



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TÍTULO DEL PROYECTO:

“EFECTO DE LA EXPOSICIÓN GESTACIONAL A ARSÉNICO INORGÁNICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS (L-GLUTAMATO/CISTINA Y CISTEÍNA) Y DEL RECEPTOR NMDA EN CEREBRO DE RATÓN”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. LUCIO ANTONIO RAMOS CHÁVEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. MA. EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COTUTORES DE TESIS:

DRA. MA. DE LOURDES MASSIEU TRIGO
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR- DIV. NEUROCIENCIAS

DR. J. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2016.



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de febrero del 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **RAMOS CHÁVEZ LUCIO ANTONIO** con número de cuenta **511020881** con la tesis titulada **"Efecto de la exposición gestacional a arsénico inorgánico sobre la expresión de transportadores de aminoácidos (L-glutamato/cistina y cisteína) y del receptor NMDA en cerebro de ratón"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**:

Presidente: Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
Vocal: Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Secretario: Dra. María de Lourdes Massieu Trigo
Suplente: Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade
Suplente: Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de abril del 2016.

M. del Coro Arizmendi Arriaga

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

A las instituciones:

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México; por la administración, orientación y apoyo durante el Doctorado.

Al Consejo Nacional de ciencia y Tecnología (CONACyT); por la beca de manutención con número **211718**, que me fue otorgada para la realización de esta tesis de Doctorado.

Este proyecto contó con financiamiento de DGAPA-PAPIIT IN207611, CONACyT 102287, Red Temática en Salud Ambiental Infantil, CONACyT 251229 otorgado a MEG.

A la UNAM a través PAEP por el apoyo recibido durante la formación del Doctorado en Ciencias.

A mi tutor principal:

Dra Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte del Depto. de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto del IIB-UNAM; por todo el apoyo, la dedicación y las enseñanzas durante la realización del proyecto de tesis de Doctorado.

A los cotutores de tesis:

Dra. Ma. de Lourdes Massieu Trigo y Dr. J. Javier Espinosa Aguirre; por las sugerencias, el seguimiento y la revisión del proyecto de tesis de Doctorado.

Al jurado de tesis:

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez, Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dra. Ma de Lourdes Massieu Trigo, Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade y Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez; por la revisión, comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar el escrito de la tesis de Doctorado.

Por su apoyo y enseñanza:

Dr. Pavel Petrosyan; por toda la ayuda técnica y el apoyo experimental del proyecto.

Dra. Luz María del Razo y M. en C. Luz de Carmen Sánchez Peña; por la colaboración en las mediciones de los niveles de arsénico y sus especies y por las aportaciones en la escritura del artículo.

Dra. Angélica Zepeda y Psic. Andrea Aguilar Arredondo; por la ayuda con el equipo y la asesoría en las pruebas de memoria espacial.

A la M. en C. Irma Daniela Silva Adaya y Dr. Miguel Tapia Rodríguez, por el apoyo técnico en la realización de las inmunofluorescencias.

Dr. Víctor Daniel Garzón Cortés, y especialmente a la MVZ. Georgina Díaz Herrera, y MVZ. Jorge Omar García Rebollar, de la Unidad de Modelos Biológicos, por toda la disposición y facilidades brindadas.

Dra. Julieta Rubio; por todas los cuestionamientos, dudas y correcciones en los seminarios de grupo.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Isabel Chávez Ruíz y Lucio Ramos Maldonado; por enseñarme a creer en mí y por los valores que me inculcaron desde niño, siempre estaré eternamente agradecido, por ser el hombre que soy, ¡Los amo!

A mis hermanos:

Patricia, Roxana Grisel, y Rubén; por el apoyo moral de siempre y por estar pendiente de mí, porque parte de mi triunfo es de ustedes, siempre están en mi mente, ¡los amo hermanos!

A mis sobrinos:

Diego, Fernando, Miguel, Ángel, Rubén, Guadalupe, Ximena, y Sherlyn; por el cariño, las sonrisas y las travesuras, por los momentos que me han regalado, ¡su tío que los ama!

A mis amigos:

Carla, Daniela y Pavel; por ser incondicionales, por la felicidad compartida de llegar a cerrar un ciclo tan importante llamado Doctorado. ¡Los amo simios!

A mis amigos de laboratorio; Wendy, Nidia, Cesar, Celeste, Christian, Ángel, Jorge, Christina, Janikua, Gerardo, Efraín y Fernanda, por los momentos compartidos y toda la ayuda brindada. ¡Gracias!

A Mariana, Sabina, Eli y Abril por el tiempo en casa, por tolerar mis fiestas y por escucharme y compartir mis frustraciones. ¡Gracias chicas!

A mis amigos entrañables; Omar, Oscar y chicos del INCAN, por el cariño, los consejos, las aventuras y el tiempo compartido.

Esta tesis la dedico a mi querido y entrañable primo Jesús Chávez Vázquez, por la infancia juntos, por la alegría y los bonitos recuerdos, por ese abrazo cálido que siempre recordaré. Por la felicidad compartida de estudiar un doctorado en la UNAM. Siempre estarás en mi mente y corazón. ¡Te amo mi Chuy!

ÍNDICE

	Pág.
Índice de figuras.....	1
Índice de cuadros.....	2
Resumen.....	3
Abstract.....	4
Abreviaturas.....	5
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Arsénico en agua “un problema de salud pública mundial”.....	7
1.2. Efectos en salud por exposición a iAs.....	9
1.3. Metabolismo de iAs.....	9
1.4. Exposición gestacional a iAs.....	11
1.5. Mecanismo neurotóxico del iAs.....	13
1.5.1. Alteraciones celulares del SNC y periférico por exposición a iAs.....	15
1.6. Estrés oxidante y gestación.....	15
1.7. Síntesis de GSH en el SNC.....	17
1.8. Transportadores asociados a la síntesis de GSH “L-Glu,L-Cys, L-Cys2”	
1.8.1. LAT1.....	18
1.8.2. EAAC1 y Transportadores de L-Glutamato (GLAST, GLT1).....	19
1.8.3. Sistema XC-.....	21
1.9. Receptor N-metil de Aspartato y comunicación celular.....	23
1.9.1. Aspectos patológicos del L-Glu-NMDA durante el neurodesarrollo.....	25
1.9.2. Expresión de las subunidades del NMDAR durante el neurodesarrollo.....	26
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
3. HIPÓTESIS.....	29
4. OBJETIVOS.....	30
5. MÉTODOS	
5.1. Animales y tratamientos.....	31
5.2. Obtención del tejido y Western blots	33
5.3. Inmunofluorescencia	34
5.4. Determinación de GSH y GSSG por o-ftalaldehído.....	34
5.5. Medición As y sus especies por espectrometría de absorción atómica.....	35
5.6. Evaluación de la memoria espacial	

5.6.1. Tarea de reconocimiento de lugar de objeto.....	35
5.6.2. Laberinto de agua de Morris.....	36
5.7. Análisis estadístico.....	38
6. RESULTADOS	
6.1. Exposición a iAs.....	39
6.2. Especies de As en orina de hembras gestantes, en cerebro completo en el 1 DPN y regiones en el 15 DPN de progenie expuesta gestacionalmente a iAs.....	42
6.3. Efecto de la exposición gestacional a iAs sobre los niveles de GSH y GSSG en cerebro completo en el 1 DPN, y en corteza e hipocampo de ratones de 15 DPN.....	42
6.4. Cambios en los niveles de GSH inducidos por iAs se ven acompañados con aumento en la expresión de los transportadores xCT, EAAC1 y LAT1 y modulación en la expresión de las subunidades del NMDAR en regiones cerebrales.....	43
6.5. La exposición gestacional a arsénico altera la ejecución de la tareas de reconocimiento de lugar de objeto y laberinto de agua de Morris “memoria espacial”	47
7. DISCUSIÓN.....	51
8. CONCLUSIÓN.....	57
9. PERSPECTIVAS.....	58
10. BIBLIOGRAFÍA.....	59
11. ANEXOS	
11.1. Químicos y anticuerpos.....	76
11.2. Artículo publicado.....	77

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Esquema de metilación oxidativa del iAs ³⁺	10
Figura 2. Ciclo cisteína/glutamato entre astrocitos y neuronas	20
Figura 3. Modelo de la entrada de L-Cys ² , L-Cys y exporte de L-Glu en células del SNC.....	22
Figura 4. Representación esquemática de la exposición a 20 mg/L (ppm) de iAs vía agua de bebida	32
Figura 5. Peso de ratones control y expuestos a As 30 días previos a la cruce.....	39
Figura 6. Peso de ratón hembra control y expuestos a iAs durante la gestación.....	40
Figura 7. Ingesta de agua y especies de As en orina y tejido cerebral.....	41
Figura 8. Niveles de GSH y GSSG en cerebro y regiones de ratón en el 1 y 15 DPN	43
Figura 9. Expresión de transportadores de cistina/glutamato y cisteína en ratón control y gestacionalmente expuesto en el día 1 DPN.....	44
Figura 10. Expresión de transportadores de cistina/cisteína y glutamato en ratón control y gestacionalmente expuesto en el 15 DPN	46
Figura 11. Expresión de transportadores de cistina/glutamato, cisteína y glutamato en hipocampo de ratón macho en el 90 DPN.....	47
Figura 12. Expresión de transportadores de cistina/glutamato, cisteína y glutamato en hipocampo de ratón hembra en el 90 DPN	48
Figura 13. Efecto de la exposición a iAs sobre la memoria de trabajo espacial en pruebas de reconocimiento de lugar en ratón macho y hembra de 90 DPN.....	49
Figura 14. Efecto de la exposición a iAs sobre la memoria espacial en el laberinto de agua de Morris en ratón macho y hembra de 90 DPN.....	50
Figura 15. Representación esquemática del efecto de la exposición gestacional a 20 mg/mL de iAs en los transportadores y receptores a L-Glu en cerebro de ratón en el 1, 15 y 90 DPN.....	58

Índice de cuadros

	Pág.
Cuadro 1. Niveles límites de iAs en agua de uso humano en diversos lugares del mundo.....	8
Cuadro 2. Población expuesta a iAs por la dieta (alimento y/o agua de bebida) en diversos lugares del mundo.....	8
Cuadro 3. Cuadrante de entrada al laberinto de agua de Morris durante los cinco días de entrenamiento	38
Cuadro 4. Días de término de la gestación, peso, signos de toxicidad agua y distribución de sexos en progenie expuesta a iAs.....	40
Cuadro 5. Anticuerpos primarios usados en western blot e inmunofluorescencias, secundarios, proteínas de carga y marcadores de peso molecular.....	76

Resumen

El arsénico inorgánico (iAs) es un importante contaminante natural. A nivel global, millones de personas ingieren agua con altos niveles de iAs. La exposición crónica a iAs se ha asociado con un menor coeficiente intelectual y problemas de aprendizaje, así como deterioro de la memoria, especialmente en niños. El iAs se mono y di metila en el sistema nervioso central (SNC). La metilación del iAs requiere glutatión reducido (GSH), principal antioxidante en el SNC. En humanos, iAs y sus especies cruzan la placenta y se han determinado en tejido embrionario, lo que sugiere exposición del feto durante la gestación. La síntesis celular del GSH está limitada por la disponibilidad del aminoácido cisteína, el cual es internalizado por transportadores como xCT, EAAC1 y LAT1. Para investigar los efectos de la exposición a iAs durante la gestación se expusieron ratones CD1 a 20 mg/L de iAs por un mes para luego cruzarlos. Se valoró el daño oxidante (GSH y GSSG), la expresión de transportadores relacionados con la síntesis de GSH y el transporte y la toxicidad de L-Glutamato, como xCT, EAAC1, LAT1, GLAST y GLT1, así como subunidades NR2A y NR2B del receptor a L-Glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR). Las hembras continuaron con la exposición durante la gestación y la progenie fue sacrificada en el 1, 15 y 90 día postnatal (DPN). En el día 90 DPN, se llevaron a cabo pruebas de localización de espacial de objeto y de laberinto de agua, con el fin de analizar la posible correlación entre la exposición a iAs con las deficiencias en memoria. La exposición gestacional a iAs en el 1 DPN aumentó la expresión de los transportadores de cisteína, cistina/glutamato en cerebro completo, así como en la corteza y el hipocampo en el 15 DPN, e indujo una modulación negativa de la subunidad NR2B del NMDAR en el hipocampo. Las tarea de conducta mostraron disminución significativa de la memoria espacial en los ratones machos adultos, mientras que el efecto fue observable en las hembras en el laberinto de agua de Morris. En resumen la exposición gestacional a iAs genera cambios en GSH, una respuesta positiva en los transportadores de L-glutamato/cistina y cisteína, así como cambios en la expresión de los transportadores de recaptura y receptores a L-glutamato, estos cambios podrían comprometer la función cerebral en la adultez.

Abstract

Inorganic arsenic (iAs) is an important natural pollutant. Millions of individuals worldwide drink water with high levels of iAs. Chronic exposure to iAs has been associated with lower IQ and learning disabilities as well as memory impairment, especially in children. iAs is methylated in tissues such as the brain, generating mono and dimethylated species. iAs methylation requires cellular glutathione (GSH), which is the main antioxidant in the central nervous system. In humans, As species cross the placenta and are found in cord blood, suggesting fetal exposure during pregnancy. A CD1 mouse model was used to investigate effects of gestational iAs exposure to 20 mg/L which can lead to oxidative damage, disrupted cysteine/glutamate transport and its putative impact in learning and memory. On postnatal days (PNDs) 1, 15 and 90, the expression of membrane transporters related to GSH synthesis, glutamate transport and toxicity, such as xCT, EAAC1, GLAST and GLT1, as well as LAT1, were analyzed. Also, the expression of the glutamate receptor N-methyl-D-aspartate (NMDAR) subunits NR2A and B as well as the presence of As species in cortex and hippocampus were investigated. Also, during PND 90, behavioral tests were performed. Gestational exposure to iAs affected the expression of cysteine/glutamate transporters in cortex and hippocampus and induced a negative modulation of NMDAR NR2B subunit in the hippocampus. Behavioral tasks showed significant spatial memory impairment in males while the effect was observed in females in Morris water maze. In summary gestational exposure to iAs triggers changes in GSH, a positive response in the L-glutamate/cysteine and cysteine transport as well as changes in the expression of recapture transporters and the L-glutamate receptors, these alterations observed could compromise brain function in adulthood.

Abreviaturas

AQ9, acuaporina 9

As, arsénico

As III, arsenito

As IV, arsenato

AS3MT, arsénico-3-metiltransferasa

iAs, arsénico inorgánico

orgAs, arsénico orgánico

Ap1, proteína activadora 1

BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro

cdk5, cinasa dependiente de ciclina 5

CREB, proteína de unión a elementos en respuesta a cAMP

CyS, cistina

CySS, cisteína

DAPK1, proteína cinasa 1 asociada a muerte

DMA, dimetil arsénico

DPN, día postnatal

EAAT, transportador de aminoácidos excitadores

EAAC1, acarreador de aminoácidos excitadores de tipo 1

Egr1, proteína 1 de respuesta al crecimiento temprano

GABA_A, receptor de ácido γ -aminobutírico A

GLAST, transportador de aspartato glutamato

GLT1, transportador 1 de glutamato glial

Glu, glutamato

GPx, glutatión peroxidasa

GRx, glutatión reductasa

GSH, glutatión reducido

GSSG, glutatión oxidado
 γ -GluCys, γ -glutamilcisteína
IGF-2, factor-2 de crecimiento parecido a la insulina
LAT1, transportador de aminoácidos neutros sodio-independiente
L-Cys, L-cisteína
L-Cys2, L-cistina
L-Glu, L-glutamato
L-Gly, L-glicina
LTD, depresión a largo plazo
LTP, potenciación a largo plazo
MAP2, proteína 2 asociada a microfilamentos
MAZ, proteína asociada a C-Myc
MMA, mono metil arsénico
NfkB, factor nuclear κ B
Nrf2, factor relacionado al factor nuclear eritroide-2
NMDA, N-metil-D-Aspartato
OMS, Organización Mundial de la Salud
PTEN, homólogo de tensina y fosfatasa
REST, factor de transcripción silenciador RE1
ROS, especies reactivas del oxígeno
SAM, S-adenosilmetionina
SNC, sistema nervioso central
SSA, secretaria de salud
SOD, superóxido dismutasa
TMA, trimetil arsénico
 xC^- , transportador de aminoácidos aniónicos
4f2hc, cadena pesada del antígeno de superficie celular 4F2

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El Arsénico en agua “un problema de salud pública mundial”

El iAs contaminante natural

El Arsénico (As), es un elemento químico que puede llegar a ser un contaminante de origen natural, clasificado como un metaloide (semi-metal), altamente tóxico, que está presente en el suelo, aire y agua, pero que actividades humanas como la minería, fundición de minerales y uso de compuestos químicos que contienen As propician un aumento importante en su nivel ambiental. El As puede existir en forma tanto inorgánica (iAs) como orgánica (orgAs), siendo las formas inorgánicas las comúnmente encontradas en la naturaleza. Dependiendo de las condiciones del medio el As puede existir con valencia 3- (gas arsina), 0 (As elemental), 3+ (AsIII, arsenito), 5+ (AsV, arsenato). Las formas trivalentes son las que presentan mayor citotoxicidad. La toxicidad del arsénico se ha establecido en el siguiente orden: arsina > As+3 inorgánico > As+3 orgánico > As+5 inorgánico > As+5 orgánico > compuestos arsenicales y arsénico elemental. En condiciones con alto contenido de oxígeno la forma que prevalece es la 5+, mientras que en condiciones reductoras o poco oxigenadas las 3+. El As es usado en plaguicidas, dispositivos electrónicos y en medicina como agente quimioterapéutico (ATSDR, 2007). De manera natural el iAs se encuentra en rocas ígneas asociado a minerales, de donde es liberado por lixiviación, por lo que la geoquímica del lugar condiciona el nivel del metaloide.

El agua contaminada con iAs es la fuente de exposición humana con importancia epidemiológica. Por ello a nivel internacional se han establecido normativas para limitar su presencia en fuentes de agua de ingesta humana. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2004, estimó como segura la concentración límite de 10 µg de As/L de agua, una condición que varía en el mundo (**Cuadro 1**). En México la SSA estableció como seguros para uso humano hasta 25 µg de iAs/L de agua (NOM-127-SSA1-1994). Se ha documentado que poblaciones humanas han estado expuestas crónicamente al metaloide a diferentes concentraciones de iAs en agua (**Cuadro 2**). La presencia del iAs no se limita a una sola región geográfica, encontrándose en países de tercer y primer mundo, que incluye a lugares como:

Argentina, Chile, China, Finlandia, Hungría, Japón, India, México, Pakistán, Tailandia, Taiwán, Estados Unidos y Canadá, por lo que constituye un problema de salud pública a nivel mundial.

Cuadro 1. Niveles límites de iAs en agua de uso humano en diversos lugares del mundo.

<i>Lugar</i>	<i>Nivel de iAs (µg/L)</i>
<i>Argentina</i>	50
<i>Canadá</i>	10
<i>Chile</i>	50
<i>China</i>	50
<i>Comunidad Europea</i>	10
<i>Estados Unidos</i>	10
<i>India</i>	50
<i>México</i>	25
<i>Organización Mundial de la Salud</i>	10
<i>Tailandia</i>	50
<i>Taiwán</i>	50

Se ha estimado que entre 150-200 millones de individuos en al menos 70 países sufren de intoxicación crónica con iAs en la dieta (alimento y agua de bebida). En el **Cuadro 2**, se muestran algunas de las estimaciones de población expuesta a través del agua a iAs a nivel global.

Cuadro 2. Población expuesta a iAs por la dieta (alimento y/o agua de bebida) en diversos lugares del mundo.

<i>Lugar</i>	<i>Población expuesta</i>	<i>nivel de exposición</i>	<i>Referencia</i>
<i>Argentina</i>	2,000,000	0.002-7.55 mg/L	IARC, monographs, 84, 2004
<i>Chile</i>	500,000	media de 0,598 mg/L	Castro de Esparza, 2006
<i>China</i>	3,000,000-19,600,000	0.01-1.82 mg/L	IARC, monographs, 84, 2004; Rodríguez-Lado, et al., 2013
<i>India</i>	45,000,000-80,000,000	0.0005- 3.2 mg/L	NRC, 2001
<i>México</i>	2,000,000	>0.025 mg/L	Comisión Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2003
<i>Nepal</i>	500,000	>0.05 mg/L	Shrestha, 2012; Adamsen y Pokharel, 2002
<i>Perú</i>	250,000	0.0246-0.5 mg/L	Castro de Esparza, 2006
<i>Tailandia</i>	15,000	0.001-5 mg/L	IARC, monographs, 84, 2004
<i>Estados Unidos</i>	2,500,000	0.025 mg/L	Castro de Esparza, 2006
<i>España</i>	50,000	0.001-0.1 mg/L	IARC, monographs, 84, 2004
<i>Mongolia</i>	500,000	0.001-2.4 mg/L	IARC, monographs, 84, 2004
<i>Canadá</i>	ND	0.0005-3 mg/L	IARC, monographs, 84, 2004

1.2. Efectos en salud por exposición a iAs:

A la fecha no se ha demostrado que el arsénico sea un elemento esencial para el ser humano. La intoxicación por iAs a través del agua de bebida, comúnmente conocida como “hidroarsenicismo” se ha asociado a múltiples padecimientos humanos. La exposición crónica a iAs se ha relacionado a daño en la piel, enfermedades cardiovasculares, metabólicas, y del sistema nervioso periférico y central (Wang et al., 2003; Rodríguez et al., 2003; Yoshida et al., 2004; Wang et al., 2007). El iAs es un cancerígeno humano multiórgano de categoría 1, está asociado a cáncer de vejiga, piel, pulmón, riñón, próstata e hígado (ATSDR, 2007). El iAs genera deleciones, alteraciones cromosómicas (aberraciones, aneuploidías, e intercambio de cromátidas hermanas, pero no mutaciones puntuales) [NRC, 1999]. La teratogenicidad del iAs se ha visto en modelos murinos. El iAs es un carcinógeno transplacentar (Shen et al., 2007; Waalkes et al., 2007). El iAs cruza la barrera placentaria (Concha et al., 1998), sugiriendo su presencia en el organismo durante todo el desarrollo.

En cuanto a su impacto sobre el SNC, la exposición aguda a iAs genera encefalopatías y la exposición crónica está asociada a alteraciones en el aprendizaje y la memoria tanto en adultos como en niños (Gerr et. al., 2000; Calderón et. al., 2001; Mukherjee et. al., 2003). La neurotoxicidad infantil se ha reportado en diversas partes del mundo. La exposición a iAs previa al nacimiento y durante la infancia temprana se asocia negativamente con la capacidad intelectual, verbal y la memoria (Calderón et al., 2001; Tsai et al., 2003; Von Ehrenstein et al., 2007; Rosado et al., 2007; Asadullah y Chaudhury, 2008; Wasserman et al., 2014).

1.3. El metabolismo de iAs: disminución de glutatión (GSH) y S-adenosilmetionina (SAM)

En un principio se pensó que el metabolismo del iAs era un proceso de desintoxicación para su eliminación del organismo, pero luego se demostró que en pasos intermediarios se forman metabolitos bioactivos, que llegan a tener una mayor reactividad con componentes celulares que el compuesto origen, el iAs.

Una vez ingerido el iAs se absorbe principalmente en el intestino delgado, las células lo incorporarán a través de transportadores inespecíficos. Se ha establecido que posterior a la ingestión, el hígado es el principal órgano que metaboliza al iAs (Marafante et al., 1985). Sin embargo la capacidad de metabolizar el iAs ha sido reportada en otros tejidos como testículos, riñón, pulmón y el cerebro (Healy et al., 1998; Rodríguez et. al., 2005).

Como se mencionó antes el iAs entra a las células a través de transportadores inespecíficos como las acuagliceroporinas en el caso de las formas trivalentes (III), mientras las formas pentavalentes (V) lo hacen a través de acarreadores de fosfatos. Es ampliamente aceptado que en las células de la mayoría de los mamíferos el iAs sufre un proceso de metilación oxidativa, con reducción previa de las especies V intermediarias que se forman. Generalmente, el iAs es ingerido en forma pentavalente (iAsV), y es rápidamente reducido en la sangre a la forma trivalente (iAsIII) (Vahter y Marafante, 1985; Marafante et al., 1985). El iAsIII es entonces sustrato para su metilación por la Arsénico-3-metiltransferasa (AS3MT). Esta enzima agrega un grupo metilo, usando como donador a la S-adenosilmetionina (SAM). Este ciclo se repite formándose así las especies orgánicas mono, di, y hasta trimetiladas del As (MMAs, DMAs, y TMAs respectivamente), en sus formas tri y pentavalentes (**Figura 1**) (Styblo et al., 1995; Thomas, et al., 2001; Thomas et al., 2004; Thomas et al., 2007).

