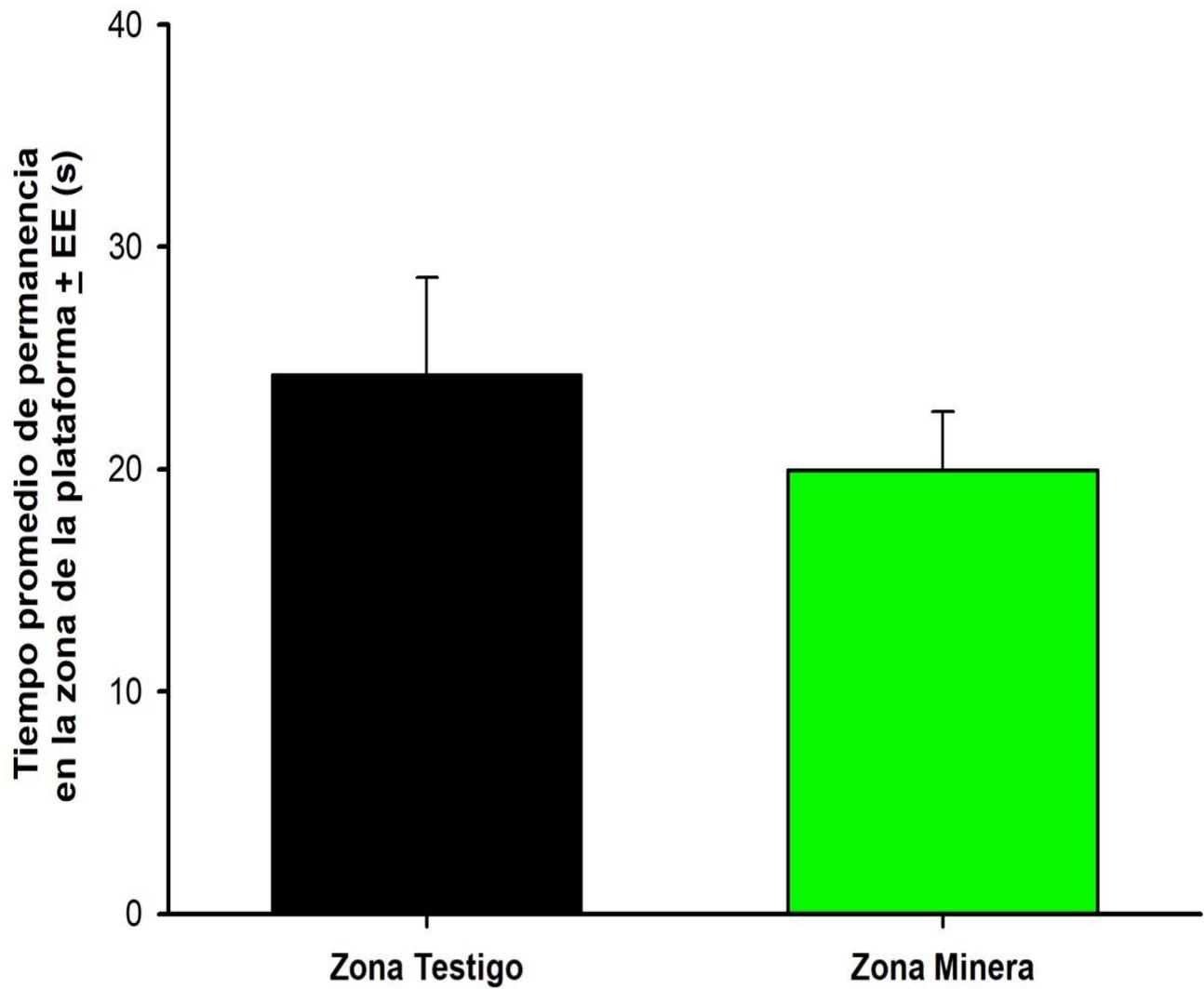


Figura 17. Tiempo promedio de permanencia en la zona de la plataforma durante la prueba de memoria (PM) en el laberinto acuático de Morris en el roedor *Peromyscus melanophrys* que habita una zona testigo y una zona minera. Se muestra promedio \pm EE. Zona Testigo n= 8, Zona Minera n= 7 (U= 22.000, p= 0.4875).

9.3 Evaluación del número de células positivas a la enzima tirosina hidroxilasa

El número de células positivas a TH fue significativamente menor únicamente en las áreas cerebrales SNpr (9 ± 1 ; $U= 1$; $p= 0.0065$) y PN (43 ± 7 ; $U= 6$; $p= 0.0404$) de los individuos de la zona minera de Huautla, Morelos en comparación a los individuos de la zona testigo (19 ± 2 y 67 ± 8 , respectivamente) (Tabla 8).

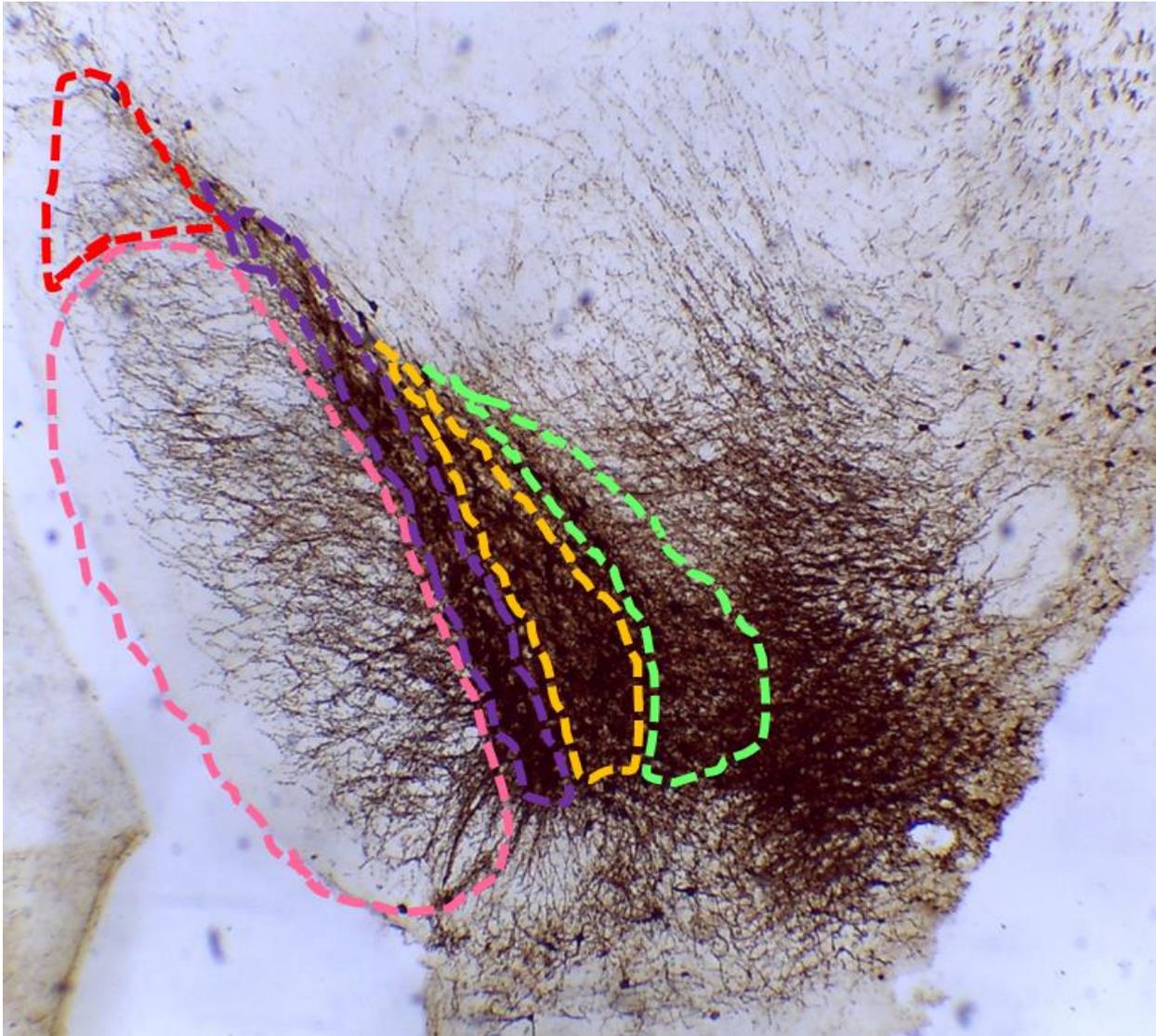


Figura 18. Señalamiento en líneas punteadas de las áreas dopaminérgicas cuantificadas en un corte cerebral coronal del roedor *Peromyscus melanophrys*. En color rojo: *Substancia nigra pars lateralis* (SNpl). En rosa: *Substancia nigra pars reticular* (SNpc). En morado: *Substancia nigra pars compacta* (SNpc). En amarillo: Área tegmental ventral (AVT). En verde: Núcleo parabraquial pigmentoso (PBP).

