



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

**EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO SOBRE LOS
TRANSPORTADORES DE GLUCOSA Y EL RECEPTOR DE INSULINA EN
EL HIPOCAMPO DE RATONES MACHO DE LA CEPA C57BL/6J.**

Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Neurobiología)

P R E S E N T A

Lic. en Psicología: Miriam Guadalupe Cruz García

Director de Tesis

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

Dra. María Magdalena Giordano Noyola



Campus Juriquilla, Querétaro. Diciembre 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del comité tutorial certificamos que la tesis elaborada por: **Miriam Guadalupe Cruz García**, cuyo título es: “**Efectos de la exposición al arsénico sobre los transportadores de glucosa y el receptor de insulina en el hipocampo de ratones macho de la cepa C57BL/6J**”, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Secretario (Tutor)

Dra. Verónica M. Rodríguez Córdova

Vocal

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Suplente

Dra. María. Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Suplente

Dra. María de la Luz Del Razo Jiménez

Aprobado por el Comité Académico

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Coordinador del Programa

RESUMEN

El consumo prolongado de agua contaminada con arsénico inorgánico (As_i) se asocia con un deterioro en la memoria (Smith *et al.*, 2000). El hipocampo, es una estructura central en el proceso de memoria. Estudios *in vitro* e *in vivo* han descrito la vulnerabilidad de esta estructura ante la administración de As y, a las alteraciones en la regulación de la glucosa central y periférica mediadas por las proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs), y el receptor de insulina (RI), proteínas expresadas ampliamente en el hipocampo (Choeri *et al.*, 2005; Havrankova y Root, 1978; Shila *et al.*, 2005). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del consumo de agua contaminada con As sobre la expresión de GLUT1, GLUT3, y RI en el hipocampo y sobre la ejecución de una tarea de memoria espacial. Se utilizaron 30 ratones macho de la cepa C57BL/6J los cuales fueron sometidos al consumo de agua con 50 mg As_i/L durante 30 días. Se evaluó la expresión del mRNA de GLUT1, GLUT3 y RI mediante RT-PCR. Se utilizó el laberinto acuático de Morris (LAM) para evaluar la memoria espacial, y se realizó la caracterización de los metabolitos del As en el hipocampo mediante la técnica de espectrometría por absorción atómica acoplada a generación de hidruros (HG-CT-AAS por sus siglas en inglés *hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry*). El grupo expuesto durante un mes a As_i mostró una disminución significativa en la expresión del mRNA GLUT1 y GLUT3 en el hipocampo, en cambio mostró un incremento en la expresión del RI. Además, el grupo expuesto a As_i durante 45 días mostró una mayor latencia en alcanzar la plataforma de escape en la prueba de memoria. El consumo de agua contaminada con As_i incrementó significativamente la proporción de especies metiladas y dimetiladas de As (MMA, DMA) en comparación con el grupo control. La exposición de As_i durante dos meses incrementó

significativamente, con respecto al grupo control, los niveles de glucosa sanguínea en ayunas y causó intolerancia a la prueba de glucosa.

Debido al papel central de GLUT1, y GLUT3 en la captura de glucosa en el SNC se sugiere que la exposición a As_i ejerce sus efectos deletéreos sobre la memoria a través de alteraciones en la glucohomeostasis central.

SUMMARY

Children and adolescent populations chronically exposed to inorganic arsenic (iAs) via drinking water (DW) have shown behavioral alterations, and memory deficits. Also, recent studies have associated iAs exposure with alterations in glucoregulation. The hippocampus is one of the most important cerebral regions associated with memory processing. Studies *in vitro* and *in vivo* have shown the hippocampus as a vulnerable structure to iAs exposure and changes in glucose metabolism. The glucose transporters (GLUTs) and insulin receptor (IR) regulate glucose metabolism in brain. GLUTs and IR are expressed on hippocampus and the alterations in these proteins have been associated with memory disorders. The objective of this study was to evaluate the effects of iAs exposure via DW on GLUT 1, GLUT 3 and IR mRNA expression on hippocampus. We tested C57BL/6J male mice exposed to 50 mg iAs/L via DW during 30 days. RT-PCR analyses indicated that GLUT 1 and GLUT 3 mRNA levels were decreased; while IR mRNA levels were increased in the hippocampus exposed animals to iAs group in comparison to a control group. In addition, the mice exposed to iAs showed increased latencies to find a platform on the Morris-Water-Maze test. The levels of iAs and their methylated arsenic species, methylarsenic acid (MMA) and dimethylarsenic acid (DMA), in the hippocampus of exposed group were significantly higher than control. Peripheral glucose levels after a glucose challenge were increased in the iAs exposed group. These results suggest that iAs exposure could affect memory through alteration in glucoregulation in the CNS.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Becario No: 268928

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM

Becario No. 099078201932MC

Trabajo apoyado por CONACyT 60662, 103907; PAPIIT 214608-19, 211709-21; Beca CONACyT 225292 a MCG

Agradezco el excelente trabajo de todos los días en el laboratorio

Biol. Soledad Mendoza., Claudia González Flores y MVZ. Francisco Camacho Barrios.

Un reconocimiento a las unidades que brindaron apoyo con atención y amabilidad para la realización de este proyecto.

Unidad de Biología Molecular

Dra. Anaid Antaramian

M en C. Adriana Gallardo

Unidad de Enseñanza

M. en C. Leonor Casanova Rico

Bioterio

MVZ. Martín García

Videoconferencia

Psic. Ma. de Lourdes Lara Ayala

AGRADECIMIENTOS

Dra. María Magdalena Giordano Noyola y Verónica Rodríguez Córdova

Gracias por dirigir éste trabajo, por aceptarme en su laboratorio y escucharme con respeto. También, por haber hecho mi estancia en el laboratorio un período lleno de retos pero también lleno de satisfacciones. Siempre les estaré agradecida por ello.

Por sus comentarios, atenciones y sugerencias al trabajo

Dra. Luz María Del Razo Jiménez, Dra. Clorinda Arias Álvarez, Dra. María. E Gonsebatt, Dr. Alfonso Cárabez Trejo, Dr. Mauricio Díaz Muñoz,

Agradezco el apoyo académico pero sobre todo su entusiasmo por impartir su conocimiento.

Dr. Jorge Limón Pacheco, Dr. Francisco G Vázquez Cuevas, M en C .Leopoldo Gonzales Santo y Dra. Wendy Portillo.

Expreso un profundo respeto, aprecio y agradecimiento a los profesores que me han brindado su apoyo a lo largo de mi formación académica.

Dra. Carolina Escobar, Dr. Víctor Uriarte, Dr. Alfonso Escobar, Dr. David Velázquez Martínez, Dr. Fernando Peña, y especialmente al Dr. Guillermo Álvarez Llera.

Dr. Claude Messier, I would like to thank you for your kindness and allow me to learn several techniques to evaluate the glucose transporters. I had a great time during my stay in your laboratory. Thank you so much.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser el lugar en donde podemos soñar y crear, también por albergar generaciones de personas que anhelan un México más justo, libre de pobreza, ignorancia y discriminación social.

A mi Papá, eternamente.

...en todas las tierras en barbecho, una nueva vida está a la espera de renacer. Y, lo que es más sorprendente todavía, es que la nueva vida llegará tanto si uno quiere como si no. Por mucho que cada vez se le intente arrancar, cada vez volverá a echar raíces y a reimplantarse. La nueva semilla volará con el viento y seguirá llegando y ofreciendo múltiples ocasiones para el cambio del corazón, el restablecimiento del corazón, y para volver a optar finalmente por la vida...

Pinkola, C (2003)

DEDICATORIA

A Dios

Por todo lo que me has dado y por haberme colocado con la familia correcta

No existe nadie más a quien admire, respete y quiera tanto como a **mis padres y hermanos**. Ustedes no merecen sólo un par de líneas sino una enciclopedia con varios tomos para expresar todo lo que significan para mí. Gracias por todo su amor.

A todos los que se han hecho parte de la Familia Cruz García por su apoyo y aprecio

Anne, mis adorados sobrinos y Rosaura

A mis tíos Georgina y Armando por estar siempre cerca de nosotros

A mis amigos por toda su comprensión y apoyo

ÍNDICE	Pág.
Resumen	ii
Summary	v
Abreviaturas	1
Introducción	3
1.0 Antecedentes	6
1.1. Arsénico	6
1.1.1 Toxicocinética del arsénico	6
1.1.2 Exposición al Arsénico y alteraciones en la glucohomeostasis	10
1.1.3 Arsénico y procesos cognoscitivos	11
1.2.0 Transportadores de glucosa	14
1.2.1 Descripción de los transportadores de glucosa en el sistema nervioso central	14
1.2.2 Descripción funcional de los transportadores de glucosa 1 y 3	17
1.2.3 Transportador de glucosa isoforma 1- 55 kDa: Vía de entrada a las células para el arsénico	18
1.2.4 Transportadores de glucosa y procesos cognoscitivos	19
1.3.0 Insulina	20
1.3.1 Insulina y sistema nervioso central	20
1.3.2 Insulina/ receptor de insulina: cognición y enfermedad de Alzheimer	22
2.0 Justificación	25
3.0 Hipótesis	26
4.0 Objetivos	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos específicos	26
5.0 Método y Materiales	27
5.1 Sujetos experimentales	27
5.2 Materiales	27
5.3 Análisis estadístico	28
A Experimento I	29
Efecto de la exposición a As ₃ sobre los niveles de glucosa y expresión de RI, GLUT 1 y GLUT 3	
A.1 Método general	29
A.2 Diseño experimental	30
A.3 Métodos particulares	30
A.4 Resultados	32
A.5 Discusión de Resultados	36
B Experimento II	45
Efecto de la exposición a As ₃ sobre los niveles de glucosa sanguínea y sobre la tolerancia a la glucosa intraperitoneal	
B.1 Método general	45
B.2 Diseño Experimental	45
B.2 Método particular	45
B.3 Resultados	46
B.4 Discusión de resultados	47
C Experimento III	51

Efectos de la exposición a As_i sobre dos tareas conductuales: actividad locomotora y memoria		
C.1	Método general	51
C.2	Diseño experimental	52
C.2	Método particular	52
C.3	Resultados	54
C.4	Discusión de resultados	58
6.0	Conclusiones generales	62
7.0	Referencias	64
8.0	Índice de Figuras	76
9.0	Índice de Tablas	77
10.0	Apéndice	78

Abreviaturas

ABC	-	Proteínas de Unión a ATP
As	-	Arsénico
As _i	-	Arsénico inorgánico
AsT	-	Arsénico total
AS3MT	-	Arsénico 3 Metil Transferasa
ATP	-	Adenosina 5 Trifosfato
AQP	-	Acuaporinas
BHE	-	Barrera Hematoencefálica
CAT	-	Catalasa
CR	-	Receptor de Corticosteroides
DG.	-	Diabetes Gestacional
DMA	-	Dimetilar Sénico
DMT2	-	Diabetes Mellitus Tipo 2
EA	-	Enfermedad de Alzheimer
fEPSPs	-	Potenciales Postsinápticos Excitatorios
FPG	-	Prueba de glucosa en ayuno
GC	-	Glucocorticoides
GLUT	-	Proteínas Transportadoras de Glucosa
GOD POD	-	Glucosa Oxidasa y Peroxidasa
GSH	-	Glutación Reducido
GSH-PX	-	Glutación Peroxidasa
GSSG	-	Glutación Oxidado
HPA	-	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal

IGF	-	Factor de Crecimiento Parecido a la Insulina
IPGGT	-	Prueba de Tolerancia a la Glucosa Intraperitoneal
LAM	-	Laberinto Acuático de Morris
LTP	-	Potenciación a Largo Plazo
NMDA	-	N-Metil-D- Aspartato
NO	-	Oxido Nitríco
NOS	-	Oxido Nitríco Sintetasa
MMA	-	Monometilarsénico
PPB	-	Partes por Billón
RI	-	Receptor de Insulina
ROS	-	Especies Reactivas de Oxígeno
SAM	-	S- Adenosilmetionina
STZ	-	Estreptozotocina
SNC	-	Sistema Nervioso Central
SOD	-	Superoxido Dismutasa
TMA	-	Trimetilarsénico

Introducción

El arsénico (As) es un metaloide que se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente. La exposición no ocupacional al As se produce principalmente a través del consumo de agua contaminada (Smith *et al.*, 2000). El consumo prolongado de agua contaminada con As, principalmente en su forma inorgánica (As_i), se ha asociado con el desarrollo de cáncer en la piel y órganos internos, aterosclerosis y accidentes cerebrovasculares (Cheng *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2000). De igual forma, el As_i impacta de manera adversa al sistema nervioso central (SNC) (Rodríguez *et al.*, 2001), manifestando sus efectos a través de una disminución en la ejecución de pruebas de memoria en niños y adolescentes (Calderón *et al.*, 2001; Rosado *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2003; Wasserman *et al.*, 2004). Asimismo, estudios en animales han reportado que la administración de As_i por vía oral, produce un efecto deletéreo en tareas de memoria dependientes del hipocampo (Flora *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Estudios *in vitro*, usando rebanadas de hipocampo, han ostrado la vulnerabilidad de esta estructura ante la administración del As_i de manera que la administración de arsenito de sodio (Na_3AsO_3) o de sus especies metiladas como el monometilarsénico trivalente (MMA^{III}) o dimetilarsénico trivalente (DMA^{III}) disminuyen los potenciales postsinápticos excitatorios (fEPSS), decrementan la respuesta de potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés Long Term Potentiation), mostrando un efecto mayor ante la administración de DMA^{III} , en rebanadas provenientes de animales jóvenes (Kruger *et al.*, 2007, 2009). También, se ha descrito que el hipocampo es sensible a las alteraciones del metabolismo de la glucosa periférica (Gold *et al.*, 2007) situación que conduce a un desbalance en el metabolismo central de la glucosa (Liu *et al.*, 2009).

La glucosa es el suministro principal de energía en el SNC. Debido a la naturaleza polar de la glucosa, en el SNC, ésta debe ser capturada mediante difusión facilitada a

través de la familia de proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs) (Vannuci *et al.*, 1998). Se ha considerado a las proteínas GLUT1 y GLUT3, independientes de la acción de la insulina, como las responsables del mantenimiento energético cerebral (Dwyer *et al.*, 2002). La expresión de estas proteínas depende de factores como el estado glucémico periférico de modo que, la hipoglucemia inducida por la administración de insulina incrementa la expresión de GLUT1 en la barrera hematoencefálica (BHE); mientras que, en animales tratados con STZ, fármaco que genera hiperglucemia, disminuye la expresión de GLUT1 y GLUT3 en la BHE (Dwyer *et al.*, 2002). La disminución de los GLUTs se ha asociado con alteraciones cognitivas y también se ha reportado una disminución de las mismas en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) (Dwyer *et al.*, 2002; Mooradian *et al.*, 1997).

Por otra parte, el consumo crónico de agua contaminada con As₃ se ha considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de la DM2 (Rahman *et al.*, 1998; Coronado-González *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios realizados en animales sólo indican una alteración en la glucohomeostasis periférica, resultado del daño del As₃ sobre los hepatocitos, disminución de la expresión y secreción de la hormona insulina en células β del páncreas, y alteración en la vía de señalización del receptor de la insulina (RI) y una disminución de la translocación de los GLUT4, dependientes de insulina, hacia la membrana celular en células del tejido adiposo (Bashir *et al.*, 2006; Díaz-Villaseñor *et al.*, 2006; Izquierdo-Vega *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2007; Walton *et al.*, 2004). La interacción entre el RI expresado en el tejido muscular, adiposo, hepático y la DM ha sido ampliamente documentada; no así, el efecto que tiene este síndrome sobre el RI en el SNC (Kahn y Suzuki, 2010) y aún menos el efecto que tiene el As₃ sobre el RI en el hipocampo. Además, si bien se ha descrito el efecto del As₃ sobre la memoria e incluso su probable relación con la EA (Gong y O'Bryant, 2010), poco se sabe de los

mecanismos que subyacen a estas alteraciones. De tal forma, el objetivo que persiguió esta investigación fue evaluar el efecto del As_i sobre los GLUTs 1 y 3, y el RI en el hipocampo del ratón macho de la cepa C57BL/6J.

Antecedentes

1.1. Arsénico

1.1.1 Toxicocinética del Arsénico

El As es un elemento que pertenece al grupo V de la tabla periódica, el cual puede combinarse con metales y no metales para formar compuestos orgánicos e inorgánicos. El As_i existe en tres estados de oxidación (-3, +3 y 5), los cuales dependen de las características ambientales en las que se encuentre presente el As. En condiciones de reducción, la forma predominante es el arsenito (As^{III}); mientras que el arsenato (As^V) suele ser la forma estable en condiciones oxigenadas. La exposición al As_i en su estado de oxidación trivalente, ha sido considerada altamente tóxica (Petrick *et al.*, 2000). La exposición a As_i ocurre a través de fuentes naturales (aire, suelo, alimento y agua) y fuentes antropogénicas (minería, quema de carbón y combustibles fósiles y fabricación de componentes electrónicos). Sin embargo, el consumo de agua contaminada con As_i ha sido considerada la principal fuente de exposición (Jones, 2006). El consumo prolongado de agua contaminada con As_i se ha asociado al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, enfermedades vasculares periféricas, desórdenes neurológicos, diabetes mellitus y varias formas de cáncer (Smith *et al.*, 2000).

Para comprender cómo actúa el As_i sobre el organismo es necesario entender el metabolismo celular del As, así como sus mecanismos de transporte y biotransformación (Thomas, 2007). Las proteínas involucradas en el transporte del As_i regulan la entrada, retención y eliminación del mismo en la célula, y por lo tanto su capacidad tóxica. De tal forma, se ha sugerido que el As^V, es capturado por transportadores de fosfato mientras que, el As^{III} a pH fisiológico es transportado hacia el interior de la célula a través de dos familias de proteínas transportadoras: canales de

acuaporinas (AQP por sus siglas en inglés *aquaporin water channel protein*) y transportadores de hexosa (Rosen y Liu, 2009). Las proteínas transportadoras que unen ATP (ABC, por sus siglas en inglés *ATP Binding Cassette Transporters*), particularmente las proteínas que confieren resistencia a múltiples drogas (MRP1 y MRP2, por sus siglas en inglés *Multidrug-Resistance Proteins*) participan en la eliminación del As_i ; sin embargo, los mecanismos de transporte no son exclusivos ya que se ha demostrado que algunos transportadores tienen una función bidireccional; por ejemplo, la proteína acuaporina 9 (AQP9), ha sido implicada tanto en los mecanismos de captura como de eliminación del As_i (Drobna *et al.*, 2010).

Después de la absorción oral, el As_i es metilado, principalmente en el hígado y excretado en la orina. El modelo general de biotransformación indica una serie de pasos enzimáticos de reducción y metilación oxidativa (Cullen, 1984 citado en Aposhian y Aposhian, 2006), procesos mediados por la enzima multifuncional arsenito 3 metiltransferasa (As3MT) (Thomas *et al.*, 2007). . La enzima As3MT requiere de los sistemas de reducción endógenos, para llevar a cabo su función adecuadamente, principalmente los sistemas de tiorredoxina-tiorredoxina reductasa y glutarredoxina-glutation reductasa. La proteína donadora del grupo metilo es la S-adenosil metionina (SAM) dando lugar a la S-adenosilhomocisteína con la consecuente pérdida del grupo metilo. En esta situación las especies de As_i pentavalente se forman primero, antes que las trivalentes (Thomas *et al.*, 2007). En este modelo el arsenito (As_i^{III}) es convertido a ácido monometil arsénico en su forma pentavalente (MMA^V) el cual se reduce a ácido monometil arsénico en su forma trivalente (MMA^{III}). Este arsenical se metila para formar ácido dimetil arsénico en su forma pentavalente (DMA^V) y posteriormente se reduce para formar ácido dimetil arsénico en su forma trivalente (DMA^{III}), la última metilación tiene lugar sólo en algunos mamíferos, particularmente, en roedores. La

metilación de DMA^{III} da lugar al óxido trimetil-arsénico pentavalente arsenato (TMA^{V}) que al ser reducido origina al trimetil-arsénico trivalente (TMA^{III}) (Thomas *et al.*, 2007).

El segundo modelo propuesto es el de Hayakawa *et al.* (2005, citado en Aposhian y Aposhian, 2006), el cual propone que el As_i^{III} forma un complejo con GSH, el cual es el sustrato de la enzima As3MT. La metilación por la enzima As3MT produce el complejo $\text{GSH} - \text{MMA}^{\text{III}}$, sustrato inmediato de la segunda metilación, produciendo al complejo $\text{GSH} - \text{DMA}^{\text{III}}$. La ruptura de los complejos con el GSH origina MMA^{III} y DMA^{III} que a través de la oxidación con el peróxido de hidrógeno dan lugar a las formas pentavalentes del As; MMA^{V} y DMA^{V} (Thomas *et al.*, 2007) (Ver Figura 1.1).