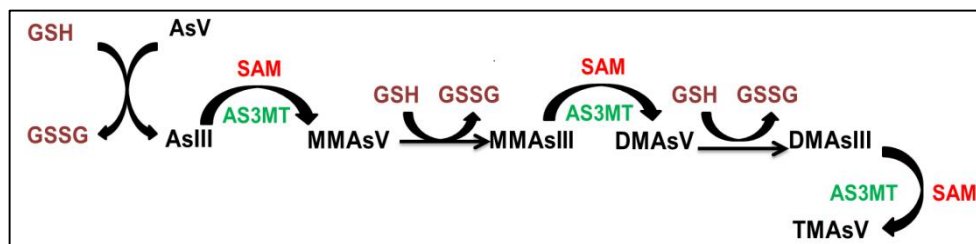


Figura 1. Esquema de metilación oxidativa del iAs³⁺. Formación de las especies orgánicas de mono, di y trimetil As. Modificado de Tomas, (2007).

El GSH y posiblemente otros tioles participan en la reducción del AsV en la sangre y de las especies mono, di y trimetiladas V formadas (Buchet y Lauwerys, 1988; Scott et al., 1993; Delnomdedieu et al., 1994; Styblo et al., 1995). En diversos sistemas experimentales se ha reportado que el iAs y sus especies III son más

citotóxicas que las V, al reaccionar fuertemente con componentes celulares ricos en grupos tioles en las proteínas, alterando su configuración molecular y actividad.

El iAs y sus especies son principalmente excretados a través de la orina, y en cantidades mínimas en la bilis y células en descamación. En población humana y en roedores, las cantidades de metabolitos eliminadas guardan proporciones más o menos constantes: 10-30% iAs, 10-20% MMA, y del 60-70% DMA, de manera independiente a la vía de exposición. Aunque se han reportado ciertas diferencias en población de los Andes, que excretan menos MMA en la orina, contrariamente a individuos de Taiwán que presentan un mayor porcentaje de MMA (10-30%), sugiriendo una mayor y menor eficiencia de metilación y de eliminación del iAs, respectivamente. Los efectos dañinos en la salud humana se han relacionado con la eficiencia en la metilación, un aumento de aproximadamente el 2-5% de iAs y MMA y disminución de DMA correlacionan con daño en la piel y al DNA (Vahter, 2002). Se ha establecido la siguiente asociación de grado de daño del iAs y sus especies DMAIII > MMAIII > iAsIII > DMAV > MMAV > iAsV. Es decir que las formas dimetiladas y monometiladas trivalentes serían más tóxicas que el iAs y sus especies pentavalentes.

1.4. Exposición gestacional a iAs

Se ha reportado la presencia de iAs y sus especies metiladas en tejido fetal, lo que sugiere una transferencia madre-feto a través de la placenta y un nivel de exposición fetal a iAs similar a la madre (Concha et al., 1998; Hall, et al., 2007; Llanos y Ronco, 2009; Parajuli et al., 2013; Davis et al., 2014; Punshon et al., 2015). El iAs y algunos metales atraviesan la placenta por un mecanismo de difusión simple (Rudge et al., 2009). Además en la placenta se expresan transportadores de iAs como la acuaporina 9 (AQ9), que aumentan su expresión por la exposición al metaloide (Fei et al., 2013). La placenta es un órgano clave en la nutrición y desintoxicación del feto, la exposición a iAs provoca displasia en la vasculatura de la placenta y daño al feto (He et al., 2007). En modelos murinos se ha demostrado que el iAs y sus especies no solo pasan la placenta sino que están presentes al nacimiento en el cerebro de la progenie expuesta durante la gestación (Jin et al., 2006). Esto

posibilita la generación de efectos tóxicos sobre el neurodesarrollo (Jin et al., 2010; Xi et al., 2010; Ramos-Chávez et al., 2015). Las células de cordón umbilical de fetos humanos y de ratón expresan la enzima AS3MT, lo que posibilita la biometilación del iAs en el tejido embrionario y la generación de las especies más tóxicas (Ferrario et al., 2008). Se ha propuesto que debido a la cronicidad de exposición humana al metaloide se han seleccionado variantes genéticas de la *as3mt*, más efectivas en el metabolismo del iAs (Schlebusch, et al., 2015).

En humanos, la exposición durante la gestación e infancia al iAs se ha asociado con anomalías de la piel, inmunotoxicidad, aumento del riesgo a cáncer pulmonar y morbilidad infantil, inflamación pulmonar, abortos espontáneos, nacimientos pretérminos, efectos cardiovasculares, alteraciones genéticas y epigenéticas, defectos en el cierre del tubo neural, bajo peso del producto al nacimiento, alteraciones motoras, disminución del índice de cefalización y neurodesarrollo y neurotoxicidad (Smith et al., 2006; He et al., 2007; Rahman et al., 2010; Parvez et al., 2011; Saha et al., 2012; Majumdar et al., 2012; Fei et al., 2013; Rodríguez-Barranco et al., 2013; Ahmed et al., 2014; Broberg et al., 2014; Laine et al., 2014; Kordas et al., 2015; Olivas-Calderón et al., 2015).

La neurotoxicidad infantil ha sido observada en áreas con altos niveles de iAs en el agua de uso humano. Existe una correlación negativa entre los niveles de iAs y medidas de inteligencia, como coeficiente de escala verbal y completa, cognición, aprendizaje, neurodesarrollo y memoria (Calderón et al., 2001; Tsai et al., 2003; Von Ehrenstein et al., 2007; Rosado et al., 2007; Asadullah y Chaudhury, 2008; Davis et al., 2014; Wasserman et al., 2014). La exposición a iAs durante la gestación genera alteraciones en genes de vías de señalización relacionadas a cáncer, ciclo celular y neurodesarrollo. Algunos genes de la vía canónica Wnt, que participa en el desarrollo, están entre los más hipermetilados (Tsang et al., 2012). La exposición a iAs durante la gestación también altera marcadores genéticos de desarrollo y diferenciación como α -fetoproteína, factor-2 de crecimiento parecido a la insulina (IGF-2) y la proteína I de unión a IGF, de inflamación, así como de estrés oxidante (Liu et al., 2009, Ahmed et al., 2011; Ramos-Chávez et al., 2015).

1.5. Mecanismos neurotóxicos del iAs

Las células nerviosas son particularmente susceptibles a la generación de estrés oxidante debido a que tienen mecanismos antioxidantes menos eficientes. Muchas patologías se asocian a un exceso de estrés oxidante por lo que el funcionamiento cerebral depende en gran medida del equilibrio óxido reductor neuronal. La exposición a iAs se ha asociado a la generación de estrés oxidante, daño y compromiso de la función cerebral (Shila et al., 2005; Flora et al., 2009; Luo et al., 2009; Flora, 2011; Luo et al., 2012; Ramos-Chávez et al., 2015).

La exposición a un metaloide como el iAs genera aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (Flora et al., 2009). La biotransformación del iAs consume antioxidantes celulares y el iAs y las especies formadas; ácido mono y dimetilarsénico (MMA y DMA III) inhiben enzimas antioxidantes y reparadoras del daño, aumentando así el estrés oxidante, al cual se le atribuye gran parte de la neurotoxicidad observada (Flora, 2011). Algunos marcadores de estrés oxidante y mecanismos antioxidantes se alteran por exposición a iAs (Lantz y Hays, 2006). Las poblaciones humanas expuestas crónicamente a iAs ($\leq 3,000 \mu\text{g}$ de As/L de agua) tienen una baja capacidad antioxidante y elevados indicadores de estrés oxidante (Wu et al., 2001). Ratas expuestas de manera crónica a arseniuro de galio presentaron déficit en la memoria y el aprendizaje, al mismo tiempo que se elevaron los niveles de ROS, y disminuía la actividad de enzimas antioxidantes y muerte neuronal (Flora, 2009). Se ha reportado una acumulación diferencial de iAs y sus especies en distintas regiones del cerebro cuando se exponen ratones por 9 días a distintas dosis de iAs (Sánchez-Peña et al., 2010) o de manera crónica (Shila et al., 2005; Mishra y Flora, 2008). El hipocampo y la corteza son sitios de acumulación importante de iAs, que además presentan efectos más marcados de exposición a iAs, disminución del antioxidante GSH y aumento de la peroxidación lipídica, ambos biomarcadores de estrés oxidante (Mishra y Flora, 2008). La corteza y el hipocampo son regiones cerebrales que están fuertemente involucradas en la memoria y el aprendizaje. García-Chávez et al., (2006) reportó que la peroxidación lipídica en cerebro, médula

espinal, nervio ciático y sural sensorial generada por exposición a iAs (10 mg/kg de peso corporal/día por 30 días), se contrarrestaba por el tratamiento con el antioxidante α -tocoferol (una forma de vitamina E). Todos estos datos sugieren que cambios en la proporción de oxidantes-antioxidantes juegan un papel importante en la neurotoxicidad generada por el iAs.

La evidencia *in vivo* ha demostrado el curso-temporal de la formación de peróxido de hidrógeno por infusión de diferentes concentraciones de iAs (50-400 μ M en 60 minutos), a través de una sonda de microdiálisis en células del estriado de rata macho y hembra (García-Chávez, et al., 2003).

Múltiples estudios han documentado que el estrés oxidante es un componente de enfermedades neurodegenerativas, envejecimiento y daño cerebral (Labunskyy y Gladyshev, 2013). La exposición durante la gestación y hasta la vida adulta a iAs promueve manifestaciones tempranas de Alzheimer y déficit cognitivo, observándose la acumulación de β -amiloide en hipocampo y corteza de manera dependiente del estrés oxidante y la inflamación (Ashok et al., 2015). Niveles elevados de ROS dañan por oxidación a componentes celulares como: lípidos, proteínas y DNA, pudiendo así afectar vías de señalización y por consecuencia el fenotipo celular. Cuando estos procesos ocurren durante la gestación se pueden manifestar al nacimiento, o como deficiencias durante la infancia temprana, o conllevar a déficit cognitivo y/o enfermedades degenerativas a corta edad (Al-Gubory, 2014).

En modelos murinos la exposición durante la vida adulta y/o durante la gestación a iAs reproducen la neurotoxicidad observada en población expuesta a mezclas de contaminantes entre ellos iAs. Los efectos neurotóxicos documentados en ratón, son un aumento en el tiempo de llegada a la plataforma de escape en el laberinto de agua de Morris (Luo et al., 2009), disminución de la memoria espacial (Ramos-Chávez et al., 2015) y en el reconocimiento de nuevos objetos y en la memoria de trabajo (Martínez-Finley et al., 2009).

1.5.1. Alteraciones celulares del SNC y periférico por exposición a iAs

En el sistema nervioso se ha reportado que la exposición a iAs genera cambios celulares importantes como desmielinización central y periférica. En poblaciones expuestas de manera crónica a iAs se ha reportado una disminución de la conductividad nerviosa, así como neuropatía periférica desmielinizante en extremidades inferiores. Análisis del hipocampo por microscopia, han mostrado que las ratas que ingirieron agua con iAs (2.72-68 mg/L por 3 meses), cursaban con daño en la memoria espacial, y cambios patológicos en la ultraestructura de la sinapsis de esta región y disminución en la cantidad de las vesículas sinápticas. En ese reporte se observó neuronas con núcleos alargados, condensación del citoplasma y la cromatina, retracción celular, edema mitocondrial, vacuolización y alteración de las crestas, así como una distensión saculada del retículo endoplásmico rugoso y edema capilar (Luo et al., 2009).

1.6. Estrés oxidante y gestación

En humanos, el avance en la gestación se ve acompañado de un aumento en los niveles de ROS y antes del parto incrementa la capacidad antioxidante fetal (Lymperaki, et al., 2015). Al nacimiento, aumenta la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa, enzimas relacionadas al glutatión (GSH) como glutatión peroxidasa GPx y glutatión reductasa (GRx), al mismo tiempo que la peroxidación lipídica se ve disminuida (Qanungo y Mukherjea, 2000).

Estados patológicos como la preclamsia, en donde hay peligro de la vida fetal y materna, se ven acompañados de la disminución de antioxidantes en el suero materno mientras que aumentan los marcadores de estrés oxidante, posibilitando el daño por estrés oxidante del producto (Patil, et al., 2009; Gharesi-Fard, et al., 2010). Un bajo aporte de antioxidantes como vitamina C, E y disminución de la actividad de SOD, se ha visto en niños con defectos en el cierre del tubo neural (Dheen, et al., 2009). El número de crías, vitaminas y enzimas antioxidantes, correlacionan negativamente con un aumento de marcadores de estrés oxidante, efectos que son

aminorados por el co-tratamiento con vitamina E y C (Naziroğlu, et al., 2004). Lo anterior se asocia a un mayor riesgo de alteraciones del desarrollo durante esa etapa crítica ante estresores ambientales.

Se desconoce, cómo algunos factores ambientales (hormonas, fármacos, estrés físico y bioquímico), pueden afectar el neurodesarrollo, las etapas determinantes de este daño y la magnitud de las consecuencias de las alteraciones generadas por estos factores. El estrés físico durante la última semana de gestación (similar al tercer trimestre humano) generan en la progenie cambios perdurables en la proteómica que afectan la función sináptica en la adultez (Kinnunen, et al., 2003). Se ha observado que ratas jóvenes y saludables que fueron suplementadas por tres semanas con flavonoides, un antioxidante natural, mejoraron la adquisición y consolidación de la memoria espacial en el laberinto de agua de Morris, animales que además presentaron aumento de la señalización de glutamato y moléculas cruciales en la plasticidad sináptica (Rendeiro, et al., 2014).

Se ha discutido que las ROS tienen un papel dual, por un lado son importantes mediadores de procesos de plasticidad sináptica, potenciación a largo plazo (LTP; propuesta como uno de los sustratos biológicos de la memoria y el aprendizaje), y así como de pérdida cognitiva (Serrano y Klann, 2004).

Se ha visto que el estrés prenatal y postnatal temprano impacta en la función cerebral normal, cambios que se reflejan en el comportamiento de un individuo y en las respuestas al ambiente. Ejemplo de ello son alteraciones psicomotoras, déficit sensorial, conductas depresivas y ansiogénicas, esquizofrenia, daño en el ciclo sueño-vigilia, disminución del aprendizaje y la memoria, desórdenes que pueden ser observables en la infancia temprana, adolescencia o en la adultez (Watson et al., 1999; Lemaire et al., 2000; Nishio et al., 2001; Wadhwa et al., 2001; Weinstock, 2001; Gué et al., 2004; Son et al., 2006; Yang et al., 2006; Wu et al., 2007; Charil et al., 2010; Bock, et al., 2015). En estas situaciones el estrés oxidante podría estar afectando el desarrollo prenatal normal (Labunskyy y Gladyshev, 2013).

Factores ambientales que alteran el equilibrio entre antioxidantes-pro-oxidantes celulares, pueden aumentar la carga oxidante fetal y la respuesta antioxidante del organismo en crecimiento, y por tanto tener consecuencias negativas en el desarrollo normal del mismo.

El cerebro de mamíferos contiene defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas, que regulan el ambiente óxido-reductor celular. Dentro de las enzimáticas están la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, peroxiredoxinas, catalasa, y dentro de los no enzimáticos se incluyen al glutatión reducido (GSH), tioredoxina, ácido retinoico (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenoides, melatonina, polifenoles y flavonoides.

Si bien son muchos los sistemas y moléculas que participan en la regulación redox cerebral, se ha propuesto al GSH como el principal y el más importante antioxidante en este órgano (Dringer, 2000).

El GSH es el antioxidante más abundante en el SNC de mamíferos, alteraciones en los niveles de GSH son comunes en enfermedades que cursan con daño y disfunción cognitiva. El GSH cumple múltiples funciones en las células, además de regular el potencial óxido-reductor celular, mantiene en su estado reducido a las proteínas celulares, participa en la división celular, apoptosis, señalización, en la respuesta inmune, en la eliminación de agentes tóxicos, y es considerado como reservorio de cisteína y glutamato intracelular, entre otros (Dringen, 2000). Todos estos procesos son importantes en el desarrollo y fisiología de un organismo.

1.7. Síntesis de GSH en el SNC

El GSH penetra mínimamente la barrera hematoencefálica, y no se ha descrito un sistema de almacenamiento de GSH, por lo que sus niveles están dados por la síntesis de *novo* en las células de mamíferos. El GSH es un tripéptido de γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina. El GSH está constituido por L-glutamato (L-Glu), L-glicina (L-Gly) y L-cisteína (L-Cys). El nivel de GSH varía dependiendo del tipo celular y la región cerebral. Ello sugiere que neuronas, glía y endotelio tienen diferentes

sistemas para llevar a cabo la síntesis de GSH. El L-Glu y L-Gly se encuentran en niveles altos por lo que la síntesis de GSH se limita por la disponibilidad del aminoácido L-Cys, el cual se encuentra en el ambiente extracelular en la forma oxidada como L-cistina (L-Cys₂). La L-Cys₂, y L-Cys entran a las células a través del transportador 1 de aminoácidos de tipo-L (LAT1) en el endotelio, el acarreador de aminoácidos excitadores de tipo 1 (EAAC1) en neuronas y el transportador de L-Cys₂ (sistema XC-) en la glía (Valdovinos-Flores y Gonsebatt, 2012). La síntesis de GSH ocurre en dos pasos: 1) la γ -glutamylcisteina sintetasa media el paso limitante para la síntesis de GSH, uniendo L-Glu y L-Cys para formar γ -glutamylcisteina (γ -GluCys). Posteriormente, 2) la Glutathión sintetasa incorpora L-Gly para formar GSH. El Adenosin trifosfato (ATP) es requerido en ambos pasos enzimáticos (Valdovinos-Flores y Gonsebatt, 2012).

1.8. Transportadores asociados a la síntesis de GSH

1.8.1. LAT1

El LAT1 es un transportador que forma parte del sistema L, media el flujo de aminoácidos neutros de cadena larga desde la sangre al cerebro. El LAT1 se expresa en la membrana luminal y abluminal del endotelio capilar de la barrera hematoencefálica (Killian et al., 2001). En el cerebro la expresión de LAT1 es alta al nacimiento, pero disminuye conforme se alcanza la adultez, y participa en el mantenimiento constante de aminoácidos durante el neurodesarrollo (Boado et al., 2004). El LAT1 es un complejo heterodimérico, que necesita de la coexpresión de 4f2hc (SLC3A2) para llevar a cabo su actividad; 4f2hc es una glicoproteína de unión a la membrana que es común a varios transportadores de aminoácidos.

LAT1 es miembro de la familia de acarreadores de solutos de tipo 7 (SLC7), que actúa como intercambiador transendotelial 1:1, es decir internalizan un aminoácido al mismo tiempo que exporta un segundo aminoácido, generalmente L-metionina (substrato endógeno de LAT1). El LAT1 transporta aminoácidos neutros y aromáticos como L-Leucina, L-Valina, L-Isoleucina, L-Fenilalanina, L-Tirosina, L-Triptófano, L-Metionina y L-Histidina, de manera independiente de Na⁺, otros iones y ATP. Estudios *in vivo* han sugerido que LAT1 es capaz de transportar L-Cys en

células endoteliales de la barrera hematoencefálica (Meier et al., 2002; Valdovinos y Gonsebatt, 2012). La expresión del mRNA de LAT1 es alta en timo, testículos, placenta, cerebro y en células en proliferación así como en tumores cerebrales (Kageyama et al., 2000; Boado et al., 2004). Además de la actividad de transporte, el LAT1 participa en sobrevivencia, fusión celular y actividad de integrinas (Kageyama et al., 2000).

1.8.2. EAAC1 y Transportadores de L-Glutamato (GLAST, GLT1)

El EAAC1 forma parte de la familia de los transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT, en humanos). Un grupo de transportadores de alta afinidad a L-glutamato (L-Glu) Na⁺ dependiente. El transporte de L-Glu está acoplado a la entrada de 3 Na⁺ y 1 H⁺ y salida de K⁺. Hay cinco miembros hasta ahora identificados: EAAT1/GLAST, EAAT2/GLT1, EAAT3/EAAC1, EAAT4 y EAAT5. Estos transportadores se encuentran en neuronas y glía, y su actividad mantiene bajos los niveles extracelulares de L-Glu, participando en la terminación de la señalización normal del L-Glu, así como en la prevención del daño tóxico de L-Glu denominado “excitotoxicidad” (Robert, et al., 2014).

El GLT-1 es el principal transportador de L-Glu, está altamente expresado en astrocitos, expresado en todo el cerebro, pero de manera importante en corteza e hipocampo. Se ha estimado que GLT1 recaptura del 80-90% del L-Glu extracelular, es un transportador de alta afinidad a L-Glu (1-100 μM). La expresión de GLT1 es abundante en el SNC y su actividad es esencial para el buen funcionamiento cerebral. Su expresión se ve aumentada con la formación de los circuitos neuronales (Holmseth, et al., 2012). El GLAST es otro transportador de L-Glu astrocítico, con menor afinidad por L-Glu, por lo que su actividad contribuye en menor medida a la recaptura de L-Glu. La disminución del mRNA de *glt1* o *glast* es acompañado del aumento del L-Glu en el medio y de muerte neuronal excitotóxica, efecto que no ocurre con la disminución del mRNA de *eaac1* (Rothstein, et al., 1996). El papel de EAAC1 en el transporte L-Glu en neuronas maduras es controversial. *In vivo* se ha documentado que EAAC1 recaptura mínimas cantidades de L-Glu (Aoyama y Nakaki, 2013; Robert et al., 2014). La actividad de los

transportadores de L-Glu se ven disminuidas por estrés oxidante, sin cambios en la expresión (Miralles et al., 2001).

Las evidencias sugieren que EAAC1 media la captación de L-Cys en la neurona, suplementando así a las neuronas del sustrato limitante para la síntesis de GSH. Se ha observado que la inhibición de la función de EAAC1 incrementa la vulnerabilidad neuronal a estrés oxidativo tanto *in vitro* como *in vivo* (Aoyama, et al., 2012). El EAAC1 se expresa en sitios extrasinápticos, es abundante en somas y dendritas. Ratones knockout para EAAC1, tienen disminuidos los niveles de GSH. En modelos de la enfermedad de Parkinson la disfunción de EAAC1 por estrés oxidante se ve acompañada de disminución de L-Cys, GSH y neurotoxicidad, lo que es restablecido con el tratamiento con N-acetil-cisteína, un precursor de GSH (Aoyama, et al., 2008). El aumento en la expresión de EAAC1 correlaciona con aumento en los niveles de GSH y resistencia al estrés oxidante (Aoyama, et al., 2012).

Se ha propuesto que EAAC1 trabaja en conjunto con el sistema XC-, un regulador redox. En donde EAAC1 internaliza el L-Glu exportado por el sistema XC- durante la síntesis de GSH, previniendo así la inhibición natural del XC- por el L-Glu. Los EAATs (GLT1 y GLAST) previenen la inhibición del transporte de L-Cys₂ por el L-Glu extracelular, evitando la disminución de la síntesis de GSH (**Figura 2**) (Lewerenz et al., 2006; Robert et al., 2014).

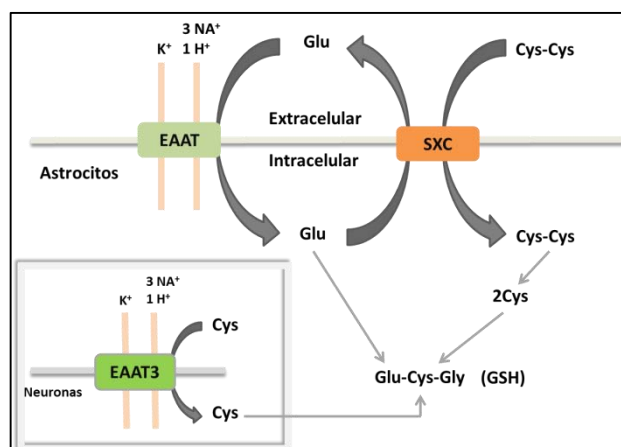


Figura 2. Ciclo cisteína/glutamato entre astrocitos y neuronas (Modificado de Robert et al., 2014).