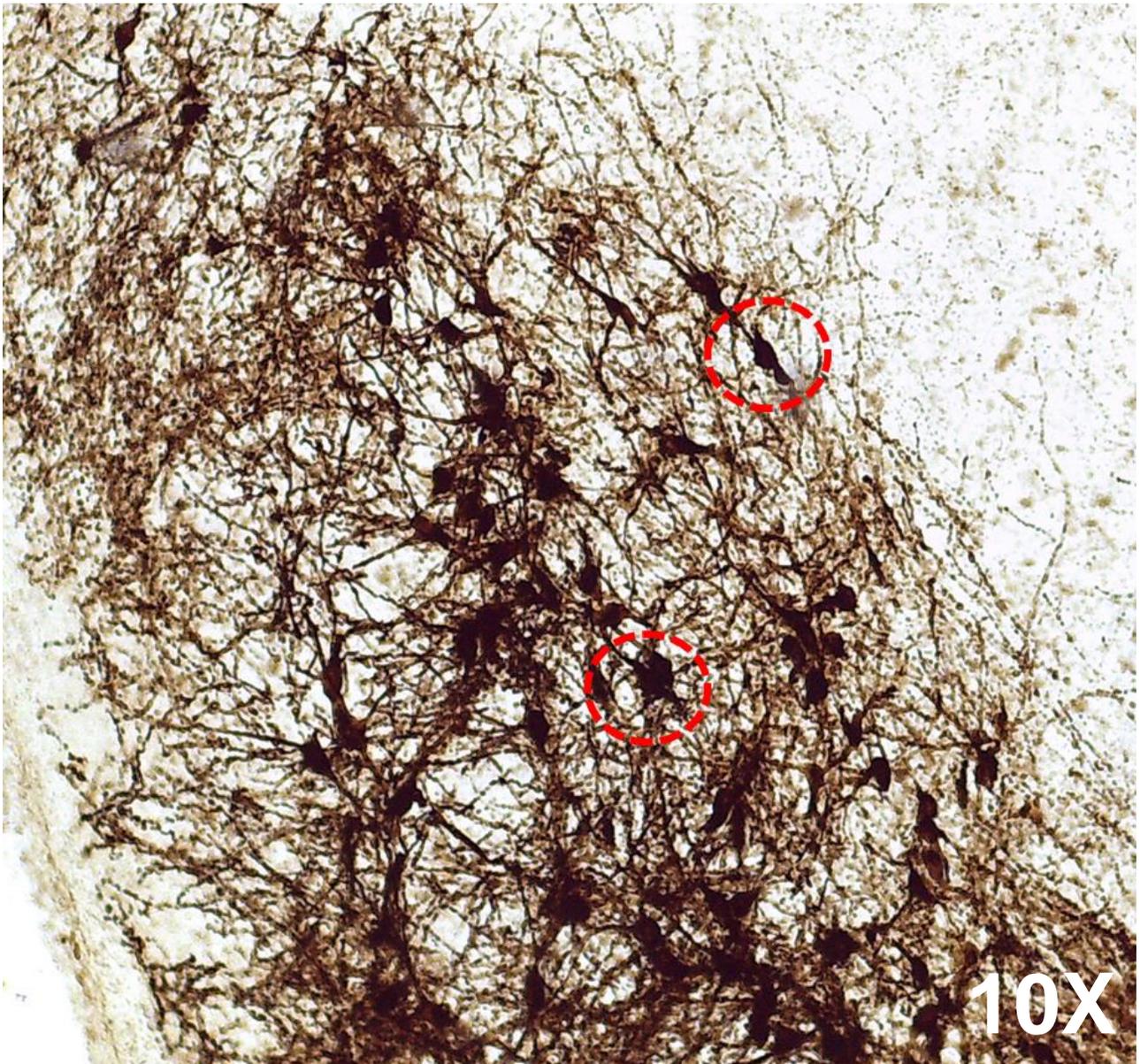


Figura 19. Celúlas positivas a la enzima tirosina hidroxilasa en un corte cerebral coronal del roedor *Peromyscus melanophrys*. En líneas punteadas rojas se indican los somas neuronales (Observado en el microscopio a través del objetivo 10x).

Tabla 8. Número de células positivas a la enzima tirosina hidroxilasa en el mesencéfalo del roedor *Peromyscus melanophrys* que habita una zona testigo y una zona minera.

Área cerebral	Zona testigo n= 6-8	Zona minera n= 5-6
<i>Substancia nigra pars reticular</i> (SNpr)	19 ± 2	9 ± 1*
<i>Substancia nigra pars compacta</i> (SNpc)	81 ± 11	83 ± 10
<i>Substancia nigra pars lateralis</i> (SNpl)	13 ± 2	13 ± 2
Área tegmental ventral (AVT)	29 ± 4	36 ± 6
Núcleo parabraquial pigmentoso (PBP)	122 ± 18	112 ± 7
Núcleo paranigral (PN)	67 ± 8	43 ± 3*
ATV + PBP	84 ± 17	100 ± 18
ATV + PBP + PN	166 ± 23	146 ± 7

* $p < 0.05$, en color rojo se representan las diferencias estadísticas.

10. DISCUSIÓN

a) Control motor y actividad exploratoria

En el presente proyecto se evaluó el control motor y la actividad exploratoria a través del paradigma campo abierto en el roedor silvestre *P. melanophrys*. En esta prueba se utilizó el número de cuadros visitados para inferir sobre el control motor. Mientras que para evaluar la actividad exploratoria se utilizó el número de incorporaciones, el número de visitas y el tiempo que permanecieron en el cuadro del centro. En el presente trabajo encontramos que el control motor y la actividad exploratoria fueron modificados en los individuos que habitan la zona minera de Huautla, Morelos (Figura 11 y 12). Particularmente, los individuos de la zona minera muestran características de hiperactividad y ansiedad, ya que su actividad no disminuyó a lo largo de los 10 minutos de registro. De acuerdo a la literatura el patrón general de conducta de los animales es disminuir su actividad conforme transcurre el tiempo en el sitio novedoso (Misslin y Cigrang, 1986; Prut y Belzung, 2003). En nuestro caso, en el segundo periodo de registro (5 a 10 min) los animales de la zona minera mostraron mayor número de incorporaciones y mayor número de cuadros visitados que los animales testigo.

Estudios en animales de laboratorio también han encontrado hiperactividad por exposición a MP como el Pb y/o Mn (Ma *et al.*, 1999; Sauerhoff y Michaelson, 1973; Virgolini *et al.*, 2004; Betharia y Maher, 2012). De acuerdo a estudios en roedores de laboratorio se sugiere que la hiperactividad se asocia a la exposición crónica y subaguda de Pb (Rodríguez *et al.*, 1996). *P. melanophrys* al habitar en una zona con residuos mineros ha estado expuesto crónicamente a metales pesados. Si bien es cierto que hasta el momento se desconoce la bioacumulación de metales en cerebro, es

probable que *P. melanophrys* este bioacumulando Pb en dicho órgano, ya que *L. irroratus* que habita la misma zona, bioacumula Pb en hígado y en áreas cerebrales como estriado, núcleo accumbens, hipocampo y mesencéfalo (Hernández Plata *et al.*, 2020). Cabe mencionar que estas áreas cerebrales dopaminérgicas están involucradas en el control motor. *P. melanophrys* bioacumula altas concentraciones de Zn, Ni, Fe, Mn Al, Pb, Cu, As y Cd en hueso, hígado y/o riñón en comparación con los animales del sitio testigo (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012; Mussali-Galante *et al.*, 2013). Por lo que es posible que los cambios conductuales encontrados en *P. melanophrys* se deban a la exposición de metales presentes en la zona. Recientemente, se ha mostrado que el roedor silvestre *L. irrotatus* que habita la misma zona que *P. melanophrys*, bioacumula de Pb en cerebro y su actividad exploratoria es menor que los animales testigo (Hernández Plata *et al.*, 2020). Varios estudios en animales de laboratorio han analizado los efectos de la exposición a metales en el control motor y actividad exploratoria (Tabla 2; Trombini *et al.*, 2001; Betharia y Maher, 2012; Saritha *et al.*, 2018). Sin embargo, existen escasos estudios que analicen los efectos conductuales de los MP en mamíferos silvestres. Hasta el momento solamente Burton *et al.* (1977) a analizado la acumulación de Mercurio y sus efectos conductuales en el roedor silvestre *Peromyscus maniculatus* en la costa del great salt lake, Utah, EUA. En dicho estudio fueron cuantificados los niveles de mercurio en el pelo dorsal de los individuos y el control motor a través de pruebas de nado y campo abierto. Se encontró que los individuos de la población con los mayores niveles de bioacumulación de Hg en el pelo mostraron menor desempeño en las pruebas de nado y actividad ambulatoria.