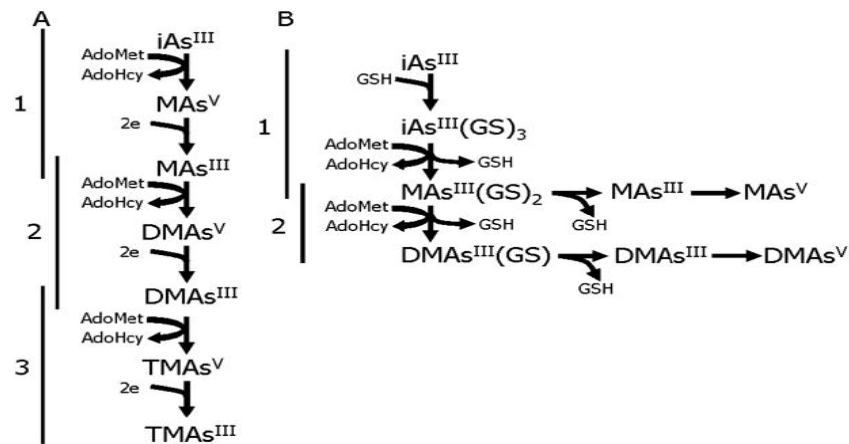


Fig. 1.1 Modelo conceptual de la metilación del As_i mediado por As3MT. A) Modelo propuesto por Cullen, (1986): B) Modelo propuesto por Hayakawa, (2005) (Modificado de Thomas *et al.*, 2007).

Además de un mecanismo de desintoxicación, la metilación del As_i ha sido considerada un mecanismo de bioactivación, ya que los metabolitos trivalentes son más tóxicos que el As_i (Petrick *et al.*, 2000; Styblo *et al.*, 2000; Vather, 2002). Petrick *et al.* (2000) y Styblo *et al.* (2000) utilizando líneas celulares de hepatocitos humanos (ATCC CCL-

13), epidérmicas y epiteliales bronquiales demostraron que el As_i y sus metabolitos afectan a la membrana plasmática, la función mitocondrial y la viabilidad celular en el siguiente orden $MMA^{III} > \text{arsenito} > \text{arsenato} > MMA^V = DMA^V$. Sin embargo, también se ha descrito que el DMA^V causa daños en el DNA, aberraciones cromosómicas, e incremento en tumores en la vejiga, mientras que el MMA^{III} también se ha descrito como un potente cancerígeno (Vather, 2002).

Otros órganos y sistemas también son capaces de biotransformar el As_i , por ejemplo, el sistema nervioso central. Rodríguez *et al.* (2005) han reportado la presencia de MMA y DMA en rebanadas de cerebro expuestas a $0.1 \mu M$ de arsenito de sodio, siendo DMA el principal metabolito presente en el cerebro. Sin embargo, la toxicocinética del As_i es órgano diferencial. Juárez Reyes *et al.* (2009) han reportado que la administración única por vía intragástrica de As^V provoca un decremento dosis dependiente de As^{III} y As^V en el hígado, alcanzando una eliminación casi total a las 12 h después de la administración de 2.5, 5 ó 10 mg As_i/kg . Los niveles de DMA^V fueron detectados a las 2 h después de la administración, mientras que en cerebro los niveles de DMA^V fueron detectados hasta las 5 h, alcanzando un pico máximo 8 h después de la administración. El incremento de los niveles de DMA^V en el cerebro puede ser resultado de un incremento periférico del DMA^V producido por el hígado, el cual atraviesa la BHE, posiblemente, a través de AQP7 o AQP9 o de una respuesta más eficiente de la enzima As3MT en el cerebro (Juárez Reyes *et al.*, 2009). De la misma forma se ha señalado que el As_i se acumula de manera diferencial en las regiones cerebrales. El consumo de 100 mg As_i/L a través del agua de bebida en ratas macho de la cepa Wistar aumenta 4.13 veces la cantidad de arsénico total (AsT) en la corteza cerebral mientras que el hipocampo reporta un incremento de 3.13 veces con respecto al grupo control (Shila *et al.*, 2005). El incremento regional del As_i se ha asociado positivamente con un incremento diferencial

en la producción de ROS (por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) y una disminución de la defensa antioxidante (García-Chávez *et al.*, 2006; Shila *et al.*, 2005). La exposición a 100 mg As_i/L en el agua de bebida durante 60 días en rata induce una disminución de enzimas de los sistemas antioxidantes; p. ej., súper óxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-PX), principalmente en la corteza, estriado e hipocampo (Shila *et al.*, 2005). Al contrario, el hipotálamo y el cerebelo muestran un efecto menor del As_i sobre el estado redox (Shila *et al.*, 2005). Un reporte reciente mostró que la acumulación del As_i en el cerebro muestra diferencias dependientes del género, acumulándose una mayor cantidad de As_i en el tejido cerebral de ratones macho (68.23 ng As/g) que en hembras (17.40 ng As/g) después de cuatro meses de exposición a 50 mg As_i/L de agua de bebida (Bardullas *et al.*, 2009).

1.1.2. Exposición al Arsénico y Alteraciones en la Glucorregulación

El consumo prolongado de agua contaminada con As_i tiene una relación causal con cáncer de piel y de diversos órganos internos, además del desarrollo de neuropatía periférica e hipertensión (Smith *et al.*, 2000). También se ha reportado que el As_i afecta el estado de glucorregulación de los individuos en regiones con arsenicismo endémico. El primer caso reportado fue en 1950 cuando un sujeto que fue sometido a un tratamiento con arsfenamina (salvarsán) desarrolló características semejantes a la diabetes mellitus tipo 2 DMT2 (Stolzer *et al.*, 1950 citado por Hill *et al.*, 2009). Estudios epidemiológicos han mostrado que la exposición a As_i aumenta el riesgo de desarrollar DMT2 y diabetes gestacional (DG) (Coronado-Gonzales *et al.*, 2007; Ettinger *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 1998). La DMT2 se caracteriza por resistencia a la insulina tanto en el tejido adiposo como en hígado, entre otros órganos, a consecuencia de una disminución en la secreción o acción de la insulina (LeRoith *et al.*, 2003). Estudios *in vivo* han reportado que la administración de 1.7 mg As_i/kg durante 90 días

en ratas de la cepa Wistar incrementa los niveles de insulina y de glucosa en suero, e incrementa la resistencia a la insulina. Además, estos cambios se acompañan de un aumento en la generación de ROS y peroxidación de lípidos en las células β del páncreas (Izquierdo-Vega *et al.*, 2006). De la misma forma, estudios *in vitro* con células β del páncreas incubadas con 5 y 10 μM de arsenito de sodio reportan una disminución de la secreción de insulina (Diaz-Villaseñor *et al.*, 2006). Walton *et al.* (2003) han investigado el efecto del As_i sobre la translocación de GLUT4 hacia la membrana celular, transportador de glucosa que permite la entrada de glucosa tanto al tejido muscular como al tejido adiposo en respuesta a un incremento de insulina, como consecuencia de la ingestión de carbohidratos (LeRoith *et al.*, 2003), encontrando que las células adiposas expuestas a una concentración de 50 μM de As_i^{III} y 2 μM de MMA^{III} mostraban tanto una disminución en la translocación hacia la membrana celular de los transportadores de glucosa GLUT4 como una disminución en la vía de señalización PKB/AKT del RI (Paul *et al.*, 2007).

1.1.3 Arsénico y procesos cognoscitivos

El efecto que tiene el As_i sobre las funciones cognoscitivas fue inicialmente descrito en algunos reportes de caso de adultos jóvenes expuestos ocupacionalmente al metaloide, en estos estudios se señala a las alteraciones de la memoria como un síntoma de arsenismo crónico (Bola y Bleecker, 1987; Morton *et al.*, 1989). Asimismo, estudios epidemiológicos realizados en niños y adolescentes expuestos crónicamente al As_i reportan una disminución en la función intelectual y en la ejecución de pruebas de aprendizaje y memoria (Calderón, *et al.*, 2004; Rosado *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2003; Wasserman *et al.*, 2004). Estos resultados se han visto apoyados por estudios realizados en ratas expuestas a As_i , éstas presentan un pobre desempeño en tareas cognoscitivas a

través de actividad locomotora y laberinto en T; relacionadas particularmente con los ganglios basales y con el hipocampo (Rodríguez *et al.*, 2001; 2002).

Los estudios que han evaluado el efecto del As_i sobre la memoria de roedores han utilizado pruebas conductuales, LAM (Laberinto Acuático de Morris) y laberinto radial de ocho brazos, en los que se ha reportado una pobre ejecución de dichas tareas (Martínez- Finley *et al.*, 2009; Flora *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Sin embargo, los resultados son contradictorios ya que el estudio de Rodríguez *et al.* (2001) no reporta alteraciones en la ejecución del laberinto radial de ratas macho expuestas diariamente con 5, 10 ó 20 mg de As_i/kg de peso durante 2 semanas (Ver Tabla 1). Debido al papel central del hipocampo en procesos de memoria (Scoville y Milner, 1957) y la vulnerabilidad de la misma a los efectos del As_i, manifestándose a través de un incremento en el estrés oxidante y una disminución de la respuesta antioxidante (Shila *et al.*, 2005), el hipocampo ha sido blanco de estudio para explicar las alteraciones de la memoria debidas a la exposición al As_i. Por ejemplo, Martínez-Finley *et al.* (2009) señalan que la exposición a 55 ppb de As_i a través del consumo de agua en etapas perinatales y durante 2 meses después del nacimiento incrementa el número de errores en una tarea de memoria evaluada en el laberinto radial. Además, este efecto se ha visto relacionado con alteraciones en el eje HPA (eje hipotálamo-pituitaria-adrenal) particularmente con un incremento en los niveles periféricos de corticoesteroides y una disminución en la expresión de los receptores a corticoesteroides en el hipocampo (glucocorticoides y mineralocorticoides), los cuales se encuentran involucrados en la fase de consolidación de la memoria (Martínez-Finley *et al.* 2009). Flora *et al.* (2009) ha señalado que animales expuestos a 1 mg As_i/L ó 1 mg AsGa/L a través del consumo de agua durante seis meses exhiben una mayor latencia para llegar la plataforma en la fase de aprendizaje del LAM. Este aumento en la latencia se asocia

con un incremento en los niveles de ROS y una disminución en la respuesta antioxidante, que se manifiesta como una disminución de glutatión reducido (GSH) y un aumento de glutatión oxidado (GSSG) tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo, siendo este último el más afectado. Asimismo, Luo *et al.* (2009) mostraron que animales tratados con 68 mg As_i/L en agua de bebida durante tres meses mostraban un aumento en la latencia para alcanzar la plataforma en el LAM y una disminución dependiente de la dosis en la expresión de la subunidad NR2A del receptor NMDA en el hipocampo. Wang *et al.* (2009) mostraron que el efecto del As_i sobre el desempeño en el LAM depende del tiempo de exposición y la dosis administrada. La administración tanto de 1 ó 4 mg As_i/L aumentan la latencia para alcanzar la plataforma de escape, aunque el efecto es mayor para la dosis de 4 mg As_i/L (Wang *et al.*, 2009).

Estudios en rebanadas de hipocampo incubadas con 0.08, 0.40 y 2.0 mg As^{III}/L han mostrado cambios morfológicos deletéreos; por ejemplo, condensación del núcleo y apoptosis (Yang *et al.*, 2003). También, se ha observado disminuida la inducción de la LTP en rebanadas de hipocampo tratadas con 1 μmol de DMA^{III} (Kruger *et al.*, 2007). La administración de MMA^{III} (10, 25, 30 ó 50 μmol/L) disminuye la amplitud de los fEPSPs de manera dependiente de la dosis tanto en animales adultos como en jóvenes. En cuanto al efecto del MMA^{III} sobre la LTP, se ha observado una respuesta bifásica con una disminución significativa a una concentración de 25 μmol/L, pero con un incremento a la concentración de 1 μmol/L (Kruger *et al.*, 2009). La evaluación de metabolitos pentavalentes del As_i: el DMA^V y el MMA^V no muestran un efecto sobre la respuesta sináptica en hipocampo incluso en dosis elevadas (100 μmol/l de MMA^V) (Kruger *et al.*, 2007, 2009). Estos resultados refuerzan las investigaciones que muestran que los metabolitos trivalentes del As_i son más tóxicos que las pentavalentes (Petrick *et al.*, 2000; Styblo *et al.*, 2000).

Otros efectos de la exposición a As_i incluyen la apoptosis en las neuronas corticales, provenientes de rata, mediada por la activación de las cinasas JNK3 y p38 MAPK asociadas a la formación de placas neuríticas y marañas neurofibrilares características en la EA (Gharibzade y Hoseini, 2008), por lo que la exposición a As_i se ha propuesto como un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad (Gong y O’Bryant, 2010).

Tabla 1. Efecto del As_i sobre la memoria en roedores (estudios *in vivo*)

Hallazgos	Concentración de As _i	Vía de Administración	Tiempo de Exposición	Tarea	Referencia
Disminución de la memoria	Arsenito de sodio 55 µg/L	VO	Perinatal 35 – 40 días postnatal	Laberinto Radial	Martínez-Finley <i>et al.</i> , 2009.
Disminución de la memoria	Arsenito de sodio 1 mg/L Arseniuro de Galio 1 mg/L	VO VO	6 meses	LAM	Flora <i>et al.</i> , 2009.
Disminución de la memoria	Arsenito de sodio 68 mg/L	VO	3 meses	LAM	Luo <i>et al.</i> , 2009.
Disminución de la memoria	Trióxido de arsénico 1 y 4 L	VO	2 meses	LAM	Wang <i>et al.</i> , 2009.
Sin efecto	Arsenito de sodio 10 mg/kg/día	Vía intragástrica	1 mes	Laberinto Radial	Rodríguez <i>et al.</i> , 2001.

VO- Vía Oral, LAM- Laberinto Acuático de Morris

1.2 Transportadores de Glucosa

1.2.1 Transportadores de glucosa en el sistema nervioso central

En comparación con otros tejidos, el cerebro depende de un suministro continuo de glucosa. Debido a la naturaleza polar de la glucosa esta debe ser capturada mediante difusión facilitada a través de la familia de GLUTs. Los GLUTs pertenecen a la familia de acarreadores de solutos 2A (SLC2A, la nomenclatura para la proteína es GLUT). Los

GLUTs son proteínas integrales de membrana con 12 segmentos transmembranales que comparten del 60 al 70 % de identidad de aminoácidos entre las diferentes isoformas y el 90 % de identidad entre especies (Vannuci *et al.*, 1998). Se han descrito 14 isoformas diferentes de las proteínas GLUT las cuales se clasifican en tres clases, clase I (GLUT 1-4), Clase II (GLUT-5) y Clase III (GLUT-6, 8, 10) (Joost y Thorens, 2001). La expresión, regulación y actividad de las proteínas GLUT juegan un papel esencial en la homeostasis de la glucosa y al igual que en la periferia, exhiben una localización específica dentro del cerebro (McEwen y Reagan, 2004). La captura de glucosa a través de los GLUTs está limitada por las enzimas glucolíticas fosfofructocinasa y hexocinasa I, cuya actividad depende del contenido de ATP, que a su vez depende de la captura de glucosa. Una concentración baja de ATP incrementa la actividad de la fosfofructocinasa y de la hexocinasa, lo que conduce a un incremento en el transporte de glucosa (Messier, 2004). Cuando la glucosa se encuentra en el citoplasma de la célula comienza el proceso de la glucólisis, cuyo objetivo es el desdoblamiento de la glucosa para obtener energía (ATP) y funcionar como intermediario para otras vías metabólicas (Harvey y Champe, 2006). Debido a que las isoformas 5, 6 y 11 de los GLUTs tienen una afinidad baja por la glucosa y a la baja concentración y localización específica de las isoformas 4 y 2, y al poco conocimiento que se tiene sobre las isoformas 8 y 10, se ha considerado a las isoformas de GLUT1 y GLUT3 como las responsables del mantenimiento energético cerebral (Dwyer *et al.*, 2002).

La Figura No.1.2 muestra el modelo clásico del metabolismo de la glucosa en la neurona y en el astrocito, enfatizando la importancia de GLUT1 y GLUT3. De acuerdo con este modelo la activación de las bombas de Na^+/K^+ , para el mantenimiento del potencial de membrana (1), incrementa el metabolismo oxidativo dentro de la neurona. La activación de las bombas de Na^+/K^+ incrementa los niveles de $\text{ADP}_i + \text{P}_i$, y AMP y

disminuye los niveles de ATP, (2) provocando la activación de la glucólisis, ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (3ab) y la producción de ATP (4ab). La activación de la glucólisis disminuye los niveles de glucosa en la célula (5) y por lo tanto incrementa la entrada de glucosa a la neurona a través del transportador GLUT3 (6), localizado en las regiones pre y postsinápticas. Por otro lado, la captura de glucosa hacia el SNC se lleva a cabo por el GLUT1, localizado en las células endoteliales que forman parte de la BHE. Los astrocitos capturan la glucosa a través de GLUT1 y mantienen su actividad a través del metabolismo oxidativo; sin embargo a diferencia de las neuronas la captura de glutamato mediado por la bomba Na^+ /glutamato activan el metabolismo oxidativo para mantener energía suficiente para convertir el glutamato a glutamina.

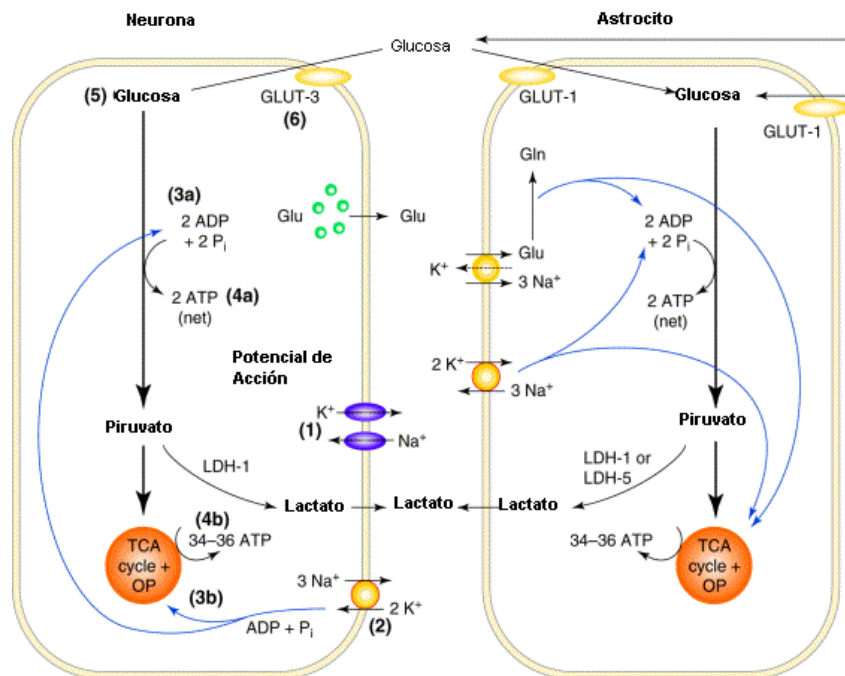


Figura 1.2. Modelo clásico del metabolismo oxidativo de la glucosa (Modificado de Ping *et al.*, 2001).

1.2.2. Descripción funcional de los transportadores de glucosa 1 y 3

El transportador de glucosa HEPG2 del eritrocito, actualmente conocido como GLUT1 se encuentra ampliamente distribuido en todos los tejidos. Sin embargo, se expresa en alta densidad en las células endoteliales que son parte de la BHE y astrocitos del SNC. Existen dos isoformas de la proteína (55 y 45 kDa), ambas son codificadas por el mismo gen; sin embargo, poseen diferentes sitios de glucosilación. Asimismo, se ha descrito que la afinidad del GLUT1 por la glucosa es menor (K_m 5 y 10 mM), comparada con GLUT3, proteína que posee una K_m de 1 a 5 mM (Duelli y Kuschinsky, 2001).