1.8.3. Sistema XC-

El xCT es la subunidad catalítica del sistema XC- y transporta al interior de las células cerebrales el amino ácido L-Cys2, forma disulfuro de la L-Cys. Su actividad en la entrada de L-Cys2 está acoplada a la salida de L-Glu, por lo que se ha sugerido que puede llevar al aumento extracelular de L-Glu (Lau y Tymianski 2010), conducir a muerte celular a través de la sobreactivación de receptores a L-Glu de tipo NMDA (Jackman et. al., 2012) y alterar la expresión de receptores y transportadores de L-Glu (Ramos-Chávez et al., 2015). Es ampliamente aceptado que xCT funciona intercambiando L-Cys2/L-Glu en proporción 1:1, pero se ha propuesto que puede funcionar de manera inversa internalizando L-Glu y liberando L-Cys2 o L-Glu por L-Glu (Patel et. al., 2004; Gochenauer y Robinson, 2001). La L-Cys2 inhibe competitivamente la captación L-Glu por xCT, y viceversa (Patel et. al., 2004). El xCT está ampliamente distribuido en el cerebro, altamente expresado en células endoteliales vasculares, ependimales, de la leptomeninges y en los plexos coroideos (Burdo et al., 2006).

Los agentes oxidantes que consumen GSH como el iAs inducen la expresión de xCT (Kobayashi et al., 2012; Ramos-Chávez et al., 2015). El gen que codifica para *xct* está bajo el control de factores de transcripción como NfκB y Nrf2, dos factores nucleares sensibles al potencial óxido-reductor celular y que además controlan la expresión de una gran variedad de enzimas antioxidantes. Se ha sugerido que la actividad de la subunidad xCT es una fuente de liberación no vesicular de L-Glu. En el cerebro la mayor parte del L-Glu liberado o extracelular es no sináptico.

El papel fisiológico de xCT es desconocido. La inhibición aguda de la actividad basal de xCT disminuye el nivel extracelular de L-Glu en la corteza prefrontal, compromete el funcionamiento cerebral, lo que sugiere que xCT puede participar en la señalización excitadora normal de L-Glu (Lutgen et al., 2014). Agentes que disminuyen la actividad de xCT disminuyen los niveles de L-Glu (Baker et al., 2002). Ratones knockout para xCT (*slc7a11*) tienen disminuidos los niveles extracelulares de L-Glu en estriado e hipocampo, además cursan con alteraciones en la memoria de trabajo y de referencia espacial (De Bundel et al., 2011; McCullagh y

Featherstone, 2014), menor susceptibilidad a procesos excitotóxicos (Bentea et al., 2015), alteraciones parecidas a la ansiedad y depresión sin compromiso sensorimotor (De Bundel et al., 2011) y disminución de la LTP (Potenciación a Largo Plazo) en hipocampo, efecto que no es reversible por suplementación con L-Glu extracelular (Li et al., 2012). La expresión de *xct* aumenta conforme el cerebro alcanza la madurez (La Bella et al., 2007). Todos estos resultados son evidencia de la importancia que la actividad de este transportador tiene en la señalización y función de aminoácidos tan importantes en cerebro como el L-Glu y L-Cys2 y en los procesos en los que éstos participan (**Figura 3**).

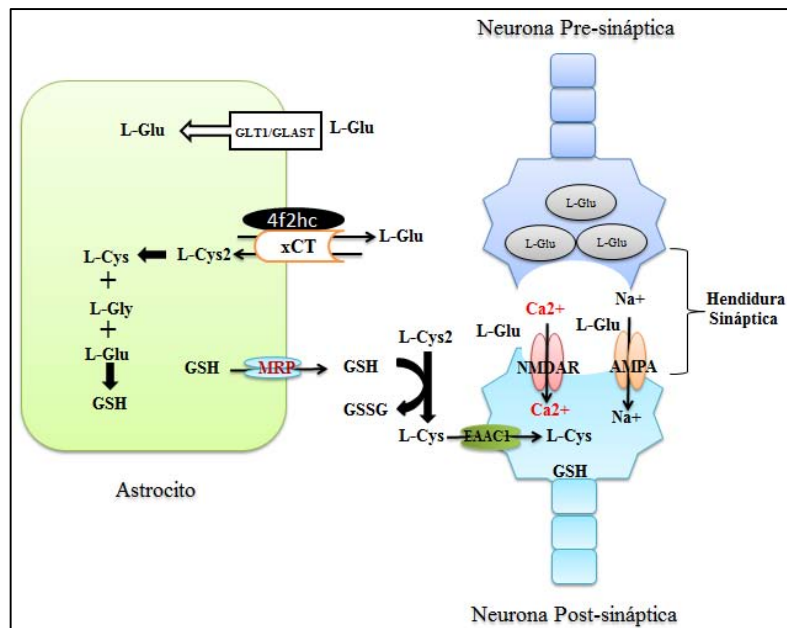


Figura 3. Modelo de la entrada de L-Cys2, L-Cys y salida de L-Glu en células del SNC. El astrocito capta la L-Cys2 a través del sistema Xc⁻ (subunidad catalítica xCT + la glicoproteína de unión a la membrana 4f2hc), sintetiza GSH, el GSH es exportado y sirve para la reducción de la L-Cys2 extracelular a L-Cys. La L-Cys es captada por las neuronas por medio del transportador EAAC1 para la síntesis de GSH. La actividad aumentada de xCT incrementa la entrada de L-Cys2 y salida de L-Glu. L-Glu es un neurotransmisor que activa receptores de tipo NMDA y AMPA, entre otros, aumentando el nivel de excitabilidad y función neuronal. La actividad de xCT se ha asociado a estrés oxidante y muerte celular vía NMDAR., así como con la neurotransmisión de L-Glu (Jackman et al., 2012; Lutgen et al., 2014).

Por experimentos *in vitro* se ha sugerido que la actividad xCT es clave para mantener los niveles extracelulares del L-Glu, y ello a su vez induce el reclutamiento postsináptico de receptores ionotrópicos al L-Glu, teniendo así consecuencias

sobre la conducta y neurofisiología (Augustin et al., 2007). La unión de L-Glu a sus receptores inotrópicos es clave para regular la abundancia de sus propios receptores en la postsinapsis. Se piensa que cambios conformacionales en los receptores a L-Glu subyacen en estos fenómenos, alteración de interacciones proteína-proteína o regulación de sitios internos de fosforilación de los receptores a L-Glu, son los eventos probables. El transportador xCT es clave en la neuroprotección vía GSH, además es crítico en el desarrollo y crecimiento celular (Limón-Pacheco et al., 2007; Shih et al., 2006).

La actividad de xCT, que es modulable por estrés oxidante, podría estar condicionando el aumento de L-Glu extracelular, alterando así la vía glutamatérgica, importante en la neurofisiología normal.

1.9. Receptor a glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR)

El NMDAR es un canal iónico permeable a Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} , un detector de coincidencias activado por el L-Glu liberado de la célula presináptica y de la unión coagonista glicina a su sitio y por cambios en el potencial de membrana en la neurona postsináptica. Para que el canal iónico se abra es necesario que ocurra una depolarización que libera el ión Mg^{2+} del poro, activando por completo al NMDAR en presencia de L-Glu. La señalización a través de Glu-NMDAR- Ca^{2+} está fuertemente involucrada en procesos de neuroprotección, cognición, plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria, así como en el daño excitotóxico, estrés oxidante, neurodegeneración, alteraciones de la memoria y desórdenes del sistema nervioso central (Mony, 2009; Bading, 2013). La activación del NMDAR por L-Glu, aumenta los niveles intracelulares de Ca^{2+} , el cual es un segundo mensajero que transmite la señal de la sinapsis al núcleo celular, activando al factor de transcripción CREB que controla la expresión de por lo menos 200 genes (Hardingham y Bading, 2010).

El NMDAR, es un complejo heterodimérico formado por la asociación de tres familias de proteínas. Han sido descritas ocho isoformas de la subunidad obligatoria 1 (familia 1: NR1), cuatro tipos de la subunidad 2 (familia 2: NR2 A, B, C y D), y dos tipos de la subunidad 3 (familia 3: NR3 A y B), el tipo de subunidad NR2 y/o NR3 y

sus asociaciones le confieren características electroquímicas e interacciones internas al receptor, direccionando así la respuesta celular y los blancos sinápticos específicos. Los NMDAR que expresan NR2A tienen una cinética de activación y desactivación más rápida que los que expresan NR2B, por lo que el nivel de Ca^{2+} que pasan a través de estos últimos es hasta cuatro veces mayor que los que expresan la subunidad NR2A (Bading, 2013). Se ha propuesto que el NMDAR es central en los fenómenos de plasticidad sináptica: LTP y LTD (depresión a largo plazo), que son procesos propuestos como determinantes en la memoria celular (Shipton y Paulsen, 2014). Se ha propuesto que la isoforma NR2A se expresa en los receptores de la hendidura postsináptica madura, por lo que son activados durante la actividad sináptica normal, asociándose a señales de sobrevivencia vía Akt, ERK, y CREB. Mientras que la isoforma NR2B se encuentra en los receptores de los sitios extrasinápticos por lo que son activados durante procesos de liberación excesiva de L-Glu (isquemia/reperfusión, estrés oxidante, etc), desencadenando señales de muerte neuronal excitotóxica mediada por PTEN, cdk5, y DAPK1 [Lai, et al., 2014]. Se discute si es el tipo de subunidad influencia o dirige la respuesta celular cerebral y si tienen un sitio sináptico particular de expresión (Shipton y Paulsen, 2014). De manera in vivo, se ha reportado que el aumento en la expresión de NR2B tiene un efecto positivo en la LTP, memoria y aprendizaje (Tang et. al., 1999)

Durante la sinaptogénesis las neuronas son particularmente sensibles a alteraciones en la actividad del NMDAR (hipersensibilidad del NMDAR). Las células neuronales tienen aumentado el umbral de inactivación del canal por el bloqueo que ejerce el Mg^{2+} . Durante el neurodesarrollo las neuronas son extremadamente vulnerables a sufrir muerte excitotóxica por alteración de la actividad del NMDAR. La sobre-estimulación de NMDAR genera muerte celular excitotóxica, mientras una disminución en la actividad sináptica lleva a muerte celular por apoptosis (vía inactivación del NMDAR, sobre-actividad de $GABA_A$ o de canales de Na^+) (McDonald, et al., 1988; Ikonomidou, et al., 1989; Ikonomidou, et al., 1999; Scheetz, y Constantine-Paton, 1994).

La actividad del NMDAR juega un papel esencial en la formación de las conexiones sinápticas durante el desarrollo (Forrest, et al., 1994; Jiang et al., 2014). El NMDAR tiene un papel crítico en la maduración funcional y estructural de la sinapsis [Kelsch et al., 2014]. Experimentos *in vitro* e *in vivo* han reportado que la actividad neuronal disminuye la muerte celular en diferentes áreas cerebrales en desarrollo como la retina, cerebelo y la corteza cerebral (Mennerick y Zorumski, 2000).

La inhibición de la actividad del NMDAR en el cerebro inmaduro, provoca una disminución sustancial de la síntesis de la neurotrofina BDNF (Factor Neurotrófico derivado del cerebro; Hansen, et al., 2004).

Esta inactivación durante el neurodesarrollo afecta la actividad de ERK1/2-CREB. El factor CREB es esencial para la sobrevivencia de neuronas inmaduras, lo cual sugiere que durante el desarrollo cerebral normal, es a través de esta vía que se lleva a cabo el papel trófico de la actividad del NMDAR por la acción de su neurotransmisor el L-Glu. La activación de CREB promueve la proliferación y viabilidad celular. La ausencia y/o disminución de la expresión genética de CREB provoca a muerte neuronal masiva y neurodegeneración progresiva en el cerebro en desarrollo, respectivamente (Dragunow, 2004).

1.9.1. Aspectos patológicos de L-Glu-NMDA durante el neurodesarrollo

Las neuronas inmaduras son susceptibles a sufrir neurodegeneración (Lei et al., 2012). Durante etapas post-natales tempranas del desarrollo cerebral se ha observado muerte celular por la administración *in vivo* de antagonistas de NMDAR y agonistas de GABA_A. Los animales tratados en estas condiciones, presentaron déficit en la plasticidad sináptica hipocampal y desarrollaron problemas en la memoria y el aprendizaje en la vida adulta (Jevtovic-Todorovic, et al., 2003). En ratas de 7 días de edad, administradas con drogas anestésicas que afectan la actividad del NMDAR como midazolam, óxido nitroso e isoflurano, muestran reacciones neurodegenerativas en tálamo, hipotálamo, amígdala, núcleo caudado, frontal y parietal, occipital, corteza límbica, e hipocampo. Estos animales no presentaron signos de daño neurológico agudo, pero mostraron un déficit

significativo en el aprendizaje tanto a los 30 como a los 130 días de edad (Jevtovic-Todorovic, et al., 2001; Jevtovic-Todorovic, et al., 2003; Stratmann, et al., 2009; Lei, et al., 2012).

Se ha propuesto que el efecto apoptogénico se da a través de la inactivación de receptores NMDA y excesiva activación de receptores GABA_A. Esto podría constituir la base mecanística por la cual drogas de abuso como el alcohol o la ketamina generan neuropatías durante el neurodesarrollo y disminución de la masa cerebral fetal al nacimiento (Ikonomidou, 2001; Olney, 2002; Jevtovic-Todorovic, et al., 2003).

Se han observado que en enfermedades del neurodesarrollo, neurodegeneración, déficit cognitivo, ansiedad y en síndromes que cursan con un importante retraso mental se ven acompañados de cambios en los niveles de L-Glu. Por lo que factores que alteran los niveles de L-Glu podrían afectar el proceso normal de la transmisión nerviosa L-Glu-NMDAR (Lalonde y Joyal, 1993; Loepke y Soriano, 2008; Davidson y Flick, 2013; Lee, et al., 2015).

1.9.2. Expresión de las subunidades del receptor NMDA durante el neurodesarrollo

En el neurodesarrollo normal, la expresión del mRNA de las subunidades del NMDAR está altamente regulada. Al nacimiento, las neuronas inmaduras expresan en su sinapsis mayoritariamente la isoforma NR1 acopladas a la subunidades NR2B y NR2D. Lo que refleja una mayor entrada de Ca²⁺ en la célula neuronal inmadura. A medida que el cerebro madura aumenta la expresión en sitios sinápticos de la subunidades NR2A y NR2C, hasta alcanzar su nivel máximo en la adultez. NR3A comienza a expresarse a partir del nacimiento. Ratones knockout para NR2B o NR1 son letales, mueren a las pocas horas de nacidos, lo que refleja la importancia crítica de estas subunidades en la formación y desarrollo normal del organismo. Estos cambios en la expresión reflejan los patrones temporales y los procesos de maduración cerebral a los que podrían estar asociados (Haberny, et al., 2002).

En los ratones, al día 14 de gestación, el hipotálamo y la médula espinal tienen bajos niveles de mRNA de *nr2b*, mientras que al día 17 hay un aumento acentuado en el transcrito de *nr2b* en tálamo, médula espinal y en la corteza (capa 1), y una expresión más baja en el hipocampo, e hipotálamo. Al nacimiento la expresión de *nr2b* está presente en corteza, hipocampo, área septal, estriado y el núcleo talámico, y en niveles bajos en cerebelo. Al día 7-12 de post-nacimiento aumenta considerablemente la expresión de *nr2b* en corteza e hipocampo y en menor medida en el estriado, septum, núcleo talámico y en cerebelo [Monyer, et al., 1994]. De manera similar en humanos se ha observado que en cerebros fetales la transcripción de *nr2b* es alta en la corteza cerebral a partir del segundo mes de gestación (Jantzie, et al., 2015).

La expresión del mRNA de *nr2b* disminuye con la edad. Lo contrario ocurre con *nr2a*. Al día 2 de vida el mRNA del *nr2a* es casi indetectable pero aumenta su expresión con la maduración cerebral (Scheetz y Constantine-Paton, 1994).

Son múltiples los factores de transcripción que controlan la expresión de las subunidades del NMDAR. El factor de transcripción Sp1 puede unirse a sitios en los genes de *nr1*, *nr2a*, *b* y *c*. El Sp1 está presente en la diferenciación neuronal y su ausencia conlleva a defectos embrionarios del desarrollo cerebral y muerte. Otros factores de transcripción que también tienen sitios de reconocimiento dentro del gen de *nr1* y que lo controlan de manera positiva son Sp3, Egr1, MAZ, y Nfκb. Se sugiere que existe interacciones entre estos factores de transcripción que incrementan o reducen su actividad sobre el promotor del gen (Okamoto, et al., 2002; Raivich y Behrens, 2006). Hay secuencias de unión a Ap1 en el gen de *nr2b*, que es compartido con el factor CREB. La modulación por Ap1 se asocia a procesos de estrés, diferenciación, apoptosis y crecimiento (Qiang y Ticku, 2005; Raivich y Behrens, 2006). El Trb1 es un factor nuclear neuronal que se expresa en el desarrollo cerebral, tiene efecto positivo sobre la expresión de *nr2b* y *nr1* (Wang, et al., 2004). El factor de transcripción silenciador RE1 (REST) regula de manera negativa a *nr1*, *nr2a*, *nr2b*, *nr2c* y *nr3a*. El REST se expresa en células

indiferenciadas, en progenitores neurales y no neurales, en donde suprime la expresión de genes (Schoenherr, et al., 1996; Roopra, 2001; Bruce, 2004).

Se ha propuesto que estos cambios en la expresión de las subunidades de NMDAR son parte de un sistema que el cerebro de vertebrados desarrolló como un mecanismo que permitiera equilibrar los cambios en la excitabilidad durante el neurodesarrollo (Scheetz y Constantine-Paton, 1994).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que el iAs y sus metabolitos se han determinado en tejido fetal humano y en el cerebro de ratón con exposición gestacional y que su metabolismo consume GSH, en este trabajo se planea valorar el efecto de la exposición gestacional a iAs sobre la expresión de los transportadores relacionados a la síntesis de GSH (xCT, EAAC1 y LAT1). Asimismo, y dado que xCT es fuente de liberación no vesicular de glutamato, se investigará la expresión de transportadores y receptores a glutamato (GLT1, GLAST y las subunidades NR2A y NR2B del NMDAR) en cerebro de ratón CD1. Además se estudiarán las repercusiones en el aprendizaje y memoria mediante pruebas conductuales.

3. HIPÓTESIS

La exposición gestacional a iAs disminuirá los niveles de GSH por lo que se aumentará la expresión de los transportadores del aminoácido limitante en su síntesis, la cisteína (xCT, EAAC y LAT1).

Y dado que la expresión de xCT se ve acompañada de liberación no vesicular de glutamato, ello puede conllevar a cambios en la expresión de los transportadores de recaptura GLT1 y GLAST y en las subunidades (NR2A y NR2B) del receptor glutamatérgico de tipo NMDA en el cerebro de ratón.

Estos efectos comprometerán la funcionalidad sináptica en la adultez alterando la memoria y aprendizaje.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo general*

Evaluar el efecto de la exposición gestacional a iAs sobre la expresión de transportadores relacionados a la síntesis de GSH, la recaptura de glutamato, los receptores a glutamato y sus repercusiones en tareas de memoria espacial.

4.2. *Objetivos particulares*

- Determinar en el cerebro de ratón CD1 expuestos gestacionalmente a iAs, la expresión de los transportador xCT, EAAC1, LAT1 y de las isoformas NR2A y NR2B del receptor glutamatérgico NMDA.
- Investigar mediante inmunofluorescencia la expresión de los transportadores de aminoácidos, identificando los tipos celulares, en el cerebro de ratón CD1 expuestos gestacionalmente a iAs.
- Medir los niveles de GSH/GSSG en el cerebro de ratones expuestos durante la gestación a iAs.
- Cuantificar el iAs y sus especies metiladas en el cerebro de ratones expuestos durante la gestación a iAs.
- Valorar la memoria espacial de ratones expuestos durante la gestación a iAs.

5. MÉTODOS

5.1. Animales y tratamiento

Como modelo experimental se emplearon ratones de la cepa CD1 (machos y hembras) de 7 u 8 semanas de edad, que fueron obtenidos de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas de 12 h de luz-oscuridad, 23-25 °C y humedad relativa del 50-60%. Durante el experimento los animales tuvieron libre acceso al alimento (Harlan 2018S Diet; Harlan, Indianapolis, IN, USA) y agua. Se alojaron en grupos de 4 animales por caja, separados por sexo. Un grupo (12 machos y 12 hembras) fue asignado de manera aleatoria con la exposición vía agua de bebida a 20 mg de iAs por L de agua (20 mg/L o 20 ppm) por 30 días (expuesto). Transcurrido los 30 días, un macho fue colocado con una sola hembra (cruza). El inicio de la gestación fue estimado por la formación del tapón vaginal; y una vez que la gestación era evidente con el crecimiento del vientre de las hembras, el macho fue retirado de la caja. Las hembras continuaron con la exposición durante toda la gestación (19 ± 1 días) y durante la lactancia de la progenie. Al mismo tiempo se estableció un grupo de comparación (control) que recibió agua libre de iAs, y que fue manipulado de manera similar al expuesto. La dosis empleada fue elegida tomando en consideración lo reportado por (Golub et al., 1998). Las soluciones de iAs fueron preparadas diariamente en agua desionizada estéril. Se registró diariamente el consumo de agua por el peso del bebedero, así como el peso de los animales durante todo el experimento (cada 6 días previo a la cruce y en el día 0, 7 y 14-18 de la gestación de las hembras). En el 1, 15 y 90 día postnatal (DPN) las crías fueron sacrificadas por dislocación cervical (previa anestesia), para la obtención en frío del cerebro completo (1 DPN) y regiones (corteza e hipocampo en el 15 y 90 DPN). Las muestras fueron inmediatamente congeladas por inmersión en nitrógeno líquido y guardadas a -70°C hasta su procesamiento para los westerns blot.

A los 15 DPN fue posible realizar la diferenciación entre machos y hembras con base a la longitud anogenital (The Laboratory Mouse, 2000). En el 15 DPN camadas

lactantes del grupo de hembras y machos expuestas a iAs fueron aleatoriamente divididas: el 50% de las camadas se les sustituyó el agua con iAs por agua desionizada (igual que los controles y se los denominaron como: “grupo gestacionalmente expuesto a iAs”). El resto continuó con la exposición a 20 mg/L de iAs o “crónicamente expuesto a iAs”, hasta el 90 DPN (**figura 4**). En el 90 DPN, los tres grupos controles (control), el grupo “gestacionalmente expuesto” (iAs 15 DPN) y el expuesto a iAs durante la gestación, lactancia y hasta el DPN 90 (iAs 90 DPN), fueron sometidos a pruebas de reconocimiento espacial de lugar de objeto y del laberinto de agua. La progenie de los controles ingirió agua libre de iAs. Todas las progenies de los grupos fueron separadas de las madres en el 22 DPN.

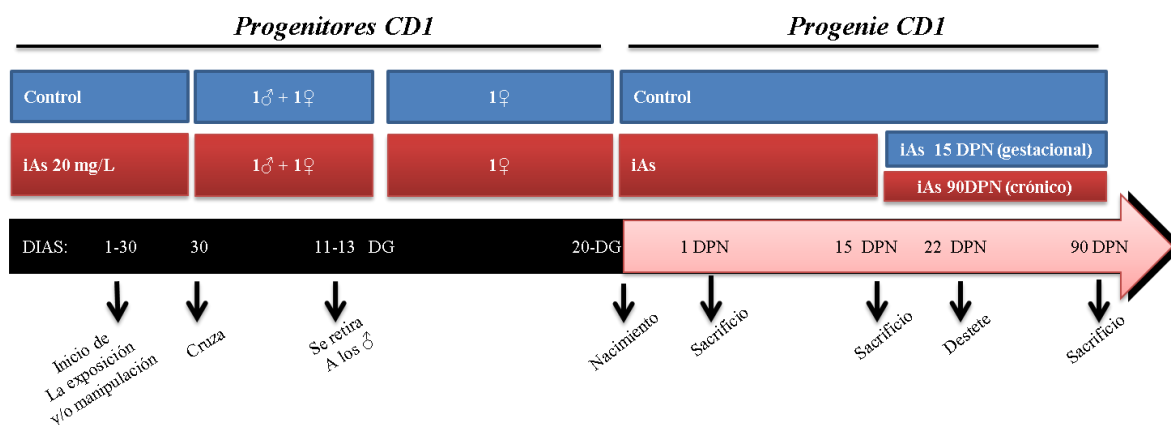


Figura 4. Representación esquemática de la exposición a 20 mg/L (ppm) de iAs vía agua de bebida. Ratones CD1 en edad reproductiva fueron expuestos a iAs por 30 días, posteriormente se cruzaron en grupos de un macho y una hembra. El inicio de la gestación fue registrado por la prueba del tapón vaginal. Las hembras gestantes fueron expuestas a iAs durante toda la gestación. La mitad de las camadas expuestas fueron liberadas de la ingesta de iAs a partir del día 15 de lactancia, iAs 15 DPN y el resto continuo con la exposición (iAs 90 DPN). Control= controles, iAs15 DPN: expuestos a iAs durante la gestación y hasta el día 15 de lactancia, iAs 90 DPN: expuestos a iAs durante la gestación, lactancia y hasta el 90 DPN, DG: día de gestación, DPN: día postnatal. Las soluciones de iAs fueron cambiadas diariamente, se registró el consumo de agua y pesos en ciertos puntos del experimento.