El presente estudio es uno de los primeros en mostrar que habitar una zona minera con presencia de metales pesados (Zn, Ni, Fe, Mn Al, Pb, Cu, As y Cd) causa

hiperactividad y cambios neuroquímicos en algunas regiones cerebrales en el roedor silvestre *P. melanophrys*. Asimismo, también apoya los resultados encontrados en otro roedor que habita la misma zona, *L. irroratus* (Hernández-Plata *et al.*, 2020). Ambos estudios sugieren que los residuos mineros de la zona minera de Huautla, Morelos tienen efectos neurotóxicos sobre los animales, principalmente en el grupo de roedores. Dado que el control motor y la actividad exploratoria fueron alteradas en los animales de *P. melanophrys* de la zona minera, nuestros resultados sugieren que las áreas cerebrales que participan en dichos procesos podrían estar siendo afectadas por los metales pesados. Estudios adicionales en las áreas cerebrales involucradas en el control motor y actividad exploratoria, tales como núcleo accumbens, estriado, globo pálido, corteza motora, entre otras son necesarios para conocer los mecanismos fisiológicos involucrados ante exposiciones crónicas a metales pesados en animales silvestres (Kandel *et al.*, 2001).

Por otra parte, si bien es cierto que los resultados en *P. melanophrys* son similares a lo encontrado en el roedor *L. irroratus* que habitan la misma zona minera de Huautla, Morelos, existen diferencias en las variables afectadas. Mientras que en los individuos *P. melanophrys* que habitan la zona minera se encontró hiperactividad, en *L. irroratus* de la zona minera disminuye la actividad exploratoria en comparación a los animales de la zona testigo. Dichas diferencias entre especies pueden deberse a las distintas fuentes de exposición a las que están en contacto cada roedor, cabe recordar que tienen hábitos distintos, siendo *P. melanophrys* de vida semi arborícola y alimentándose principalmente de granos y semillas. Mientras que *L. irroratus* es totalmente terrestre y se alimenta de semillas y ocasionalmente de plantas e invertebrados. Lo cual podría influir sobre la bioacumulación de MP en los tejidos de los organismos, incluyendo el cerebro.

Asimismo, ambas especies difieren en peso y talla. Por ejemplo, *P. melanophrys* mide en promedio 104 a 120 mm en hembras; 105 a 120 mm en machos y pesa de 8 a 13 g hembras; 8 a 10 g en machos. Mientras que *L. irroratus* mide 180 a 300 mm y pesa entre 34-50 g. Lo que podría inferir diferencias metabólicas y de biotransformación de los metales pesados entre especies (Oehme, 1972; Vahter y Norin, 1980; Bahena *et al.*, 2001; Naquenkar y Ramaiah, 2010). Por ello, es importante realizar estudios ecotoxicológicos en varias especies de la zona contaminada, puesto que éstas pueden mostrar diferente vulnerabilidad entre sí, como lo encontramos entre *P. melanophrys* y *L. irroratus*. A este respecto *P. melanophrys* es una especie que ha sido utilizada en estudios de contaminación ambiental para análisis de genotoxicidad y genética de poblaciones, donde se requiere toma de muestras sanguíneas o el sacrificio de individuos (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012; Mussali-Galante *et al.*, 2013). Ahora con nuestro estudio podemos proponer incluir los marcadores conductuales que son no invasivos en *P. melanophrys* para el biomonitoreo de zonas contaminadas por metales pesados.

Las implicaciones ecológicas de nuestros hallazgos en el roedor *P. melanophrys* al presentar características de hiperactividad y ansiedad, podrían verse reflejadas en primera instancia sobre la sobrevivencia del individuo y tener un impacto en la población. Al mostrar estos patrones conductuales y recordando que este roedor es silvestre, podría verse afectada al ser blanco de depredadores y tomar decisiones precipitadas para la elección de sitios o rutas de escape, aumentando la tasa de mortalidad. Los individuos de *P. melanophrys* al ser blanco fácil de depredadores tanto terrestres como aéreos, podría disminuir el tamaño de la población y a su vez la densidad de la misma, impactando indirectamente sobre la reproducción de los individuos, disminuyendo la tasa de natalidad de esta especie. Estos impactos

poblacionales en *P. melanophrys*, también han sido sugeridos en *L. irroratus* (Hernández-Plata *et al.*, 2020). Es importante recordar que dado que los metales pesados se biomagnifican, es posible que otros niveles de la cadena trófica también estén siendo afectados.

Por otra parte, a diferencia de los cambios encontrados en la actividad locomotora y exploratoria, los roedores de *P. melanophrys* que habitan la zona minera no presentaron modificaciones en los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria.

b) Aprendizaje y memoria

En el presente estudio se encontró que los roedores de la especie *P. melanophrys* tanto en la zona minera como en la zona testigo no mostraron cambios en el aprendizaje (Figura 15). Esto fue observado a través del laberinto acuático de Morris (LAM), utilizando el tiempo de llegada a la plataforma como variable para medir la fase de aprendizaje. Es importante resaltar que a pesar de que los individuos de la zona minera están en contacto directo con los residuos que contienen metales pesados biodisponibles desde su gestación, lactancia, desarrollo e incluso por generaciones, el aprendizaje de los individuos de la zona minera fue estadísticamente igual al de los animales de la zona testigo a través de los 6 días de entrenamiento. Estos resultados contrastan con la hipótesis donde se esperaba que el aprendizaje disminuyera en individuos de la zona expuesta a residuos mineros en comparación a individuos de la zona testigo. Si bien es cierto que en animales de laboratorio se ha encontrado que el aprendizaje se modifica por exposición a Pb y /o Mn (Cory-Slechta, 1995; Sadeeq *et al.*, 2013; García-Arenas *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2019; Betharia y Maher, 2012). También existen estudios que coinciden con nuestros resultados de que la exposición a metales

no modifica el aprendizaje (Ma *et al.*, 1999; Schneider, 2001; Cao *et al.*, 2008; Nava-Ruiz *et al.*, 2012; Von Stackelberg *et al.*, 2015).

La discrepancia entre los estudios en animales de laboratorio en cuanto al efecto de los metales pesados sobre el aprendizaje pueden deberse a diversas variables que pueden afectar los resultados tales como, tipo de cepa de roedor, sexo, edad, tiempo de exposición, periodo de vida de exposición (gestación, lactancia y/o adultez), dosis administrada, vía de administración y mezcla de metales. A pesar de ello, se ha propuesto que el aprendizaje al depender, al menos en parte, de una región anatómica con mecanismos de plasticidad como lo es el hipocampo podría no verse afectada por la exposición a metales pesados. Lo que podría explicar nuestros hallazgos en *P. melanophrys*.

Los mecanismos de plasticidad, tales como la neurogénesis, se refiere a la generación de nuevas neuronas a partir de células progenitoras que ocurren durante la edad adulta a niveles variables en todos los taxones de vertebrados, incluidos los mamíferos (Baker *et al.*, 2011). Una de las características de la neurogénesis adulta en mamíferos es que se limita a dos regiones del cerebro: 1) la zona subventricular, donde se encuentran las nuevas interneuronas que nacen y se proyectan hacia la corriente migratoria rostral hasta el bulbo olfatorio y 2) en el hipocampo, en la zona subgranular, esta distribución se ha visto en marsupiales (Harman *et al.*, 2012; Lledo *et al.*, 2006). El hipocampo es una estructura que participa en el aprendizaje y sus procesos de plasticidad neuronal pueden ser favorecidos por el entorno en donde se desarrollan los individuos. Por ejemplo, Guilarte *et al.* (2002), expuso ratas a 1500 ppm de acetato de Pb en el agua de bebida (desde 10 días antes de nacidas, durante la gestación, lactancia y hasta el destete) y formó tres grupos: control, expuestas a Pb y expuestas a

Pb con un medio enriquecido (un entorno con túneles, columpios, rampas y juguetes). Ellos encontraron que los individuos expuestos a Pb en un medio enriquecido tienen un mejor desempeño para encontrar la plataforma oculta en el laberinto acuático de Morris en comparación a los individuos expuestos a Pb sin medio enriquecido e incluso al grupo control. Asimismo, Cao *et al.*, (2008) en ratas macho expuestas a 1500 ppm de acetato de Pb en agua de bebida durante la gestación y 21 días de lactancia, el aprendizaje fue similar entre el grupo control y el grupo expuesto a Pb que habitaba un medio enriquecido. Si se compara el medio enriquecido proporcionado a los animales de laboratorio con el medio en donde se desarrolla *P. melanohrys* que es silvestre y hábitos semi-arborícolas (*P. melanohrys* escala en busca de alimento o refugio, brinca ante ataques de depredadores, se desplaza en busca de pareja o sitios de anidación, etc.), se puede inferir que cuenta con un medio enriquecido que posiblemente le ha ayudado a mejorar sus mecanismos neuronales para contrarrestar los efectos negativos de la exposición a metales pesados sobre funciones cognitivas como el aprendizaje y memoria importantes para su sobrevivencia.