Algunos autores han propuesto que la modulación de la expresión de estos transportadores depende de la actividad metabólica neuronal (Duelli y Kuschinsky, 2001; Vannuci *et al.*, 1998). Por ejemplo, se ha demostrado que la nicotina incrementa el índice metabólico en la corteza frontal y en el núcleo accumbens, el análisis de las isoformas de GLUT1 y GLUT3 en estas estructuras mostraron un incremento en la densidad de GLUTs; mientras que la privación crónica del sistema visual disminuye moderadamente los transportadores GLUT1 y GLUT3 en estructuras relacionadas con la percepción visual. Por lo tanto, se sugiere que la densidad de estos transportadores se relaciona positivamente con la actividad neuronal (Duelli y Kuschinsky, 2001). Además, la expresión de GLUT1 y GLUT3 se correlaciona negativamente con los niveles de glucosa sanguíneos (Hou *et al.*, 2007). El estudio de Hou *et al.* (2007) señala que la hiperglucemia, inducida mediante la administración de STZ (60 mg/kg i.p) disminuye la expresión tanto del mRNA como de las proteínas GLUT1 y GLUT3 en comparación con el grupo control. En contraste, la hipoglucemia, provocada por la administración elevada de insulina en comparación con el tratamiento de STZ, provoca una regulación al alza para estos transportadores. Estos mismos autores también señalan que los cambios asociados a la alteración de los niveles de glucosa son mecanismos de

protección ya sea para evitar la neurotoxicidad provocada por hiperglucemia o para mantener constante el suministro de energía ante la hipoglucemia (Hou *et al.*, 2007). Asimismo, algunas enfermedades neurológicas modifican la expresión de GLUT1 y GLUT3; por ejemplo, en la epilepsia se observa una disminución en la expresión de transportadores GLUT1 (Xiuli *et al.*, 2005). De la misma forma, la isquemia hace evidente cambios temporales en la expresión de los GLUT1 y GLUT3 mostrando un incremento inmediato al accidente isquémico y una disminución en la expresión de los mismos después del cuarto día del evento isquémico. Además, se ha descrito que los traumas cerebrales incrementan la expresión de GLUT3 (Xiuli *et al.*, 2005).

1.2.3. Transportador de glucosa isoforma 1- 55 kDa: Vía de entrada del arsénico a la célula

Generalmente se ha aceptado que el transporte del As en las células de mamíferos se lleva a cabo a través de AQPs. El MMA^{III} se transporta a través de AQP9, proteína que se expresa principalmente en hígado y en los astrocitos. Mientras que, AQP7 se encarga del transporte de As_i^{III}, y se expresa en el hígado, tejido adiposo y testículo (Liu *et al.*, 2006). Liu *et al.* (2006) han propuesto a los GLUT1 como una vía alterna de entrada tanto del MMA^{III} como del As_i^{III} a las células. Asimismo, estudios *in vitro* han reportado que los GLUT1 expresados en *Saccharomyces cerevisiae* tiene una alta afinidad por el MMA^{III} (Km 1.2 mM) y muestran inhibición no competitiva entre la glucosa y el ácido MMA^{III} (Liu *et al.*, 2006). Se ha sugerido que el MMA^{III} y la glucosa actúan en dos sitios diferentes de la proteína debido a que la administración de fosfocolina o citocalasina B, inhibidores de la captura de glucosa a través de GLUT1, no inhiben la captura de MMA^{III} (Liu *et al.*, 2006). De igual manera, también se ha reportado la participación de los transportadores GLUT4 en el transporte de As y su importancia como vía de entrada al músculo cardíaco (Rosen y Liu, 2009). Debido a que GLUT1 es

ampliamente expresado tanto en el eritrocito como en la BHE, se ha propuesto como vía de entrada principal a estas células e incluso en el SNC se ha señalado como responsable de la neurotoxicidad mediada por As (Liu *et al.*, 2006; Rosen y Liu, 2009).

1.2.4. Transportadores de Glucosa y Procesos Cognoscitivos

Más allá de la participación de la glucosa como sustrato energético principal del cerebro. La glucosa se ha involucrado en la modulación de procesos cognoscitivos a través de las proteínas GLUTs (Messier *et al.*, 1997). Por ejemplo, Choeiri *et al.* (2005) han mostrado que la realización de una tarea de condicionamiento operante en ratas incrementa la expresión de mRNA y de la proteína de GLUT1 isoforma 45 kDa en el hipocampo dorsal. La expresión de la proteína depende del tiempo al cual se realice la evaluación. El aumento de la expresión de GLUT1 es mayor inmediatamente después de realización de la tarea que 24 h después de la realización de la misma. El incremento en la concentración de GLUT1 isoforma 45 kDa en el hipocampo dorsal se correlacionó negativamente con la latencia para alcanzar el criterio de aprendizaje de la tarea. Este incremento en los transportadores GLUT1 isoforma 45 kDa señala un mecanismo de compensación del hipocampo para sostener la demanda metabólica provocada por la ejecución de la prueba cognoscitiva (Choeiri *et al.*, 2005). Igualmente, Winocur *et al.* (2005) evaluaron la relación entre la expresión del RI y la translocación de los transportadores GLUT4 en el hipocampo de ratas Zucker *fa/fa* (estos animales son hiperfágicos, hiperlipidémicos, obesos, y presentan una mutación autonómica recesiva en el gen *fa*, que codifica para el receptor de leptina) con la ejecución de una prueba de memoria. Aunque, en este estudio no se reportó una disminución en la expresión de los RIs y GLUT4 en el compartimiento intracelular con respecto al control, sí se encontró

una disminución de GLUT4 en la membrana celular, lo cual se asoció con un mal desempeño en una prueba de memoria dependiente de hipocampo.

Algunas enfermedades neurodegenerativas como la EA también se han relacionado con una alteración en la densidad de GLUT1 y GLUT3 (Harr *et al.*, 1995, citado en Xiuli *et al.*, 2005). Mooradian *et al.* (1997), en estudios *post mortem*, encuentran una disminución en la expresión de la proteína GLUT1 isoforma 55 kDa, sin observar cambios en la concentración del mRNA en la BHE de pacientes con EA. Los estudios sobre la relación entre el déficit en la glucorregulación cerebral y los procesos cognoscitivos han demostrado que los pacientes con EA mejoran su memoria cuando los niveles de glucosa alcanzan 225 mg/dl no así en niveles de 175 mg/dl en la periferia a través de una pinza hiperglucémica, en donde se administra de manera controlada glucosa y simultáneamente insulina (Craft *et al.*, 1993 citado en Messier *et al.*, 1997).

Park (2001) sugiere que la mejora en la memoria de estos pacientes obedece a un incremento de la captura de glucosa probablemente mediada por la interacción de los RIs y los transportadores GLUT4 en el hipocampo, los cuales al activarse incrementarían la captura de glucosa permitiendo una mejor ejecución de las tareas cognoscitivas.

Insulina

1.3.1 Insulina y Sistema Nervioso Central

La insulina es una hormona polipeptídica producida por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas. La insulina es la hormona más importante que coordina el uso de glucosa en los tejidos. Sus efectos metabólicos son anabólicos, favorecen la síntesis de glucógeno, triglicéridos y proteínas. La insulina madura se compone de 51 aminoácidos dispuestos en dos cadenas polipeptídicas, designadas A y B, que están unidas por dos puentes

de disulfuro. La molécula de insulina también contiene un puente de disulfuro intramolecular entre los residuos de aminoácidos de la cadena A (Harvey y Champe, 2006).

Aunque, el cerebro ha sido considerado como un órgano insensible a la insulina, Havrankova y Roth (1978) demostraron la existencia de receptores para ésta en el cerebro. Los RI se expresan de manera diferencial a través de todo el cerebro; las zonas de mayor densidad son el plexo coroideo, bulbo olfatorio, hipotálamo, núcleo arcuato, corteza cerebelar, corteza cerebral e hipocampo (Havrankova y Roth, 1978; Zhao y Alkon, 2001; Zhao *et al.*, 2004).

La fuente principal de insulina en el cerebro proviene del páncreas, la captura de ésta dentro del SNC ocurre mediante un transportador transendotelial activo específico para la insulina que atraviesa la BHE (Baura *et al.*, 1993, citado en Park, 2001). El índice de captura de insulina es sensible a diferentes estados fisiológicos; por ejemplo, la hipoinsulinemia inducida farmacológicamente incrementa la captura de insulina dentro del cerebro (Park, 2001). Sin embargo, los resultados son contradictorios, ya que el ayuno, en donde se presentan bajos niveles de insulina, también disminuye al transportador endotelial para la insulina en la BHE (Banks, 2004). Asimismo, condiciones tales como la obesidad o los altos niveles de glucocorticoides disminuyen el transporte de insulina al SNC (Convit, 2005).

La insulina es una hormona principalmente conocida por sus efectos en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas; sin embargo, ésta ejerce una acción importante dentro del cerebro y es considerada como un factor neurotrófico en etapas tempranas del desarrollo (Zhao *et al.*, 1999, citado en Zhao *et al.*, 2004), y es un neuromodulador capaz de afectar la recaptura de algunos neurotransmisores como epinefrina y serotonina (Schulingkamp *et al.*, 2000). Además, también se ha señalado a la insulina como un factor de protección contra el daño en la memoria provocado por accidentes isquémicos (Zhao *et al.*, 2004).

1.3.2 Insulina/ Receptor de insulina: Cognición y Enfermedad de Alzheimer

La localización de los RI en diferentes áreas cerebrales sugieren que la insulina afecta una variedad de funciones desde la glucorregulación (Zhao *et al.*, 2004), ingesta de alimento (Porte *et al.*, 2000, citado en Zhao *et al.*, 2004), peso corporal (Porte *et al.*, 2000, citado en Zhao *et al.*, 2004), fertilidad y reproducción (Gerozissis, 2003, citado en Zhao *et al.*, 2004), aprendizaje (Zhao *et al.*, 2004), memoria y atención (Stockhorst *et al.*, 2004). Por ejemplo, se demostró que las ratas a las que se les administró insulina dentro del tercer ventrículo, después de la realización de una tarea de evitación pasiva, mostraron niveles mayores de retención en comparación con las que recibieron solución salina (Park, 2001). Debido a que la insulina fue administrada después de la adquisición, se piensa que la insulina participa en los procesos de consolidación de la memoria (Park, 2001).

La coadministración de insulina y glucosa ha reportado efectos positivos sobre la memoria verbal y atención selectiva en adultos mayores (Zhao *et al.*, 2004). La insulina administrada por vía intranasal ha mostrado efectos benéficos sobre la memoria declarativa (Stockhorst *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren la participación de la insulina en los procesos de memoria y son congruentes con los resultados obtenidos por Zhao *et al.* (1999), quienes reportaron que el número de RI en el hipocampo incrementó después del entrenamiento en una tarea de memoria espacial, lo que indica la plasticidad funcional que presentan estos receptores. Además, también se ha reportado que la insulina central afecta la actividad neuronal en el hipocampo, induciendo un incremento en la potenciación a largo plazo (Biessels *et al.*, 1998). La insulina también incrementa la utilización de la glucosa en la corteza entorrinal y el hipocampo (Park, 2001; Stockhorst *et al.*, 2004).

De acuerdo con Zhao *et al.* (2004), durante el aprendizaje la insulina se une a la subunidad β de su receptor activando una tirosina cinasa y subsecuentemente las vías de la transmisión GABAérgica y glutamatérgica, la vía de SHC-MAP, la vía que activa la PKC y la vía IRS/PI3K, las cuales interactúan mejorando la eficiencia sináptica, la sobrevivencia neuronal y la transcripción de genes involucrados en la memoria conduciendo a una mejor consolidación de la misma.

La insulina participa en el metabolismo de la glucosa cerebral (Havrankova y Roth, 1978). La inyección de insulina directamente en los ventrículos estimula enzimas claves de la glucólisis y del ciclo de Krebs para producir ATP y mantener un adecuado funcionamiento celular (Hoyer, 2004). La inhibición del RI conduce a algunas anomalías en el metabolismo oxidativo de la glucosa y por lo tanto, también en la función celular; a través de la disminución del eje metabólico central (Hoyer, 2004).

La activación por la insulina de los RI inicia la vía de señalización PI3K/PKB, la cual inhibe a la enzima GSK3. Esta enzima regula la producción de la proteína precursora de amiloide (APP), y los derivados de ésta, como el beta-amiloide ($A\beta$), reducen la unión de insulina al RI (Hoyer, 2004). Hoyer (2002) propone que la enzima degradadora de insulina IDE (por sus siglas en inglés, *Insulin-Degrading Enzyme*) es una de las proteínas, que degrada a la proteína $A\beta$ para evitar su acumulación y prevenir sus efectos neurotóxicos. Sin embargo, el exceso de insulina inhibe la degradación de la proteína $A\beta$. La proteína tau, componente importante de las marañas neurofibrilares, también es influenciada por GSK3. Por lo tanto, la exposición a la insulina por un período corto fosforila a la proteína tau e incrementa la actividad de la GSK3 (Hoyer, 2004). En cambio, la exposición prolongada a la insulina desinhibe la actividad de la GSK3 (Hoyer, 2004), lo que conduce a una hiperfosforilación de la proteína tau y a una

alteración del metabolismo APP, por lo que aumentan las concentraciones de A β (Hoyer, 2004).

En la EA de inicio tardío, el principal factor de riesgo es el envejecimiento, y éste, por sí mismo, se asocia con diferentes alteraciones metabólicas: decremento en la producción de ATP (Hoyer, 2004), reducción del uso de energía (Hoyer, 2004) y disminución de la acción de la insulina (Hoyer, 2002, 2004). Las anormalidades neuronales en el metabolismo de la glucosa en la EA se relacionan con una alteración en las vías de señalización del RI (Zhao *et al.*, 2004). Los pacientes con EA presentan una baja concentración de insulina en el CSF y una baja actividad en la vía PI3K del RI (Zhao *et al.*, 2004). Estas características también se observan en individuos mayores de 60 años sin EA, por lo que se consideran anormalidades asociadas a la edad más que a la enfermedad (Hoyer, 2004). Sin embargo, los pacientes con EA presentan un regulación a la alza de los RI, lo que sugiere una alteración en la cascada de señalización del RI (Hoyer, 2004). Debido a esto, Hoyer (2002) propone que la EA es un estado de DMT2 cerebral, síndrome que se caracteriza por una resistencia a la insulina periférica en tejidos como el hígado, músculo esquelético y cardíaco incrementando los niveles de la hormona en fases iniciales de la enfermedad acompañándose de una disminución gradual de la producción de la misma por las células β del páncreas (Leroith *et al.*, 2003). De tal forma, se ha mostrado que los pacientes con EA presentan algunas características de la DMT2, como hiperinsulinemia periférica (Hoyer, 2004).

2.0 Justificación

El hipocampo es una estructura central para el proceso de memoria y vulnerable al As_i por su alta capacidad de concentración de metabolitos de As_i (Sánchez-Peña *et al.*, 2010), lo que provoca un incremento en la producción de ROS y peroxidación de lípidos (Shila *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado que la administración de As_i afecta la respuesta electrofisiológica normal (Krüger *et al.*, 2007, 2009), disminuye la producción del NO, mensajero retrógrado importante para la consolidación de la memoria (Flora *et al.*, 2009), disminuye la translocación de los receptores GC (Glucocorticoides) hacia el núcleo para ejercer sus efectos sobre el genoma, y altera la estructura de los receptores NMDA del glutamato en esta estructura cerebral (Luo *et al.*, 2009; Martinez-Finley *et al.*, 2009). Por otra parte los GLUTs se expresan en el hipocampo y se han implicado en el proceso de memoria, debido sobre todo a su papel en la glucohomeostasis central (Choeri *et al.*, 2005). Por todo lo anterior, el objetivo del siguiente trabajo es evaluar el efecto de la exposición a As_i sobre la expresión del mRNA de los GLUTs y el RI en el hipocampo y contribuir con ello a explicar cómo podría el As_i alterar las funciones cognitivas.

3.0 Hipótesis

La exposición a As_i alterará la expresión del mRNA del transportador de glucosa isoformas 1 y 3 en el hipocampo.

La exposición a As_i alterará la expresión del mRNA de los receptores de insulina en el hipocampo.

La exposición a As_i alterará la ejecución de una prueba de memoria relacionada con la integridad del hipocampo.

4.0 Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la exposición al As_i en el agua de bebida sobre la expresión del mRNA de GLUT1, GLUT3 y RI en el hipocampo del ratón C57BL/6J.

4.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto del As_i sobre los niveles séricos de glucosa.
2. Evaluar el efecto de la exposición al As_i en el agua de bebida sobre la expresión del mRNA de GLUT1 y GLUT3 en el hipocampo de ratón.
3. Evaluar el efecto de la exposición al As_i en el agua de bebida sobre la expresión del mRNA de RI en el hipocampo de ratón.
4. Evaluar el patrón de distribución del As_i y sus metabolitos en el hipocampo de ratón, después de la exposición a As_i .
5. Evaluar el efecto de la exposición al As_i sobre la conducta motora.
6. Evaluar el efecto de la exposición al As_i en el desempeño de una tarea de memoria espacial.

5.0 Métodos y Materiales

5.1 Sujetos Experimentales

Se utilizaron 76 ratones macho de la cepa C57Bl/6J (35 ± 3 g) procedentes del Bioterio del Instituto de Neurobiología-UNAM y mantenidos en un ciclo invertido de luz-oscuridad de 12 h (encendido de luz- 10:00 AM) con una temperatura entre 18-23 °C. Los ratones tuvieron acceso libre al alimento (Labdiet 5001) durante el periodo de exposición a As_i . Es reconocido que la dieta de roedores contiene harina de pescado que contribuye a la presencia de arsénico orgánico, considerado no toxico, aunque puede contener trazas de As_i . La cantidad de As_T proveniente de la dieta fue de aproximadamente 0.23 mg As/kg . El grupo de 50 mg As_i/L consume diariamente entre 6.58 y 7.34 mg As/kg , considerando la fuente que proviene del agua de bebida y el alimento (Bardullas *et al.*, 2009).

Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo siguieron las regulaciones establecidas por “El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud” de la Secretaria de Salud (publicada en Enero de 1987) y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales del laboratorio”

5.2 Materiales

El arsenito de sodio fue obtenido de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA); el reactivo de diagnóstico para la determinación cuantitativa *in vitro* de glucosa en suero o plasma en sistemas fotométricos (Glucosa GOD POD) se obtuvo de *DiaSys Diagnostic Systems GmbH* (Holzheim, Alemania). Para la medición de glucosa capilar se utilizo el glucómetro Accu-Chek Performa (Roche, Alemania).

5.3. Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías con medidas repetidas en un factor, para evaluar el efecto del As_i sobre los niveles de glucosa en suero, velocidad de nado, identificación de la meta, aprendizaje espacial y actividad locomotora y prueba de tolerancia a la glucosa, seguido de un análisis *post hoc*, prueba LSD de Fisher. La prueba de memoria fue analizada mediante una prueba t de Student. La obtención del área bajo la curva de la prueba de tolerancia intraperitoneal (i.p.) a la glucosa fue obtenida mediante el método trapezoidal. Los niveles del mRNA y el análisis de los metabolitos de especies metiladas del As_i fueron evaluados mediante una prueba de U-Mann Whitney. La significancia estadística fue establecida como $p \leq 0.05$.

A) Experimento I

Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L sobre los niveles de glucosa y expresión del RI, GLUT1 y GLUT3.

A.1 Método General

Se utilizaron 30 ratones macho de la cepa C57Bl/6J (35 ± 3 g) procedentes del Bioterio del Instituto de Neurobiología-UNAM y mantenidos en un ciclo invertido de luz-oscuridad de 12 h (encendido de luz- 10:00 AM) con una temperatura entre 18-23 °C. Los ratones tuvieron acceso libre al alimento (Labdiet 5001) durante un mes de exposición a As_i. Los animales fueron divididos de manera aleatoria en una de dos condiciones experimentales: a un tratamiento control y un tratamiento de 50 mg As_i/L durante un mes. El agua de bebida con Asi fue preparada diariamente a partir de una solución con 1000 mg de Asi/L en agua desionizada y ajustada a un pH= 7 para minimizar el estado de oxidación de arsenito a arsenato. El grupo control recibió agua desionizada con pH = 7.

Al finalizar el mes del tratamiento 10 animales por grupo recibieron alimentación *ad libitum* antes de ser sacrificados, mientras que 5 animales por grupo se sometieron a privación de alimento durante 12 h previas al sacrificio. Los roedores fueron sacrificados por dislocación cervical, se colectó sangre del tronco y se extrajo el cerebro del cual se colectaron ambos hipocampos, uno de ellos fue designado para la evaluación del mRNA mientras que el otro fue utilizado para evaluar el contenido de arsenicales. El tejido que fue congelado a -70 C, hasta su utilización.