Los experimentos y tratamientos de los animales fueron realizados con base a la guía establecida en los “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication #85-23, revised 1985) y las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Clave NOM-062-ZOO-1999)” de la “Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)” (publicada en Agosto, 2001). El protocolo experimental fue aprobado por el CICUAL del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

5.2. Obtención del tejido y Western Blots

Para la medición de las proteínas, transportadores (xCT, EAAC1, LAT1, GLAST y GLT1) y subunidades del NMDAR (NR2A y NR2B) los tejidos se procesaron mediante el método descrito por Schindler et al., (2006), para proteínas membranales. En breve, una muestra del tejido congelado fue homogenizada en 10 volúmenes de buffer de extracción BCL (10 mM HEPES, 10 mM NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 5 mM EDTA, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, y 10 mg/ml aprotinin y leupeptin) que contenía 10% de sacarosa 2.5 M. El homogenado obtenido se centrifugó en dos ocasiones a 6,300 x g a 4°C por 10 minutos, colectando los sobrenadantes. Los sobrenadantes colectados fueron centrifugados a 100,000 g por 30 minutos a 4°C. El precipitado fue recuperado y solubilizado en 40 mM Tris-HCl, pH 9.5, 8 M urea y 4% (w/v) Triton X-100. La concentración de proteína fue determinada usando Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Meridian Rd, Rockford, USA). Las muestras (5-40 µg) fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS del 8% (NR2A y NR2B) al 10% (xCT, EAAC1, LAT1, GLAST y GLT1) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Germany), en condiciones de voltaje y amperaje constante, respectivamente. Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en TBS-0.1% Tween-20, y posteriormente se incubaron con el respectivo anticuerpo primario. Una vez revelada la proteína de interés, se desprendieron los anticuerpos de la proteína problema mediante un tratamiento con NaOH 0.2 M (stripping), para posteriormente incubar con el anticuerpo primario para la proteína control β-tubulina o GAPDH. Las bandas de las proteínas fueron visualizadas con un anticuerpo secundario ligado a HRP, usando ECL Prime western blotting detection reagent (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA). Las imágenes de las placas fotosensibles fueron capturadas y la densitometría analizada con Image J software versión 1.46r software (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

5.3. Inmunofluorescencia

Para las inmunolocalizaciones, ratones CD1 en el 15 DPN fueron sedados intraperitonealmente con 70 mg/kg de pentobarbital sódico (Sedalphorte^{MR}, Reg. SAGARPA Q-7503-003; uso veterinario) y transcardialmente perfundidos con solución salina al 9% fría, seguido de paraformaldehído al 4% p/v en buffer de fosfatos (PB), pH 7.4. Posteriormente los animales se decapitaron y el cerebro completo fue cuidadosamente removido, y postfijado con paraformaldehído al 4% en PB a 4°C, sucesivamente fueron deshidratados en solución crioprotectora de sacarosa al 20% y 30%. Secciones de 22µm fueron realizadas en frío y se procedió a hacer las inmunofluorescencias flotantes. Después de tres lavados con PBS+0.3% Triton X-100 (PBST), los cortes fueron incubados con anticuerpo primario anti-xCT o anti-EAAC1 y anti-MAP2 con 2% de suero de caballo normal en PBST toda la noche a 4°C y en agitación constante. El excedente de anticuerpo primario fue eliminado con tres lavados con PB, y entonces el anticuerpo secundario respectivo anti-rabbit Alexa Fluor 594 o anti-chicken Alexa 488 fue incubado por 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes se montaron con Vectashield mounting medium con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para ser analizados en un microscopio. Las fotografías se adquirieron en un microscopio confocal Olympus BX51WI DSU (Olympus, Center Valley, PA, USA), acoplado a una cámara Hamamatsu EM-CCD C9100 (Hamamatsu, Hamamatsu, Japan).

5.4. Determinación de los niveles de GSH y GSSG

Los niveles de GSH y GSSG se midieron del homogenado obtenido a partir de cerebro completo en el 1 DPN y corteza e hipocampo en el 15 DPN. El homogenado y las mediciones fueron realizadas mediante la metodología descrita por Senft et al., (2000). El ensayo fluorométrico de *o*-phthalaldehído (OPA, P0657-5G) fue adaptado a microplaca (Greiner high and medium binding 96 well plattes M4686-40EA, Sigma-Aldrich). La fluorescencia se determinó con filtros de 365 nm de excitación y 430 nm de emisión en un Multidetector de Elisa DTX 800/880 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Los niveles de GSH y GSSG se expresan en nmol por g de tejido, se usó como referencia una curva estándar de GSH y GSSG. El método de OPA, se basa

en la formación de un derivado fluorescente, isoindol, para el caso de del GSH. Para la determinación del GSSG en un primer paso se inhibe esta reacción y posteriormente el GSSG es reducido a GSH para la posterior derivación del isoindol con OPA.

5.5. Medición de iAs y especies de As metiladas

Las concentraciones de iAs y las especies de As metiladas se cuantificaron en la orina de 12 h de las hembras en el día de gestación 15-18 (colectada mediante el uso de una cámara metabólica, en la fase activa), en el cerebro completo en el 1 DPN y en hígado, corteza e hipocampo en el 15 DPN de la progenie. Las mediciones se realizaron por espectrometría de absorción atómica con generador de hidruros usando un criocondensador (HG-CT-AAS), como lo reportado por Hernández Zavala et al., (2008). La cuantificación fue realizada usando curvas de calibración independientes de la especie de arsénico. Sales disódicas ácidas de arsénico (99% de pureza), y ácido de arsénico dimetilado (DMAV; 98% de pureza) fueron obtenidas de Sigma-Aldrich. Sal disódica de ácido metilarsénico (MMAV, 99% de pureza), fue obtenido de Ventron (Danvers, MA, USA). El borohidruro de sodio fue obtenido de EM Science (Gibbstown, NJ, USA). Las muestras fueron digeridas con ácido fosfórico grado ultrapuro 2 X (J. Baker), previo a su análisis como se ha descrito por Hughes et al. (2003).

5.6. Pruebas de conducta

5.6.1. “Tarea de reconocimiento de lugar de objeto”

Al 90 DPN ratones CD1 machos y hembras controles (control), expuestos durante la gestación y hasta el 15 DPN de lactancia “gestacionalmente expuesto”(iAs 15 DPN) y con exposición gestacional y continuada a iAs “As crónico” (iAs 90 DPN), fueron sometidos a una tarea de localización espacial de objeto, para ello se empleó la metodología descrita por Mumby et al. (2002), adaptada para su uso en ratón. La tarea fue realizada en una cámara de campo abierto de acrílico con paredes blancas de 30 cm de alto x 60 cm ancho x 60 cm largo. Dos objetos de

idéntica forma, tamaño y color (blanco, negro y rojo), fueron usados en cada prueba. Los objetos y la cámara se limpiaron previa y posteriormente a cada sesión con una solución que contenía 10% de etanol, 10% de dextrán en agua destilada, para eliminar rastros odoríferos. Durante el experimento la distancia de las señales ambientales se mantuvieron de manera constante, así como las condiciones de oscuridad en el cuarto de experimentación. Por tres días consecutivos, los ratones fueron habituados de manera individual al contexto (cámara de campo abierto) y al experimentador, efectuando una sesión de 10 minutos por día por animal. En el cuarto día, la prueba se efectuó en dos fases: la fase exploratoria de localización de objeto (*fase de reconocimiento*); y la fase de prueba, para la discriminación del cambio de localización del objeto (*fase de prueba*). En la fase de reconocimiento, los dos objetos se situaron en idéntica orientación con respecto a las esquinas de la cámara (10 cm de las esquinas), a cada animal se le permitió un tiempo de exploración de objeto. Posteriormente el sujeto (ratón) fue regresado a la caja de alojamiento por 15 minutos. Concluido el tiempo de recuperación (15 minutos en la caja de alojamiento), el sujeto fue retornado a la cámara de campo abierto, con los mismos objetos de la fase de reconocimiento pero, uno de ellos había sido cambiado de lugar (en una esquina contraria y a la mitad de distancia de la esquina, manteniendo igual orientación). El tiempo de reconocimiento y de prueba fue de 5 minutos y ambas sesiones fueron video grabadas para posterior análisis por un observador entrenado. Las medidas de conducta incluyeron la frecuencia y el tiempo acumulado en segundos en el que el animal se acercó (tocar con el cuerpo o vibras) y tocó cada objeto con las patas durante la exploración. Se calculó un índice de discriminación (ID) mediante la fórmula de $ID = \text{tiempo dedicado a explorar el objeto cambiado} / \text{tiempo dedicado a explorar ambos objetos}$. Animales que durante la fase de prueba exploraron menos de 10 segundos, no fueron incluidos en el análisis. El ID fue también determinado en la fase de exploración para cada objeto, con el fin de verificar preferencia por el objeto o el lugar del objeto.

5.6.2. Laberinto de agua de Morris

Con esta prueba se valora la memoria de referencia espacial, dado que la plataforma es invisible y permanece en el mismo lugar durante los ensayos de entrenamiento en una piscina rodeada de señales ambientales extra-laberinto. El laberinto de agua fue realizado de acuerdo a lo reportado por Vorhees et al., (2006). La prueba se realizó en una piscina blanca y circular de 124 cm de diámetro. La plataforma de escape se mantuvo aproximadamente 1 cm por debajo de la superficie del agua. La temperatura del agua osciló entre 20-22°C. La piscina fue dividida en cuatro puntos cardinales (N, S, E y O), la plataforma permaneció invisible en el mismo lugar (cuadrante noreste “NE”). Las pruebas se realizaron durante la fase activa de los animales y con iluminación roja. La piscina se limpió entre cada entrenamiento. Las señales espaciales de referencia usadas fueron cartulinas con rayas y objetos en la habitación. El entrenamiento se realizó durante 5 días consecutivos a la misma hora del día anterior. Cada sesión de entrenamiento fue de 60 segundos por ratón con cuatro entrenamientos por animal por día, alternando el cuadrante de entrada en cada entrenamiento y sesión (**Cuadro 4**). Posterior a la llegada a la plataforma el sujeto permaneció en ella por 30 segundos (reconocimiento espacial). Las sesiones fueron videograbadas, se cuantificó el tiempo que tardaba el sujeto en llegar a la plataforma de escape, reportándose en cada día el promedio de los cuatro entrenamientos. Se usó el software EthoVision® XT Version 11.5 (Noldus Information Technology, International headquarters Wageningen, The Netherlands). En caso de que el ratón no encontrara de manera efectiva la plataforma, era cuidadosamente dirigido hacia ella, permitiendo el posterior tiempo de reconocimiento (30 segundos).

Cuadro 3. Cuadrante de entrada al laberinto de agua de Morris durante los cinco días de entrenamiento.

Día	Entrenamiento			
	1	2	3	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

E= este; N= norte; NO= noroeste; SE= sureste.

5.7. Análisis estadístico

Los datos son expresados en promedios \pm Error Estándar (SE). La n de los grupos en cada experimento es indicado en el pie de figura de cada resultado. Pruebas de “t” de Student o análisis de varianza (ANOVA) de una vía fueron usadas para evaluar la significancia estadística, seguidas de una prueba de comparación múltiple *post hoc* de Dunnett o de Tukey. ANOVA de medidas repetidas fue usada para la comparación con respecto al tiempo del experimento para el laberinto de agua de Morris y pesos de los animales durante el tiempo del experimento. Se estableció el valor de $P < 0.05$ como estadísticamente significativo en todos los casos.

6. RESULTADOS

6.1. Exposición a iAs

La exposición de los progenitores a 20 mg/L de iAs en el agua de bebida durante 30 días previos a la cruce fue bien tolerada, no se observaron alteraciones en el peso (**Figura 5A** y **B** en machos y hembras, respectivamente), consumo de agua (**Figura 7A**), o conductas reproductivas (progenitores), así como el peso de las hembras gestantes (**Figura 6**). Durante la gestación las hembras continuaron con la exposición a iAs. No se observaron cambios en el peso (**Figura 6**) y el consumo de agua durante la gestación (**Figura 7A**). Sin embargo, durante la lactancia las hembras expuestas a iAs disminuyeron de manera significativa el consumo de agua (**Figura 7A**). El tamaño de las camadas entre expuestas y controles, el número de hembras y machos, así como los días de gestación (19 ± 1 días) no se alteraron (**Cuadro 4**).

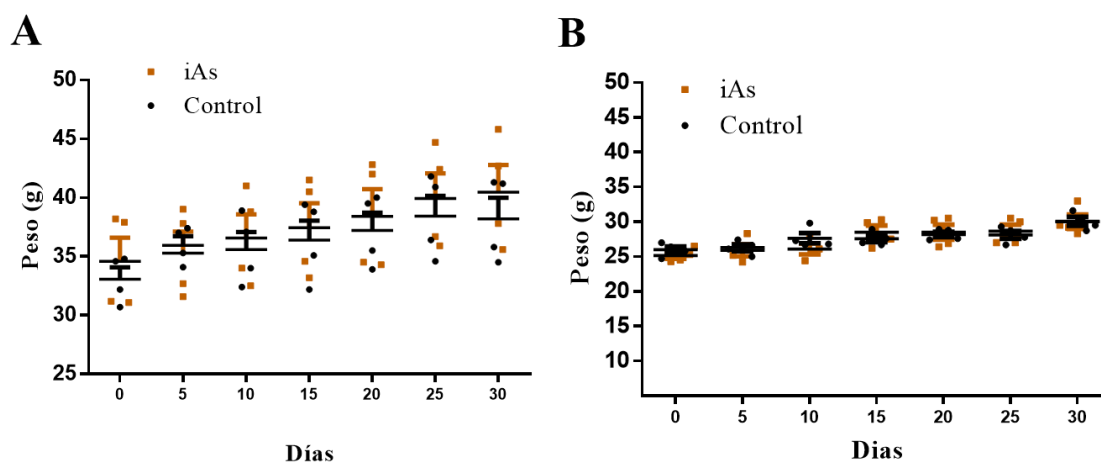


Figura 5. Peso de ratones control y expuestos a iAs 30 días previos a la cruce. Los animales fueron pesados de manera individual cada cinco días en un periodo de 30 días. **(A)** Peso de ratones machos y **(B)** hembras en edad reproductiva (7-8 semanas). Los valores son expresados como los pesos individuales de una n de 4 ratones por grupo \pm SE. Los grupos controles vs iAs fueron comparados mediante una prueba de "t" de medidas repetidas tomando como significativo un $P < 0.05$. No se observaron cambios en el peso previo a la cruce entre hembras y machos controles y los que ingerían agua con 20 mg/L de iAs.

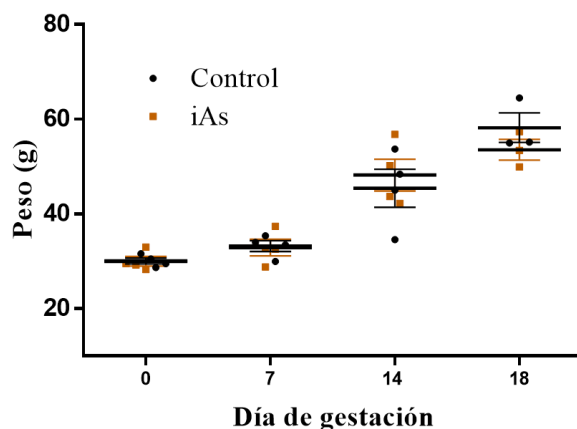


Figura 6. Peso de los ratones hembras controles y expuestos a iAs durante la gestación. Los animales fueron pesados de manera individual en el día 0, 7, 14 y 15-18 post-tapón vaginal. El inicio de la gestación fue estimado por la presencia del tapón vaginal. Los valores son expresados como los pesos individuales de una n de 4 ratones hembras, el valor de la media por grupo \pm SE. Los grupos control vs iAs fueron comparados mediante una prueba de *t* de medidas repetidas tomando como significativo un $P < 0.05$. No se observaron cambios en el peso durante la gestación entre hembras controles y las que ingerían agua con 20 mg/L de iAs.

Al nacimiento, la progenie expuesta durante la gestación no manifestó signos de toxicidad aguda, por ejemplo abortos, ataxia, enrojecimiento, hinchazón, malformaciones y/o muerte al nacimiento o durante al experimento (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Días de término de la gestación, pesos, signos de toxicidad agua y distribución de sexos en las progenies controles y expuestas a iAs.

Medida	Control	iAs	P
Hembras			
Días de término de la gestación (días)	18.5 \pm 1	18.25 \pm 1.15	0.7304
Progenie			
Peso al nacimiento (g)	1.33 \pm 0.52	1.5 \pm 0.55	0.5995
Abortos	0	0	NA
Malformaciones	0	0	NA
Signos de toxicidad aguda	0	0	NA
Sexo	nt= 51	nt= 51	
Número de machos	8 \pm 1.41	7 \pm 1.15	0.3153
Número de Hembras	4.75 \pm 2.06	5.75 \pm 2.63	0.5714

Los datos fueron tomados del promedio de 4 camadas controles y expuestas a 20 mg/L de iAs; NA= No Aplica; nt= n total

El promedio de ingesta de iAs para los machos fue de 2.69 ± 0.69 mg/kg por día durante los 30 días previos a la cruce, tiempo en que las hembras ingirieron 2.72 ± 0.88 mg/kg/día. Durante la gestación las hembras ingirieron 2.92 ± 1.17 mg/kg/día (20 días), y durante la lactancia (22 ± 1 días) las cantidades se incrementaron hasta 10.73 ± 1.9 mg/kg/día. Una disminución significativa de la ingesta de agua fue observada en el grupo de hembras expuestas a iAs durante este tiempo (**Figura 1A**).

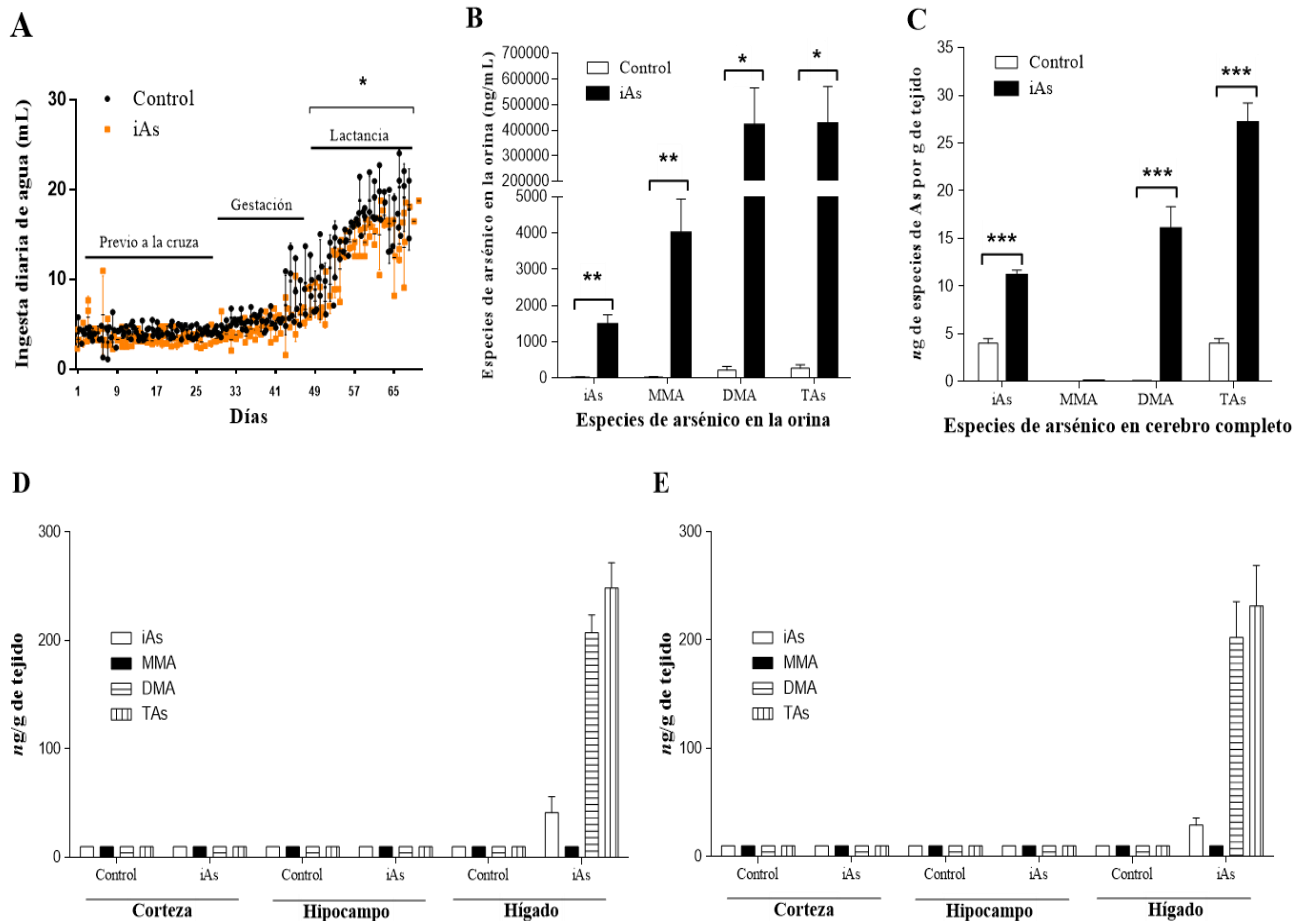


Figura 7. Ingesta de agua y especies de As en orina y tejido cerebral. **(A)** Ingesta de agua de hembras durante la gestación y lactancia. La ingesta de agua se estimó por peso diario del bebedero. Diferencias significativas se observaron solo en la lactancia. **(B)** Especies de As en orina de hembras controles y expuestas a iAs de 15-18 días de gestación (n=6). La orina de 12 h fue colectada usando cajas metabólicas. **(C)** iAs y especies de As en cerebro completo de ratón CD1 de 1 DPN y de 15 DPN macho **(D)** y hembra **(E)**. Para los análisis una cría fue elegida al azar de cada camada. Los valores son expresados como medias \pm SE; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. grupo control. iAs: arsénico inorgánico, MMA: monometilarsénico, DMA: dimetilarsénico, tAs (iAs + MMA + DMA): arsénico total (Modificado de Ramos Chávez et al., 2015).

6.2. Especies de As en orina de hembras gestantes, en cerebro completo en el 1 DPN y regiones en el 15 DPN de progenie expuesta gestacionalmente a iAs

La cantidad de iAs y las especies derivadas de su metabolismo se determinaron en la orina de hembras en el día 15-18 de gestación. La principal especie de As excretada en la orina de hembras expuestas fue el DMA, seguida del MMA y el iAs. El As total (tAs; MMA+DMA+iAs) en las hembras expuestas a iAs fue 1,500 veces más elevado que en las hembras controles (**Figura 7B**). En el 1 DPN, el análisis del As en cerebro completo de la progenie expuesta mostró que el DMA (58.9%) y el iAs (41%) fueron las principales especies presentes en el cerebro de la progenie expuesta durante la gestación a iAs. El nivel de iAs y sus especies en controles fueron 6.7 veces más bajas que en las crías expuestas en la gestación a iAs (**Figura 7C**). Durante la lactancia (15 DPN), los niveles de las especies de As en corteza e hipocampo de machos (**Figura 7D**) y hembras (**Figura 7E**) no fueron detectables en controles y expuestos a iAs, graficándose para ambos grupos el límite de detección del método. En cambio, en los hígados de machos y hembras expuesto a iAs se observó la acumulación de las especies de As (**Figura 7D y 7E**, respectivamente).

6.3. Efecto de la exposición gestacional a iAs sobre los niveles de GSH y GSSG en cerebro completo en el 1 DPN, y en corteza e hipocampo de ratones de 15 DPN.