Además de los mecanismos neuronales de plasticidad, las interacciones químicas que ocurren en el interior de los organismos entre los diferentes metales podrán dar resultados de sinergismo o antagonismo, es decir en una mezcla de metales sus efectos aumentan o se contrarrestan entre sí (Andrade *et al.*, 2017; Goyer y Clarkson, 2006). Un ejemplo de ello es el trabajo de Rai *et al.* (2010) en donde ratas expuestas intragastricamente a As, Cd y Pb (individual y en mezcla) desde la gestación hasta el desarrollo y post-destete hasta los 2 meses, sólo mostraron déficit en la memoria en presencia de la mezcla de metales, lo que demuestra que la combinación de estos metales tienen la capacidad de inducir toxicidad sinérgica. En cambio, ratas expuestas

a Pb (500 ppm) y/o Cd (100 ppm) mostraron ante la exposición de Pb mayor actividad vertical. Mientras que la exposición a Cd disminuye el movimiento y aumenta el tiempo de descanso. Pero la coadministración de Pb y Cd no modifica los patrones conductuales (Nation *et al.*, 1989; Nation *et al.*, 1990), mostrando un efecto antagónico entre los dos metales.

Con respecto a la memoria, ésta se conforma de 2 fases o características: el almacén de información y la evocación de información (Kandel *et al.*, 2001). Estas 2 características no mostraron cambios en los individuos de *P. melanophrys*, ya que el tiempo de llegada a la plataforma, número de cruzamientos y tiempo que invirtieron en el cuadrante donde se encontraba la plataforma fue similar entre los animales de ambas zonas (Figura 16 y 17). Nuestros resultados contrastan con la hipótesis planteada, puesto que esperábamos que el proceso de memoria disminuiría en individuos de la zona minera en comparación a los individuos de la zona testigo. Existen trabajos donde el proceso de memoria ha mostrado cambios (Jett *et al.*, 1997; Kuhlman *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 2015; Von Stackelber *et al.*, 2015; García-Arenas *et al.*, 2004; Nava-Ruiz *et al.*, 2012). Por ejemplo, Schneider (2001) trataron ratas hembras y machos a 150, 375 y 750 ppm de acetato de Pb en agua de bebida durante la lactancia hasta 55 días PND. Ellos encontraron deterioro en la memoria a partir de los 21 días de exposición, donde al evaluar el tiempo de llegada a la plataforma de escape, los animales requirieron un mayor tiempo en comparación al grupo control. Sin embargo, nuestros resultados son similares a lo encontrado en otros trabajos tales como Ma *et al.*, (1999).

Dado que el aprendizaje y memoria fue similar entre los animales testigos y de la zona minera, nuestros resultados sugieren que a pesar de que *P. melanophrys* está expuesto sistémicamente a metales pesados, las áreas cerebrales que participan en el

aprendizaje y memoria podrían no estar afectadas por los metales pesados o podrían estar diferencialmente afectadas pero que en su conjunto son capaces de mantener dichos procesos cognitivos intactos. Estudios adicionales en las áreas cerebrales involucradas en el aprendizaje y memoria, tales como corteza perirrinal, corteza parahipocámpica, corteza entorrinal, circunvolución dentada, subículo y áreas hipocampales CA3 y CA1 son necesarios para conocer los mecanismos fisiológicos involucrados ante exposiciones crónicas a metales pesados en animales silvestres (Kandel *et al.*, 2001).

c) Número de células positivas a TH

Los cambios conductuales por la exposición individual o a mezclas de MP en roedores de laboratorio han estado relacionados con cambios neuroquímicos inducidos por MP. Mallo *et al.*, (2006) ante dosis de 0.5 mg de Pb granulado en dieta durante 30 días postnatal encontraron aumento en los niveles de dopamina y en la actividad exploratoria en los individuos expuestos al recorrer un mayor número de cuadros que los animales del grupo control. En nuestro caso el marcador neuroquímico utilizado fue el número de células positivas a la enzima tirosina hidroxilasa en el roedor silvestre *P. melanophrys*.

Cabe recordar que dicha enzima es importante ya que es la limitante para la síntesis del neurotransmisor dopamina. Brevemente, de acuerdo a nuestra hipótesis, en el presente estudio, el número de células positivas a TH en los individuos de la zona minera disminuyó solo en 2 de las 6 regiones dopaminérgicas analizadas: Sustancia nigra pars reticular (SNpr) y núcleo paranigral (PN). Estos hallazgos sugieren que a pesar de que los individuos de la zona minera están expuestos a MP de forma sistémica, las diversas áreas cerebrales muestran vulnerabilidad diferencial entre ellas, siendo SNpr y PN las áreas más sensibles en *P. melanophrys*. Esto podría explicar, al menos en parte los

resultados de hiperactividad en los animales. Las áreas cerebrales SNpr y PN envían proyecciones hacia el estriado y el hipocampo, respectivamente (DeFrance *et al.*, 1985; An *et al.*, 2014). El estriado es una estructura relacionada con el control motor. Nuestros resultados sugieren que estas vías y áreas cerebrales podrían estar siendo alteradas en algún punto de la neurotransmisión en los individuos de la zona minera.

Por otra parte, los resultados en *P. melanophrys* son semejantes a los encontrados en *L. irroratus*, que habita la misma zona minera que nuestro modelo. Ambos roedores mostraron cambios el número de células positivas a TH. En *L. irroratus* el número de células positivas a TH fue mayor en el área AVT de los animales expuestos a MP (Hernández-Plata *et al.*, 2020). Mientras que nuestro modelo de estudio mostró disminución en las áreas SNpr y PN, regiones anatómicamente cercanas a AVT (Figura 11). En *L. irroratus* estos cambios en el número de neuronas en el mesencéfalo se relacionó con cambios en la síntesis y degradación de dopamina en el estriado. Por lo que es importante realizar estudios en *P. melanophrys* para analizar otras áreas cerebrales u otros marcadores neuroquímicos, tales como niveles de dopamina y sus metabolitos. En animales de laboratorio ya sea han descrito modificaciones en la neurotransmisión dopaminérgica y otros neurotransmisores por exposición a metales en diversas áreas cerebrales (Mejia *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1999; Antonio *et al.*, 2002; Basha *et al.*, 2013; Saritha *et al.*, 2018).

d) Consideraciones finales

Nuestro modelo de estudio *P. melanophrys* es un roedor silvestre expuesto a dosis y tiempos de exposición reales a mezclas de MP y considerada una especie centinela (Tovar-Sánchez *et al.*, 2012). El presente estudio neurotoxicológico en dicha especie puede complementar su perfil como especie centinela y proporcionar información sobre los efectos y mecanismos a largo plazo tras su exposición crónica a residuos mineros.

Por otra parte, dado que en modelos de laboratorio se ha estudiado ampliamente el efecto de los metales pesados sobre el sistema nervioso, en el presente estudio utilizamos dicha información para establecer nuestras hipótesis y comparar nuestros resultados. Sin embargo, es importante realizar estudios en animales silvestres para evaluar los efectos de los metales pesados a dosis relevantes y tiempos de exposición crónicos, ya que los estudios neurotoxicológicos en animales silvestres son escasos. Los estudios neurotoxicológicos son relevantes porque permiten hacer inferencias a nivel individual y a nivel de población. Además de que la conducta es un marcador que para su evaluación no se emplean métodos invasivos, lo que permite la sobrevivencia del individuo y obtener información sobre el impacto de los contaminantes ambientales sobre los ecosistemas.