A.2 Diseño Experimental



A.3 Métodos Particulares

Determinación de glucosa sérica a partir de muestras colectadas del tronco

Las muestras de sangre fueron colectadas en hielo e inmediatamente centrifugadas a 3,500 g por 5 min. Se recuperó el sobrenadante, y se mantuvo a -20 ° C hasta su utilización. El análisis de glucosa fue realizado por triplicado, utilizando la técnica colorimétrica de glucosa GOD POD (Glucosa Oxidasa y Peroxidasa). Brevemente, se tomaron 10 µl de suero, el cual se mezcló con 1 ml de reactivo (Glucosa GOD POD), esta solución se incubó a 37 °C durante 10 min. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Kyrios-Soter Scientific, USA) a una longitud de onda de 500 nm. La concentración de glucosa se determinó usando un gráfico estándar de calibración.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Para detectar los niveles de expresión del mRNA de GLUT1, GLUT3 y RI en el hipocampo se utilizó la técnica de RT-PCR. Las muestras de hipocampo fueron homogeneizadas en 1 ml del agente de extracción de RNA Trizol (Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA). La concentración y la pureza del RNA fue determinada por la absorbancia 260/280 nm. Para la realización del cDNA se utilizó M-MLV reversa (Promega, Madison, WI, USA) y oligo dT primer (Invitrogen). Para la amplificación del cDNA se utilizaron los oligos correspondientes, los cuales fueron diseñados de acuerdo a la base de datos de NCBI y el programa Oligo version (3.0). Además, se verificó la secuencia de los oligos a partir de los productos de PCR (Ver Apéndice)

RT-PCR en tiempo real

Para el análisis cuantitativo del mRNA de GLUT1, GLUT3 y RI se usó un termociclador LightCycler™ (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind., USA). Los resultados se analizaron de acuerdo al método de $2^{-\Delta\Delta C_p}$ (Livak y Schmittgen, 2001). La β -Actina fue cuantificada como gen de referencia. La especificidad de la PCR se confirmó por análisis de curva de fusión, para asegurar la presencia de un solo producto (Ver Apéndice).

A.4 Resultados

La exposición a As_i durante un mes no produjo alteraciones en los niveles de glucosa evaluados durante la condición de sin ayuno o con ayuno de 12 h (Figura No.A.1^a y No. A.1^b).

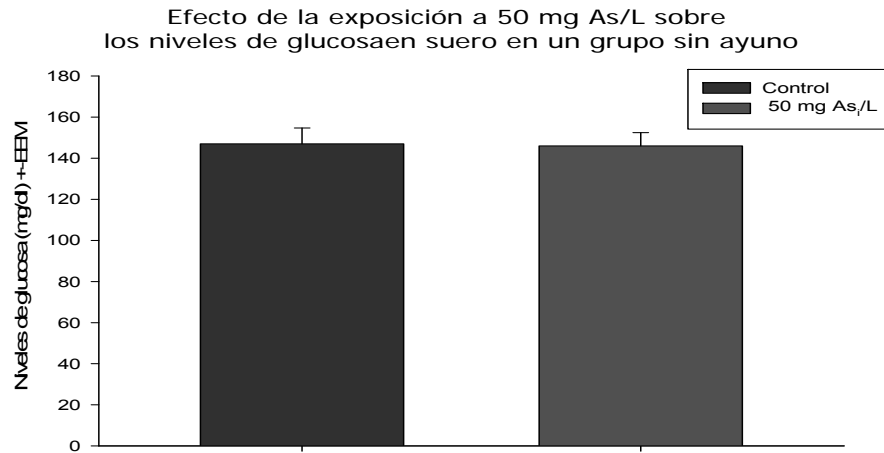


Figura A.1^a Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L durante un mes sobre los niveles de glucosa en suero (Sin ayuno n= 10).

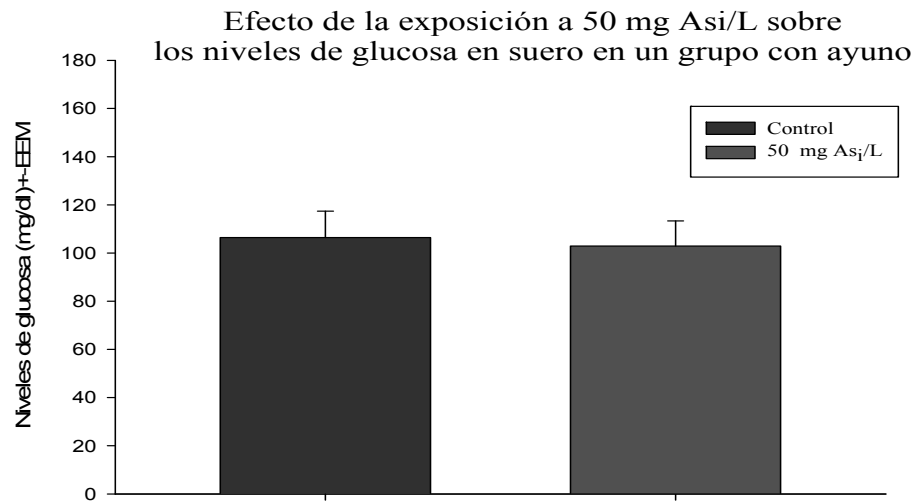


Figura A.1^b Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L durante un mes sobre los niveles de glucosa en suero (Con ayuno n= 5).

Con respecto a la expresión de los transportadores, se encontró un incremento de un 40 - 67 % la expresión del RI en el hipocampo de ratones macho de la cepa C57BL/6J

tanto en el grupo sin ayuno ($U = 4$, $p < 0.001$) como en el grupo con ayuno ($U = 10$, $p < 0.005$). Los datos fueron normalizados de acuerdo al gen de referencia β -Actina (Figura A.2).

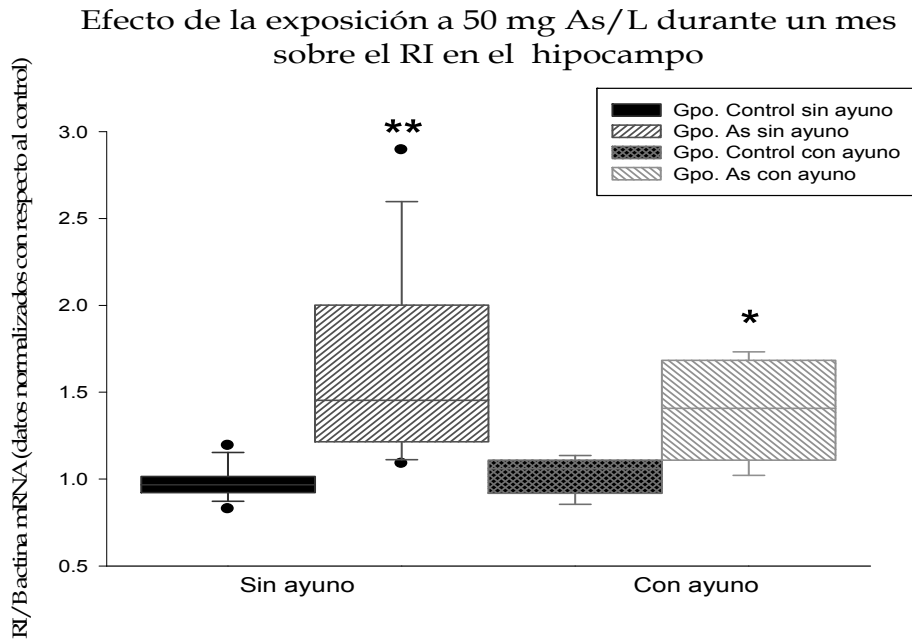


Figura A.2. Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L durante un mes sobre el RI en el hipocampo de ratones macho. Se muestra la mediana, rango intercuartil y los valores máximo y mínimo. ($n=10$ sin ayuno y $n= 5$ con ayuno). * Diferente del grupo control** $p < 0.001$, * $p < 0.005$.

La exposición a As_i produce una disminución significativa en los niveles de mRNA de GLUT3 en el grupo con alimentación *ad libitum* (67 %, $U=5$, $p < 0.001$) no así con el grupo en ayuno. Al contrario de GLUT3, el GLUT1 disminuye significativamente en el grupo en ayuno (22%, $U=31$, $p < 0.05$) mientras que en el grupo sin ayuno no se observan cambios significativos (Figuras A.3 y A.4).

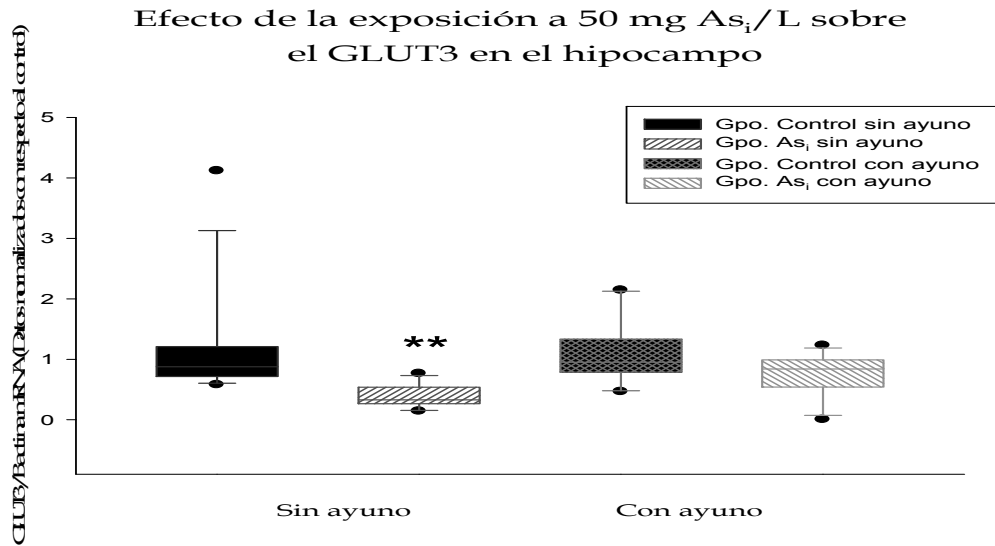
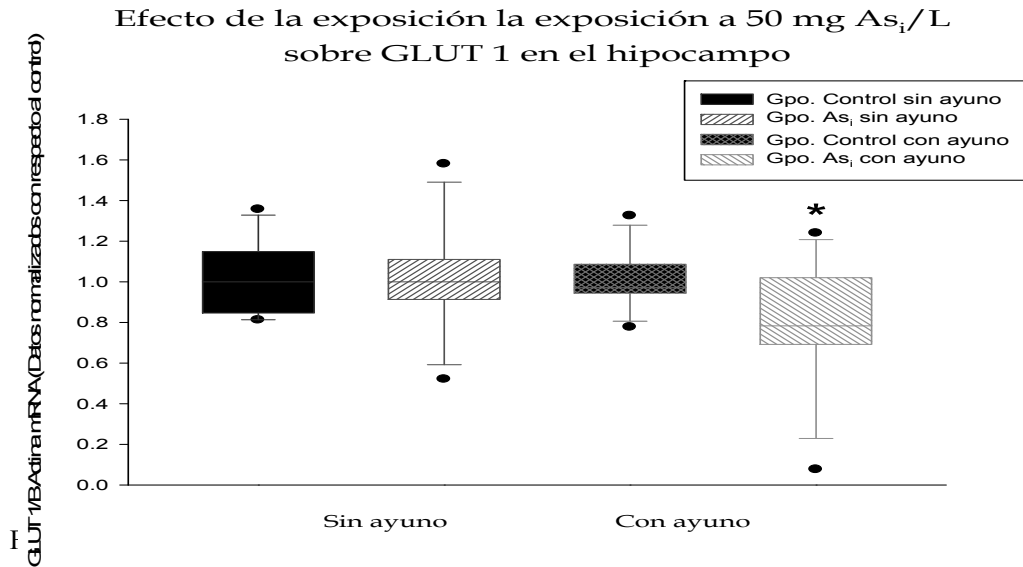


Figura. A.3. Niveles de mRNA de GLUT3 en el hipocampo de ratones macho expuestos a 50 mg As_i/L durante un mes. Se muestra la mediana, rango intercuartil y los valores máximo y mínimo. (n=10 sin ayuno y n= 5 con ayuno). * Diferente del grupo control, p < 0.001.



de GLUT1 en el hipocampo. Se muestra la mediana, rango intercuartil y los valores máximo y mínimo. (n=10 sin ayuno y n= 5 con ayuno). * Diferente del grupo control, p < 0.005.

Distribución de especies de As_i en el hipocampo

Se encontró una mayor cantidad de As_i , MMA y DMA y en consecuencia de AsT en el grupo tratado con 50 mg As_i/L sin ayuno en comparación con el grupo control ($U's=86-90$, $p < 0.05$). De la misma forma, se encontró un incremento de MMA y DMA, siendo este último el metabolito con mayor abundancia en el hipocampo del grupo expuesto a 50 mg As_i/L ($U=90$, $P<0.001$ y $U=90$, $P<0.001$) (Ver Figura A.5^a).

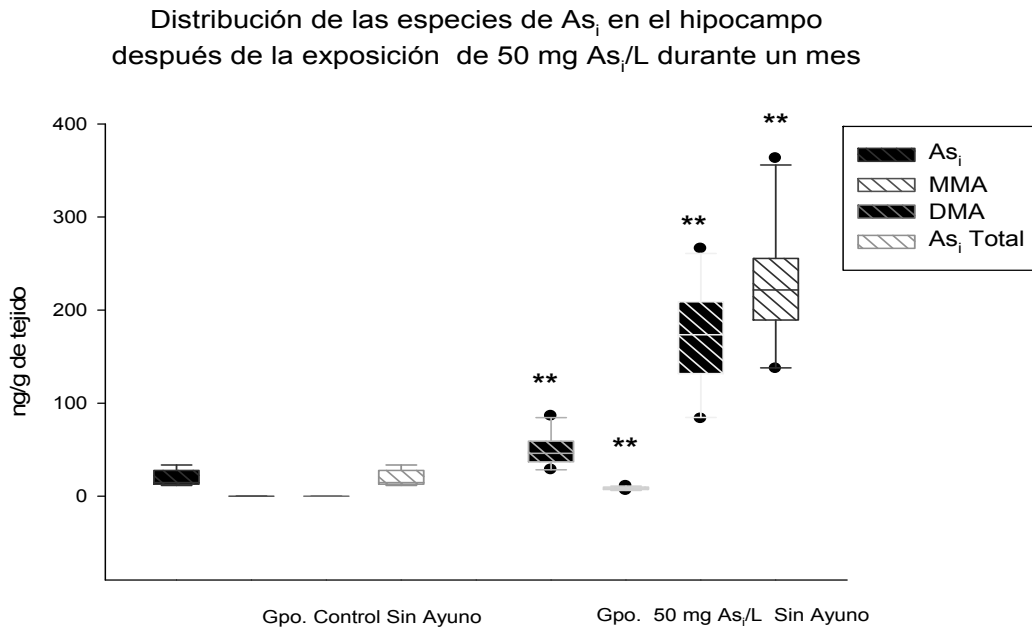


Figura A.5a Distribución de las especies de arsénico en el hipocampo de ratones expuestos durante un mes a 50 mg As_i/L en una condición **sin ayuno**. As_i , MMA, DMA y AsT ($As_i+MMA+DMA$). Se grafica la mediana, las barras representan el valor máximo y mínimo ($n=9$ grupo control sin ayuno y $n= 10$ grupo 50 mg As_i/L sin ayuno). ** $p < 0.001$

En el grupo tratado con 50 mg As_i/L con 12 h de ayuno mostró un incremento significativo en la concentración de As_i , MMA, DMA y AsT con respecto a su grupo control ($U's = 0 - 25$, $p < = 0.008$) (Figura A.5b).

Distribución de las especies del As en el hipocampo después de la exposición de 50 mg As_i/L durante un mes

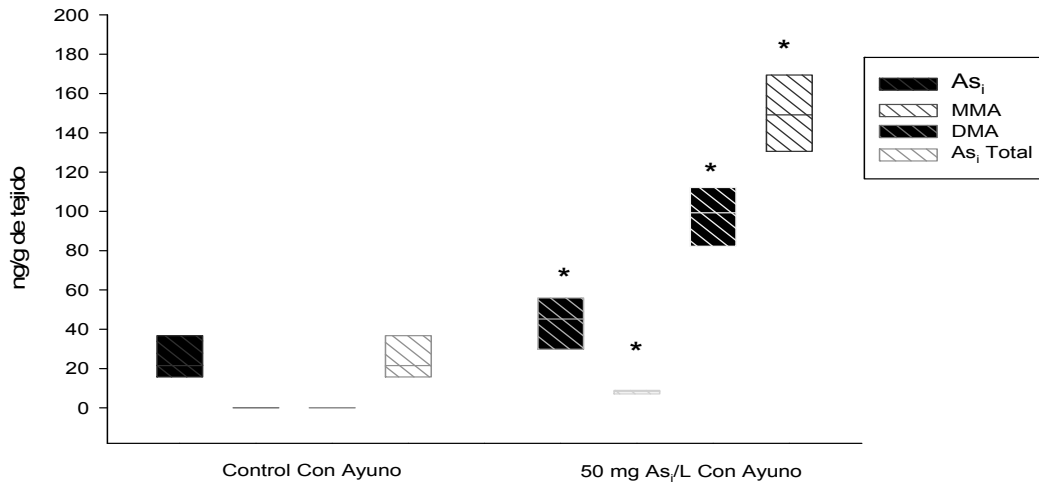


Figura A.5b Patrón de distribución de las especies de arsénico en el hipocampo de ratones expuestos durante un mes a 50 mg As_i/L en una condición con ayuno. As_i, MMA, DMA y AsT (As_i+MMA+DMA). Se grafica la mediana, las barras representan el valor máximo y mínimo (n=5 grupo control con ayuno y n= 4 grupo 50 mg As_i/L sin ayuno). , * p < 0.01.

A.5 Discusión de Resultados

Efectos del As_i sobre la expresión de mRNA de GLUT1 y GLUT3

Hasta el momento no tenemos conocimiento de reportes previos que evalúen el efecto de la exposición a As_i sobre la expresión del mRNA de GLUT1 y GLUT3 en el SNC. Este estudio muestra que la exposición de As_i de agua de bebida durante un mes disminuye la expresión del mRNA de GLUT1 y GLUT3 en el hipocampo. Dependiendo de la condición nutricional, y del estado de ayuno o alimentación.

Algunos estudios *in vitro* han mostrado que la administración de As_i incrementa la captura de glucosa, y que este mecanismo puede estar mediado por el aumento de los

GLUTs en la membrana celular (Bazuine *et al.*, 2003; Macdowell *et al.*, 1997; Widneli *et al.*, 1990). Bazuine *et al.* (2003) demostraron que la incubación de 0.5 mM de As_i durante 30 min incrementa la captura de glucosa en células adiposas 3T3-L1, acompañado de un aumento en la translocación de GLUT4 y GLUT1 del almacén intracelular citoplasmático (inactivo) hacia la membrana celular. Igualmente, Macdowell *et al.* (1997), utilizando células de músculo esquelético de rata L6, reportaron un incremento de GLUT1 y GLUT4 en la membrana plasmática, $95 \pm 35\%$ y $60 \pm 13\%$ respectivamente; mientras que, se reporta una disminución de GLUT1 y GLUT4 en el compartimento intracelular del $63 \pm 9\%$ y $77 \pm 11\%$. Asimismo, Widneli *et al.* (1990) han mostrado que la incubación con 0.2 mM As_i durante 2 h en células BHK (por sus siglas en inglés *Baby Hamster Kidney*) promueve la translocación de GLUT1 a la membrana plasmática, tres veces más comparado con las células control.

Los estudios anteriores indican que el As_i influye en la redistribución de GLUT1 y GLUT4 en la célula, pero no incrementa la cantidad de proteína total (Bazuine *et al.*, 2003; Macdowell *et al.*, 1997; Widneli *et al.*, 1990). Algunos estudios han mostrado que la translocación de GLUTs a la membrana celular también es resultado de un incremento en los niveles de glucosa, insulina y de factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 (IGF1) (Dwyer *et al.*, 2002).