Se sabe que el metabolismo del iAs consume GSH, una de las causas de estrés oxidante por iAs; para valorar si la exposición gestacional podría generar cambios en los niveles de GSH en células cerebrales, GSH y oxidado (GSSG) fue determinado en cerebro completo en el 1 DPN y en corteza e hipocampo en el 15 DPN. En el 1 DPN en cerebro completo, las crías expuestas gestacionalmente tuvieron un aumento significativo de GSSG (**Figura 8A**). En esta etapa, las regiones cerebrales y el sexo no pudieron ser identificados físicamente. En el 15 DPN, no se observaron diferencias en los niveles de GSH y GSSG en corteza e hipocampo de ratones machos y hembras controles y expuestos (**Figura 8B**). Sin embargo, en

hipocampo de hembras expuestas a iAs se observó un aumento significativo de GSH, lo cual podría ser debido a la expresión de transportadores de cistina o cisteína (**Figure 8C**).

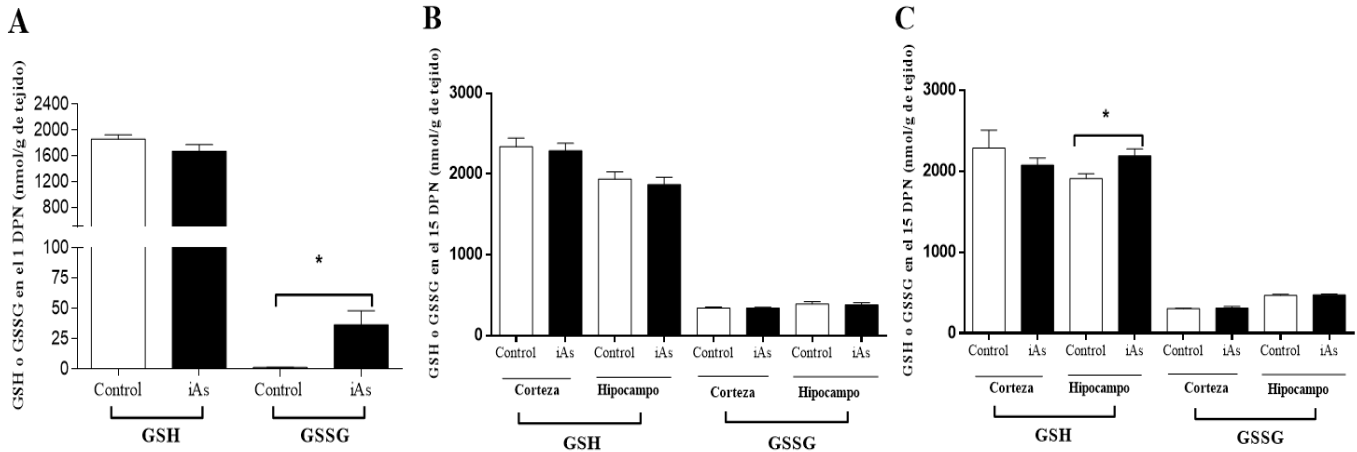


Figura 8. Niveles de GSH y GSSG en cerebro y regiones de ratones en el 1 y 15 DPN. **(A)** En el día 1, las especies de As se determinaron en cerebro completo. Al 15 DPN corteza e hipocampo pudieron ser separadas de machos **(B)** y hembras **(C)** y procesadas para la determinación de GSH y GSSG. Los datos son expresados como medias \pm SE. La significancia estadística (* $P < 0.05$ vs. grupo control) fue valorada con una prueba de “*t*” de Student; $n=9$ por grupo (Modificado de Ramos Chávez et al., 2015)

6.4. Los cambios en los niveles de GSH inducidos por iAs se ven acompañados con aumento en la expresión de los transportadores xCT, EAAC1 y LAT1 y modulación en la expresión de las subunidades del NMDAR en regiones cerebrales.

Para valorar si los cambios en el contenido de GSH y en GSSG pueden modular a los transportadores de cistina, cisteína y glutamato. Se exploró la expresión de los transportadores xCT, EAAC1 y LAT1 en cerebro completo en el 1 DPN y en la corteza e hipocampo en el 15 y 90 DPN mediante western blots. La expresión de los transportadores xCT, EAAC1 y LAT1 (**Figura 9A, B y C** respectivamente) fueron significativamente mayores en los cerebros de las crías expuestas a iAs en el 1 DPN.

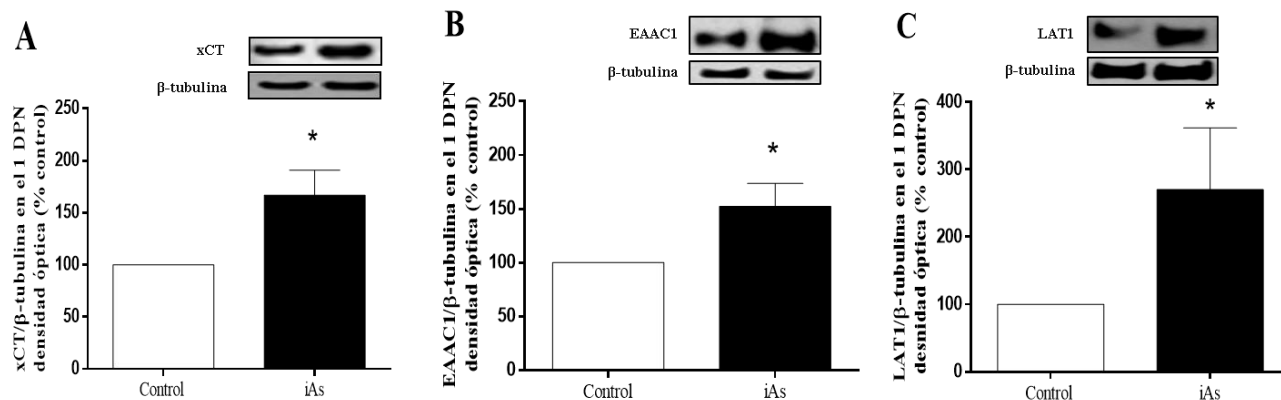


Figura 9. Expresión de transportadores de cistina/glutamato y cisteína en ratón controles y gestacionalmente expuestos en el 1 DPN. El cerebro completo fue obtenido y procesado para los análisis de western blot, como se describe en material y métodos para valorar la expresión de (A) xCT, (B) EAAC1 y (C) LAT1. Las evaluaciones densitométricas de las imágenes de los blot fueron realizadas usando β -tubulina como control de carga. Las barras representan la media \pm SE, valores relativos en donde el control representa el 100% de la expresión. La significancia estadística (* $P < 0.05$ vs. grupo control) fue valorada con una prueba de “*t*” de Student; $n=6$ por grupo. Blot representativos son mostrados en la parte superior de cada panel (Modificado de Ramos Chávez et al., 2015).

Esta expresión continuó incrementada en el 15 DPN para xCT y EAAC1 (**Figura 10C, D**), no fue así para LAT1 (dato no mostrado) en ratón macho y hembra gestacionalmente expuestos. La expresión de xCT y EAAC1 fue observada principalmente en neuronas del hipocampo (**Figura 10A, B**).

Un aumento en los niveles de glutamato extracelular ha sido asociado con modulación de las subunidades del NMDAR. En el mismo tiempo, la exposición a iAs disminuyó la expresión de las subunidad NR2A del NMDAR en el hipocampo de crías machos en el 15 DPN (**Figure 10E**), mientras la subunidad NR2B fue menor tanto en corteza como hipocampo de machos y hembras (**Figure 10F**).

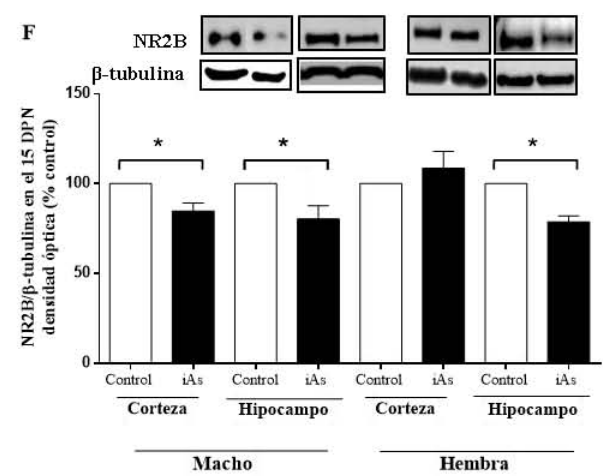
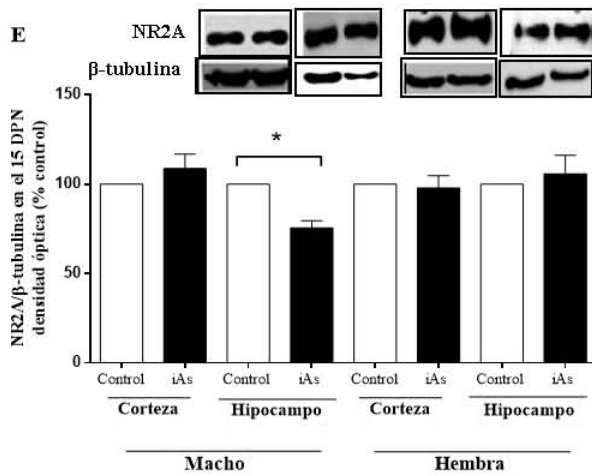
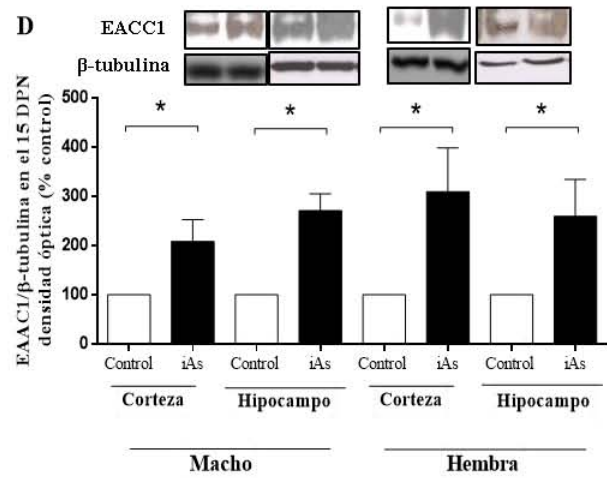
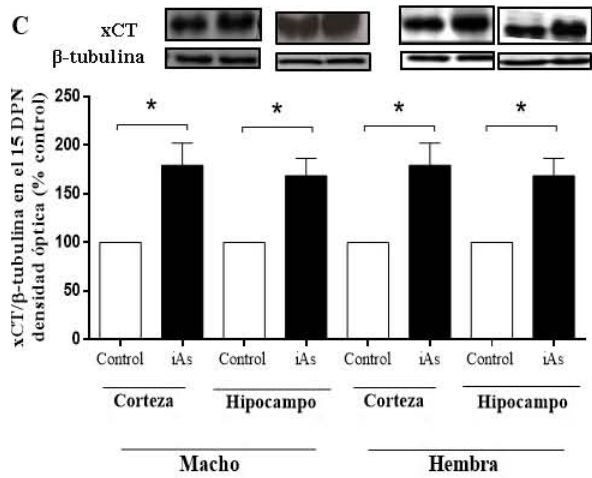
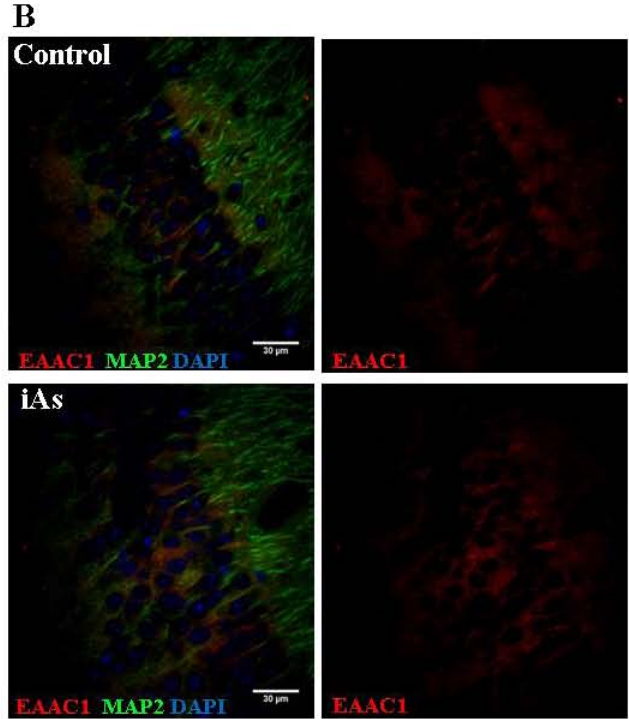
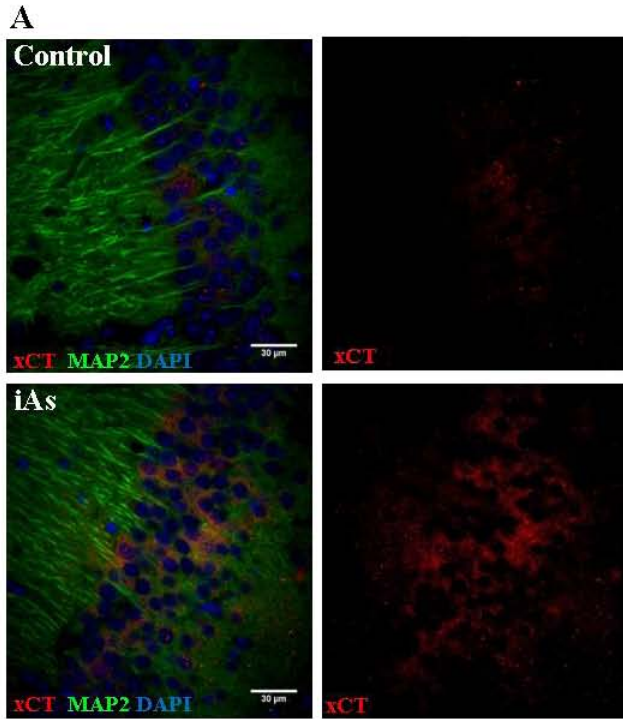


Figura 10. Expresión de transportadores de cistina/cisteína y glutamato en ratón controles y gestacionalmente expuestos en el 15 DPN. Imágenes de microscopía confocal de la expresión de xCT (**A**) y EAAC1 (**B**) en células de CA1 del hipocampo de ratones controles y expuestos de 15 DPN. Marcador neuronal anti-MAP2 (verde), xCT (rojo) o EAAC1 (rojo). Los núcleos fueron contrañeidos con DAPI (azul). La barra representa 30 μ m. La corteza e hipocampo fueron cuidadosamente removidas de machos y hembras y el tejido procesado para western blot como se describe en material y métodos para valorar la expresión de xCT (**C**); EAAC1 (**D**); subunidad NR2A del NMDAR (**E**); subunidad NR2B (**F**) del NMDAR. Las evaluaciones densitométricas de las imágenes de los blots fueron realizadas usando β -tubulina como control de carga. Las barras representan la media \pm SE, valores relativos en donde el control representa el 100% de la expresión. La significancia estadística (* $P < 0.05$ vs. grupo control) fue valorada con una prueba de “*t*” de Student; $n=4-6$ por grupo. Blots representativos son mostrados en la parte superior de cada panel (Modificado de Ramos Chávez et al., 2015).

En el 15 DPN, la progenie expuesta gestacionalmente a iAs fue subdividida, la mitad de camadas continuó la exposición con 20 mg/L de arsenito de sodio (como sus progenitores), mientras al resto de las camadas recibió agua libre de iAs, como los controles hasta el 90 DPN. En este tiempo se efectuó una prueba de reconocimiento de lugar de objeto. Posterior a ello los animales fueron sacrificados y el hipocampo fue obtenido para examinar la expresión de los transportadores y las subunidades del NMDAR. Los machos expuestos mostraron incremento en la expresión de xCT, aunque la exposición continuó (iAs 90 DPN), los niveles de xCT se reducen comparado con animales que fueron únicamente expuestos durante la gestación y hasta el 15 DPN (iAs 15 DPN; **Figura 11A**). La expresión de EAAC1 no se vio alterada en ninguno de los grupos (**Figure 11B**). Sin embargo, la expresión de GLT1 disminuyó únicamente en los animales expuestos durante la gestación y hasta el 15 DPN (iAs15 DPN), ningún cambio fue observado para GLAST (**Figura 11C, D**). Con respecto a las subunidades de NMDAR, la expresión de tanto NR2A y NR2B fueron significativamente disminuidas solo en el grupo de exposición en el periodo de la gestación y hasta el 15 DPN, cuando la expresión de xCT fue más alta y más baja de GLT1 (iAs15 DPN; **Figura 11C, D**). En el caso del hipocampo de las hembras, solo se observó un aumento marginal de la expresión de xCT en ambas condiciones (iAs 15 DPN y iAs 90 DPN; $p < 0.08$), sin cambios estadísticamente significativos en la expresión de GLAST, GLT1 o en las subunidades del NMDAR (**Figura 12A, B, C, D, E y F**).

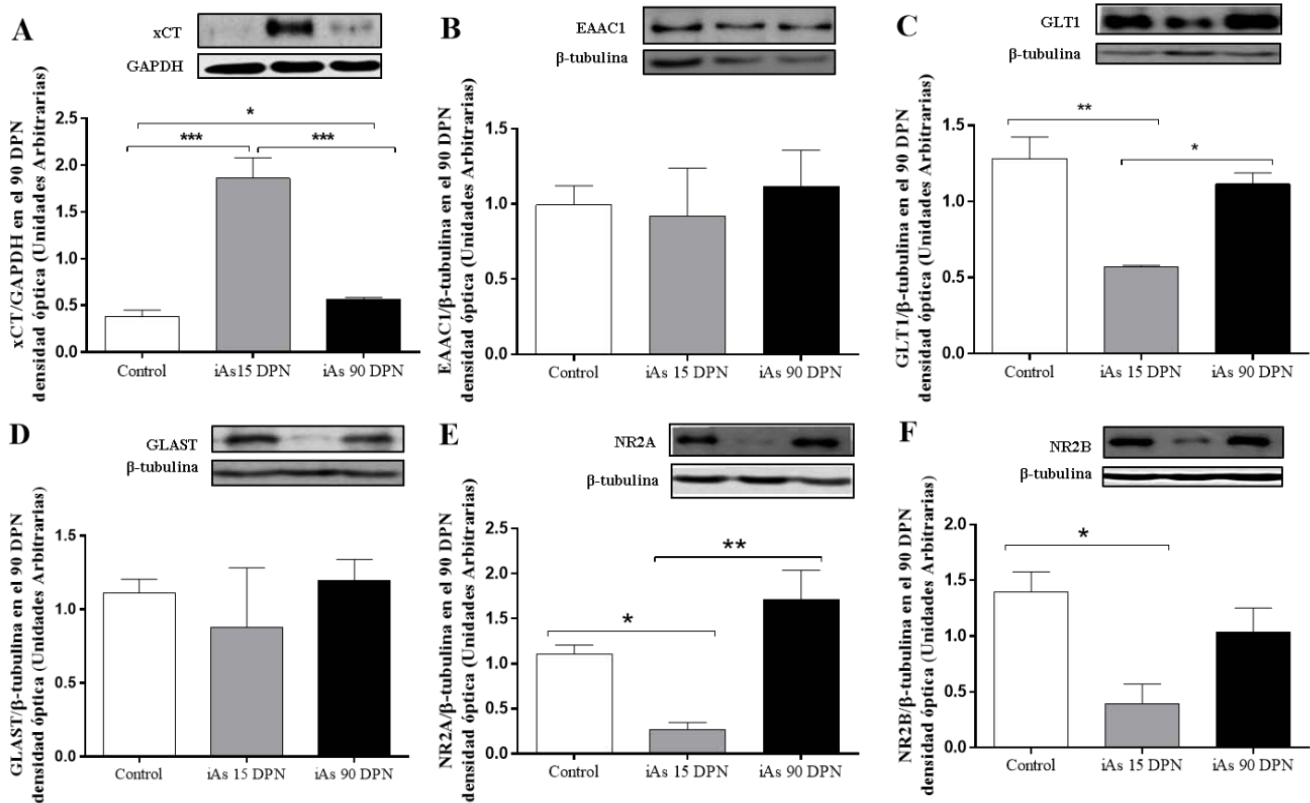


Figura 11. Expresión de transportadores de cistina/glutamato, cisteína y glutamato en hipocampo de ratones machos en el 90 DPN. xCT (A); EAAC1(B); GLT1(C); GLAST (D); NR2A (E); NR2B (F). Las evaluaciones densitométricas de las imágenes de los blots fueron realizadas usando GAPDH o β -tubulina como control de carga. Las barras representan la media \pm SE de valores relativos en donde el control representa el 100% de la expresión. La significancia estadística (* $P < 0.05$ vs. grupo control) fue valorada con una prueba de ANOVA con una prueba post-hot de Tukey; $n=3-5$ por grupo. Blots representativos son mostrados en la parte superior de cada panel. Control= controles, iAs15 DPN: expuestos a iAs durante la gestación y hasta el día 15 de lactancia, iAs 90 DPN: expuestos a iAs durante la gestación, lactancia y hasta el 90 DPN (Modificado de Ramos Chávez et al., 2015).

6.5. La exposición gestacional a arsénico altera la ejecución de las tareas de reconocimiento de lugar de objeto y laberinto de agua de Morris “memoria espacial”.

La tarea de reconocimiento de lugar fue realizada en el 90 DPN, para determinar si la exposición a iAs tuvo un impacto negativo sobre la memoria espacial. La habilidad de discriminación espacial, fue valorada en los grupos de ratones machos y hembras, que incluían al grupo control, iAs 15 DPN y iAs 90 DPN. Durante la fase de reconocimiento, no se observó preferencia por el objeto o el lugar de localización del objeto, valorado mediante el tiempo dedicado a la exploración de cada objeto

(Figura 13A). En la fase de prueba, cuando el objeto fue cambiado de lugar, los machos iAs 15 DPN y iAs 90 DPN disminuyeron significativamente el reconocimiento de la localización del objeto, en una medida similar (Figura 13B). En las hembras, este efecto fue marginalmente significativo para el grupo de iAs15 DPN, sin significancia con la exposición prolongada a iAs (iAs 90 DPN; Figura 13B). Estos resultados fueron corroborados en el laberinto de agua de Morris, observándose que los animales machos y hembras (Figura 14A y B, respectivamente) controles disminuyen de manera significativa el tiempo de llegada a la plataforma desde el día 2 de entrenamiento (mayor reconocimiento espacial), no así los iAs 15 DPN, y los iAs 90 DPN, que lo hacen hasta el día 5 de entrenamiento. Las hembras controles necesitaron dos entrenamientos previos para disminuir el tiempo de llegada a la plataforma, no así los machos quienes mostraron una mejoría en la localización a partir del primer día de entrenamiento (Figura 14A y B).