11. CONCLUSIONES

- Los individuos de la especie *P. melanophrys* que habitan la zona minera de Huautla, Morelos mostraron cambios conductuales en control motor y actividad exploratoria. Específicamente, los individuos que habitan la zona minera son hiperactivos y ansiosos en comparación con los individuos testigos.
- A pesar de que los individuos de la zona minera están expuestos crónicamente a metales pesados no mostraron cambios en funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria. Es decir, los individuos de la zona minera son capaces de adquirir, almacenar y evocar información del entorno de igual forma que los animales testigo.
- A pesar de que los individuos de la zona minera están expuestos a metales pesados de forma sistémica, las diversas áreas cerebrales del mesencéfalo muestran vulnerabilidad diferencial entre ellas a los metales pesados, siendo SNpr y PN las áreas más sensibles en *P. melanophrys*, ya que solo ellas mostraron disminución del número de células positivas a la enzima tirosina-hidroxilasa. Lo que podría explicar, al menos en parte, los cambios encontrados en el control motor y la actividad exploratoria de los individuos que habitan la zona minera.
- El roedor silvestre *P. melanophrys* considerado especie centinela fue sensible a los metales pesados al mostrar cambios conductuales y neuroquímicos, por lo que estos marcadores podrían incluirse en estudios de biomonitoreo de sitios contaminados por metales pesados donde este presente dicha especie de roedor.

12. PERSPECTIVAS

- Al ser *P. melanophrys* un eslabon intermedio en las cadenas tróficas, se sugiere realizar estudios conductuales en especies de los siguientes niveles de las cadenas tróficas.
- Utilizar la conducta como biomarcador de efecto menos invasivo para otras especies de roedores que habitan la misma zona minera que *L. irroratus* y *P. melanophrys*.
- Evaluar en los roedores de la zona minera algunos marcadores en la neurotransmisión sináptica nigroestriatal o mesocorticolímbica, tales como concentración de dopamina y sus metabolitos y niveles de receptores dopaminérgicos.
- Explorar los efectos de la exposición a metales en otras conductas y sistemas de neurotransmisión de los roedores que habitan la zona minera.

13. REFERENCIAS

- Aguado Aguilar L. (2001). Aprendizaje y memoria. *Revista Neurológica* 32(4): 373-381.
- Alarcón Corredor OM. (2009). Los elementos traza. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa ULA* 4(3): 107-124.
- Albaine Pons JR. (1987). Efectos de hacinamiento sobre las conductas de campo abierto y aprendizaje de evitación en ratas (*Rattus norvegicus*). *Ciencia y Sociedad* 12(4): 602-614
- An J., Cai T., Che H., Yu T., Cao Z., Liu X. y Luo W. (2014). The changes of mi RNA expression in rat hippocampus following chronic lead exposure. *Toxicology Letters* 229(1): 158-166.
- Andén NE., Dahlström A., Fuxe K., Larsson K., Olson L. y Ungerstedt U. (1966b). Neuronas monoaminas ascendentes al telencéfalo y diencefalo. *Acta Physiologica Scandinavica* 67(3-4): 313-326.
- Andén NE., Fuxe K., Hamberger B. y Hökfelt T. (1966). Un estudio cuantitativo sobre el sistema de neuronas de dopamina nigro-neostriatal en la rata. *Acta Physiologica Scandinavica* 67(3-4): 306-312.
- Andrade VM., Aschner M. y Marreilha Dos Santos AP. (2017). Neurotoxicity of metal mixture. *Neurotoxicity of Metals Mixture* 18: 227-265.
- Antonio MT., López N. y Leret ML. (2002). Pb ND Cd poisoning during developmental alters cerebellar and striatal function in rats. *Toxicology* 176: 59-66.
- Artigas PJ. (2004). Nuevas opciones terapéuticas en el tratamiento del trastorno por déficit de atención/hiperactividad. *Revista de Neurología* 38: 117-123.
- Ayano G. (2016). Dopamine: receptors, functions, synthesis, pathways, locations and mental disorders: review of literatures. *Journal of Mental Disorders and Treatment* 2(2): 1-4.
- Bahena RT., Flores G. y Arias JAM. (2001). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Revista Biomedica* 11: 39-60.
- Baker JD., Wijshake T., Tchkonja T., LeBrasseur KN., Childs GB., Van de Sluis B., Kirkland LJ. y Van Deursen MJ. (2011). Clearance of positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479: 232-237.
- Basha DC., Reddy SN. y Rani UM. (2013) Age related changes in aminergic system and behavior following lead exposure: protection with essential metal supplements. *Neuroscience Research* 78: 81-89.

- Bautista Cruz A. y Arnaud Viñas AR. (2006). Elementos potencialmente tóxicos en suelos agrícolas con manejo de riesgo contaminante. *Naturaleza y Desarrollo* 4(1): 36-42.
- Betharia S. y Maher TJ. (2012). Neurobehavioral effects of lead and manganese individually and in combination in developmentally exposed rats. *NeuroToxicology* 33: 1117-1127.
- Burton VG., Alley JR., Rasmussen L., Orton P., Cox V., Jones P. y Graff D. (1997). Mercury and behavior in wild mouse populations. *Environmental Research* 14: 30-34.
- Cao X., Huang S. y Ruan D. (2008). Enriched environment restores impaired hippocampal long-term potentiation and water maze performance induced by developmental lead exposure in rats. *Developmental Psychobiology* 50: 307-313.
- Cao Y., Wang D., Li Q., Liu H., Jin C., Yang J., Wu S., Lu X. y Cai Y. (2019). Activación de Nrf2 by lead sulfide nanoparticles induces impairment of learning and memory. *Royal Society of Chemistry* 12: 34-41.
- Carrillo Mora P., Méndez Cuesta LA., Pérez de la Cruz V., Fortoul Van Der Goes TI. y Santamaría A. (2010). Efecto protector de la administración sistémica de l-kinurenina y probenecid sobre las alteraciones conductuales y morfológicas inducidas por beta amiloide soluble tóxico (25-35) en el hipocampo de rata. *Behavioral Brain Research* 210(2): 240-250.
- Cascante Burgos V. (1999). El receptor soluble de la transferrina: estudio clínico de un nuevo marcador del metabolismo del hierro. Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- Ceballos G. y Oliva G. (2005). Los mamíferos silvestres de México. México D.F. México: Fondo de Cultura Económica.
- Chavez C. y Espinoza L. (2005). *Baiomys musculus* (Merriam, 1892) In Ceballos G. Oliva G. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Fondo de Cultura, México, 667-668.
- Chetty CS., Reddy GR., Murthy KS., Johnson J., Saiwan K. y Desai D. (2001). Perinatal lead exposure alters the expression of neuronal nitric oxidase synthase in rat brain. *International Journal of Toxicology* 20(3): 113-120.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). (2019). Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla. Morelos, México. Gobierno de México. Disponible en: <https://simec.conanp.gob.mx/ficha.php?anp=107®=7>
- Cooper J., Bloom F. y Roth R. (2003). Biochemicals basis of neuropharmacology. (8th ed). USA, Oxford University Press.

- Cory Slechta DA. (1995). Relationships between lead induced learning impairments and changes in dopaminergic, cholinergic, and glutamatergic neurotransmitter system functions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 35: 391-415.
- Coues E. (1874). Sinopsis de los Muridae de América del Norte. *Actas de la Academia de Ciencias Naturales de Filadelfia* 173-196.
- D'Hoge R. y Deyn DP. (2001). Applications of the Morris water-maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 36: 60-90.
- Davson H. y Segal MB. (1996). Aspectos especiales de la barrera hematoencefálica. *Fisiología del LCR y Barreras Hematoencefálicas*: 303-485.
- D Hooge R. y De-Deyn P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 36: 60-90.
- Dix TA., Kuhn DM. y Benkovic SJ. (1987). Mechanism of oxygen activation by tyrosine hydroxylase. *Biochemistry* 26: 3354-3361.
- Domínguez EJ. y Ferrer J. (2017). Metales y aleaciones (Mecanizado básico). Editex.
- Dorado A., Arias DM., Alonso G. y Maldonado B. (2012). Educación ambiental para la biodiversidad en el tropic seco Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla, Morelos, México. *Tópicos de la Educación Ambiental* 41(2): 23-33.
- Dorado O., Maldonado B., Arias D., Sorani V., Ramírez R. y Leyva E. (2005). Programa de la conservación y manejo Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla. Comisión Nacional de Áreas Protegidas, México. 129-153.
- Dydak U., Jiang YM., Long LL., Zhu H., Chen J., Li WM., Edden AE., Hu S., Fu X., Long Z., Mo XA., Meier D., Harezlak J., Aschner M., Murdoch JB. y Zheng W. (2011). *In vivo* measurement of brain GABA concentrations by magnetic resonance spectroscopy in smelters occupationally exposed to manganese. *Environmental Health Perspectives* 119(2): 219-224.
- Escobar AE., Pérez BO., Rámirez VA. y Sansores RH. (2007). Efecto del daño de vías dopaminérgicas mesencefálicas en la conducta adictiva al tabaco. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas* 20(1): 56-63.
- Escobar Sánchez O. (2010). Bioacumulación y biomagnificación de mercurio y selenio en peces pelágicos mayores de la Costa Occidental de Baja California, Sur, México. Doctorado en Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, B.C.S, México.
- Esteves Aguilar J. (2018). Evaluación de daño genético y la inestabilidad en el desarrollo del cráneo en la especie centinela *Peromyscus melanophrys* que habita en zonas mineras. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