En cuanto a la regulación transcripcional de los GLUTs se ha mostrado que está mediada por diferentes factores de transcripción; por ejemplo, factor inducible de hipoxia -1α (HIF-1 α), AP-1, Sp1, Sp3 y proteínas de unión al RNA hnRNP A2 (Carruthes *et al.*, 2009; Dwyer *et al.*, 2002). La regulación transcripcional de GLUT1 involucra la activación de Sp1 y represión de Sp3 durante la miogénesis (Carruthes *et al.*, 2009); mientras que, se requiere el proceso contrario para la expresión transcripcional de GLUT3 (Dweyer *et al.*, 2002). Kaltreider *et al.* (1999) han mostrado

que la administración de 1 μM de As_i en células cancerígenas de mama MDA-MB-435 disminuye la expresión de Sp1; sin embargo, 2 h después del tratamiento se incrementa la expresión de la misma. Ahora bien, Jutooru *et al.* (2010) reportaron que la exposición de trióxido de arsénico 5 μM en células cancerígenas de vejiga KU7 disminuye la expresión de Sp1 y Sp3. El incremento de AP-1 y HIF-1 α aumenta la expresión de GLUT1 y GLUT3 (Dwyer *et al.*, 2002). Algunos estudios han mostrado que la exposición de 100 μM de As_i en una línea celular de rata H4II4 incrementa los niveles de AP-1 seguida por una supresión (<30% con respecto al control) a lo largo del periodo de evaluación, 6 h. Al contrario, el tratamiento de 1 μM provoca una activación mayor y sostenida de AP-1 (Kaltreider *et al.*, 1999). También, se ha descrito que condiciones como la hipoxia y la hipoglucemia disminuyen las proteínas de unión al RNA hnRNP A2 y L, incrementando la estabilidad del mRNA y la eficiencia de la traducción de GLUT1 (Carruthes *et al.*, 2009). Quio *et al.* (1997) mostraron que la exposición a As_i incrementa la expresión de hnRNP A2 en los pulmones de mineros a expuestos a este metaloide.

Si bien se desconoce el mecanismo molecular exacto por el cual el As_i modifica la expresión del mRNA de GLUT1 y GLUT3, se ha descrito otras condiciones que modulan la expresión de estas proteínas; tales como, producción de ROS, estado de hidratación, y alteraciones en la regulación de glucosa en la periferia; por ejemplo, DMT2 (Dwyer *et al.*, 2002).

Con anterioridad, se ha descrito que la exposición a As_i genera ROS, peroxidación de lípidos y una disminución de la respuesta antioxidante en el hipocampo (Shila *et al.*, 2005). Asimismo, se ha mostrado que la producción de ROS y la peroxidación de lípidos pueden modular la expresión de GLUT3. Reagan *et al.* (2000) mostró que tanto el incremento en los niveles de glucosa generados por un estado diabético y/o un

estímulo estresor productor de ROS como los glucocorticoides aumentan la peroxidación de lípidos (HNE, 4-hidroxi-2-nonenal) e incrementan la expresión de la proteína GLUT3. Asimismo, se ha demostrado que el As_i es capaz de alterar el eje HPA, involucrado en la respuesta del estrés, y también modifica la expresión de los receptores de corticoesterona (CR por sus siglas en inglés *Corticosterone Receptor*) en el hipocampo (Martínez-Finley *et al.*, 2009).

De igual forma, se ha descrito que la deshidratación modula la expresión de GLUTs (Vannucci, *et al.*, 1994), Rodríguez *et al.* (2010) han reportado que la exposición a 50 mg As_i/L disminuye el consumo de agua significativamente. Lo cual resulta interesante ya que se ha descrito que la deshidratación puede modular la expresión de GLUT1 y GLUT3. Vannucci *et al.* (1994) reportaron que la privación de agua durante tres días disminuye la expresión de mRNA de GLUT1 y un incremento del mRNA de GLUT3 en la neurohipófisis. En cuanto al nivel de proteína se encontró un incremento de GLUT3; mientras que GLUT1 al contrario del mRNA también presentó un incremento.

Si bien en este estudio la administración de 50 mg As_i/L durante un mes no produjo diferencias significativas en los niveles de glucosa periférica con respecto al control. Se ha descrito que la administración de As_i altera el estado de glucohomeostasis periférica (Navas-Acien *et al.*, 2008). Así, estudios, realizados en roedores, han mostrado que el incremento de los niveles de glucosa en la periferia puede modular la expresión de los GLUTs en el SNC (Choeri, *et al.*, 2005; Dwyer *et al.*, 2002; Vannucci *et al.*, 1997). Vannucci *et al.* (1997) encontró que en ratones genéticamente diabéticos (db/db), los cuales desarrollan, obesidad, hiperfagia e hiperglucemia, reducen la utilización de glucosa cerebral en la décima semana de vida significativamente con respecto al control. Estos cambios se acompañan de un incremento en la expresión del mRNA de GLUT1 en la microvasculatura y en la BHE mientras que el mRNA de GLUT3 muestra

una reducción significativa en la corteza frontal. De igual forma, Choeri *et al.* (2005) en ratones $Ins2^{c96y}$ Akita, caracterizados por presentar una forma anormal de la hormona insulina, reducción en el número de células β pancreáticas, y un consecuente incremento progresivo de los niveles de glucosa periférica, reportan una disminución significativa de la proteína GLUT3 en el hipocampo dorsal, sin presentar alteraciones en el GLUT1. De igual forma, el efecto de la administración de STZ, droga citotóxica para las células β pancreáticas que incrementa los niveles de glucosa de manera aguda, disminuye GLUT1 en la microvasculatura cerebral pero no se reportan cambios en la expresión de GLUT3 (Mooradian y Morín, 1991; Simpson *et al.*, 1999 citado en Dwyer *et al.*, 2002).

El efecto que tiene la hiperglucemia sobre la expresión del mRNA o de la proteína de los GLUTs no es claro. Debe considerarse, que los resultados descritos fueron obtenidos a partir de modelos que asemejan DMT2 y DMT1 cada modelo posee una etiopatogenia particular. De tal forma, que cada una de las variables de estos modelos podría incidir sobre la expresión de GLUTs.

Aunque, el efecto del As_i sobre el contenido y secreción de la insulina en el páncreas ha sido estudiado previamente (Izquierdo-Vega *et al.*, 2006; Singh y Rana, 2009), no se tienen reportes anteriores de cómo el As_i altera en éste órgano los RI. Por otra parte, Walton *et al* 2004 y Paul *et al* 2007, han mostrado que la exposición de As_i^{III} y MMA^{III} en adipocitos afecta el RI a través de la disminución de la fosforilación PKB/Akt. Esté es el primer reporte que estudia la relación entre el RI y la exposición a As_i^{III} , en el hipocampo. Esté estudio mostró que la administración de As_i durante un mes incrementa la expresión del RI en el hipocampo. Previamente, se ha descrito que tanto la insulina como el RI están presentes en el cerebro (Park, 2000) y que el incremento en la insulina periférica se asocia con un incremento en los niveles de insulina en el líquido cerebroespinal disminuyendo la expresión de la proteína RI en el SNC (Belfiore *et al.*,

2009). Izquierdo-Vega *et al.* (2006) ha mostrado que la administración del As_i incrementa los niveles de insulina en la periferia. De igual forma, se ha descrito que los ratones NIRKO (por sus siglas en inglés *mice with a brain conditional Knockout of IR*), carentes del RI en el cerebro, presentan altos niveles de insulina en la periferia.

La proteína RI presenta dos isoformas RI-A y RI-B que se distinguen por su activación y cascada de señalización. El receptor RI-B tiene una alta afinidad por la insulina, mientras que, el receptor IR-A tiene una alta afinidad por IGF-II (por sus siglas en inglés *Insulin Grow Factor*) y participa en procesos biológicos como el cáncer y el envejecimiento. Belfiore *et al.* (2009) ha descrito que la principal isoforma del RI en el SNC es la forma RI-A, y que ésta participa en procesos de sobrevivencia neuronal, aprendizaje, memoria y regulación del consumo de alimento. La sobreexpresión del RI-A se ha relacionado con diferentes tipos de cáncer y el bloqueo de RI-A disminuye el crecimiento celular maligno.

Distribución de los metabolitos del As_i en el hipocampo

A pesar de que inicialmente la biometilación fue considerada un mecanismo de desintoxicación para el As_i , estudios posteriores mostraron que algunos de sus metabolitos son aún más tóxicos que el As_i (Petrick *et al.*, 2000; Stýblo *et al.*, 2000). De tal forma, para comprender los mecanismos de acción de este metaloide sobre cualquier tejido es indispensable conocer la acumulación de los metabolitos del As_i , que a su vez son indicadores de la vulnerabilidad específica de cada región cerebral frente al As_i (Sánchez-Peña *et al.*, 2010).

Los resultados de este estudio demuestran que el consumo de agua con 50 mg As_i/L durante un mes incrementa los niveles de As_i , MMA, DMA, AsT en el hipocampo en comparación con el grupo control tanto en la condición de ayuno y de alimentación.

Los resultados muestran el siguiente orden de concentración $AsT > DMA > As_i > MMA$ estos resultados coinciden con los estudios de Rodríguez *et al.* (2005) quienes reportaron un incremento de DMA en el cerebro de ratón dependiente de la dosis utilizada (2.5, 5 ó 10 mg As_i /kg de peso).

El origen de las especies metiladas del As_i en el cerebro no sólo son resultado de la captura de los mismos provenientes de la biotransformación en el hígado sino también del proceso de metilación del cerebro *per se*. De tal forma se ha mostrado a través de modelos *in vitro* que la aplicación de 0.1 μM de arsenito de sodio a rebanadas de tejido cerebral son capaces de generar MMA y DMA, pero no TMA (Rodríguez *et al.*, 2005). Asimismo, se ha encontrado la expresión de la proteína As3MT en diferentes estructuras cerebrales, mostrándose una mayor expresión de la proteína en áreas como, el bulbo raquídeo, hipocampo, tálamo y estriado, siendo la glándula pituitaria la región con menor expresión de As3MT. La expresión de As3MT se relaciona directamente con el patrón diferencial del metabolismo As_i entre diversas estructuras cerebrales. Con respecto a lo anterior, Shila *et al.* (2005) mostraron que existe una respuesta específica de las diversas áreas cerebrales, encontrándose una acumulación mayor de As_iT en el estriado, corteza y el hipocampo en comparación con el cerebelo. La acumulación diferencial del AsT se relaciona positivamente con un incremento en la peroxidación de lípidos siendo el hipocampo seguido de la corteza cerebral y el estriado las estructuras con una mayor peroxidación de lípidos y una disminución de las enzimas encargadas de la respuesta antioxidante (SOD, CAT, y GSH-Px), las cuales también muestran una actividad regional característica (Shila *et al.*, 2005 Bashir *et al.*, 2006). Bashir *et al.* (2006) han señalado que la administración de As_i disminuye los niveles de GSH de manera dependiente de la dosis. Se sugiere que la disminución en la concentración de los arsenicales observados en el grupo con ayuno en comparación con el grupo

alimentado, se debe a que la privación de alimento disminuyó el consumo de agua, por lo tanto, ocasionó un menor consumo de agua con As_i , resultado que se ha descrito previamente por Rodríguez *et al* (2010).

Respecto a la respuesta diferencial de las estructuras cerebrales se ha encontrado que el hipocampo, es una estructura cerebral con una alta acumulación de metabolitos de As_i , principalmente DMA. Además, es la estructura que presenta la mayor capacidad de peroxidación de lípidos acompañada de una disminución de la respuesta antioxidante, lo cual indica las bases de la vulnerabilidad de esta estructura frente a la exposición a As_i y las consecuencias negativas sobre su función, particularmente aquellas asociadas a los procesos cognoscitivos, como la memoria (Shila *et al.*, 2005).

Aunque, la técnica utilizada en este estudio no permite la conocer la distribución de especies de As_i trivalentes o pentavalentes en el hipocampo, se ha encontrado un incremento en la toxicidad de las especies metiladas trivalentes debido a la capacidad de unión de los grupos sulfhidrilos de las proteínas y su consecuente inactivación (Petrick *et al.*, 2000; Styblo *et al.*, 2000). A favor de lo anterior, se ha mostrado a través de rebanadas de hipocampo que la aplicación de DMA^{III} (1, 10 ó 100 μM) y MMA^{III} (1, 10, 25 ó 50 μM) disminuye la amplitud de fEPSP, y la amplitud de la LTP (1, 10 ó 25 μM) tanto en rebanadas provenientes de animales jóvenes como de adultos, mostrando un efecto mayor en rebanas proveniente de animales jóvenes. En contraste, no se observan cambios significativos en la amplitud de fEPSP y LTP frente la aplicación de DMA^V y MMA^V (Krüger *et al.*, 2007; 2009). Krüger *et al.* (2009) consideran que para evaluar el efecto de la aplicación de DMA^V y MMA^V sobre la actividad electrofisiológica de las rebanadas se necesita un período mayor de evaluación que el utilizado en estos experimentos.

Este estudio muestra que el As_i es capaz de modular la expresión del mRNA tanto de GLUT1 y GLUT3 como del RI en el hipocampo, aunque se desconocen los mecanismos exactos por los cuáles el As_i ejerce esta acción, debido a la importancia de GLUT1 y GLUT3 en el metabolismo de la glucosa en el SNC sugerimos que la disminución del correspondiente mRNA podría ejercer un efecto deletéreo sobre las funciones cognitivas como la memoria.

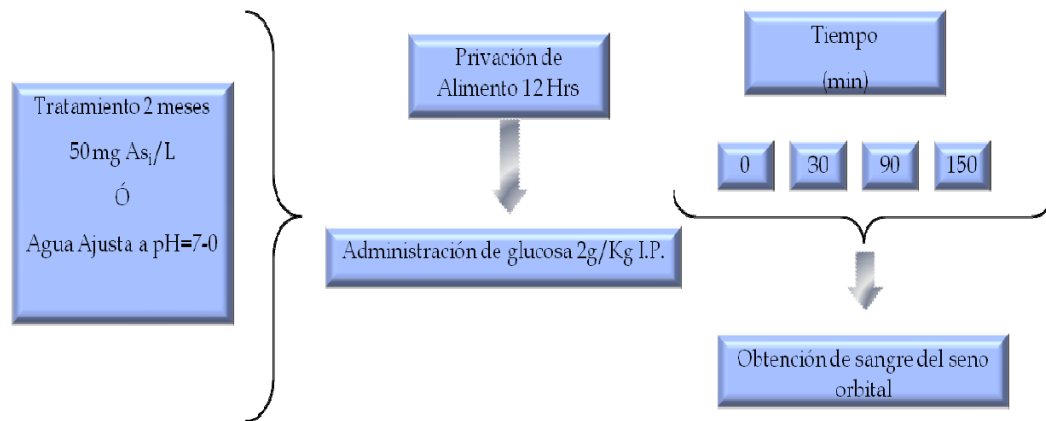
B) Experimento II

Efecto de la exposición a As_i sobre los niveles de glucosa en ayunas y sobre la tolerancia a la glucosa intraperitoneal.

B.1 Método General

Se utilizaron 24 ratones macho de la cepa C57Bl/6J (35 ± 3 g) procedentes del Bioterio del Instituto de Neurobiología-UNAM cuyas condiciones de mantenimiento fueron descritas en el Experimento I. Sin embargo, los animales fueron sometidos al tratamiento con 50 mg de As_i/L en agua desionizada ajustada a $pH=7$ durante 2 meses.

B.2 Diseño Experimental



B.3 Métodos Particulares

Evaluación de la concentración de glucosa a partir de una muestra de sangre capilar

Las muestras de sangre fueron obtenidas a través de una punción en el seno orbital del ojo del ratón con la ayuda de un capilar heparinizado. La muestra obtenida se colocó en

una tira reactiva, que contenían la enzima glucosa oxidasa, la cual al combinarse con la glucosa presente en la sangre genera ácido glucónico el cual al combinarse con ferricianida, genera ferrocianida, sustancia detectada por el glucómetro.

B.4 Resultados

La exposición a As_i no produjo efectos negativos en la condición general de salud de los ratones. No se reportan cambios significativos en cuanto al peso corporal y tampoco en la apariencia física (no se muestran los resultados).

Los resultados mostraron que el grupo expuesto a As_i mostró concentraciones de glucosa sanguínea en ayunas mayores al grupo control ($t(19) = 2.955, p < 0.01$). Además, los resultados de la curva de tolerancia a la glucosa i.p. muestran un cambio significativo de las concentraciones de glucosa a lo largo del tiempo después de la administración de glucosa [$F(3, 57) = 98.369, p < 0.0001$], sin encontrarse una interacción significativa entre los factores. Las pruebas post hoc mostraron que el grupo expuesto con As_i mostró concentraciones de glucosa elevadas 30 min después de la administración glucosa comparada con el grupo control ($t(19) = 2.539, p < 0.05$) (Figura No. B.1). Estas diferencias entre los grupos desaparecen en los 90 y 150 min después de la administración de glucosa.

Efecto de la exposición a 50 mg As_3 / L durante dos meses sobre los niveles de glucosa

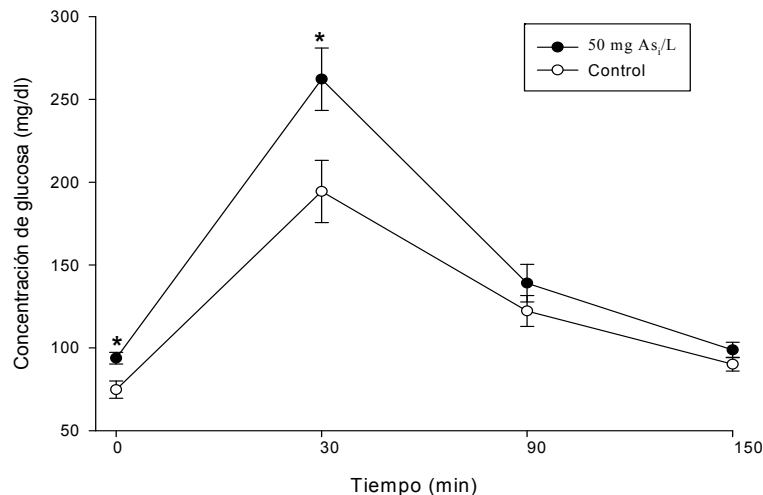


Figura B.1. Efectos de la exposición de 50 mg As_3 /L durante 2 meses sobre los niveles de glucosa capilar (n=12). * significativamente diferente del grupo control, $p < 0.05$.

B.5 Discusión de Resultados

La curva de tolerancia a la glucosa mostró un incremento estadísticamente significativo en los niveles séricos de glucosa después de la exposición a As_3 durante 2 meses específicamente en el punto basal y a los 30 min después de la administración de glucosa (2 g/kg i.p). Sin embargo, no se mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis del área bajo la curva, la cual indica la forma de depuración de la glucosa. Los resultados de este estudio coinciden con los estudios de Paul *et al.* (2007), quienes mediante una IPGTT después del consumo de agua con 25 ó 50 mg As_3 /L durante 2 meses reportaron un incremento significativo de la concentración de glucosa después de la administración i.p. de glucosa (2 g/kg de peso corporal) en el grupo tratado con As_3 con respecto los niveles basales de glucosa del grupo control. El grupo expuesto a As_3 mostró un incremento en los niveles séricos de glucosa con respecto al grupo control a los 30 y 60 min después de administrada la glucosa.

Nuestros resultados también coinciden con los reportados por Hill *et al.* (2009), quienes después de la administración única de As^V (10 ng/dl de peso i.p) en ratones hembra gestantes, reportaron un incremento estadísticamente significativo en la concentración de glucosa en todos los puntos de la IPGTT (30, 60, 90, 150 min). El pico máximo de incremento de la glucosa (30 min) se acompañó de un incremento significativo de la liberación de insulina, lo cual se entiende como un mecanismo compensatorio de las células β pancreáticas para regular los niveles de glucosa en sangre y facilitar la captura de la misma en diferentes tejidos. Sin embargo, también se ha demostrado que la DMT2 en fases iniciales presenta una liberación tardía de insulina seguida de una hipersecreción de la misma cuando se administra una IGTT (Leroith *et al.*, 2003). Este fenómeno de hipersecreción tardía podría explicar la falta de cambios en la glucemia a los 90 y 150 min después de la inyección en el grupo tratado con As_i .

Contrario a nuestro estudio, el grupo de Hill *et al.* (2009) reportó un incremento estadísticamente significativo en los niveles de glucosa a través de la prueba FPG; sin embargo, estos datos pueden deberse a factores específicos de sexo, ya que se ha encontrado que los niveles de glucosa en hembras son diferente a los machos, y varían con respecto a la dosis administrada de As_i (Rodríguez *et al.*, datos no publicados). Apoyando lo anterior, Izquierdo-Vega *et al.* (2006) reportaron que ratas, las cuales recibieron 1.7 mg As_i/L durante 3 meses mostraron incrementados los niveles de glucosa y disminuida la sensibilidad a la insulina en los tejidos. Sin embargo, otros estudios señalan un incremento de la liberación de insulina frente a la administración de dosis bajas de arsénico (Díaz- Villaseñor *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2010; Sing y Rana, 2010). Estos datos son interesantes, dado que alteraciones en la tolerancia a la glucosa son considerados como presencia de efectos pre-diabéticos y constituye un factor de riesgo importante en el desarrollo de DMT2 (LeRoith *et al.*, 2003).