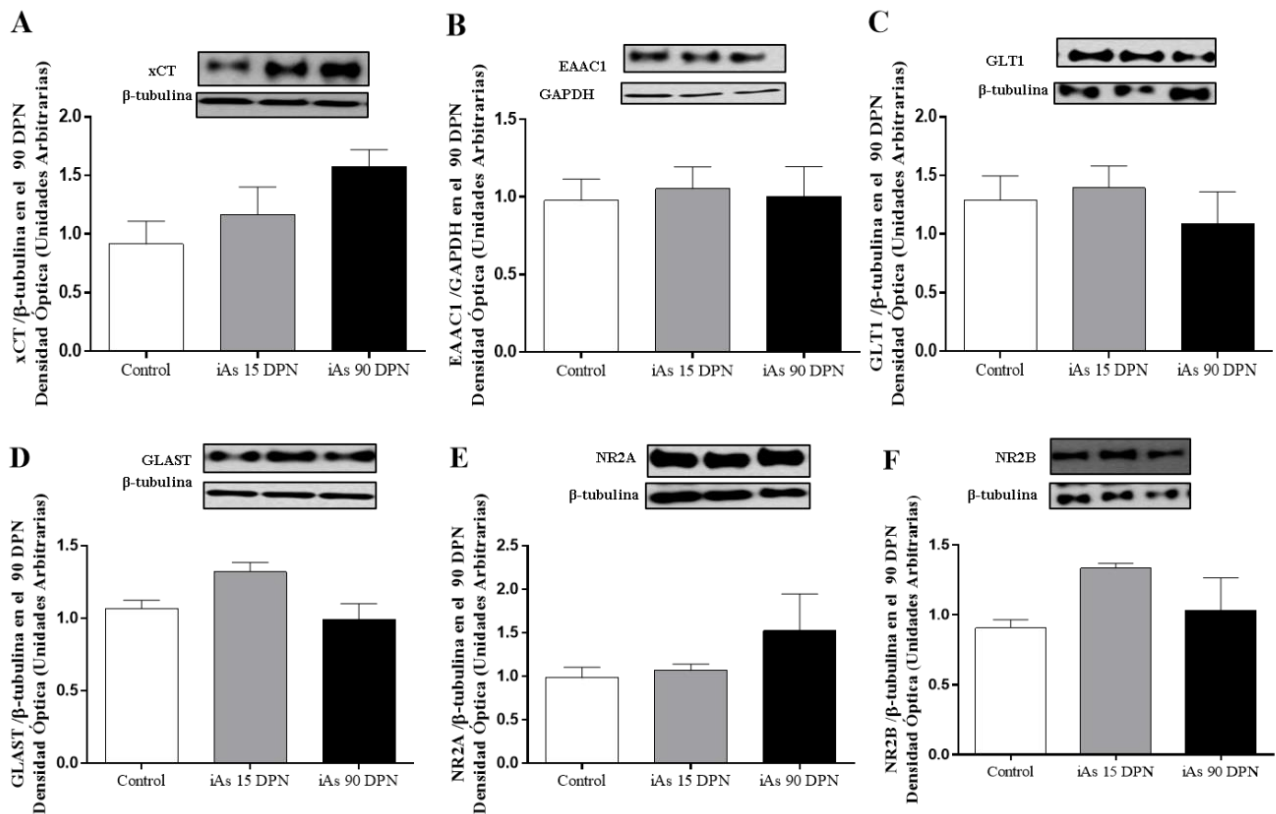


Figura 12. Expresión de transportadores de cistina/glutamato, cisteína y glutamato en hipocampo de ratones hembras en el 90 DPN. xCT (A); EAAC1(B); GLT1(C); GLAST (D); NR2A (E); NR2B (F). Las evaluaciones densitométricas de las imágenes de los blots fueron realizadas usando GAPDH o β -tubulina como control de carga. Las barras representan la media \pm SE de valores relativos en

donde el control representa el 100% de la expresión. La significancia estadística (* $P < 0.05$ vs. grupo control) fue valorada con una prueba de ANOVA con una prueba post-hoc de Tukey; $n=3-5$ por grupo. Blots representativos son mostrados en la parte superior de cada panel. Control= controles, iAs15 DPN: expuestos a iAs durante la gestación y hasta el día 15 de lactancia, iAs 90 DPN: expuestos a iAs durante la gestación, lactancia y hasta el 90 DPN.

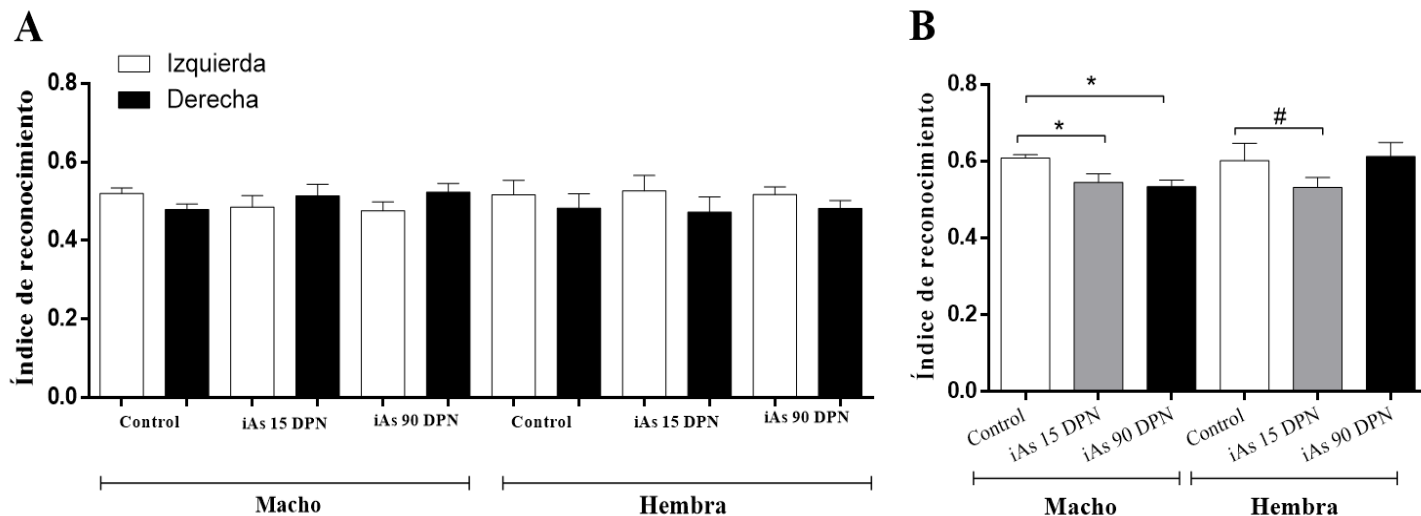


Figura 13. Efecto de la exposición a iAs sobre la memoria de trabajo espacial en pruebas de reconocimiento de lugar en ratones machos y hembras de 90 DPN. Índice de reconocimiento (IR)= (tiempo de exploración en el nuevo lugar/tiempo total de exploración). **(A)** Índice de discriminación en la fase de reconocimiento y **(B)** durante la fase de prueba en controles, expuestos durante la gestación y hasta el día 15 de lactancia (iAs 15 DPN) y expuestos durante la gestación, lactancia y hasta el 90 DPN (iAs 90 DPN). Cada barra representa la media \pm SE ($n=8$). Los datos fueron analizados usando ANOVA con una prueba post hoc de Dunnett para las comparaciones entre los grupos. La significancia estadística (*) $P < 0.05$ vs. grupo control; $n=3-5$ por grupo. # $P=0.0625$. Control= controles, iAs 15 DPN: expuesto a iAs durante la gestación y hasta el día 15 de lactancia, iAs-90 DPN: expuestos a iAs durante la gestación, lactancia y hasta el 90 DPN (Modificado de Ramos Chávez et al., 2015).

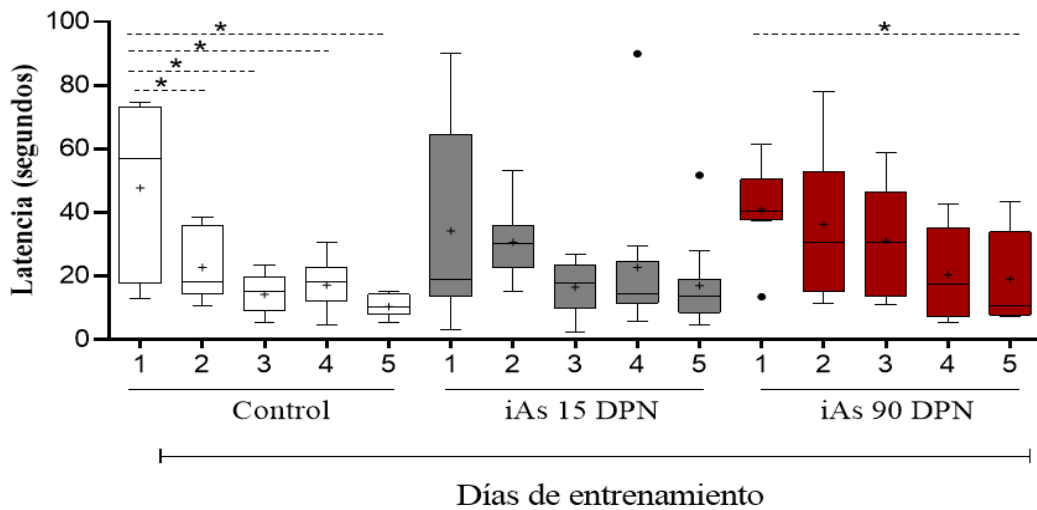
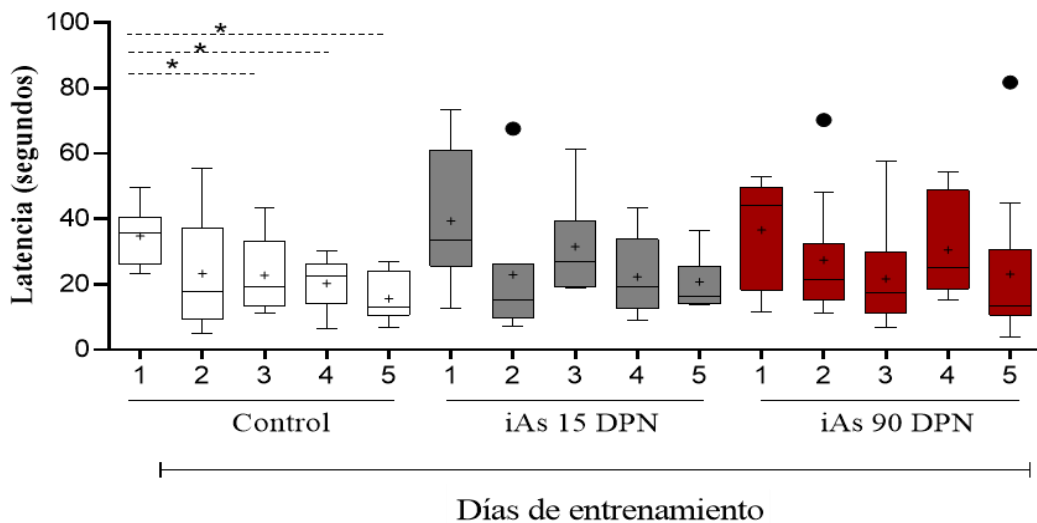
A**B**

Figura 14. Efecto de la exposición a iAs sobre la memoria espacial en el laberinto de agua de Morris en ratones machos **(A)** y hembras **(B)** de 90 DPN. Tiempo de latencia= segundos de llegada a la plataforma de escape durante los días 5 días de entrenamiento. Se realizaron 4 entrenamientos por día con duración de 60 segundos cada uno. Durante los días de entrenamiento se mantuvieron medidas de referencia espacial, y los animales fueron entrenados de manera individual. Los grupos fueron: controles, expuestos durante la gestación y hasta el día 15 de lactancia (iAs15 DPN) y expuestos durante la gestación, lactancia y hasta el día 90 postnatal (iAs 90 DPN). El gráfico representa los valores máximos y mínimos (bigotes), el primer y tercer cuartil (caja), la mediana (línea media) y la media "+", así como los valores atípicos "•" (n=10-12). Los datos fueron analizados usando ANOVA de medidas repetidas. La significancia estadística (*) P< 0.05 vs. el día 1 de entrenamiento. Control= controles, iAs 15 DPN: expuestos a iAs durante la gestación y hasta el día 15 de lactancia, iAs 90 DPN: expuestos a iAs durante la gestación, lactancia y hasta el 90 DPN.

7. DISCUSIÓN

El iAs es un metaloide ampliamente distribuido, está presente en productos antropogénicos, así como en la dieta (alimentos y agua). La presencia de iAs en agua de consumo humano causa múltiples efectos perjudiciales a la salud. La exposición crónica se ha dado a través de generaciones, sin embargo, pocos estudios han investigado los efectos de exposición al iAs en el desarrollo *in útero* (Vahter, 2008), mucho menos se ha explorado las alteraciones a nivel molecular. En humanos se ha documentado la presencia de las especies de As en sangre de cordón umbilical (Concha et al., 1998; Hall et al., 2007) y en otros tejidos fetales, incluyendo al cerebro, sugiriendo que el iAs es transferido al feto durante todo el desarrollo. Además la presencia de iAs y sus especies en tejido fetal se ha asociado negativamente con indicadores de neurodesarrollo (Parajuli et al., 2013) y correlacionado con déficit cognitivo que incluye alteraciones en los patrones de memoria, IQ verbal y de la escala completa (Tyler and Allan, 2014).

Los receptores a glutamato de tipo NMDA, participan en la memoria y el aprendizaje, así como en procesos de neurodesarrollo y neuropatologías. La sobreactivación de estos receptores puede causar muerte celular durante la falta de oxígeno y glucosa (Jung et al., 2012) y déficit de memoria debido a la exposición a xenobióticos (Olney et al., 2000; ⁶Li et al., 2012). Por otro lado, los transportadores de L-Cys²/L-Glu, participan en la síntesis de GSH en el SNC y son modulados por estrés oxidante. La hipótesis de este trabajo fue que la exposición a iAs durante la gestación podría incrementar la expresión de xCT por estrés oxidante. Esta condición puede aumentar el eflujo de L-Glu lo que podría llevar a la activación de los transportadores para eliminar el L-Glu extracelular. Al mismo tiempo, el estrés oxidante y el exceso de L-Glu podía modular la expresión de las subunidades del NMDAR (Scimemi et al., 2009) en el cerebro en desarrollo lo que podría después reflejarse como daño en la memoria.

Los ratones tienen la capacidad de metabolizar el iAs y los metabolitos formados son eliminados más eficientemente que en humanos, pero la proporción de metabolitos es muy similar (ATSDR, 2007). Los resultados del presente estudio muestran que el cerebro completo y el hígado de ratones expuestos a 20 mg/L de

iAs, contenían un promedio de concentración de especies de As de 28 y 260 ng de As/g de tejido, respectivamente (**Figura 7D y E**). Concentraciones similares han sido encontradas en muestras de hígado de residentes de un área endémica de arsénico que bebían agua que contenía entre 0.22 - 2 mg/L de iAs. En este caso, las muestras humanas de hígado mostraron concentraciones de 100 a 1,200 ng de As/g de tejido hepático, respectivamente (Mazumder, 2005). Se ha reportado la expresión de la enzima AS3MT en tejido fetal, lo cual sugiere metabolismo del iAs con consiguiente consumo de GSH.

La ingesta de agua de bebida con iAs (20 mg/L) no causó ningún signo visible de toxicidad aguda antes de la cruce de los machos y hasta la gestación de las hembras CD1, y en la progenie hasta los 90 días del post-nacimiento (DPN). Las camadas de hembras controles y expuestas fueron similares en tamaño (número de individuos), peso y proporción de sexos. Por el contrario, en un estudio similar en la cepa de ratón FVB/NJ, observaron reducción en la fertilidad por exposición a 20 mg/L de iAs, así como aumento de abortos y malformaciones congénitas (Wenjie et. al., 2007), posiblemente debidos a diferencias en la sensibilidad de la cepa. En la etapa de lactancia las hembras expuestas disminuyeron significativamente el consumo de agua, tiempo en el que aumentaron el consumo de agua alrededor de cuatro veces (**Figura 7A**).

Para verificar la toxico-cinética del iAs, las especies de As se determinaron en la orina de hembras gestantes y en cerebro e hígado de la progenie. El DMA fue la principal especie de As presente en la orina de hembras expuestas previo al parto (**Figura 7B**) similar a lo reportado por Concha et al., (1998) en un estudios en población chilena. En los cerebros de los recién nacidos, el iAs y DMA fue la especie predominante (**Figura 7C**). En el 15 DPN, cuando las regiones cerebrales y el sexo pudieron ser identificados, se sacrificaron animales, aislando la corteza y el hipocampo de machos y hembras. En este tiempo, los niveles de especies de As en hipocampo y corteza de machos y hembras lactantes expuestas no fueron diferentes de los machos y hembras controles. Esto no ocurrió en el hígado en donde la principal especie fue el DMA (**Figura 7D y E**).

La acumulación en hígado de las especies de As después de la exposición gestacional observada en este trabajo concuerda con lo reportado en ratones albinos por Jin et al. (2010). En humanos se ha mostrado que la acumulación de As en leche es muy baja (Concha et al., 1998). Así, estos resultados indican que la presencia de As en el cerebro al nacimiento es resultado de la absorción a través de la placenta y que fue eliminada del cerebro pero no del hígado durante la lactancia, en el día 15 de post-nacimiento. Estos datos puede reflejar diferencias en la cinética de eliminación a nivel de órganos que afectan la disposición de los metabolitos del As (Devesa et al., 2006). La presencia de iAs y DMA en el cerebro de los recién nacidos expuestos sugiere que la placenta no limita el paso de las especies de iAs y que podría estar asociado con los más altos niveles de GSH oxidado (GSSG; **Figura 8A**). Al mismo tiempo, el sistema de transporte xC⁻ (xCT), x-AG (EAAC1) y LAT1 aumenta su expresión (**Figura 9A, B y C** respectivamente), sugiriendo un incremento en la entrada de L-Cys, L-Cys₂ para la síntesis de GSH debido a la elevación de GSSG.

En las crías lactantes (15 DPN), los niveles de GSH o GSSG en corteza e hipocampo no fueron diferentes de los determinados en animales controles (**Figura 8B, C**) muy probablemente debidos a los bajos niveles de las especies de As (**Figura 7D, E**). Sin embargo la expresión de los transportadores xCT y EAAC1 se mantuvo aumentada (**Figura 10A, B**), ello fue también observado en las inmunofluorescencias de células de CA1 del hipocampo (**Figura 10A, B**). El aumento en la expresión tanto de xCT y EAAC1 pueden proteger contra la toxicidad de L-Glu (Lewerenz et al., 2006) reduciendo el L-Glu extracelular y la activación del NMDAR (Scimemi et al., 2009). En este tiempo se observó disminución significativa de la subunidad NR2B en ambos sexos, y la subunidad NR2A en el hipocampo sólo de machos expuestos de 15 DPN. Esta observación sugiere que la alteración del transporte de L-Cys₂ y L-Glu debido a la exposición a iAs puede modificar la expresión de NR2B en el hipocampo. Otras condiciones como el estrés prenatal (Zhao et al., 2013), etanol (Brady et al., 2013), dieta alta en grasa (Page et al., 2014) y nicotina (Wang et al., 2011) han sido asociadas con disminución de NR2B o la proporción de NR2B/NR2A.

La expresión reducida de NR2B del NMDAR se ha relacionado con alteraciones cognitivas y neuropatologías (Paoletti et al. 2013). En el 90 DPN, la progenie expuesta mostró daño significativo en la ejecución del reconocimiento de lugar comparado con los controles. Los machos fueron más afectados que las hembras (**Figura 13B y 14A**), sugiriendo que las neuronas hipocampales fueron afectadas por la exposición a iAs. Los animales fueron sacrificados para investigar la expresión de transportadores y de las subunidades del NMDAR en el 90 DPN en hipocampo. La expresión de xCT se mantuvo aumentada (**Figura 11A**) especialmente en los animales expuestos a iAs durante la gestación y hasta el 15 DPN. Sin embargo, en el 90 DPN, la expresión de EAAC1 no fue diferente entre la progenie control y expuesta.

El GLT1, es un transportador que participa en la eliminación del L-Glu extracelular, su expresión se disminuyó en los animales expuestos durante la gestación a iAs (**Figura 11C**). Estos resultados sugieren que los niveles del L-Glu pueden estar incrementados en el hipocampo de estos ratones, llevando a una disminución de NR2A y NR2B (**Figura 11D, F**) y a la disminución en la memoria espacial (**Figura 13B y 14A**). Estos resultados son consistentes con los hallazgos en modelos neuronales en donde el aumento de L-Glu extracelular inicia una respuesta adaptativa que lleva a una disminución gradual de la expresión del NMDAR en respuesta a tóxicos ambientales o a bloqueadores de transportadores de L-Glu (Cebers et al., 2001; Win-Shwe et al., 2009). La expresión de transportadores de L-Glu es esencial para mantener bajo el nivel de L-Glu extracelular, previniendo su neurotoxicidad crónica (Rothstein et al., 1996). En el 90 DPN, machos expuestos durante la gestación y que continuaron bebiendo agua con arsénico también muestran disminución de la memoria, aumento en la expresión de xCT y disminución marginal de NR2B, sin cambios en NR2A, sugiriendo que la eficiencia sináptica podría ser afectada. Investigaciones futuras serán necesarias para aclarar estas observaciones.

En resumen nuestros datos apoyan la idea de que el GSH es un importante reservorio de L-Glu neuronal que previene la excitotoxicidad (Koga et al., 2011).

Los presentes resultados sugieren que la exposición gestacional a iAs altera la expresión de las subunidades del NMDAR en el hipocampo y correlaciona con la disminución de la memoria espacial. Esta alteración podría estar asociada con estrés oxidante en el nacimiento y alteración del transporte de L-cistina/L-glutamato y de L-cisteína, lo cual puede a su vez disminuir la expresión de NR2B (Paoletti et al., 2013). La expresión de las subunidades del NMDAR cambia durante el desarrollo cerebral. La subunidad NR2B es más abundante, durante la segunda semana del desarrollo postnatal, así como en las neuronas inmaduras y en la adultez se ha sugerido que abunda en sitios extrasinápticos (Roulet et al., 2010; Qiu et al., 2011). La exposición gestacional y postnatal a iAs altera este patrón disminuyendo NR2B especialmente en el día 15 DPN cuando esta subunidad es más predominante. El transportador EAAC1, no altera la activación de los receptores a L-Glu en la hendidura sináptica, pero reduce el reclutamiento de NMDAR que contienen NR2B en sitios peri-sinápticos/extra-sinápticos (Scimemi et al., 2009). Entonces, el incremento en la expresión de EAAC1 observada en los ratones expuestos a iAs, podrían además alterar la vida media del L-Glu en el espacio extracelular alterando la activación del NMDAR y la inducción de la potenciación a largo plazo.

En ratas se ha visto que la exposición a realgar (una droga mineral que contiene iAs), genera déficit cognitivo, que es acompañado de un exceso de L-Glu extracelular en hipocampo. La acumulación de L-Glu en la hendidura sináptica se relacionó a la disminución en la expresión de NR1 y un aumento en la subunidad NR2A, disminución de GLT1 y cambios en la ultraestructura de neuronas del hipocampo (Huo et al., 2014). Interesantemente, una actividad incrementada del transportador xCT se acompaña con un aumento en los niveles de L-Glu y muerte neuronal vía la sobreactivación del NMDAR (Jackman et al., 2012). Además, ratones xCT^{-/-} muestran de forma significativa niveles extracelulares más bajos de L-Glu, así como una modificación en la memoria de trabajo, sugiriendo que xCT constituye una fuente de liberación no vesicular importante de L-Glu (De Bundel et al., 2011).

Se ha propuesto que xCT es un componente clave de la señalización excitadora de L-Glu, participando en la neurofisiología normal de la conducta (Lutgen et al., 2014). Adicionalmente, la disminución de NR2B podría ocurrir por ubiquitinización si se incrementan los agonistas del NMDAR, como ha sido reportado en otros modelos (Ehlers, 2003). Entonces, el transporte alterado de L-Glu por aumento de la actividad de xCT podría contribuir a la disminución de NR2B.

De manera similar ratas adultas expuestas a diferentes concentraciones de arsenito de sodio durante 3 meses a partir del destete, muestran daño cognitivo, acompañado de disminución dosis dependiente de NR2A en hipocampo a nivel de mRNA y proteína (Luo et al., 2009; Luo et al., 2012). Similarmente, el aumento de NR2A fue observado en el 90 DPN en hipocampo de machos (**Figure 11E**). La subunidad NR2A del NMDAR parece ser un blanco sensible de la neurotoxicidad inducida por el iAs (Luo et al., 2009; Luo et al., 2012).

Otra línea de investigación para explicar el mantenimiento de la expresión baja de la subunidad NR2B en machos podría ser debido a cambios epigenéticos. La metilación de iAs consume GSH y SAM lo que puede afectar la metilación del DNA (Reichard y Puga, 2010; Tyler et al., 2014). De acuerdo a Reichard y Puga (2010) las modificaciones epigenéticas observadas durante la exposición gestacional a iAs sugieren blancos de cambios de metilación gen específico, algunos de los genes son hipometilados mientras otros sufren hipermetilación.

Así, la hipermetilación del promotor de NR2B y/o hipometilación de represores de NR2B podría llevar a la disminución de NR2B. Al respecto, ratas expuestas durante la gestación a 3 y 36 mg/L de arsenito de sodio en agua de bebida muestran cambios en el *estatus* de metilación de genes involucrados en la plasticidad neuronal en corteza e hipocampo (Martínez et al., 2011). Modificaciones de histonas han sido observadas en ratón prenatalmente expuesto a 100 µg/L de arsenito de sodio lo cual podría ser asociado con alteraciones en el aprendizaje durante la adultez (Cronican et al., 2013). También, hay evidencia de que los cambios en la expresión de NR2B dependientes de actividad (Lee et al., 2008) o expresión de NR2B durante el tratamiento crónico intermitente con etanol (Qiang et al., 2010) son debidos a modificaciones epigenéticas.