- Flora G., Gupta D. y Tiwari A. (2012). Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology* 5(2): 47-58.
- Galiñanes G. (2010). Desarrollo funcional del sistema córticoestriatal: rol de las vías dopaminérgicas. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- García-Arenas G., Ramirez AV., y Balderas I. (2004). Cognitive deficits in adult rats by lead intoxication are related with regional specific inhibition of cNOS. *Behavioural Brain Research* 149: 49-59.
- Gongora PJ. (2013). Evolución reciente de la minería en México. *Comercio Exterior* 63: 2-6.
- Gonzales Brito WA. (2015). Efecto de un gradiente de contaminación por jales mineros sobre las comunidades de artrópodos asociados a la vegetación y con énfasis en el orden Araneae en Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Goyer AR. y Clarkson WT. Cassarett and Doull's Toxicity: The basic science of poison. *Effects of heavy metals*. Pág. 354.
- Guilarte RT., Toscano DC., McGlothlan LJ. y Weaver A. (2002). Environmental enrichment reverses cognitive and molecular deficits induced by developmental lead exposure. *Annals of Neurology* 5: 50-56.
- Hall CS. (1934). Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology* 18: 385-403.
- Hernández GM. (2015). Estructura de la comunidad de microartrópodos a través de un gradiente de contaminación por metales pesados en Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Hernández LB. (2015). Análisis de la anatomía y morfología de *Prosopis leavifata*, por acumulación de metales pesados en la Sierra de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Hernández Plata I., Rodríguez VM., Tovar-Sánchez E., Carrizales L., Villalobos P., Mendoza-Trejo MS. y Mussali-Galante P. (2020). Metal brain bioaccumulation and neurobehavioral effects on the wild rodent *Liomys irroratus* inhabiting mine tailing areas. *Environment Science and Pollution Research*. 27(29), 36330-36349.
- Hoffman GE., Le WW. y Sita LV. (2008). The importance of titrating antibodies. *Current Protocols in Neuroscience* 2: 2-12.

- Instituto de Neurociencias del Principado de Asturias. (2018). Aparatos de evaluación en roedores. Disponible en: ineuropa.uniovi.es/servicios/roedores
- Jaishankar MT., Tseten N., Anbalagan BM. y Beeregowda. (2014). Toxicity mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology* 7: 20-60.
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1), 167–182.
- Jett AD., Kuhlmann CA., Famer JS. y Guilarte RT. (1997). Age-dependent effect of developmental lead exposure on performance in the Morris wáter maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 57: 271-279.
- Kaakola S., Männistö PT. y Nissinen E. (1987). Striatal membrane-bound and soluble catechol-O-methyl-transferase after selective neuronal lesions in the rat. *Journal Neural Trans* 69: 221-228.
- Kandel ER., Schwartz JH., Jessell TM. y Agud AJ. (2001). Principios de la neurociencia (4ª ed) Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España. 274-290.
- Kuhlmann CA., McGlothan LJ. y Guilarte RT. (1997). Developmental lead exposure causes spatial learning déficits in adult rats. *Neuroscience Letters* 223: 101-104.
- Liang G., Qin H., Zhang Le., Ma S., Huang X., Lv Y., Qing L. y Xiong Q. (2015). Effects of chronic manganese exposure on the learning and memory of rats by observing the changes in the hippocampal cAMP signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology* 83: 261-267.
- Lisvishts BG., Kraposhin VS. y Linetski YL. (1982). Propiedades físicas de metales y aleaciones, Mir.
- Lledo PM., Alonso M. y Grubb MS. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 179-193.
- Londoño-Franco L., Londoño-Muñoz P. y Muñoz-García F. (2016). Riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 14(2): 145-153.
- López-Vera C. (2006). Biomagnificación y bioacumulación de mercurio en cuatro especies de tiburón de la península de Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología Marina Toxicología. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá.
- Luthman J., Oskarsson A., Olson L. y Hoffer B. (1992). Postnatal lead exposure affects motor skills and exploratory behavior in rats. *Environmental Research* 58: 236-252.

- Ma T., Chen HH. y Ho IK. (1999). Effects of chronic lead (Pb) exposure on neurobehavioral function and dopaminergic neurotransmitter receptors in rats. *Toxicology Letters* 105: 111-121.
- Mällo T., Alftoa A., Koiv K., Tonissaar M., Eller M. y Harro J. (2007). Rats with persistently low or high exploratory activity: behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. *Behavioral Brain Research* 177: 269-281.
- Martínez-Riera N., Gandur MJ., Soria, N. y Riera-De Matínez, VN. (2001). Evaluación de las alteraciones conductuales y dopaminérgicas en ratones con bajas concentraciones de plomo. *Revista de Toxicología* 18(2): 87-91.
- McDermott CM., Abrahams TP., Partosoedarso E., Hyland N., Ekstrand J., Monroe M. y Hornby, PJ. (2001). Site of action of GABA_B receptor for vagal motor control of the lower esophageal sphincter in ferrets and rats. *Gastroenterology* 120: 1749-1762.
- Medel-Reyes A., Ramos-Gómez S., Avelar GF., Mora TL. y Rodríguez VF. (2008). Caracterización de jales mineros y evaluación de su peligrosidad con base en su potencial de lixiviación. *Conciencia Tecnología* 35: 32-35.
- Mejía JJ., Díaz-Barriga F., Calderón J., Ríos C. y Jimenez-Capdeville ME. (1997). Effects of lead-arsenic combined exposure on central monoaminergic systems. *Neurotoxicology and Teratology* 19: 489-497.
- Méndez-López M., Arias J., Bontempi B. y Wolff M. (2013). Reduced cytochrome oxidase activity in the retrosplenial cortex after lesions to the anterior thalamic nuclei. *Behavioural Brain Research* 250: 264-273.
- Mendoza-Amezquita E., Amienta-Hernández MA., Ayora C., Soler, A. y Ramos-Ramirez E. (2006). Potential lixiviation of trace elements in tailings from the mines La Asunción and Las Torres in the Guanajuato mining district, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 23(1): 75-83.
- Meredith PA., McIntosh MJ., Petty MA. y Reid JL. (1988). Effects of lead exposure on rat brain catecholaminergic neurochemistry. *Comparative Biochemistry and Physiology* 89: 215-219.
- Merriam C. (1982). Description of nine new mammals collected by E.W.Nelson in the states of Colima and Jalisco, México. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 7: 164-174.
- Misslin R. y Cigrang M. (1986). Does neophobia necessarily imply fear of anxiety. *Behavioural Processes* 12: 45-50.
- Monreal-Saavedra R. y Hernández-Rabago P. (2015). Mi México es minero, México, D.F. AIMMG, A.C.

- Moreira EG., De Magalhaes-Rosa GJ., Barros SB., Vassilieff VS. y Vassilieff I. (2001). Antioxidant defense in rat brain regions after developmental lead exposure. *Toxicology* 169(2): 145-151.
- Moreira GE. y Vassilieff SV. (2001). Developmental lead exposure: behavioural alterations in the short and long term. *Neurotoxicology and Teratology* 23: 489-495.
- Morgado Bernal I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria. *Cic: cuadernos de información* 10: 221-233.
- Morris R. (1984). Developments of a wáter-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal Neuroscience Methods* 11: 47-60.
- Murillo HA. (2015). Detección de daño genotóxico en *Prosopis leavigata* de los jales de la Sierra de Huautla, Morelos, México provocado por metales pesados. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mussali Galante P. (2008). Estudio sobre la inducción del daño al ADN en sangre periférica de individuos expuestos a metales en el agua de bebida en la población de Huautla, Morelos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
- Mussali Galante P. (2012). Comparison of two wild rodent species as sentinels of environmental contamination by mine tailings. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 1677-1688.
- Mussali-Galante P. (2013). Análisis de poblaciones de *Peromyscus* sp (RODENTIA MURIDAE) Asociadas a jales dentro de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla, Morelos, México: Un enfoque ecotoxicogenomico. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Mussali-Galante P., Tovar-Sánchez E., Valverde M. y Rojas Del Castillo E. (2013). Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29: 117-140.
- Mussali-Galante P., Tovar-Sánchez E., Valverde M., Valencia-Cuevas L. y Rojas E. (2012). Evidence of population genetic effects in *Peromyscus melanophrys* chronically exposed to mine tailings in Morelos, México. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 7666-7679.
- Musser GG. y Carleton MD. (2005). Superfamily Muroidea. In: Wilson DE, Reeder DM (eds) *Mammal species of the world a taxonomic and geographic reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore: 894–1531
- Nagvenkar GS. y Ramaia, N. (2009). Arsenite tolerance and biotransformation potential in estuarine bacteria. *Ecotoxicology* 19(4): 604-613.