Aunque, se han descrito algunos de los factores asociados al desarrollo de la DMT2 provocada por la exposición al As₃, ha sido poco estudiado el efecto de la predisposición genética en alteraciones de la tolerancia a la glucosa sobre el metabolismo del As₃. De tal forma, que la exposición a As₃ pueda convertirse en un mecanismo disparador más que el origen etiopatogénico de la DMT2 (Ettinger *et al.*, 2009). A este respecto, se ha mostrado que el metabolismo del As₃ es diferente en animales diabéticos que en animales normoglicémicos (Sing y Rana, 2009). Sing y Rana (2009) reportaron que la aplicación intermitente de trióxido de arsénico (0.4 mg/kg de peso corporal) en animales diabéticos inducidos por aloxona durante 30 días disminuyen los niveles de glucosa e incrementa la concentración de insulina en sangre en comparación con los animales sin diabetes que recibían trióxido de arsénico.

Los estudios epidemiológicos indican que el As₃ es un factor de riesgo para el desarrollo de la DMT2 (Coronado-González *et al.*, 2007; Ettinger *et al.*, 2009; Navas-Acien, 2006; Rahman *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 2000). Sin embargo, lo único claro hasta el momento es que el As₃ tiene un efecto sobre la glucohomeostasis, a través de los mecanismos de captura de glucosa, liberación de la insulina o capacidad de los tejidos para responder a la misma, y mediante las modificaciones que ejerce sobre las estructuras de las proteínas importantes para el metabolismo celular, principalmente en los grupos sulfhidrilos de las mismas.

En cuanto a la capacidad del As₃ para modular la captura de glucosa estudios *in vitro*, en células adiposas 3T3-L1 y células de músculo esquelético de rata L6, han mostrado que la administración de As₃ incrementa la captura de glucosa, de manera dosis dependiente (0.01- 1.0 mM), medida a través del método 2-deoxy-D[14C]glucosa (2-DOG) (Bazuine *et al.*, 2003; Macdowell *et al.*, 1997). La captura máxima de glucosa en estas células se obtiene a los 30 min de incubación con 0.5 mM de As₃. Sin embargo, la captura de

glucosa mediada por la administración de As_i es menor en comparación con la que se obtiene frente a la incubación con insulina (Bazuine *et al.*, 2003). Sin embargo, los resultados son contradictorios ya que también se ha descrito que la administración de As_i disminuye la captura de glucosa en células 3T3- L1, y también la translocación de GLUT4 a la membrana celular mediada por la fosforilación de PKC (Walton *et al.*, 2003).

También, se ha reportado que As_i reacciona con los grupos sulfhidrilos de la dihidrolipoamida, cofactor de las enzimas piruvato deshidrogenasa y α -cetoglutarato alterando su estructura química e inhibiendo las enzimas sensibles para el eje metabólico central (Petersen, 1955, citado en Tseng, 2004). Todo lo anterior apunta a que la exposición a As tiene varios efectos sobre diversos factores involucrados en la gluco-regulación a nivel periférico.

C) Experimento III

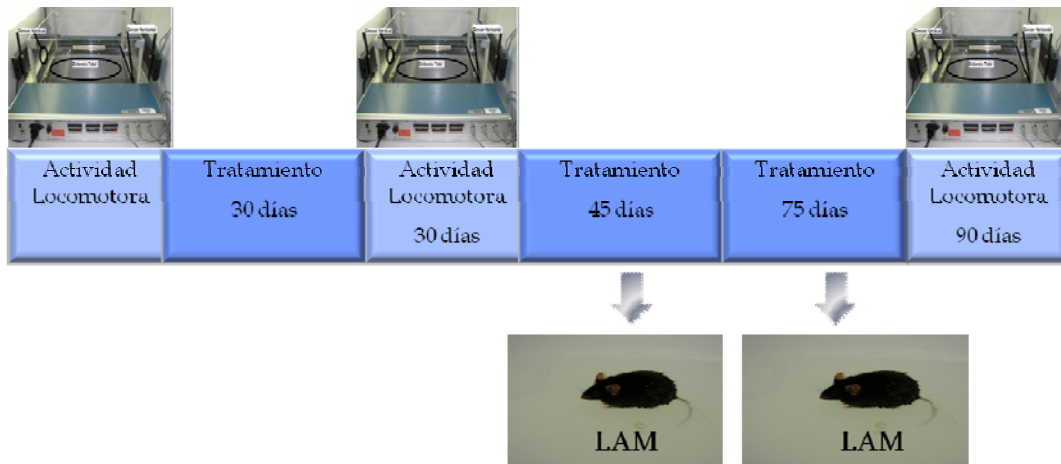
Efectos de la exposición a As_i sobre la conducta del ratón C57Bl/6J: actividad locomotora y memoria espacial.

C.1 Método General

Se utilizaron 22 ratones macho de la cepa C57Bl/6J (35 ± 3 g) procedentes del Bioterio del Instituto de Neurobiología-UNAM y mantenidos en un ciclo invertido de luz-oscuridad de 12 h (encendido de luz- 10:00 AM) con una temperatura entre 18-23 °C. Los ratones tuvieron acceso libre al alimento (Labdiet 5001) durante el periodo de exposición a As_i. Los animales fueron divididos de manera aleatoria en una de 2 condiciones experimentales: a un tratamiento control y un tratamiento de 50 mg As_i/L durante 3 meses. El agua de bebida con As_i fue preparada diariamente a partir de una solución con 1000 mg de As_i/L en agua desionizada y ajustada a un pH= 7 para minimizar el estado de oxidación de arsenito a arsenato. El grupo control recibió agua desionizada con pH ajustada a 7.0 como tratamiento.

Para analizar el efecto temporal de la exposición a As_i sobre la actividad locomotora se registró la actividad locomotora, concretamente el parámetro de distancia recorrida total, antes del tratamiento, después de un mes y de tres meses de iniciado el tratamiento. La adquisición del aprendizaje espacial y la memoria fueron evaluadas con el LAM utilizando el protocolo de plataforma escondida (Vorhees y Williams, 2006).

C.2 Diseño Experimental



C.3 Métodos Particulares

Actividad Locomotora

La actividad locomotora fue registrada con el sistema *Digiscan Animal Activity Monitor* (Omnitech Electronics, Columbus, OH). Cada ratón se colocó en una caja individual de acrílico con agua y alimento *ad libitum*. La actividad locomotora espontánea de los animales fue registrada durante 25 h. Se evaluaron cuatro parámetros de la actividad locomotora con base en estudios previos (Rodríguez *et al.*, 2002; Bardullas *et al.*, 2009), la actividad horizontal, distancia total, actividad vertical y cuentas estereotipadas. La primera hora del registro fue considerada como el período de habituación por lo que fue descartada del análisis estadístico (Ver Apéndice).

Evaluación de Funciones Cognoscitivas: Laberinto Acuático de Morris

La adquisición del aprendizaje espacial y la memoria fueron evaluadas con el LAM utilizando el protocolo de plataforma escondida. Se utilizó un laberinto circular de 120 cm de diámetro, dividido en 8 cuadrantes; norte, sur, este, oeste, sureste, suroeste, noreste y noroeste. El laberinto fue llenado de agua (19 - 22 °C) un centímetro por arriba de la

plataforma móvil de 10 x 10 centímetros de acrílico (Vorhees y Williams, 2006). El experimento tuvo lugar en una habitación con luz roja a las 12.00 h.

La tarea fue dividida en tres fases; en la primera fase se evaluó la velocidad de nado de los animales. El ratón fue colocado en un extremo del canal midiéndose el tiempo que tardó en llegar a la plataforma de escape. Se realizaron 4 ensayos consecutivos y se obtuvo el promedio de los 4 ensayos. La segunda fase, que prueba si los animales son capaces de identificar una señal visible para localizar la meta, se llevó a cabo colocando a los animales dentro del laberinto acuático, en un punto de partida aleatorio, la meta estaba señalada (mástil de 12 cm) y era colocada también de manera aleatoria. Se realizaron 4 ensayos diarios por 8 días. Se registró la latencia de escape y se obtuvo el promedio de los 4 ensayos diarios. La tercera fase evaluó la capacidad espacial del ratón tomando como referencia señales presentes en diferentes cuadrantes del laberinto. Se utilizó el mismo diseño que la fase 2s; sin embargo, en esta fase la plataforma permaneció en el mismo lugar y los animales tuvieron diferentes puntos de partida. Se realizaron 4 ensayos diarios. La prueba de memoria se realizó 48 h después de la última sesión de entrenamiento, en esta prueba la plataforma de escape fue retirada, los animales tuvieron un periodo libre de nado de 30 s para el grupo piloto y 60 s para los grupos experimentales. La prueba de memoria fue video grabada para evaluar la latencia de llegada desde el punto de partida hacia el cuadrante donde estuvo ubicada la plataforma durante las sesiones de entrenamiento y el número de cruces en ese cuadrante, como indicador del estado de memoria.

C.4 Resultados

Resultados actividad locomotora

Para evaluar la ejecución motora de los animales expuestos a 50 mg As_i/L se analizaron 4 parámetros de la actividad locomotora: actividad horizontal, actividad vertical, cuentas estereotipadas y distancia total. La evaluación basal de la conducta motora no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales, ni una interacción significativa. Solamente, se encontró un efecto significativo de tiempo en las variables analizadas; actividad horizontal ($F_{23, 437} = 12.674$, $p < 0.001$); actividad vertical ($F_{23, 276} = 2.179$, $P < 0.001$); cuentas estereotipadas ($F_{23, 437} = 10.173$, $p < 0.001$) y distancia total ($F_{23, 437} = 10.061$, $p < 0.001$). La evaluación de la ejecución motora después del primer mes de exposición de 50 mg As_i/L también mostró un efecto de tiempo en la actividad horizontal ($F_{23, 414} = 36.103$, $p < 0.0001$), actividad vertical ($F_{23, 414} = 9.820$, $p < 0.001$), cuentas estereotipadas ($F_{23, 414} = 28.332$, $p < 0.0001$) y en el parámetro de distancia total ($F_{1, 414} = 6.836$, $p = 0.0175$). No se encontró ni un efecto de grupo, ni de interacción.

El análisis de la actividad motora después de 3 meses de exposición a 50 mg As_i/L tampoco mostró diferencias entre los grupos, ni en la interacción, sino solamente un efecto de tiempo en los cuatro parámetros de evaluación; actividad horizontal [$F(23, 460) = 14.095$, $p < 0.0001$]; actividad vertical [$F(23, 460) = 1.953$, $p < 0.0055$]; cuentas estereotipadas [$F(23, 460) = 13.252$, $p < 0.001$] y distancia total [$F(23, 460) = 7.114$, $p < 0.0001$] en donde se observa una disminución de la actividad a lo largo del registro. (Figura C.1)

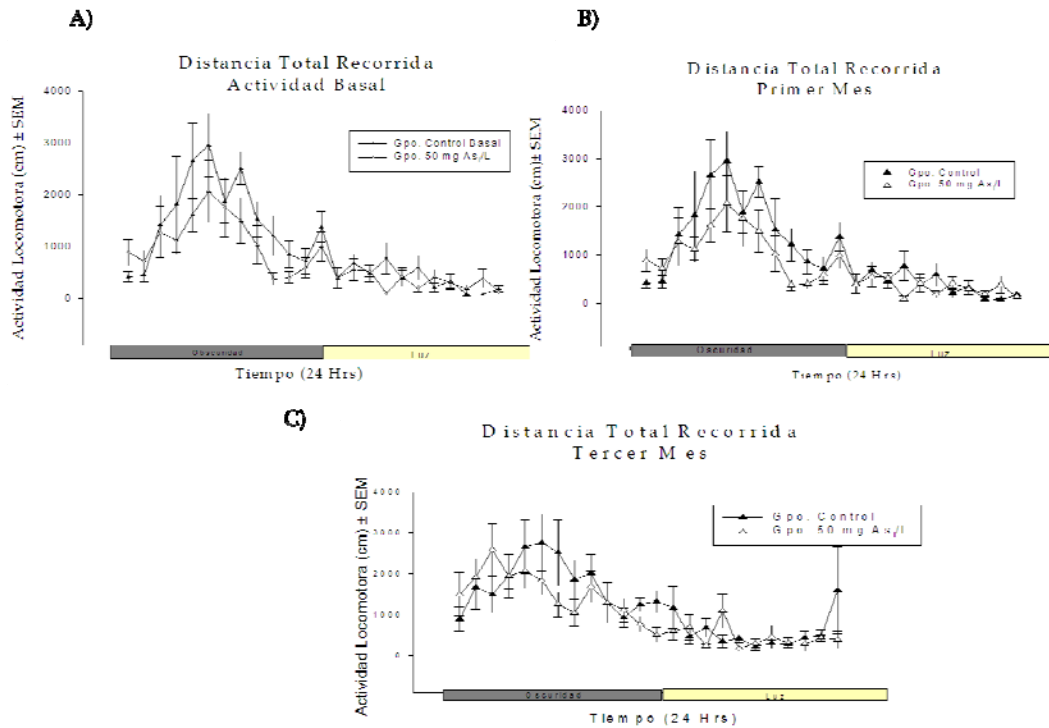


Figura C.1. Efecto del As_i sobre la actividad locomotora (distancia total) después de la exposición a 50 mg As_i/L. (A) Se muestra la actividad basal antes del tratamiento con As_i. (B) Después de un mes de tratamiento con As_i. (C) Distancia total después de tres meses de tratamiento con As_i.

Resultados LAM

A lo largo de la fase de evaluación de la velocidad de nado, tanto el grupo tratado con 50 mg As_i/L como el grupo control disminuyeron paulatinamente la latencia para alcanzar la plataforma de escape en el canal de nado [F (3, 60) = 5.57, p < 0.01] (Figura C.2). En el último ensayo la velocidad de nado del grupo control fue de 5.5 ± 5.8 se mientras que la del grupo con 50 mg As_i/L fue de 8.7 ± 11.5 s.

En la tarea de identificación de la meta tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos; ambos grupos disminuyen la latencia para alcanzar la plataforma a lo largo de los ensayos (F_{7, 140} = 5.3, p < 0.001) (Figura C.3).

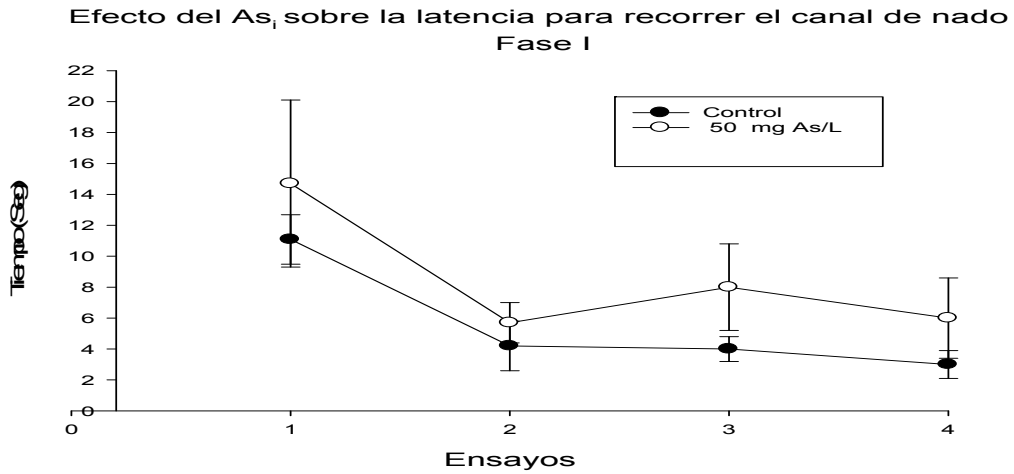


Figura. C.2. Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L durante un mes sobre la latencia para recorrer el canal de nado en los ratones macho de la cepa C57BL/6J, en 4 ensayos consecutivos. Se observa una disminución en la velocidad de nado durante los ensayos ($n= 11$ por grupo, $p < 0.01$).

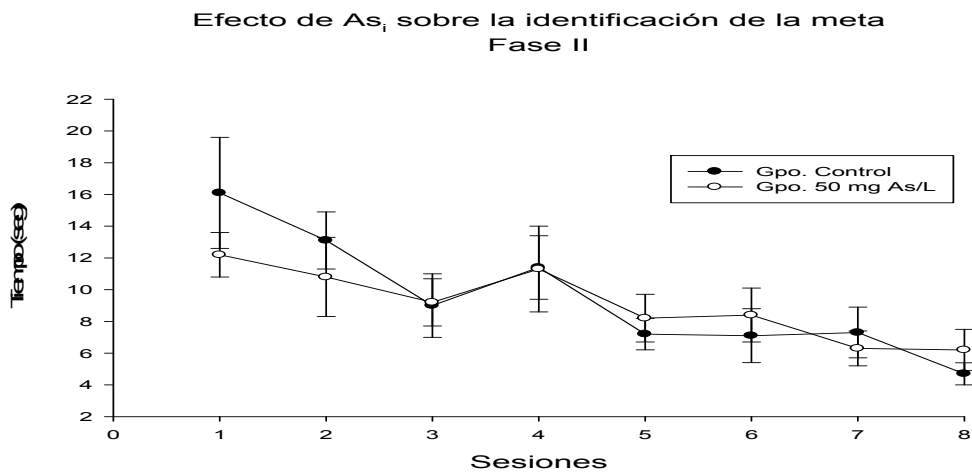


Figura C.3. Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L durante un mes sobre la identificación de una señal en los ratones macho de la cepa C57BL/6J. Se observa una disminución en la velocidad de nado durante las sesiones ($n= 11$ por grupo, $p < 0.001$).

Durante la fase de entrenamiento de la tarea espacial, el grupo tratado con 50 mg As_i/L no mostró diferencias significativas con respecto al control. Ambos grupos mostraron una disminución en la latencia para alcanzar la plataforma de escape a lo largo de los ensayos [F (5, 100) = 6.2, $p < 0.001$]. Sin embargo, en la prueba de memoria, el grupo tratado con 50 mg As_i/L muestra una mayor latencia para llegar al sitio blanco ($t(19) = 3.284$, $p < 0.01$) (Figura C.4). De la misma forma, el grupo tratado con 50 mg As_i/L muestra un menor número de cruces, en un periodo de un minuto, en el sitio blanco en comparación con el grupo control ($t(19) = -2.745$, $p < 0.05$). Ahora bien, al realizar nuevamente la prueba de memoria un mes después del último ensayo, el grupo control incrementó la latencia para encontrar la plataforma, por lo que ya no se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y tratado con As_i (Figura C.4).

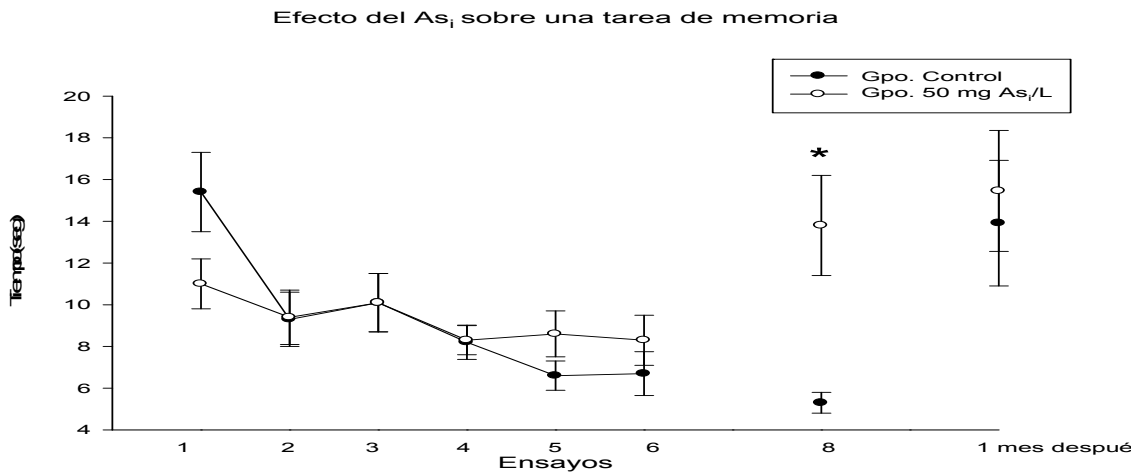


Figura C.4. Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L durante un mes sobre el aprendizaje espacial y sobre la memoria. Ambos grupos disminuyen su latencia durante las sesiones de entrenamiento; sin embargo, durante la prueba de memoria (evaluada 48 h después) los animales expuestos a 50 mg As_i/L muestran un mayor latencia ($n= 11$ por grupo, * $p < 0.01$). Esta diferencia desaparece cuando dicha prueba se realiza un mes después. La latencia que estos animales tienen 48 h después es semejante a la que tienen los animales control un mes después.

* Significativamente diferente del control, $p < 0.01$.