La actividad/expresión alterada de la subunidad NR2B debido a modificaciones post-transcripcionales (Qiu et al., 2011), ubiquitinización (Ehlers, 2003) o modificaciones epigenéticas (Lee et al., 2008; Qiang et al., 2010; Tyler et al., 2014) se ha relacionado con la modulación del aprendizaje y procesos de memoria, percepción al dolor, comportamiento alimenticio así como a desórdenes neurológicos. Los resultados de este trabajo muestran que la expresión de las subunidades del NMDAR se alteran por la exposición a iAs, lo cual a su vez puede dañar la memoria en la vida temprana, lo que está en concordancia con lo reportado en algunas poblaciones humanas (Tyler et al., 2014). El aprendizaje y la memoria son procesos complejos que involucran varias regiones cerebrales y redes neuronales. Este trabajo muestra como el As y/o sus especies pueden alterar la expresión de componentes claves que pueden llevar a alteraciones conductuales y al desarrollo de posteriores neuropatologías en la vida. Es importante identificar los agentes ambientales que pueden dañar el desarrollo neuronal, maduración y fisiología interfiriendo con la bioquímica de neurotransmisores y amino ácidos cruciales tales como L-Glu y L-Cys.

8. CONCLUSION

En resumen, los presentes resultados sugieren que la exposición gestacional a iAs genera cambios en GSH, aumento en el transporte de L-cistina/L-glutamato y L-cisteína, disminución en la recaptura de L-Glu, generando un posible aumento del nivel extracelular de L-Glu, lo que correlaciona con la reducción de la expresión de NR2B, y con una disminución cognitiva en la adultez (**Figura 14**). Éste podría ser el mecanismo probable de cómo agentes que generan estrés oxidante comprometen la comunicación neuronal de L-Glu.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adamsen, R.K., Pokharel, A. (2002). The Arsenic Contamination of the Drinking Water in Nepal. Disponible en: <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacd/arsenico/nepal.pdf>.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for arsenic. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2007.
- Ahmed, S., Moore, S.E., Kippler, M., Gardner, R., Hawlader, M.D., Wagatsuma, Y., Raqib, R., Vahter, M. (2014). Arsenic exposure and cell-mediated immunity in pre-school children in rural bangladesh. *Toxicol Sci.* 141: 166-175. doi: 10.1093/toxsci/kfu113
- Ahmed, S., Mahabbat-e, Khoda, S., Rekha, R.S., Gardner, R.M., Ameer, S.S., Moore, S., Ekström, E.C., Vahter, M., Raqib, R. (2011). Arsenic-associated oxidative stress, inflammation, and immune disruption in human placenta and cord blood. *Environ. Health Perspect.* 119: 258-264. doi: 10.1289/ehp.1002086
- Al-Gubory, K.H. (2014). Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development. *Reprod. Biomed. Online.* 29: 17-31. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.03.002
- Aoyama, K., Nakaki, T. (2013). Neuroprotective properties of the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Amino Acids.* 45: 133-142. doi: 10.1007/s00726-013-1481-5
- Aoyama, K., Wang, F., Matsumura, N., Kiyonari, H., Shioi, G., Tanaka, K., Kinoshita, C., Kikuchi-Utsumi, K., Watabe, M., Nakaki, T. (2012). Increased neuronal glutathione and neuroprotection in GTRAP3-18-deficient mice. *Neurobiol. Dis.* 45: 973-982. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.016
- Aoyama, K., Matsumura, N., Watabe, M., Nakaki, T. (2008). Oxidative stress on EAAC1 is involved in MPTP-induced glutathione depletion and motor dysfunction. *Eur. J Neurosci.* 27: 20-30.
- Asadullah, M.N., Chaudhury, N. (2008). Poisoning the mind: arsenic contamination and cognitive achievement of children. *World Bank Policy Research Working Paper*, 2008. doi.org/10.1596/1813-9450-4510
- Ashok, A., Rai, N.K., Tripathi, S., Bandyopadhyay, S. (2015). Exposure to As-, Cd-, and Pb-mixture induces A β , amyloidogenic APP processing and cognitive impairments via oxidative stress-dependent neuroinflammation in young rats. *Toxicol. Sci.* 143:64-80. doi: 10.1093/toxsci/kfu208
- Augustin, H., Grosjean, Y., Chen, K., Sheng, Q., Featherstone, D.E. (2007). Nonvesicular release of glutamate by glial xCT transporters suppresses glutamate receptor clustering in vivo. *J Neurosci.* 27, 111-123.
- Bading, H. (2013). Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 593-608. doi: 10.1038/nrn3531

Baker, D.A., Shen, H., Kalivas, P.W. (2002). Cystine/glutamate exchange serves as the source for extracellular glutamate: modifications by repeated cocaine administration. *Amino Acids*. 23: 161-162.

Bentea, E., Demuyser, T., Van Liefferinge, J., Albertini, G., Deneyer, L., Nys, J., Merckx, E., Michotte, Y., Sato, H., Arckens, L., Massie, A., Smolders, I. (2015). Absence of system xc- in mice decreases anxiety and depressive-like behavior without affecting sensorimotor function or spatial vision. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 59, 49-58. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.01.010

Boado, R.J., Li, J.Y., Pardridge, W.M. (2004). Developmental regulation of the rabbit blood-brain barrier LAT1 large neutral amino acid transporter mRNA and protein. *Pediatr. Res*. 55, 557-560.

Bock, J., Wainstock, T., Braun, K., Segal, M. (2015). Stress In Utero: Prenatal Programming of Brain Plasticity and Cognition. *Biol. Psychiatry*. 78, 315-326. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.02.036

Brady, M.L., Diaz, M.R., Iuso, A., Everett, J.C., Valenzuela, C.F., Caldwell, K.K. (2013). Moderate prenatal alcohol exposure reduces plasticity and alters NMDA receptor subunit composition in the dentate gyrus. *J. Neurosci*. 33, 1062-1067. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1217-12.2013

Broberg, K., Ahmed, S., Engström, K., Hossain, M.B., Jurkovic, Mlakar, S., Bottai, M., Grandér, M., Raqib, R., Vahter, M. (2014). Arsenic exposure in early pregnancy alters genome-wide DNA methylation in cord blood, particularly in boys. *J. Dev. Orig. Health. Dis*. 5: 288-298. doi: 10.1017/S2040174414000221

Bruce, A.W. (2004). Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 10458-10463.

Buchet, J.P., Lauwerys, R. (1988). Role of thiols in the in-vitro methylation of inorganic arsenic by rat liver cytosol. *Biochem. Pharmacol*. 37, 3149-3153.

Burdo, J., Dargusch, R., Schubert, D. (2006). Distribution of the cystine/glutamate antiporter system xc- in the brain, kidney, and duodenum. *J. Histochem. Cytochem*. 54, 549-557.

Castro de Esparza, M.L. International Congress Mexico City, 20-24 June 2006, Natural Arsenic in Groundwaters of Latin America. Presencia de arsénico en el agua de bebida en América Latina y su efecto en la salud pública.

Calderon, J., Navarro, M.E., Jimenez-Capdeville, M.E., Santos-Diaz, M.A., Golden, A., Rodriguez-Leyva, I., Borja-Aburto, V., Díaz-Barriga, F. (2001). Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ. Res*. 85, 69-76.

Cebers, G., Cebere, A., Kovács, A. D., Högberg, H., Moreira, T., Liljequist, S. (2001). Increased ambient glutamate concentration alters the expression of NMDA receptor subunits in cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int*. 39, 151-160.

Charil, A., Laplante, D.P., Vaillancourt, C., King, S. (2010). Prenatal stress and brain development. *Brain. Res. Rev.* 65, 56-79. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.06.002

Cronican, A.A., Fitz, N.F., Carter, A., Saleem, M., Shiva, S., Barchowsky, A., Koldamova, R., Schug, J., Lefterov, I. (2013). Genome-wide alteration of histone H3K9 acetylation pattern in mouse offspring prenatally exposed to arsenic. *PLoS One.* 8, 1-14. doi: 10.1371/journal.pone.0053478

Concha, G., Vogler, G., Lezcano, D., Vahter, M. (1998). Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. *Toxicol. Sci.* 44, 185–190.

Davis, M.A., Li, Z., Gilbert-Diamond, D., Mackenzie, T.A., Cottingham, K.L., Jackson, B.P., Lee, J.S., Baker, E.R., Marsit, C.J., Karagas, M.R. (2014). Infant toenails as a biomarker of in utero arsenic exposure. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 24, 467-473. doi: 10.1038/jes.2014.38

Davidson, A. y Flick, R.P. (2013). Neurodevelopmental implications of the use of sedation and analgesia in neonates. *Clin. Perinatol.* 40, 559-573.

De Bundel, D., Schallier, A., Loyens, E., Fernando, R., Hirohisa, M., Van, Liefferinge, J., Vermoesen, K., Bannai, S., Sato, H., Michotte, Y., Smolders I., Massie, A. (2011). Loss of system x(c)- does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *J. Neurosci.* 31, 5792–5803. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5465-10.2011

Delnomdedieu, M., Basti, M.M., Otvos, J.D., Thomas, D.J. (1994). Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione: a magnetic resonance study. *Chem.-Biol. Interact.* 90, 139-155.

Devesa, V., Adair, B.M., Liu, J., Waalkes, M.P., Diwan, B., Styblo, M., Thomas, D.J. (2006). Arsenicals in maternal and fetal mouse tissues after gestational exposure to arsenite. *Toxicology* 224, 147-155.

Dheen, S.T., Tay, S.S., Boran, J., Ting, L.W., Kumar, S.D., Fu, J., Ling, E.A. (2009). Recent studies on neural tube defects in embryos of diabetic pregnancy: an overview. *Curr. Med. Chem.* 16, 2345-2354.

Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62, 649-671.

Dragunow, M. (2004). CREB and neurodegeneration. *Front. Biosci.*9:100-103.

Ehlers, M.D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin–proteasome system. *Nat. Neurosci.* 6, 231-242.

Fei, D.L., Koestler, D.C., Li, Z., Giambelli, C., Sanchez-Mejias, A., Gosse, J.A., Marsit, C.J., Karagas, M.R., Robbins, D.J. (2013). Association between In Utero arsenic exposure, placental gene expression, and infant birth weight: a US birth cohort study. *Environ. Health.* 16:12-58. doi: 10.1186/1476-069X-12-58

Ferrario, D., Croera, C., Brustio, R., Collotta, A., Bowe, G., Vahter, M., Gribaldo, L. (2008). Toxicity of inorganic arsenic and its metabolites on haematopoietic progenitors "in vitro": comparison between species and sexes. *Toxicology*. 249: 102-8. doi: 10.1016/j.tox.2008.04.008

Flora, S.J. (2011). Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic. Biol.* 51, 257-81. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.008

Flora, S.J., Bhatt, K., Mehta, A. (2009). Arsenic moiety in gallium arsenide is responsible for neuronal apoptosis and behavioral alterations in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 236-44. doi: 10.1016/j.taap.2009.05.013

Forrest, D., Yuzaki, M., Soares, H.D., Ng, L., Luk, D.C., Sheng, M., Stewart, C.L., Morgan, J.I., Connor, J.A., Curran, T. (1994). Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron*. 13, 325-338.

García-Chávez, E., Jiménez, I., Segura, B., 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, 1024-1031.

García-Chávez, E., Santamaría, A., Díaz-Barriga, F., Mandeville, P., Juárez, B., Jiménez-Capdeville, M.E. (2003). Arsenite-induced formation of hydroxyl radical in the striatum of awake rats. *Brain. Res.* 976: 82-89.

Gerr, F., Letz, R., Ryan, P.B., Green, R.C. (2000). Neurological effects of environmental exposure to arsenic in dust and soil among humans. *Neurotoxicology*. 21: 475-87.

Ghaheri-Fard, B., Zolghadri, J., Kamali-Sarvestani, E. (2010). Proteome differences of placenta between pre-eclampsia and normal pregnancy. *Placenta*. 31:121-125. doi: 10.1016/j.placenta.2009.11.004

Gochenauer, G.E., Robinson, M.B. (2001). Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) up-regulates astrocytic chloride-dependent L-[3H] glutamate transport and expression of both system xc(-) subunits. *J. Neurochem.* 78: 276-286.

Golub, M. S., Macintosh, M.S., Baumrind, N. (1998). Developmental and reproductive toxicity of inorganic arsenic: animal studies and human concerns. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 1, 199-241.

Gué, M., Bravard, A., Meunier, J., Veyrier, R., Gaillet, S., Recasens, M., Maurice, T. (2004). Sex differences in learning deficits induced by prenatal stress in juvenile rats. *Behav. Brain Res.* 150, 149-157.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NIH Publication No. 85-23. Revised 1985.

Haberny, K.A., Paule, M.G., Scallet, A.C., Sistare, F.D., Lester, D.S., Hanig, J.P., Slikker, W. Jr. (2002). Ontogeny of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor system and susceptibility to neurotoxicity. *Toxicol. Sci.* 68, 9-17.

Hall, M., Gamble, M., Slavkovich, V., Liu, X., Levy, D., Cheng, Z., Van Geen, A., Yunus, M., Rahman, M., Pilsner, J.R., Graziano, J. (2007). Determinants of arsenic metabolism: blood arsenic metabolites, plasma folate, cobalamin, and homocysteine concentrations in maternal-newborn pairs. *Environ. Health Perspect.* 115, 1503–1509.

Hansen, H.H., Briem, T., Dzierko, M., Sifringer, M., Voss, A., Rzeski, W., Zdzisinska, B., Thor, F., Heumann, R., Stepulak, A., Bittigau, P., Ikonomidou, C. (2004). Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. *Neurobiol. Dis.* 16: 440-453.

Hardingham, G.E., Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 682-696. doi: 10.1038/nrn2911

He, W., Greenwell, R.J., Brooks, D.M., Calderón-Garcidueñas, L., Beall, H.D., Coffin, J.D. (2007). Arsenic exposure in pregnant mice disrupts placental vasculogenesis and causes spontaneous abortion. *Toxicol. Sci.* 99: 244-253.

Healy, S.M., Casarez, E.A., Ayala-Fierro, F., Aposhian, H.V. (1998). Enzymatic methylation of arsenic compounds V. arsenite methyltransferase activity in tissues of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 148, 65-70.

Hernández-Zavala, A., Matousek, T., Drobná, Z., Paul, D.S., Walton, F., Adair, B.M., Jirí, D., Thomas, D.J., Stýblo, M. (2008). Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomicabsorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer). *J. Anal. At Spectrom.* 23, 342-351.

Holmseth, S., Dehnes, Y., Huang, Y.H., Follin-Arbelet, V.V., Grutle, N.J., Mylonakou, M.N., Plachez, C., Zhou, Y., Furness, D.N., Bergles, D.E., Lehre, K.P., Danbolt, N.C. (2012). The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. *J. Neurosci.* 32: 6000-6013. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5347-11.2012

Hughes, M.F., Kenyon, E.M., Edwards, B.C., Mitchell, C.T., Del Razo, L.M., Thomas, D.J. (2003). Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191, 202-210.

Huo, T.G., Li, W.K., Zhang, Y.H., Yuan, J., Gao, L.Y., Yuan, Y., Yang, H.L., Jiang, H., Sun, G.F. (2014). Excitotoxicity Induced by Realgar in the Rat Hippocampus: the Involvement of Learning Memory Injury, Dysfunction of Glutamate Metabolism and NMDA Receptors. *Mol. Neurobiol.* 51, 980-989. Doi: 10.1007/s12035-014-8753-2

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some Drinking-Water Disinfectants and Contaminants, Including Arsenic. Geneva:World Health Org, Intl Agency Res Cancer Monogr, 2004: 84. 267 pp.

Ikonomidou, C., Bittigau, P., Koch, C., Genz, K., Hoerster, F., Felderhoff-Mueser, U., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2001). Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem. Pharmacol.* 62, 401-405.

Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*. 283, 70-74.

Ikonomidou, C., Mosinger, J.L., Salles, K.S., Labruyere, J., Olney, J.W. (1989). Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-aspartate neurotoxicity. *J. Neurosci*. 9, 2809-2818.

Jackman, N.A., Melchior, S.E., Hewett, J.A., Hewett, S.J. (2012). Non-cell autonomous influence of the astrocyte system on hypoglycaemic neuronal cell death. *ASN Neuro*. 4, 23-32. pii: e00074. doi: 10.1042/AN20110030

Jantzie, L.L., Talos, D.M., Jackson, M.C., Park, H.K., Graham, D.A., Lechpammer, M., Folkerth, R.D., Volpe, J.J., Jensen, F.E. (2015). Developmental expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits in human white and gray matter: potential mechanism of increased vulnerability in the immature brain. *Cereb. Cortex*. 25, 482-495. doi: 10.1093/cercor/bht246

Jevtovic-Todorovic, V., Hartman, R.E., Izumi, Y., Benshoff, N.D., Dikranian, K., Zorumski, C.F., Olney, J.W., Wozniak, D.F. (2003). Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J. Neurosci*. 23: 876-882.

Jevtovic-Todorovic, V., Wozniak, D.F., Powell, S., Olney, J.W. (2001). Propofol and sodium thiopental protect against MK-801-induced neuronal necrosis in the posterior cingulate/retrosplenial cortex. *Brain. Res*. 913: 185-189.

Jiang, S., Su, J., Yao, S., Zhang, Y., Cao, F., Wang, F., Wang, H., Li, J., Xi, S. (2014). Fluoride and arsenic exposure impairs learning and memory and decreases mGluR5 expression in the hippocampus and cortex in rats. *PLoS One*. 9, 1-10 e96041. doi: 10.1371/journal.pone.0096041. eCollection 2014

Jin, Y., Xi, S., Li, X., Lu, C., Li, G., Xu, Y., Qu, C., Niu, Y., Sun, G. (2006). Arsenic speciation transported through the placenta from mother mice to their newborn pups. *Environ. Res*. 101, 349-55.

Jin, Y., Wang, G., Zhao, F., Liao, Y., Sun, D., Zhong, Y., Yu, X., Lv, X., Li, G., Sun, G. (2010). Distribution of speciated arsenicals in mice exposed to arsenite at the early life. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 73, 1323-1326. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.02.012

Jung, Y.J., Suh, E.C., Lee, K.E. (2012). Oxygen/Glucose Deprivation and Reperfusion Cause Modifications of Postsynaptic Morphology and Activity in the CA3 Area of Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Korean. J. Physiol. Pharmacol*. 16, 423-9. doi: 10.4196/kjpp.2012.16.6.423

Kageyama, T., Imura, T., Matsuo, A., Minato, N., Shimohama, S. (2000). Distribution of the 4F2 light chain, LAT1, in the mouse brain. *Neuroreport*. 11:3663-3666.

Kelsch, W., Li, Z., Wieland, S., Senkov, O., Herb, A., Göngrich, C., Monyer, H. (2014). GluN2B-containing NMDA receptors promote glutamate synapse development in

hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 34: 16022-16030. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1210-14.2014

Killian, D.M., Chikhale, P.J. (2001). Predominant functional activity of the large, neutral amino acid transporter (LAT1) isoform at the cerebrovasculature. *Neurosci. Lett.* 306, 1-4.

Kinnunen, A.K., Koenig, J.I., Bilbe, G. (2003). Repeated variable prenatal stress alters pre- and postsynaptic gene expression in the rat frontal pole. *J. Neurochem.* 86: 736-748. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01873.x

Koga, M., Serritella, A.V., Messmer, M. M., Hayashi-Takagi, A., Hester, L.D., Snyder, S.H., Sawa, A., Sedlak, T.W. (2011). Glutathione is a physiologic reservoir of neuronal glutamate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 596-602. doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.087

Kordas, K., Ardoino, G., Coffman, D.L., Queirolo, E.I., Ciccariello, D., Mañay, N., Ettinger, A.S. (2015). Patterns of exposure to multiple metals and associations with neurodevelopment of preschool children from Montevideo, Uruguay. *J. Environ. Public Health.* 2015: 493471. doi: 10.1155/2015/493471

Kobayashi, S., Kuwata, K., Sugimoto, T., Igarashi, K., Osaki, M., Okada, F., Fujii, J., Bannai, S., Sato, H. (2012). Enhanced expression of cystine/glutamate transporter in the lung caused by the oxidative-stress-inducing agent paraquat. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 2197-2203. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.040

La Bella, V., Valentino, F., Piccoli, T., Piccoli, F. (2007). Expression and developmental regulation of the cystine/glutamate exchanger (xc-) in the rat. *Neurochem. Res.* 32, 1081-1090.

Labunskyy, V.M., Gladyshev, V.N. (2013). Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging. *Antioxid. Redox. Signal.* 19, 1362-1372. doi: 10.1089/ars.2012.4891

Lai, T.W., Zhang, S., Wang, Y.T. (2014). Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 115, 157-88. doi: 10.1016/j.pneurobio

Laine, J.E., Bailey, K.A., Rubio-Andrade, M., Olshan, A.F., Smeester, L., Drobná, Z., Herring, A.H., Stýblo, M., García-Vargas, G.G., Fry, R.C. (2014). Maternal arsenic exposure, arsenic methylation efficiency, and birth outcomes in the Biomarkers of Exposure to ARsenic (BEAR) pregnancy cohort in Mexico. *Environ. Health. Perspect.* 123: 186-92. doi: 10.1289/ehp.1307476

Lalonde, R. y Joyal, C.C. (1993). Effects of ketamine and L-glutamic acid diethyl ester on spatial and nonspatial learning tasks in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44, 539-545.

Lantz, R.C., Hays, A.M. (2006). Role of oxidative stress in arsenic-induced toxicity. *Drug. Metab. Rev.* 38, 791-804.

Lau, A., Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 460, 525-542. doi: 10.1007/s00424-010-0809-1

Llanos, M.N., Ronco, A.M. (2009). Fetal growth restriction is related to placental levels of cadmium, lead and arsenic but not with antioxidant activities. *Reprod. Toxicol.* 27, 88-92. doi: 10.1016/j.reprotox.2008.11.057.

Lee, J.H., Zhang, J., Wei, L., Yu, S.P. (2015). Neurodevelopmental implications of the general anesthesia in neonate and infants. *Exp. Neurol.* 272, 50-60. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.03.028

Lee, S., Kim, W., Ham, B. J., Chen, W., Bear, M. F., Yoon, B. J. (2008). Activity-dependent NR2B expression is mediated by MeCP2-dependent epigenetic regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 930-934. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.082

Lei, X., Guo, Q., Zhang, J. (2012). Mechanistic insights into neurotoxicity induced by anesthetics in the developing brain. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 6772-6799. doi: 10.3390/ijms13066772

Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., Abrous, D.N. (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 97, 11032-11037

Lewerenz, J., Klein, M., Methner, A. (2006). Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system Xc⁻ protects from oxidative glutamate toxicity. *J. Neurochem.* 98, 916-925.

^aLi, Y., Tan, Z., Li, Z., Sun, Z., Duan, S., Li, W. (2012). Impaired long-term potentiation and long-term memory deficits in xCT-deficient mice. *Biosci. Rep.* 32, 315-321. doi: 10.1042/BSR20110107

^bLi, Z., Chadalapaka, G., Ramesh, A., Khoshbouei, H., Maguire, M., Safe, S., Rhoades, R. E., Clark, R., Jules, G., McCallister, M., Aschner, M. & Hood, D. B. (2012). PAH particles perturb prenatal processes and phenotypes: protection from deficits in object discrimination afforded by dampening of brain oxidoreductase following in utero exposure to inhaled benzo(a)pyrene. *Toxicol. Sci.* 125, 233-47. doi: 10.1093/toxsci/kfr261

Limón-Pacheco, J.H., Hernández, N.A., Fanjul-Moles, M.L., Gonsébat, M.E. (2007). Glutathione depletion activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways that display organ-specific responses and brain protection in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 1335-47.

Liu, J., Yu, L., Coppin, J.F., Tokar, E.J., Diwan, B.A., Waalkes, M.P. (2009). Fetal arsenic exposure appears to facilitate endocrine disruption by postnatal diethylstilbestrol in neonatal mouse adrenal. *Chem. Biol. Interact.* 182: 253-258. doi: 10.1016/j.cbi.2009.07.023

Loepke, A.W., Soriano, S.G. (2008). An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function. *Anesth. Analg.* 106, 1681-1707.