- Nation JR., Frye GD., Von Stultz J. y Bratton GR. (1989). Efectos de la exposición combinada al plomo y al cadmio: cambios en la respuesta controlada de forma programada y en la dopamina, la serotonina y sus metabolitos. *Behavioural Neuroscience* 103(5): 1108-1114.
- Nation RK., Grover AC., Bratton GR. y Salinas AJ. (1990). Behavioral antagonism between lead and cadmium. *Neurotoxicology and Teratology* 12: 99-104.
- Nava-Ruíz C. y Méndez-Armenta M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Archivos de Neurociencias* 17: 89-95.
- Nava-Ruíz C., Méndez-Armenta M. y Ríos C. (2012). Lead neurotoxicity effects on brain nitric oxidase synthase. *Journal of Molecular Histology* 43(5): 553-563.
- Nava-Ruíz C., Méndez-Armenta, M. y Ríos-Castañeda, C. (2012). Efecto del plomo sobre aprendizaje y memoria de ratas adultas, en un modelo subagudo. *Archivos de Neurociencias* 17(2): 89-95
- Oehme FW. (1972). Mechanisms of heavy metals. *Clinical Toxicology* 5(2): 151-167.
- Pacheco VH., Valdivieso A., Ruza F. y Martínez MC. (1980). Nutrición parenteral en pediatría I: fisiología y técnica. *Revista Chilena de Pediatría* 51(3): 297-303.
- Padurariu M., Antioch I., Balmus I., Ciobica A., El-Iethy HS. y Kamel MM. (2017). Describing some behavioral animal models of anxiety and their mechanisms with special reference to oxidative stress and oxytocin relevance. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 5: 98-104.
- Padurariu M., Ciobica A., Hritcu L., Stoica C., Bild W. y Stefanescu C. (2010). Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 469(1): 6-10.
- Paxinos G. y Watson C. (2005). *The brain rat in stereotaxic coordinates*. (5th ed). San Diego, California, USA; Elsevier Academic Press.
- Pérez De la Cruz MC. (1995). Inactivación por la oxidación de la enzima tirosina hidroxilasa de sustancia negra de rata durante el proceso de envejecimiento: efecto protector del tratamiento con deprenilo. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.
- Pérez Millán. (2010). Estudio de la participación del receptor de dopamina D2 en la regulación de lactotropos hipofisarios y su influencia en el desarrollo de prolactinomas mediante la generación de un ratón transgénico tejido específico. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

- Polanco LA., Vargar C. y Gongora ME. (2011). Modelos animales: una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicológica* 18: 141-148.
- Prut L. y Belzung C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* 463: 3-33.
- Puga S., Sosa M., Lebgue T., Quintana C. y Campos A. (2006). Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada* (1,2): 150-155.
- Quesada Gómez JM. y Sosa-Henríquez M. (2011). Nutrición y osteoporosis, calcio y vitamina. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* 3(4): 165-182.
- Rai A., Maurya SK., Khare P., Srivastava A. y Bandyopadhyay S. (2010). Characterization of developmental neurotoxicology of As, Cd, and Pb mixture: synergistic action of metal mixture in glial and neuronal functions. *Toxicological Sciences* 118(2): 586-601.
- Ramos Gómez M., Avelar J., Medel-Reyes A., Yamamoto L., Godinez L., Ramirez M., Guerra R. y Rodríguez F. (2012). Movilidad de metales en jales procedentes del distrito minero de Guanajuato, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 28(1): 49-59.
- Rebollo Salinas DB. (2019). Biomagnificación de metales pesados en una cadena trófica en los jales de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Reiter LW., Anderson GE., Laskey JW. y Cahill. (1975). Developmental and behavioral changes in the rat during chronic exposure to lead. *Environmental Health Perspectives* 12: 119-123.
- Remon E., Bouchardon JL., Cornier C., Guy B., Leclerc JC. y Faure O. (2005). Soil characteristics, heavy metal availability and vegetation recovery at a former metallurgical landfill: implications in risk assessment and site restoration. *Environmental Pollution* 137(2): 316-323.
- Rivillas Y. (2018). Cáncer e inflamación en relación con el metabolismo del hierro. *Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud* 3: 60-63.
- Rodrigues AL., Rocha JB., Mello CF. y Souza DO. (1996). Effects of perinatal lead exposure on rat behavior in open-field and two way avoidance tasks. *Pharmacology and Toxicology* 79: 150-156.
- Rodríguez HD. (2017). Intoxicación ocupacional por metales pesados. *MEDISAN* (21): 33-72.

- Rodríguez VM., Dufour L., Carrizales L., Díaz Barriga F. y Jiménez Capdeville M. (1998) Effects of oral exposure to mining waste on in vivo dopamine release from rat striatum. *Environmental Health Perspectives* 106(8): 487-491.
- Rodríguez VM., Limón Pacheco JH., Mendoza Trejo MS., González Gallardo A., Hernández Plata I. y Giordano M. (2013). Repeated exposure to the herbicide atrazine alters locomotor activity and the nigrostriatal dopaminergic system of the albino rat. *Neurotoxicology* 34: 82-94.
- Romero DA., Belmonte, SF. y García, FG. (2011). Erosión y efectos de la minera en la sierra de Cartagena-La Unión. Control de la degradación y usos sostenible del suelo. Instituto Mediterráneo del Agua (IEA) Murcia: 147-178.
- Romero, FM. Armienta, MA. y González-Hernández, G. (2007). Solid-phase control on the mobility of potentially toxic elements in an abandoned lead/zinc mine tailings impoundment, Taxco, México. *Applied Geochemistry* 22: 109-127.
- Roque IS. (2008). Implementación del laberinto acuático de Morris en la evaluación del aprendizaje espacial. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana* 8: 22-23.
- Rosas Ramírez ME. (2018). Relación entre la bioacumulación de metales pesados y la concentración de clorofila en *Sanvitalia procumbens*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Rubio C., González DW., Martín-Izquierdo RE., Revert C., Rodríguez I. y Hardisson A. (2007). El zinc: oligoelemento esencial. *Nutrición Hospitalaria* 22: 101-107.
- Ruppert AP., Dean FK. y Reiter WL. (1984). Developmental of locomotor activity of rats pups exposed to heavy metals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 78: 69-77.
- Rzedowski, K. (1978). Vegetación en México. México. Limusa, S.A; 160-168.
- Sadeeq AA., Inbegbu AO., Taura MG., Timbuak JA., Adamu LH. y Kwanashie HO. (2013). Studies on the effects of mercury exposure on spatial learning and memory of adult wistar rats. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention* 2(12): 13-17.
- Sampedo Piquero P., Zancada-Menéndez C., Begega A., Méndez M. y Arias JL. (2013). Effects of forced exercise on spatial memory and cytochrome c oxidase activity in aged rats. *Brain Research* 15(2): 9-20.
- Sánchez SM., Hurtado Y., Atlántida C. y Morales RJ. (2003). La minería en México. Geografía, Historia, Economía y Medio Ambiente: 163-170.
- Santoyo Martínez M. (2016). Bioacumulación, daño genotóxico y cambios en la morfología foliar de *Acacia farnesiana* en los jales de Huautla, Morelos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