C.5 Discusión

Efecto del As_i sobre la memoria

La memoria y el aprendizaje son propiedades del sistema nervioso para adquirir, retener y evocar información con el fin de obtener la ventaja adaptativa de la experiencia (Bermúdez y Prado, 2001). Los resultados de este trabajo reportan que los animales expuestos a As_i durante un mes tienen una mayor latencia para alcanzar el sitio blanco en la prueba de memoria 48 h de la última sesión de entrenamiento, indicando un déficit de memoria, el cual podría involucrar la integridad del hipocampo. Esta alteración no depende de problemas motores o incapacidad de identificar señales y asociarlas con la plataforma de escape debido a que ambos grupos experimentales realizan la prueba de velocidad de nado e identificación de la meta de manera semejante. Algunos estudios han mostrado que el As_i produce efectos deletéreos sobre la memoria, los cuales han sido asociados a altos niveles de glucocorticoides periféricos y una disminución en los GR centrales, alteraciones en la subunidad NR2A del receptor NMDA del glutamato e incremento de ROS (Martinez-Finley *et al.*, 2009; Flora *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Debido a la participación que tiene el hipocampo en los procesos de memoria, esta estructura ha sido ampliamente estudiada y también se ha sugerido como estructura blanco para estudiar el substrato anatómico y electrofisiológico que subyace al déficit de la memoria. Debido a que el As_i afecta algunos mecanismos que son importantes para la memoria en los cuales se ve implicado el RI y su vía de señalización, creemos que el As_i podría estar ejerciendo sus efectos deletéreos a través de este receptor y los transportadores de glucosa.

El As_i disminuye el mRNA de GLUT1 y GLUT3 en el hipocampo por lo que sugerimos, a reserva de evaluar la proteína, que el As_i genera una disminución de la

captura de glucosa en el hipocampo y un déficit energético, el cual incide directamente sobre el desempeño cognoscitivo (Simpson *et al.*, 1997).

Debido a que se ha descrito que las alteraciones en la glucohomeostasis no solo están asociadas a la alteración de la expresión de GLUTs sino también con alteraciones en la cognición algunos estudios han evaluado el efecto de la relación entre hiperglucemia-expresión de GLUTs y funciones cognitivas (Choeri *et al.*, 2005; Vannucci *et al.*, 1997). De tal forma, Choeri *et al.* (2005) han encontrado que la hiperglucemia disminuye la expresión de la proteína GLUT3 en el hipocampo, sin presentar cambios significativos en la ejecución de una prueba de memoria. Sin embargo, estudios realizados en seres humanos, pacientes con DM2 o que padecen EA, reportan una disminución tanto de la proteína GLUT1 como GLUT3 (Liu *et al.*, 2009; Mooradian *et al.*, 1997). A este respecto, algunos estudios han descrito la exposición a As_i como un factor de riesgo para el desarrollo de la EA (Gharibzadeh y Hoseini, 2008; Gong y O'Bryan, 2010). Gharibzadeh y Hoseini (2008) reportaron que la administración de As_i favorece la activación de p38MAPK, inductor de las señales que participan en la inflamación y JNK3, proteína asociada a la fosforilación de tau y a la formación de placas neurofibrilares, marcador central de la EA.

Algunos autores han señalado la participación de RI en procesos cognoscitivos (Zhao *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2004). En este estudio se encontró un aumento de los RI en el hipocampo después de un mes del consumo de 50 mg As_i/L . Aunque se ha encontrado que la expresión del RI se asocia con un mejor desempeño en tareas de memoria (Zhao *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2004) existe evidencia que señala lo contrario. Schubert *et al.* (2004) mostró un modelo *in vivo* para estudiar la participación de RI en los procesos cognoscitivos, a través de la inactivación temporal de los RI por medio de un mRNA antisentido para RI (NIRKO). En estos ratones se elimina el 95 % de la expresión de RI,

además se reduce la fosforilación de proteínas implicadas en la vía de señalización del mismo IRS 1, PIP3, AKT y GSK3B. La baja fosforilación de GSK3B conduce a su activación promoviendo la fosforilación de la Thr 231 de la proteína tau, encargada de polimerizar a la proteína tubulina en el citoesqueleto, lo cual promueve la formación de marañas neurofibrilares, marcador de la EA. De tal forma, los ratones NIRKO poseen 3.5 veces más proteína tau fosforilada que el grupo control. El efecto de este modelo sobre la ejecución de una prueba de memoria no muestra efectos significativos. Los ratones NIRKO muestran una velocidad de nado, latencia para alcanzar la plataforma y ejecución de la prueba de memoria semejante a los controles. Debido a lo anterior, Schubert *et al.* (2004) ha sugerido que el efecto benéfico que se observa por la administración de insulina en sujetos con EA, se debe a través de su interacción con el receptor IGF 1, por el cual posee una menor afinidad. A su vez, esta sugerencia se ve apoyada por el hecho de que los animales NIRKO no modifican su metabolismo basal de glucosa, estudiado a través de la técnica de PET (Schubert *et al.* 2004).

Algunos estudios han señalado a las alteraciones del metabolismo periférico de la insulina y a las alteraciones centrales del RI como mecanismos implicados en el desarrollo de la EA (Hoyer, 2002).

Hasta el momento no tenemos conocimiento de otros estudios que evalúen el efecto del As_i sobre los receptores de insulina y los transportadores de glucosa en el SNC, por lo que este estudio pretende aportar información sobre los mecanismos implicados en algunos aspectos involucrados en el déficit de la memoria encontrado en poblaciones expuestas a As_i de manera crónica y entender cómo el As_i afecta la regulación de la glucosa en el SNC.



Figura. C.5. Posibles mecanismos implicados en el déficit cognoscitivo provocado por la exposición a As_i .

El presente estudio propone que el As_i genera déficit cognitivo debido, entre varios factores, a las alteraciones en la glucorregulación central específicamente en el hipocampo, provocados por una disminución de los GLUT1 y GLUT3. Otros factores están involucrados en el efecto deletéreo sobre la memoria; por ejemplo, incremento de estrés oxidante, alteración en los receptores NMDA y GC. Además, de una disminución del NO, mensajero retrógrado importante para la formación de LTP y alteraciones electrofisiológicas en el hipocampo. Asimismo, se considera las alteraciones de la glucorregulación periférica como un factor que puede incidir indirectamente sobre el déficit cognoscitivo.

6.0 Conclusiones

En este estudio se confirmó un incremento de las concentraciones de glucosa en la periferia después de la exposición de dos meses con 50 mg As_i/L y una intolerancia a la prueba de glucosa mediante una IPGGT; sin embargo, la exposición de 50 mg As_i/L durante un mes no mostró cambios significativos evaluados mediante una FPG. Se sugiere evaluar las concentraciones de glucosa antes del tratamiento y de manera longitudinal y periódica hasta la finalización del mismo. Si bien, el análisis del área bajo la curva indica la depuración de la glucosa del organismo, deben considerarse los factores que involucran esta acción; por ejemplo, la secreción de la insulina por las células β pancreáticas o la secreción del péptido C, péptido que se secreta junto la insulina y posee una vida media mayor en comparación con la insulina, permitiendo una mejor evaluación de la misma (Harvey y Champe, 2006). Interesantemente, se encontró un aumento en la expresión del RI en el hipocampo a consecuencia de la exposición de As_i .

Aunque no se tienen reportes previos del efecto del As_i sobre la captura de glucosa en el SNC; una forma indirecta de evaluarlo es a través de la expresión de GLUT1 y GLUT3, principales proteínas implicadas en el transporte de glucosa en el SNC. En esta investigación se encontró una disminución de la expresión del mRNA de GLUT1 y GLUT3 en el hipocampo pero no en todos los tratamientos. Por lo que se sugiere que el As_i disminuye la captura de glucosa en esta estructura. Sin embargo, es necesario evaluar la cantidad de proteína para conocer cómo el As_i influye sobre la traducción de las mismas. Asimismo, el aislamiento de la membrana plasmática permitirá evaluar el efecto del tratamiento sobre el proceso de translocación. Si bien, se ha descrito que la expresión de los GLUTs está regulada por las concentraciones de glucosa en la periferia (Dwyer *et al.*, 2002). En este estudio se desconoce si el aumento de glucosa influye

sobre la expresión del mRNA de GLUT1 y GLUT3, se considera que dicho aumento en la glucosa es una variable que puede influir en nuestros resultados, ya que se han descrito diversos factores de transcripción en donde el As_i modifica la expresión de estas proteínas (Kaltreider *et al.*, 1999).

La disminución de GLUTs 1 y 3 se ha asociado con problemas cognitivos y EA. Este estudio indica que la exposición a As_i disminuye la ejecución de una prueba de memoria. Si bien, se propone que la alteración de la memoria es producto de la disminución de la captura de glucosa mediada por GLUTs, es necesaria la evaluación de las concentraciones de glucosa en el SNC, a través de la medición de la misma ya sea en el líquido cefalorraquídeo o por medio de ensayos de captación de ¹⁴C-desoxiglucosa.

Recientemente se ha propuesto la exposición al As_i como un factor asociado en el desarrollo de la EA (Gong y O'Bryan, 2010). La presente investigación apoya esta teoría y añade información de 3 maneras; 1) la exposición a As_i incrementa los niveles de glucosa en la periferia; 2) disminuye la expresión del mRNA de GLUT1 y GLUT3, y 3) disminuye la ejecución de una tarea de memoria, todas estas características son factores asociados en el desarrollo de la EA.

7.0 Referencias

- Alquier, T., Leloup, C., Lorsignol, A y Pénicaud, L. 2006. Translocable glucose transporters in the brain. *Diabetes*, 55, 131-38.
- Aposhian , H., Zakharyan, R., Avram, M., Kopplin, M y Wollenberg, M. 2004. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198, 327-335.
- Aposhian, H y Aposhian, M. 2005. Arsenic toxicology: five questions. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 1-15.
- Arruthers, A., DeZutter, J., Gaunguly, A y Devaskar, S. 2009. Will the original glucose transporter isoform please stand up!. *American Journal Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 297, E836- E848.
- Award, N y Gagnon, M. 2002. Impact of peripheral glucoregulation on memory. *Behavioral Neuroscience*, 4, 692-702.
- Banks, W. 2004. The source of cerebral insulin. *European Journal of Pharmacology*, 490, 5-12.
- Bardullas, U., Limón-Pacheco, J., Giordano, M., Carrizales, L., Mendoza-Trejo, M y Rodríguez, VM. 2009. Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 239, 169 -177.
- Bashir, S., Sharma, Y., Isrhad, M., Gupta., D y Dogra, D. 2006. Arsenic- induced cell death in liver and brain of experimental rats. *Basic and Clinical Pharmacology*, 98, 38-43.
- Bazuine, M., Ouwens, M., Gomes de Mesquita, D y Maassen, A. 2003. Arsenite stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes involves both glut4 translocation and p38 MAPL activity. *European Journal of Biochemistry*, 270, 3891-3903.
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca., Vigneri, R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine Reviews*, 30, 586-623.

- Biessels, G., Kamal, A., Urban, I., Spruijt, B., Erkelens, W y Gispen, W. 1998. Water maze and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocine rats: effects of insulin treatment. *Brain Research*, 800, 125-135.
- Bola-Wilson, K y Bleecker, M. 1985. Neuropsychological impairment following inorganic arsenic exposure. *Journal of Occupational Medicine*, 29, 500-503.
- Calderón, J., Navarro, M., Jiménez, M., Santos, M., Golden, A., Rodríguez., Borja, V y Díaz, F. 2001. Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environmental Research*, 85, 69-75.
- Carruthers A., DeZutter, J.,Ganguly A y Devaskar, C. 2009. Will the original glucose transporters please stand up!. *American Journal Phisiology Endocrinology Metabolism*, 297,836-848.
- Craft, S. 2005. Insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease: Age- and-obesity-related effects on memory, amyloid and inflammation. *Neurobiology of Aging*, 26:65-69.
- Cheng, T., Ke, D., Guo, H. 2010. The association between arsenic exposure from drinking water and cerebrovascular disease mortality in Taiwan. *Water Research* (2010), doi:10.1016/j.watres.2010.05.040.
- Chih, P., Lipton, P y Roberts, E. Do active cerebral neurons really use lactate rather than glucose? *Trends in Neurosciences*, 24, 573-577.
- Choeri, C., Hewitt., K., Durking, J., Simard, C., Renaud y Messier, C. 2005. Longitudinal evaluation of memory performance and peripheral neuropathy in the *Ins^{2c96y} Akita* mice. *Behavioral Brain Research*, 157, 31-38.
- Choeiri, C., Staines, W., Miki, T., Seino, S y Messier, C. 2005. Glucose transporter plasticity during memory processing. *Neuroscience*, 130,591- 600.
- Convit, A. 2005. Links between cognitive impairment in insulin resistance: An explanatory model. *Neurobiology of Aging*, 26, 31-35.
- Coronado-Gonzales, J., Del Razo, L. M., García-Vargas, G., Sanmiguel-Salazar, F y Escobedo de la Peña, J. 2007. Inorganic arsenic exposure and type 2 diabetes mellitus in Mexico. *Environmental Research*, 104, 383- 89.

Cotran, S., Kumar, V y Robbins, S. 2003. Patología estructural y funcional. México. Ed. McGraw-Hill Interamericana.

Deng, Y., Li, B., Liu, Y., Iqbal, K., Grundke-Iqbal y Gomg, C. X. 2009. Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, O-GlcNAcylation, and phosphorylation of tau neurofilaments in the brain. *The American Journal of Pathology*, 175, 2089-2098.

Díaz-Villaseñor, A., Sánchez-Soto, C., Cebrián, M., Ostrosky-Wegman, P y Hiriart, M. 2006. Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic β -cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 214, 30-34.

Drobna, Z., Walton, F., Paul, D., Xing, W., Thomas, D y Styblo, M. 2010. Metabolism of Arsenic in human liver: the role of membrane transporters. *Archives of Toxicology*, 84, 31-16.

Duelli, R y Kuschinsky, W. 2006. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiology Science*, 16, 71-76.

Dwyer, D, Vannucci, S y Simpson, I. 2002. Expression, regulation, and functional role of glucose. En D. Bradley (Eds). *Glucose Metabolism in the Brain*. International Review of Neurobiology, 5. London UK: Academic Press.

Ettinger, A., Zota, A., Amarasiriwardena, C., Hopkins, M., Schwartz, J., Hu, H y Wright, O. 2009. Maternal arsenic exposure and impaired glucose tolerance during pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, 117, 1059-1064.

Flora, S., Bhatt, K y Mehta, A. 2009. Arsenic moiety in gallium arsenide is responsible for neural apoptosis and behavioral alterations in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240, 236-244.

García Chávez, E., Jiménez, I., Segura, B y Del Razo, L.M. 2006. Lipid oxidative damage and distribution of inorganic arsenic and its metabolites in the rat nervous system after arsenite exposure: Influence of alpha tocopherol supplementation. *Neurotoxicology*, 27, 102 - 131.

Gharibzadeh, S y Shahabuddin, S. 2008. Arsenic exposure may be a risk factor for Alzheimer disease. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neuroscience*, 20, 501.

Gold, S., Dziobek, L., Sweat, V., Tirsi, A., Rogers, K., Bruehl, H., Tsui, W., Richradson, S., Javier, E y Convit, A. 2007. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 4, 711- 719.

Gong, G y O'Bryan, S. 2010. The arsenic exposure hypothesis for alzheimer disease. *Alzheimer Disease Association Disorders*, 0, 1-6.

Grillo, G., Piroli, G., Hendry, R y Reagan, L. 2009. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Research*, 3, 35-45.

Harvey, A y Champe, C. 2006. *Bioquímica*. México. Ed. McGraw Hill.

Havrankova, J y Roth, J. 1978. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature*, 272, 827-829.

Hernández-Zavála, A., Drobna, Z., Styblo, M y Thomas, D. 2009. Analysis of Arsenical Metabolites in Biological Samples. *Current Protocols of Toxicology*, 42, 4.33.1-4.33.17.

Hill, D., Wlodarczyk, B., Mitchell, L y Finnell, R. 2009. Arsenate-induced maternal glucose intolerance and neural tube defects in a mouse models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 239, 29-36.

Hou, W., Yu-Xin, X., Li, Z., Hong, L., Xing-guo, H., Yu-xin, X., Ting, Y., Fu-yu, X., Ju, S., Chun-li., F., Wen-Wen y Z., Li, C. 2007. Influence of blood glucose on the expression of glucose transporter proteins 1 and 3 in the brain of diabetic rats. *Chinese Medicine*, 120, 1704-1709.

Hoyer, S. 2004. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *European Journal of Pharmacology*, 40, 115-125.

Izquierdo, J., Soto, C., Sánchez- Peña,L., De Vizcaya-Ruiz, A y Del Razo, L. 2004. Diabetogenic effects and pancreatic oxidative damage in rats subchronically exposed to arsenite. *Toxicology Letters*, 160, 135 142.

Jones, F. A. 2007. A broad view of arsenic. *Poultry Science Association*,86, 2-14.

Joss, H., Bell, G., Best, J., Birnbaum, M., Charron, M., Chen, Y., Doege, H., James, D., Lodish, H., Moley, K., Moley, J., Mueckler, M., Roger, S., Shurman, A., Seino, S y Thorens, B. 2002. Nomenclature of GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 282, 974-976.

Juárez, A., Jiménez, M., Delgado, J y Ortiz-Pérez, D. 2009. Time Course of arsenic species in the brain in the liver of mice alter oral administration of arsenate, *Archives of Toxicology*, 0378 – 0387.

Jutooru, I., Chadalapaka, G., Screevalsan, S., Lei, P., Barhoumi, R., Burghardt, R y Safe, S. 2010. Arsenic trioxide downregulates specificity protein (SP) transcription factors and inhibits bladder cancer cell and tumor growth. *Experimental Cell Research*, 316, 2174-2188.

Kahn, R y Suzuki, R. 2010. Insulin action in the brain and the pathogenesis of alzheimer disease. En S. Craft & Y. Christen (Eds.). *Diabetes, Insulin and Alzheimer's Disease*. London New York, Springer.

Kaltreider, R., Pesce, C., Ihnat, M., Lariviere, J y Hamilton, J. 1999. Differential effects of Arsenic (III) and Chromium (IV) on nuclear transcription factor binding. *Molecular Carcinogenesis*, 25, 219-229.

Krüger, K., Repges, H., Hippler, J., Hartmann, L., Hirner, A., Straub, H., Binding, N y Mußhoff, U. 2007. Effects of dimethylarsinic and methylarsinous acid on evoked synaptic potentials in hippocampal slices of young and adult rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225, 40–46.

Krüger, K., Straub, H., Hirner, A., Hippler, J., Binding, N y Mußhoff, U. 2009. Effects of monomethylarsonic and monomethylarsonous acid on evoked synaptic potentials in hippocampal slices of adult and young rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236, 115-123.

Leroith, D., Taylor, I y Olefsky, M, 2003. *Diabetes mellitus. Fundamentos clínicos*. México: McGraw Hill.

- Lewis, D., Southwick, L., Ouellet-Hellstrom, R., Rensch, J y Calderon, R. Drinking water arsenic in Utah: a cohort mortality study. *Environmental Health Perspectives*, 107: 359-65.
- Leloup, C., Arluison, M., Kassis, N., Lapetit, N., Cartier, N., Ferré, P y Pénicaud, L. 1996. Discrete brain areas express the insulin-responsive glucose transporter GLUT 4. *Molecular Brain Research*, 38, 45-53.
- Li, Q., Chen, H., Huang, X y Costa, M. 2006. Effects of 12 metal ion son iron regulatory protein 1 (IRO) and hypoxia-inducible factor- 1 alpha (HIF-1 α) and HIF-regulated genes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 213, 245-255.
- Li, Y., Lui, F., Iqbal, I., Iqbal, K y Xing, C. 2009. Brain glucose transporters, O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau and Alzheimer disease. *Journal of Neurochemistry*, 111, 242-249.
- Liu, Z., Sanchez, M., Jiang, X., Goles, E., Landfear, S y Rosen, B. 2006. Mammalian glucose permease GLUT1 facilities transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid. *Biochemistry Biophysic Research Community*, 15, 424-430.
- Luo, J., Qiu, Z., Shu, W., Zhang, Y., Zhang, L y Chen, J. 2009. Effects of arsenic exposure from drinking water on spatial memory, ultrastructures and NMDAR gene expression of hippocampus in rats. *Toxicology Letters*, 184, 121-125.
- Livak, K y Schmittgen, T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2 (Delta Delta C (T)) method. *Methods*, 25, 402-408.
- Martínez Finley, E., Ali, A y Allan, A. 2009. Learning deficits in C57BL/6J mice following perinatal arsenic exposure: Consequence of lower corticosterone receptor levels?. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 94, 271-277
- McEwen, B y Reagan, L. 2004. Glucose transporters expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *European Journal of Pharmacology*, 490, 13-24.
- Messier, C. 2004. Glucose improvement of memory: a review. *European Journal of Pharmacology*, 490, 33-57. Messier, C., Gagnon, M., Knott, V. 1997. Effect of glucose

and peripheral glucose. Regulation on memory in the elderly. *Neurobiology of Aging*, 18, 297-304.

Mcdowell, H., Walker, T., Hajduch, E., Cristie, G., Batty, I y Downes, P. 1997. Inositol Phospholipid 3-Kinase is activated by cellular stress but is not required for the stress-induced activation of glucose transport in L6 rat skeletal muscle cell. *European Journal of Biochemistry*, 247, 306-313.

Morton, W y Caron, G. 1989. Encephalopathy: An Uncommon manifestation of workplace arsenic poisoning?. *American Journal of Industrial Medicine*, 15, 1-5.

Mooradian, A., Chung, C y Shah, N. 1997. GLUT 1 expression in the brain of patients with Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, 18, 469-474.

Nagaraja, T y Desiraju, T. 1994. Effects on operant learning and brain acetylcholine esterase activity in rats following chronic inorganic arsenic intake. *Human Exposure Toxicology*, 13, 353-366.

Navas-Acien, A., Silbergeld, E., Streeter, R., Clark, J., Burke, T y Guallar E. 2006. Arsenic exposure and type 2: a systematic review of the experimental and epidemiological evidence. *Environmental Health Perspective*, 114, 641-648.

Park, C. 2001. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 25, 311-323.

Paul, D., Hernández-Zavala, A, Walton, F., Adair, B., Dedina, J., Matousek, T y Stýblo, M. 2007. Examination of the effects of arsenic on glucose homeostasis in cell culture and animal studies: Development of a mouse model for arsenic – induced diabetes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222 305-314.

Paul, D., Harmon, A., Devesa, D., Thomas, D y Styblo, M. 2007. Molecular Mechanisms of the Diabetogenic Effects of Arsenic: Inhibition of Insulin Signaling by Arsenite and Methylarsonous Acid. *Environmental health Perspectives*

Peters, R. 1995. Biochemistry of some toxic agents. I. Present state of knowledge of biochemical lesions induced by trivalent arsenical poisoning. *Bull. Johns Hopkins Hospital*. 97, 1 –20.

- Petrick, J., Ayala-Fierro, F., Cullen, W., Carter, D y Aposhian, H. 2000. Monomethylarsonous acid (MMA III) is more toxic than arsenite in cultured human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 163, 203-207.
- Piroli, G., Grillo, C., Reznikov, L., Adams, S., McEwen, B., Charron, M y Reagan, L. 2007. Corticosterone impairs insulin-stimulated translocation of GLUT4 in rat hippocampus. *Neuroendocrinology*, 85, 71-80.
- Quao, L., Tockman, M., Erozan, Y., Yao, S., Barret, M., Zhou, W., Giffen, C., Luo, X y Taylor, R. 1997. A case- cohort study of an early biomarker of lung cancer in a screening cohort of Yunnan tin miners in China. *Cancer Epidemiological Biomarkers Preview*, 6, 893-900.
- Rahman, M., Tondel, M., Ahmad, S y Axelson, O. 1998. Diabetes Mellitus Associated with Arsenic Exposure in Bangladesh. *Journal of Epidemiology University School of Hygiene and Public Health*, 148
- Reagan, L., Magariños, A., Yee, D., Swezda, L., Van Bueren, A., McCall, A y McEwen, B. 2000. Oxidative stress and HNE conjugation of GLUT 3 are increased in the hippocampus of diabetic rats subject to stress. *Brain Research*, 862, 292-300.
- Rodriguez, V., Carrizales, L., Jiménez-Capdeville, M., Dufour, L y Giordano, M. 2001. The effects of sodium arsenite exposure on behavioural parameters in the rat. *Brain Research Bulletin*, 55, 301–308.
- Rodriguez, V., Carriakes, L., Mendoza, M., Fajardo, O y Giordano, M. 2002. Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *Neurotoxicology and Teratology*, 24, 743-750.
- Rodríguez, V., Del Razo, L., Limón-Pacheco, J., Giordano, M., Sánchez-Peña, L., Uribe-Querol, E., Gutiérrez-Ospina, G y Gonsébat, M. 2005. Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicological Science*, 84, 157-166.
- Rodríguez, V., Limón-Pacheco, J., Carrizales, L., Mendoza-Trejo, S y Giordano G. 2010. Chronic exposure to low levels of inorganic arsenic causes alterations in

locomotor activity and in the expression of dopaminergic and antioxidant systems in the albino rat. *Neurotoxicology and Teratology*, 32, 640-647.

Rosado, J., Ronquillo, D., Kordas, K., Rojas, O., Alatorre, J., Lopez, P., Garcia- Vargas, G., Caamaño, M., Cebrián, M y Stoltzfus, R. 2007. Arsenic exposure and cognitive performance in Mexican schoolchildren. *Environmental Health Perspective*, 115: 1371-1375.

Rosen, B y Liu, Z. 2009. Transport pathway for arsenic and selenium: A minireview. *Environmental International*, 35, 512-515.

Sánchez-Peña, L., Petrosyan, P., Morales, M., Gonzáles, N., Gutiérrez-Ospina, G., Del Razo, L.M. y Gonsébat, M. 2010. Arsenic species, AS3MT amount, and AS3MT gen expression in different regions of mouse exposed to arsenite. *Environmental Research*, 110, 428-434.

Schulingkamp, S., Pagano, T., Hung, D y Raffa, R. 2000. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24, 855-872.

Scoville, B y Milner, B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*, 20, 11-21.

Shila, S., Kokilavini, V., Subathra, M y Panneerselvam, C. 2005. Brain regional responses in antioxidant systems to α -lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology*, 210, 25-36.

Singh, N y Rana, S. 2009. Effect of insulin on Arsenic Toxicity in Diabetic Rats-Liver Function Studies. *Biology Trace Elements Research*, 19, 215-226.

Shubert, M., Gautam, D., Surjo, D., Veki, K., Baudler, S., Schubert, D., Kondo, T., Albert, J., Galldiks, N., Küstermann, E., Arnds, S., Jacobs, A., Krone, W., Kahn, C y Brüning, J. 2004. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 3100-3105.

Smith, A. 2000. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization*, 78: 1093-1113.

- Stockhorst, U., de Fries, D., Steingrueber, H y Scherbaum, W. 2004. Inulin and the CNS: effects on food intake , memory, and endocrine parameters and the role of intranasal administration in humans. *Physiology Behavior*, 83, 47-54.
- Styblo, M., Del Razo L.M., Vega, L., Germolec, D., LeCluyse, E., Hamilton, G., Reed, W., Wang, C., Cullen, W y Thomas, D. 2000. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Archives of Toxicology*, 74, 289-299.
- Tsai, S., Chou, H., The, H., Chen, C y Chen, C. 2003. The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence. *Neurotoxicology*, 24: 747-753.
- Tseng, C. 2004. The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197, 67-83.
- Thomas, D. 2007. Molecular process in cellular arsenic metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 222, 365-373.
- Thomas, D., Li, J., Water, S., Xing, W., Adair, B., Drobna,Z., Devesa, V y Styblo, M. 2007. Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and methylation of arsenicals. *Experimental Biology and Medicine*, 232, 3-13..
- Vahter, M. 2002. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 181, 211-217.
- Vannucci, S., Maher, F.,Koehler, E y Simpson, I.1994. Altered expression of GLUT-1 and GLUT-3 glucose transporters in neurohypophysis of water-deprived or diabetic rats. *American Journal Physiology*, 267, 605-611.
- Vannucci, S., Gibbs, M y Simpson, I. 1997. Glucose utilization and glucose transporters proteínas GLUT 1 and GLUT 3 in brains of diabetic (db/db) mice. *American Journal Physiology*, 272, E267-E274.
- Vannucci, J., Koehler, E., Reynolds, T., Clark, R y Simpon, I. 1998. GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effects of diabetes. *Brain Research*, 797, 1-11.
- Vorhees, C y Williams, M. 2006. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1, 848-858.

- Wang, Li, S., Piao, F., Hong, Y., Liu, P y Zhao, Y. 2009. Arsenic-down-regulates the expression of CamK4, an important gene related to cerebellar LTD in mice. *Neurotoxicology and Teratology*, 31, 318-322.
- Walton, F., Harmon, A., Paul, D., Drobna, Z., Patel, Y y Styblo, M. 2004. Inhibition of insulin-dependent glucose uptake by trivalent arsenicals: possible mechanism of arsenic-induced diabetes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198: 424– 433.
- Wasserman, G., Liu, X., Parves, F., Ahsan, H., Factor-Litvak, P., Kline, J., van Geen, A., Slavkovich, V, Loiacono, N., Levy, D., Cheng, Z y Graziano, J. 2004. Water arsenic exposure and children's intellectual function in Araihasar, Bangladesh. *Environmental Health Perspectives*, 112: 1329-1333.
- Widnel, C., Baldwin, S., Davis, I., Martin, L y Pasternaki, A. 1990. Cellular stress induces a redistribution of the glucose transporter. *The FASEB Journal*, 4, 1634-1637.
- Winocur, G., Greenwood, C., Piroli, G., Grillo, C., Reznikov, L., Reagan, L y McEwen, B. 2005. Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behavioral Neuroscience*, 119, 1389-1395.
- Wu, T y Chang, L. 2003. Prevalence of non-insulin-dependent diabetes mellitus and related vascular diseases in southwestern arseniasis-endemic and nonendemic areas in Taiwan. *Environmental Health Perspectives*, 111, 155-159.
- Xiuli, G., Meiyu, G y Guanhua, D. 2005. Glucose transporters 1. Distribution in the brain and in neural disorders. Its relationship with transport of neuroactive drugs trough the blood brain barrier. *Biochemical Genetics*, 43,175-187.
- Yang, D., Liang, C., Jin, Y y Wang, D. 2003. Effect of arsenic toxicity on morphology and viability of enzyme in primary culture of rat hippocampal neurons. *Journal of Hygiene Research*, 32:309-312.
- Zhao, W y Alkon, D. 2001. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 177, 125-134.

Zhao, W., Chen, H., Quon, J y Alkon, D. 2004. Insulin and insulin receptor in experimental models of learning and memory. *European Journal of Pharmacology*, 490, 71-81.

Zhao, W., Chen, H., Xu, H., Moore, E., Meiri, N., Quon, M y Alkon, D. 1999. Brain insulin receptors and special memory. *The Journal of Biological Chemistry*, 49, 34893-34902.

8. 0 Índice de Figuras

Página

Figura 1.1	Modelo conceptual de la metilación del As_i mediado por $As3MT$	8
Figura 1.2	Modelo clásico del metabolismo oxidativo de la glucosa	16
Figura A.1 ^a	Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L durante un mes sobre los niveles de glucosa en suero en un grupo sin ayuno	32
Figura A.1 ^b	Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L durante un mes sobre los niveles de glucosa en suero en un grupo con ayuno	32
Figura A.2	Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L durante un mes sobre el RI en el hipocampo de ratones macho	33
Figura A.3	Niveles de mRNA de GLUT3 en el hipocampo de ratones macho expuestos a 50 mg As_i/L durante un mes	34
Figura A. 4	Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L durante un mes sobre los niveles de mRNA de GLUT1 en el hipocampo	34
Figura A.5 ^a	Acumulación de las especies de arsénico en el hipocampo de ratones expuestos durante un mes a 50 mg As_i/L en una condición sin ayuno	35
Figura A,5 ^b	Acumulación de las especies de arsénico en el hipocampo de ratones expuestos durante un mes a 50 mg As_i/L en una condición con ayuno	36
Figura B.1	Efectos de la exposición de 50 mg As_i/L durante dos meses sobre los niveles de glucosa sérica	47
Figura C.1	Efecto del As_i sobre la actividad locomotora (distancia total) después de la exposición a 50 mg As_i/L	55
Figura. C.2	Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L durante un mes sobre la velocidad de nado en los ratones macho de la cepa C57BL/6J	56
Figura C.3	Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L durante un mes sobre la identificación de una señal en los ratones macho de la cepa C57BL/6J	56
Figura C.4	Efecto de la exposición a 50 mg As_i/L durante un mes sobre el aprendizaje espacial y sobre la memoria	57
Figura C.5	Mecanismos implicados en el déficit cognoscitivo provocado por As_i	61

9.0. Índice de Tablas

		Página
Tabla 1	Efecto del As _i sobre la memoria (estudios <i>in vivo</i>)	14
Tabla 2	Información de los oligos y de los parámetros del PCR	80
Tabla 3	Protocolo para la tarea de identificación de la meta	82
Tabla 4	Protocolo de Entrenamiento	83

10.0 Apéndice

Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La técnica de RT-PCR se usó para detectar los niveles de expresión del *RI* y de los GLUTs en el hipocampo. Brevemente, las muestras de hipocampo fueron homogeneizadas en 1 ml del agente de extracción de RNA Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La concentración y la pureza del RNA fue determinada a una absorbancia 260/280 nm. La integridad del RNA fue verificada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.0 %. Para la obtención del cDNA se utilizó M-MLV reversa (Promega, Madison, WI, USA) y oligo dT primer (Invitrogen). Para la amplificación del cDNA se utilizaron los oligos correspondientes, los cuales fueron diseñados de acuerdo a la base de datos de NCBI y el programa Oligo versión (3.0) (ver Tabla 2). Los parámetros que se indicaron en el termociclador (LightCycler TM (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind., USA) fueron 25 ciclos de las siguientes condiciones: desnaturalización 94 °C por 30 segundos, alineamiento 60 °C por 30 segundos, elongación 72 °C por 30 segundos. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis al 1.5 % de agarosa y se visualizaron en un transiluminador UV (BioRad, Hercules, CA, USA). Las imágenes fueron capturadas por analizador de imágenes Kodak ID versión 3.6 (Rochester, NY, USA).

RT-PCR en tiempo real

Para el análisis cuantitativo de mRNA del *RI* y los GLUTs 1, 3 y 4 se usó un termociclador LightCycler TM (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind., USA). El cDNA se preparó como se mencionó previamente para la RT-PCR. Durante la PCR los productos fueron detectados en la fase de elongación usando el reactivo Platinum SYBR

green Mix (Invitrogen). Para cada reacción se usaron 6 μ l Platinum SYBR green, 1 μ l de 500 nM de oligo sentido y antisentido, 3 μ l de albumina de suero bovino no acetilada, 0.5 μ l de $MgCl_2$ y 3 μ l del cDNA diluido 1:10 y 1.2 para la evaluación de GLUT1 y 3. La reacción se llevó a cabo con las siguientes condiciones: un ciclo a 95 °C por 2 min (reacción de incubación), seguido de 55 ciclos de 95 °C durante 1 segundo, 61 °C por 8 segundos y 72 °C durante 10 segundos. Los resultados se analizaron de acuerdo al método de $2^{-\Delta\Delta C_p}$ (Livak y Schmittgen, 2001). La proteína β - actina fue cuantificada como gen de referencia. La especificidad de la PCR se confirmó por análisis de curva de fusión, para asegurar la presencia de un solo producto y por análisis en geles de agarosa para verificar el peso molecular. Los geles fueron visualizados con un transiluminador de luz UV (BioRad, Hercules, CA, USA).

Tabla. 2 Información de los oligos y de los parámetros del PCR

Nombre	Secuencia de primers (sentido/antisentido)	Ciclos	Producto
<i>glut 1</i>	5'AAAGAAGAGGGTCGGCAGAT 3'	25	264 pb
	5'TCCAGCTCGCCTCTACAACAA3'		
<i>glut 3</i>	5'TCAGGAAAGACCAAGGAAGC 3'	25	212 pb
	5'ATCAAGTGAGGAGGGGGTCT 3'		
<i>Ri</i>	5'GCAACTGTTCGGAACCTGAT 3'	35	221 pb
	5'CTCGGGGATGCACTTATTGT 3'		

Análisis de arsenicales en tejido.

Se realizó la determinación del patrón de especies arsenicales As_i, MMA y DMA en muestras de hipocampo. Previo al análisis de la muestra, esta fue digerida a 80 oC durante 6 h con 3 ml de ácido fosfórico suprapuro. La separación de los arsenicales se realizó por medio de una criotrampa y la detección de las correspondientes arsinas por generación de hidruros con detección en un espectrofotómetro de absorción atómica, método descrito por Hernández Zavala *et al* (2009). Como parte del aseguramiento de la calidad en el análisis de arsenicales, se contaron con estándares certificados de arsénico en orina que ofrece el Centro de Toxicología de Québec.

Actividad Locomotora

La actividad locomotora fue registrada a través del sistema *Digiscan Animal Activity Monitor* (Omnitech Electronics, Columbus, OH, USA), el cual posee detectores infrarrojos horizontales y verticales, los cuales están acoplados a un sistema computacional que registra y almacena la información generada. Los animales fueron colocados individualmente en cajas de acrílico con agua y alimento *ad libitum* y fueron registrados durante 25 h. Se evaluaron cuatro parámetros de la actividad locomotora en base a estudios previos (Rodríguez *et al.*, 2002; Bardullas *et al.*, 2009).

Actividad horizontal: se define como el número de interrupciones que detecta el sensor horizontal de la caja de registro en un periodo de tiempo determinado

Actividad vertical: definida con el número de interrupciones registradas en el sensor vertical de la caja.

Distancia total: es la distancia recorrida total medida en cm y que es un indicador de la actividad ambulatoria.

Cuentas estereotipadas: definidas como el número de veces que se interrumpe un conjunto de sensores de manera repetitiva en un periodo de tiempo determinado

El registro se llevo a cabo durante 25 h y fue dividido en un ciclo de luz/obscuridad. La primera hora del registro fue considerada como el período de habituación por lo que fue descartada del análisis estadístico.

Laberinto Acuático de Morris

La adquisición del aprendizaje espacial y la memoria fue evaluada a través del LAM utilizando el protocolo de plataforma escondida (Vorhees y Williams, 2006).

La tarea fue dividida en tres fases; en la **primera fase**, velocidad de nado, se utilizó un canal de nado de acrílico (15 x 244 cm) lleno de agua (22 °C) con una plataforma de entrada y otra de salida. El ratón se colocó en un extremo del canal midiéndose el tiempo que tardó en llegar a la plataforma de escape. Se realizaron cuatro ensayos consecutivos y se obtuvo el promedio de los cuatro ensayos.

La **segunda fase**, identificación de la meta se realizó en un laberinto circular de 120 cm de diámetro, dividido en ocho cuadrantes; norte, sur, este, oeste, sureste, suroeste, noreste y noroeste. El laberinto fue llenado de agua (19 - 22 °C) un centímetro por arriba de la plataforma móvil (10 x 10 centímetros de acrílico). En esta fase se utilizó un mástil azul de 12 centímetros sobre la plataforma, como señal de identificación de la meta. La plataforma de escape y el punto de partida del ratón cambiaron aleatoriamente durante cada ensayo. Se realizaron cuatro ensayos diarios espaciados por cinco u ocho días. Se registró la latencia de escape y se obtuvo el promedio de los cuatro ensayos por días.

Tabla. 3. Protocolo para la tarea de identificación de la meta

Día de Ensayo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
1	N- SE	E-NE	S-SO	O-SE
2	S-NE	N-NO	O-NE	E-SE
4	O-NO	S-SE	E-SO	O-NS
5	N-NE	S-NO	E-NO	O-SO
6	S-NE	O-SO	E-SO	N-NE

N - norte, S- sur, E- este, O- oeste. NO- noroeste, NE- noreste, SE-sureste, SO-suroeste. La primea letra indica el punto de inicio mientras que las letras seguidas del guion indican la posición de la meta.

La **tercera fase** evaluó la capacidad de ubicación del ratón en base a señales espaciales. Se utilizó el mismo diseño que la fase dos; sin embargo, en esta fase la plataforma permaneció en el mismo lugar y los animales tuvieron diferentes puntos de partida. Se realizaron cuatro ensayos diarios espaciados por cinco min durante seis días. La prueba de memoria se realizó 48 h después de la última sesión de entrenamiento, en esta prueba la plataforma de escape fue retirada, los animales tuvieron periodo libre de nado de 60 segundos. La realización de la prueba de memoria fue video grabada para evaluar la latencia del punto de partida hacia el cuadrante en donde se encontraba la plataforma y el número de cruces en el cuadrante blanco, como indicador del estado de memoria.

Tabla 4. Protocolo de entrenamiento

Día	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
1	N	E	SE	NO
2	SE	N	NO	E
3	NO	SE	E	N
4	E	NO	N	SE
5	N	SE	E	NO
6 Prueba	NE			

N - norte, NO- noroeste, NE- noreste, S- sur, SE-sureste, E- este y O- oeste.