- Santoyo Martínez M., Mussali Galante P., Hernández Plata I., Valencia Cuevas L., Flores Morales A., Ortiz Hernández L., Flores Trujillo K., Ramos Quintana, F. y Tovar Sánchez E. (2020). Heavy metal bioaccumulation and morphological changes in *Vachelia campechiana* (Fabaceae) reveal its potential for phytoextraction of Cr, Cu, and Pb in mine tailings. *Environmental Science and Pollution Research* 27: 11260-11276.
- Saritha S., Basha DC., Praveen KK. y Rajrami RG. (2018). Effects of arsenic and lead combined exposure on brain monoaminergic system and behavioral functions in rats: reversal effect of MiADMSA. *Toxicology and Industrial Health* 20(10): 1-20.
- Sauerhoff MW. y Michaelson IA. (1973). Hyperactivity and brain catecholamines in lead exposed developing rats. *Science* 80: 1022-1024.
- Schneider JS., Lee MH., Anderson DW., Zuck L. y Lidsky TI. (2001). Enriched environment during development is protective against lead induced neurotoxicity. *Brain Research* 896: 48-55.
- Secretaria de Economía. (2020). Minería. México. Gobierno de México. Disponible en: <https://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/mineria>
- Siegel GJ. (2012). Catecholamines. Kuhar, MJ., Minneman, K. y Muly, EC. (7ed) Basic neurochemistry: molecular, celular and medical aspects. Chicago, EUA. ELSEVIER. 211-225.
- Solís-Miranda B. (2016). Aislamiento de bacterias de jales mineros y análisis de su potencial para la remediación de sitios contaminados con metales pesados. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Solomon P., Berg L. y Martin DW. (2001) Biología. McGrawHill Interamericana. México.
- Terman CR. (1968). Dinámica poblacional. *Biology of Peromyscus* 1: 412-450.
- Tovar Sánchez E., Cervantes LT., Martínez C., Rojas E., Valverde M., Ortiz Hernández L. y Mussali Galante P. (2012). Comparison of two wild rodent species sentinels of environmental contamination by mine tailings. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 1677-1686.
- Tovar Sánchez E., Mussali Galante P., Martínez MP., Ortíz ML., Hernández E., Sánchez S. y Olvera Velona A. (2016). Relationship between genotoxic damage and arsenic blood concentrations in individuals residing in a arenic contaminated área in Morelos, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 32: 101-117.
- Tresguerres JAF. (2003). Fisiología humana. McGrawHill Interamericana. (2ed) 983-1020.

- Trombini TV., Pedrosa CG., Ponce D., Almeida AP. y Godinho AF. (2001). Developmental lead exposure in rats: is a behavioral sequel extended at F2 generation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 68: 273-751.
- Tubino M. (2007). Plasticidad y evolución: papel de la interacción. *Revista de estudios neuro-lingüísticos* 16-25.
- Vahter M. y Norin H. (1980). Metabolism of ⁷⁴As-Labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. *Environmental Research* 21(2): 446-457.
- Virgolini BM., Volosin M., Fulginiti AS. y Cancela LM. (2004). Amphetamine and stress responses in developmentally lead-exposed rats. *Neurotoxicology and Teratology* 26: 291-303.
- Volke ST., Velasco TA., De la Rosa PA. y Solórzano OG. (2005). Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. Etapa II. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- Von Stackelberg K., Guzy E., Chu T. y Claus-Henn B. (2015). Exposure to mixture of metals and neurodevelopmental outcomes: a review. *Risk Analysis* 35(6): 971-1016.
- Vorhees CV. y Williams MT. (2014). Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR Journal* 55(2): 310-332.
- Vorhees CV. y Williams MT. (2014). Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies. *Neurotoxicology and Teratology* 45: 75-90.
- Vullo D. (2002). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva* 2: 93-104.
- Webster RA. (2001). Dopamine. In: Neurotransmitters, drugs and brain function. Wiley & Sons Ltd. USA. 137-161.
- Weinstein I. (1988). The origins of human cancer: molecular mechanism of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Research* 48: 4135-4143.
- Young SG., Choleris E. y Kirkland BJ. (2006). Use of salient and nonsalient visual spatial cues by rats in the Morris water-maze. *Physiology & Behavior* 87: 794-799.
- Yu PH. (1986). Monoamine oxidase. In: Neuromethods 5: Neurotransmitters enzymes. Boulton, AA. Baker, GB. y Yu, PH. Humana Press. Clifton, New, Jersey. 235-272.

Cuernavaca, Morelos a 25 de enero de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **Ana Raquel Pérez Ríos**, con el título del trabajo: **ESTUDIO NEUROCONDUCTUAL EN EL ROEDOR *Peromyscus melanophrys* EXPUESTO A JALES DE HUAUTLA, MORELOS.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: M. EN C. CAROLINA ABARCA CAMACHO

SECRETARIO: DRA. MARIANA ROMERO AGUILAR

VOCAL: DRA. PATRICIA MUSSALI GALANTE

SUPLENTE: BIOL. JUSTINA LETICIA PEÑA CAMACHO

SUPLENTE: DR. EFRAÍN TOVAR SÁNCHEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CAROLINA ABARCA CAMACHO | Fecha:2021-01-25 14:54:50 | Firmante

nAepy/AHnfosQAlgbkYbeSf6pCT/uoSeMQ8Fh1rPe+8b7b5PmXx5WTmH1k5ZEKFDzkkCcTyz+GiYhbNzurRLN4XqDQY00Rsr1D7+GoRYKQjRKjRim1PqAYEwgswNuvYgr4EpNcZu4otnK+ZBs3PU9o7ND0m7c48ntDtYxdD2a+R5FqSmHa9AHrt0sr567bHRi7eN7+JkJo1tEsk5bfP72hklueSpDkXy3ZKZ47u5LS8Wst+5ZhVrYTrhuNSmRV0YbtrD9PKo5S+2rvITXA/Mr/S+hM//pw2WikvULLfgzsNUwGBMI7gnCEf1ucnMT9SHuHLffDasUT4YSI7mXkmMA==

EFRAIN TOVAR SANCHEZ | Fecha:2021-01-25 14:55:17 | Firmante

jBaek4mvFvWFcgxVQJPMO28GEMTaoPJ5gGhQONNegvi6ZDORoZRhrJmfxMkSJ5wfbYeka3x5oQWoS1/2B+Wif0tN0xHaAEBE/kkA6yQYfIECumNB03PqJARH0YYnzcFusQvAt6K4LjQvPVJoM2PknCdZCHOIEfo7oep3LPiwXAfkwBFXFPdrEzB65TWSnFzCTzmgjMkJ1iGJlBtBQp5Uj4kn6HeY3+y/tGrPvMhbxnUCQj/WkKB/QTW61rMhCVW/s+P4Usp3Aw4p+eZUxXKakB5xug8LD0f3VtOnwBcn+nqJrDPT2YqZ4NjGqRha7Dna4YamPLu7Ah8MXZ1WpDMC2w==

MARIANA ROMERO AGUILAR | Fecha:2021-01-25 15:58:17 | Firmante

My+pzidTEDIJyBpQByZlWKhxBnyvnd2s8rOIUqcXjZZdVi6DcZbwO5CDTr3k8n/J8RpxDJSv9ozolTcgpeOg2uEdDibmljPBmmqh7q9YApXXKqjSiXtBHIXO1q6+87gxHIWfnNfEU0U4PkT5SWy6na8VQR1mUunyLmq03wOCR3pftfBOSLy+0+IOxjbJinjp/fYwe4Q7Vtkfvs5QO4Ph8dpr8LlwsTJjiWAOMYflwzMYAS9x2x0rb6Up/ffxzeusLTERsHs8ilnv+2+hEb7MN8XSC99mnHvt7uhCQtuCN1/e8ksoGABentitVl0mT+vDuD37G7lXfVlnc0azRA==

PATRICIA MUSSALI GALANTE | Fecha:2021-01-25 16:18:07 | Firmante

ieVHQGz4f52zZl+WmZJcYBRdzQjCYGmh7x95nq8kalZS9LBr5R4QiJOBKL2JBVpGDRZ8she6Vps9/lpWigO17YBm1ITKp4/Ao9br3firkVke1HwGVPZM6WocNEBU+74e6bcU+sy pDyLA9uy12k5/INTB5OksO3Fwzzf/bIKABLNMWh9lx6e4cAW/o/wEZR2p0CqB3VemHzpkpg0WT/ucclfP60uCnrNlhg+raPWd7G6b7R/6K2+uP7zBmTTsO+KuwAwixHPSDA5dVIN AgNuomBJ5P/Jr2qOAXR8B3loa2Kz0LQ2gbABwclmLmKl4v2mHra+DixZIE+9oG6JRLIyeQ==

JUSTINA LETICIA PEÑA CAMACHO | Fecha:2021-01-25 19:04:33 | Firmante

SMUvFcPaNpe7rm6xkbv6pT5sW5ozKn/geiCrIuVXTpGNbLFOtYSa7U31dxL7jCcoEYHlmJ3nDSEfoXs2svwxI9QL+C5+Mab2Kllktqsr9U1J3L6/Ela8ORIj/bLtoLHdd0g6UcwUBs AbCPxwpWaRW4Z3Dp7JGDFG6LHvIUra108uawf5xUtAQR9rMUXj53Z1AsDGF7I/5tgM1rKR+PP01KYyObsh2/j5X1yuuVelYQInuJS4EgVV5xmJQp3nEWvh1wIE/2VvPSJ6Eb/0/NluPh9tZZVv0fXmSl01bCyFJiJi6ohrdTTf/B2SNi5w3kPEY6R3iJlBtdaEsMQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



qCr4SM

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kEQgO2NGKXlCaJ4EZeyj3zG5IYP0WmPn>