Luo, J., Qiu, Z., Zhang, L., Shu, W.Q. (2012). Arsenite exposure altered the expression of NMDA receptor and postsynaptic signaling proteins in rat hippocampus. *Toxicol. Lett.* 211, 39-44. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.02.021

- Luo, J.H., Qiu, Z.Q., Shu, W.Q., Zhang, Y.Y., Zhang, L., Chen, J.A. (2009). Effects of arsenic exposure from drinking water on spatial memory, ultra-structures and NMDAR gene expression of hippocampus in rats. *Toxicol. Lett.* 184, 121–125. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.10.02
- Lutgen, V., Resch, J., Qualmann, K., Raddatz, N.J., Panhans, C., Olander, E.M., Kong, L., Choi, S., Mantsch, J.R., Baker, D.A. (2014). Behavioral assessment of acute inhibition of system xc⁻ in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 231: 4637-4647. doi: 10.1007/s00213-014-3612-4
- Lymperaki, E., Tsikopoulos, A., Makedou, K., Paliogianni, E., Kiriazi, L., Charisi, C., Vagdatli, E. (2015). Impact of iron and folic acid supplementation on oxidative stress during pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol.* 18:1-4.
- Majumdar, K.K., Guha, Mazumder, D.N. (2012). Effect of drinking arsenic-contaminated water in children. *Indian. J. Public. Health.* 56: 223-226. doi: 10.4103/0019-557X.104250
- Marafante, E., Vahter, M., Envall, J. (1985). The role of the methylation in the detoxication of arsenate in the rabbit. *Chem.-Biol. Interact.* 56, 225–238.
- Martínez, L., Jiménez, V., García-Sepúlveda, C., Ceballos, F., Delgado, J.M., Nino-Moreno, P., Doniz, L., Saavedra-Alanís, V., Castillo, C.G., Santoyo, M.E., González-Amaro, R., Jiménez-Capdeville, M.E. (2011). Impact of early developmental arsenic exposure on promotor CpG-island methylation of genes involved in neuronal plasticity. *Neurochem. Int.* 58, 574–581. doi: 10.1016/j.neuint.2011.01.020
- Martínez-Finley, E.J., Ali, A.M., Allan, A.M. (2009). Learning deficits in C57BL/6J mice following perinatal arsenic exposure: consequence of lower corticosterone receptor levels?. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94: 271-277. doi: 10.1016/j.pbb.2009.09.006
- Mazumder, D.N. (2005). Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 169-175.
- McCullagh, E.A., Featherstone, D.E. (2014). Behavioral characterization of system xc⁻ mutant mice. *Behav. Brain. Res.* 265: 1-11. doi: 10.1016/j.bbr.2014.02.010
- McDonald, J.W., Silverstein, F.S., Johnston, M.V. (1988). Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.* 459, 200-203.
- Meier, C., Ristic, Z., Klauser, S., Verrey, F. (2002). Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *EMBO J.* 21, 580-589.
- Mennerick, S. y Zorumski, C.F. (2000). Neural activity and survival in the developing nervous system. *Mol. Neurobiol.* 22, 41-54.
- Mirallen V.J., Martínez-López, I., Zaragoza, R., Borrás, E., García, C., Pallardó, F.V., Viña, J.R. (2001). Na⁺ dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) in primary astrocyte cultures: effect of oxidative stress. *Brain. Res.* 922: 21-29.

Mishra, D., Flora, S.J. (2008). Differential oxidative stress and DNA damage in rat brain regions and blood following chronic arsenic exposure. *Toxicol. Ind. Health*. 24: 247-256. doi: 10.1177/0748233708093355

Mony, L., Kew, J.N.C., Gunthorpe, M.J., Paoletti, P. (2009). Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br. J. Pharmacol.* 157, 1301-1317. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00304.x

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 12, 529-540.

Mukherjee, S.C., Rahman, M.M., Chowdhury, U.K, Sengupta, M.K., Lodh, D., Chanda, C.R., Saha, K.C., Chakraborti, D. (2003). Neuropathy in arsenic toxicity from groundwater arsenic contamination in West Bengal, India. *J. Environ. Sci. Health. A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 38: 165-83.

Mumby, D.G., Gaskin, S., Glenn, M.J., Schramek, T.E., Lehmann, H. (2002). Hippocampal Damage and Exploratory Preferences in Rats: Memory for Objects, Places, and Contexts. *Learn. Mem.* 9, 49-57.

National Research Council, (1999). Arsenic in Drinking Water. National Academy of Sciences, Washington, DC.

National Research Council, 2001. Arsenic in drinking water. J Environ Health. 2001 update. National Academy Press, Washington, DC.

Naziroğlu, M., Simşek, M., Kutlu, M. (2004). Moderate exercise with a dietary vitamin C and E combination protects against streptozotocin-induced oxidative damage to the blood and improves fetal outcomes in pregnant rats. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42: 511-517.

Nishio, H., Kasuga, S., Ushijima, M., Harada, Y. (2001). Prenatal stress and postnatal development of neonatal rats—sex-dependent effects on emotional behavior and learning ability of neonatal rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 37-45.

Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización".

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Okamoto, S., Sherman, K., Bai, G., Lipton, S.A. (2002). Effect of the ubiquitous transcription factors, SP1 and MAZ, on NMDA receptor subunit type 1 (NR1) expression during neuronal differentiation. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 107, 89-96.

Olivas-Calderón, E., Recio-Vega, R., Jay, Gandolfi, A., Clark, Lantz, R., González-Cortes, T., Alba, C.G., Froines, J.R., Espinosa-Fematt, J.A. (2015). Lung inflammation biomarkers and lung function in children chronically exposed to arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* pii: S0041-008X(15)30010-7. doi: 10.1016/j.taap.2015.06.001

Olney, J.W. (2002). New insights and new issues in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology*. 23: 659-668.

Olney, J.W., Farber, N.B., Wozniak, D.F., Jevtovic-Todorovic, V., Ikonomidou, C. (2000). Environmental agents that have the potential to trigger massive apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Environ. Health Perspect.* 108, 383-388.

Page, K.C., Jones, E.K., Anday, E.K. (2014). Maternal and postweaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 306, 527-537. doi: 10.1152/ajpregu.00319.2013

Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383-400. doi: 10.1038/nrn3504

Parajuli, R.P., Fujiwara, T., Umezaki, M., Watanabe, C. (2013). Association of cord blood levels of lead, arsenic, and zinc with neurodevelopmental indicators in newborns: a birth cohort study in Chitwan Valley, Nepal. *Environ. Res.* 121, 45-51. doi: 10.1016/j.envres.2012.10.010

Parvez, F., Wasserman, G.A., Factor-Litvak, P., Liu, X., Slavkovich, V., Siddique, A.B., Sultana, R., Sultana, R., Islam, T., Levy, D., Mey, J.L., van Geen, A., Khan, K., Kline, J., Ahsan, H., Graziano, J.H. (2011). Arsenic exposure and motor function among children in Bangladesh. *Environ. Health Perspect.* 119, 1665-1670. doi: 10.1289/ehp.1103548

Patel, S.A., Warren, B.A., Rhoderick, J.F., Bridges, R.J. (2004). Differentiation of substrate and non-substrate inhibitors of transport system xc(-): an obligate exchanger of L-glutamate and L-cystine. *Neuropharmacology*. 46, 273-284.

Patil, S.B., Kodliwadmath, M.V., Kodliwadmath, M. (2009). Lipid peroxidation and anti-oxidant activity in complicated pregnancies. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 36, 110-112.

Punshon, T., Davis, M.A., Marsit, C.J., Theiler, S.K., Baker, E.R., Jackson, B.P., Conway, D.C., Karagas, M.R. (2015). Placental arsenic concentrations in relation to both maternal and infant biomarkers of exposure in a US cohort. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 25, 599-603. doi: 10.1038/jes.2015.16

Qanungo, S., Mukherjea, M. (2000). Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol. Cell. Biochem.* 215:11e9.

Qiang, M., Denny, A., Chen, J., Ticku, M.K., Yan, B., Henderson, G. (2010). The site specific demethylation in the 5'-regulatory area of NMDA receptor 2B subunit gene associated with CIE-induced upregulation of transcription. *PLoS One.* 5, 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0008798

Qiang, M., Ticku, M.K. (2005). Role of AP-1 in ethanol-induced N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunit gene up-regulation in mouse cortical neurons. *J. Neurochem.* 95, 1332-1341.

Qiu, S., Li, X.Y., Zhuo, M. (2011). Post-translational modification of NMDA receptor GluN2B subunit and its roles in chronic pain and memory. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 22, 521-529. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.06.003

Rahman, A., Persson, L.A., Nermell, B., El Arifeen, S., Ekström, E.C., Smith, A.H., Vahter, M. (2010). Arsenic exposure and risk of spontaneous abortion, stillbirth, and infant mortality. *Epidemiology.* 21, 797–804. doi: 10.1097/EDE.0b013e3181f56a0d

Raivich, G., Behrens, A. (2006). Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Prog. Neurobiol.* 78, 347-363

Ramos-Chávez, L.A., Rendón-López, C.R., Zepeda, A., Silva-Adaya, D., Del Razo, L.M., Gensebatt, M.E. (2015). Neurological effects of inorganic arsenic exposure: altered cysteine/glutamate transport, NMDA expression and spatial memory impairment. *Front. Cell. Neurosci.* 9; 9:21. doi: 10.3389/fncel.2015.00021

Reichard, J. F., Puga, A. (2010). Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation. *Epigenomics* 2, 87–104. doi:10.2217/epi.09.45

Rendeiro, C., Foley, A., Lau, V.C., Ring, R., Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Williams, C.M., Regan, C., Spencer, J.P. (2014). A role for hippocampal PSA-NCAM and NMDA-NR2B receptor function in flavonoid-induced spatial memory improvements in young rats. *Neuropharmacology.* 79, 335-344. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.003

Robert, S.M., Ogunrinu-Babarinde, T., Holt, K.T., Sontheimer, H. (2014). Role of glutamate transporters in redox homeostasis of the brain. *Neurochem. Int.* 73, 181-191. doi: 10.1016/j.neuint.2014.01.001

Rodríguez-Lado, L., Sun, G., Berg, M., Zhang, Q., Xue, H., Zheng, Q., Johnson, C.A. (2013). Groundwater Arsenic Contamination Throughout China. *Science.* 341, 866-868 DOI: 10.1126/science.1237484

Rodríguez, V.M., Del Razo, L.M., Limón-Pacheco, J.H., Giordano, M., Sánchez-Peña, L.C., Uribe-Quero, E., Gutiérrez-Ospina, G., Gensebatt, M.E. (2005). Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicol. Sci.* 84, 157-166.

Rodríguez, V.M., Jiménez-Capdeville, M.E., Giordano, M. (2003). The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicol. Lett.* 145:1-18.

Rodríguez-Barranco, M., Lacasaña, M., Aguilar-Garduño, C., Alguacil, J., Gil, F., González-Alzaga, B., Rojas-García, A. (2013). Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Total. Environ.* 1: 454-455:562-77. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.03.047

Roopra, A. (2001). Neurological disease: listening to gene silencers. *Mol. Interv.* 1, 219-228.

Rosado, J.L., Ronquillo, D., Kordas, K., Rojas, O., Alatorre, J., Lopez, P., Garcia-Vargas, G., Del Carmen-Caamaño, M., Cebrián, M.E., Stoltzfus, R.J. (2007). Arsenic exposure and

cognitive performance in Mexican schoolchildren. *Environ. Health Perspect.* 115, 1371-1375.

Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron.* 16: 675-686.

Roulet, F. I., Wollaston, L., Decatanzaro, D., Foster, J.A. (2010). Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience.* 170, 514-522. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.069

Rudge, C.V., Röllin, H.B., Nogueira, C.M., Thomassen, Y., Rudge, M.C., Odland, J.Ø. (2009). The placenta as a barrier for toxic and essential elements in paired maternal and cord blood samples of South African delivering women. *J. Environ. Monit.* 11: 1322-1330. doi: 10.1039/b903805a

Saha, K.K., Engstrom, A., Hamadani, J.D., Tofail, F., Rasmussen, K.M., Vahter, M. (2012). Pre- and postnatal arsenic exposure and body size to two years of age: a cohort study in rural Bangladesh. *Environ. Health Perspect.* 120, 1208-1214.

Sánchez-Peña, L.C., Petrosyan, P., Morales, M., González, N.B., Gutiérrez-Ospina, G., Del Razo, L.M., Gonshebbatt, M.E. (2010). Arsenic species, AS3MT amount, and AS3MT gene expression in different brain regions of mouse exposed to arsenite. *Environ. Res.* 110, 428-434. doi: 10.1016/j.envres.2010.01.007

Scheetz, A.J. y Constantine-Paton, M. (1994). Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J.* 8, 745-752.

Schindler, J., Jung, S., Niedner-Schatteburg, G., Friauf, E., Nothwang, H.G. (2006). Enrichment of integral membrane proteins from small amounts of brain tissue. *J. Neural Transm.* 113, 995-1013.

Schlebusch, C.M., Gattepaille, L.M., Engström, K., Vahter, M., Jakobsson, M., Broberg, K. (2015). Human adaptation to arsenic-rich environments. *Mol. Biol. Evol.* 32, 1544-1555. doi: 10.1093/molbev/msv046

Schoenherr, C.J., Paquette, A.J., Anderson, D.J. (1996). Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 9881-9886.

Scimemi, A., Tian, H., Diamond, J. S. (2009). Neuronal Transporters Regulate Glutamate Clearance, NMDA Receptor Activation, and Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *J. Neurosci.* 29, 14581-14595. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4845-09.2009

Scott, D.B., Michailidis, I., Mu. Y., Logothetis, D., Ehlers, M.D. (2004). Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. *J. Neurosci.* 24, 7096-7109.

Scott, N., Hatlelid, K.M., MacKenzie, N.E., Carter, D.E. (1993). Reactions of arsenic (III) species with glutathione. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 102-106.

Senft, A.P., Dalton, T.P., Shertzer, H.G. (2000). Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* 280, 80-86.

Serrano, F., Klann, E. (2004). Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing. Res. Rev.* 3:431-443.

Shen, J., Liu, J., Xie, Y., Diwan, B.A., Waalkes, M.P. (2007). Fetal onset of aberrant gene expression relevant to pulmonary carcinogenesis in lung adenocarcinoma development induced by in utero arsenic exposure. *Toxicol. Sci.* 95, 313-20.

Shih, A.Y., Erb, H., Sun, X., Toda, S., Kalivas, P.W., Murphy, T.H. (2006). Cystine/glutamate exchange modulates glutathione supply for neuroprotection from oxidative stress and cell proliferation. *J. Neurosci.* 26, 10514-10523.

Shila, S., Kokilavani, V., Subathra, M., Panneerselvam, C. (2005). Brain regional responses in antioxidant system to alpha-lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology.* 210, 25-36.

Shipton, O.A., Paulsen, O. (2014). GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369, 20130163. doi: 10.1098/rstb.2013.0163

Smith, A.H., Marshall, G., Yuan, Y., Ferreccio, C., Liaw, J., von, Ehrenstein, O., Steinmaus, C., Bates, M.N., Selvin, S. (2006). Increased mortality from lung cancer and bronchiectasis in young adults after exposure to arsenic in utero and in early childhood. *Environ. Health. Perspect.* 114: 1293-1296.

Shrestha, R. (2012). Arsenic Contamination of Groundwater in Nepal: Good Public Health Intention Gone Bad. *Student. Pulse*, 4(09).

Son, G.H., Geum, D., Chung, S., Kim, E.J., Jo, J.H., Kim, C.M., Lee, K.H., Kim, H., Choi, S., Kim, H.T., Lee, C.J., Kim, K. (2006). Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 26, 3309-3318.

Stratmann, G., Sall, J.W., May, L.D., Bell, J.S., Magnusson, K.R., Rau, V., Visrodia, K.H., Alvi, R.S., Ku, B., Lee, M.T., Dai, R. (2009). Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats. *Anesthesiology.* 110: 834-848. doi: 10.1097/ALN.0b013e31819c463d

Styblo, M., Yamauchi, H., Thomas, D. (1995). Comparative in vitro methylation of trivalent and pentavalent arsenicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 135, 172-178.

Suckow, M.A., Danneman, P., Brayton, C. *The Laboratory Mouse*. New York Washington, D.C. CRC Press LLC (2000). ISBN 0-8493-0322-2, www.crcpress.com. 7 p.

Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature.* 401: 63-69.

Thomas, D.J., Li, J., Waters, S.B., Xing, W., Adair, B.M., Drobna, Z., Devesa, V., Styblo, M. (2007). Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 232, 3-13.

Thomas, D.J., Waters, S.B., Styblo, M., (2004). Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 319-326.

Thomas, D.J., Styblo, M., Lin, S. (2001). The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176, 127-44.

Tsai, S.Y., Chou, H.Y., The, H.W., Chen, C.M., Chen, C.J. (2003). The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence. *Neurotoxicology.* 24, 747-753.

Tsang, V., Fry, R.C., Niculescu, M.D., Rager, J.E., Saunders, J., Paul, D.S., Zeisel, S.H., Waalkes, M.P., Styblo, M., Drobná, Z. (2012). The epigenetic effects of a high prenatal folate intake in male mouse fetuses exposed in utero to arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264: 439-50. doi: 10.1016/j.taap.2012.08.022

Tyler, C.R., Allan, A.M. (2014). The Effects of Arsenic Exposure on Neurological and Cognitive Dysfunction in Human and Rodent Studies: A Review. *Curr. Environ. Health Rep.* 1, 132-147.

Vahter, M. (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology.* 181-182: 211-217.

Vahter, M. (2008). Health effects of early life exposure to arsenic. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102, 204-211. doi: 10.1111/j.1742-7843.2007.00168.x

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

Valdovinos-Flores, C., Gonsebatt, M.E. (2012). The role of amino acid transporters in GSH synthesis in the blood-brain barrier and central nervous system. *Neurochem. Int.* 61, 405-414. doi: 10.1016/j.neuint.2012.05.019

Von Ehrenstein, O.S., Poddar, S., Yuan, Y., Mazumder, D.G., Eskenazi, B., Basu, A., Hira-Smith, M., Ghosh, N., Lahiri, S., Haque, R., Ghosh, A., Kalman, D., Das, S., Smith, A.H. (2007). Children's intellectual function in relation to arsenic exposure. *Epidemiology* 18, 44-51.

Vorhees C.V., Williams M.T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* 2006; 1:848-58.

Waalkes, M.P., Jie, L., Bhalchandra, A.D. (2007). Transplacental arsenic carcinogenesis in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 271-280.

Wadhwa, P.D., Sandman, C.A. & Garite, T.J. (2001). The neurobiology of stress in human pregnancy: implications for prematurity and development of the fetal central nervous system. *Prog. Brain Res.* 133, 131-142.

Wang, H., Dávila-García, M.I., Yarl, W., Gondré-Lewis, M.C. (2011). Gestational nicotine exposure regulates expression of AMPA and NMDA receptors and their signaling apparatus in developing and adult rat hippocampus. *Neuroscience* 188, 168-181. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.04.069

Wang, C.H., Hsiao, C.K., Chen, C.L., Hsu, L.I., Chiou, H.Y., Chen, S.Y., Hsueh, Y.M., Wu, M.M., Chen, C.J. (2007). A review of the epidemiologic literature on the role of environmental arsenic exposure and cardiovascular diseases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 315-326.

Wang, T.F., Ding, C.N., Wang, G.S., Luo, S.C., Lin, Y.L., Ruan, Y., Hevner, R., Rubenstein, J.L., Hsueh, Y.P. (2004). Identification of Tbr-1/CASK complex target genes in neurons. *J Neurochem.* 91, 1483-1492.

Wang S.L., Chiou J.M., Chen C.J., Tseng C.H., Chou W.L., Wang C.C., Wu T.N., Chang, L.W. (2003). Prevalence of non-insulin-dependent diabetes mellitus and related vascular diseases in southwestern arseniasis-endemic and nonendemic areas in Taiwan. *Environ. Health. Perspect.* 111: 155-159.

Wasserman, G.A., Liu, X., Loiacono, N.J., Kline, J., Factor-Litvak, P., Van Geen, A., Mey, J.L., Levy, D., Abramson, R., Schwartz, A., Graziano, J. H. (2014). A cross-sectional study of well water arsenic and child IQ in Maine schoolchildren. *Environ. Health.* 13, 23. doi: 10.1186/1476-069X-13-23

Watson, J.B., Mednick, S.A., Huttunen, M. & Wang, X. (1999). Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. *Dev. Psychopathol.* 11, 457-466.

Weinstock, M. (2001). Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog. Neurobiol.* 65, 427-451.

Wenjie, H., Greenwell, R.J., Brooks, D.M., Calderón-Garcidueñas, L., Beall, H.D., Coffin, J.D. (2007). Arsenic exposure in pregnant mice disrupts placental vasculogenesis and causes spontaneous abortion. *Toxicol. Sci.* 99, 244-253.

Win-Shwe, T.T., Mitsushima, D., Yamamoto, S., Fujitani, Y., Funabashi, T., Hirano, S., Fujimaki, H. (2009). Extracellular glutamate level and NMDA receptor subunit expression in mouse olfactory bulb following nanoparticle-rich diesel exhaust exposure. *Inh. Toxicol.* 21, 828-836. doi:10.1080/08958370802538068

World Health Organization. 2004. Guidelines for Drinking-water Quality Third Edition Volume 1. Recommendations

Wu, J., Song, T.B., Li, Y.J., He, K.S., Ge, L., Wang, L.R. (2007). Prenatal restraint stress impairs learning and memory and hippocampal PKC β 1 expression and translocation in offspring rats. *Brain. Res.* 1141, 205–213.

Wu, M.M., Chiou, H.Y., Wang, T.W., Hsueh, Y.M., Wang, I.H., Chen, C.J., Lee, T.C. (2001). Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan. *Environ. Health. Perspect.* 109: 1011-1017.

Xi, S., Guo, L., Qi, R., Sun, W., Jin, Y., Sun, G. (2010). Prenatal and early life arsenic exposure induced oxidative damage and altered activities and mRNA expressions of neurotransmitter metabolic enzymes in offspring rat brain. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 24: 368-78.

Yang, J., Han, H., Cao, J., Li, L., Xu, L. (2006). Prenatal stress modifies hippocampal synaptic plasticity and spatial learning in young rat offspring. *Hippocampus*. 16: 431–436.

Yoshida, T., Yamauchi, H., Fan Sun, G. (2004). Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinkingwater: dose-response relationships in review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 243–252.

Zhao, D., Liu, D., Chen, X., Wang, K., Zhang, A., Kang, J., Zhou, Q., Duan, T. (2013). Prenatal stress disturbs hippocampal KIF17 and NR2B in spatial cognition in male offspring. *J. Neurosci. Res.* 91, 535-44. doi: 10.1002/jnr.23172

11. ANEXOS

11.1. Químicos

Todos los químicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), de lo contrario son mencionados. Los anticuerpos usados en el presente trabajo para western blot e inmuno-fluorescencia, así como las condiciones de uso son listados en el **cuadro 5**.

Cuadro 5. Anticuerpos primarios usados en western blot e inmuno-fluorescencias, secundarios, proteínas de carga y marcadores de peso molecular.

Anticuerpo	Casa comercial	Catálogo	Proteína (µg)	Dilución
Rabbit anti-xCT	Abcam	ab37185	20	1:2000 ^{WB} ; 1:100 ^{IF}
Rabbit anti-EAAC1	Abcam	ab124802	20	1:3000 ^{WB} ; 1:300 ^{IF}
Rabbit anti-LAT1	Santa Cruz Biotechnology	sc-34554	20	1:2000 ^{WB}
Rabbit anti-GLT1	Abcam	ab41621	5	1:3000 ^{WB}
Rabbit anti-GLAST	Abcam	ab416	5	1:3000 ^{WB}
Rabbit anti-NR2A	Millipore	AB1555P	20	1:3000 ^{WB}
Rabbit anti-NR2B	Millipore	AB1557P	40	1:3000 ^{WB}
anti-MAP2	Abcam	ab5392	NA	1:800 ^{IF}
Rabbit Alexa Fluor 594	Life Technologies	A11039	NA	1:300 ^{IF}
anti-chicken Alexa 488	Life Technologies	A21207	NA	1:300 ^{IF}

Proteínas de carga, secundarios y marcadores de peso molecular

mouse anti-β-tubulina	Sigma-Aldrich	T4026	NA	1:5000 ^{WB}
mouse anti-GAPDH	Millipore	MAB374	NA	1:5000 ^{WB}
Secundario anti-rabbit-HRP	Cell Signaling	7074S	NA	1:4000 ^{WB} ; 1:5000 ^{WB}
Secundario anti-mouse-HRP	invitrogen	#61-6520	NA	1:5000 ^{WB}
Secundario anti-biotinilado-HRP	Cell Signaling	#7075P5	NA	1:3000 ^{WB}
Kaleidoscope (marcador visual)	BIO-RAD	#161-0324	NA; se cargaron 3 µL por gel	NA
Marcador de peso molecular (Biotinylated Protein Ladder)	Cell Signaling	7727S	NA; se cargaron 3 µL por gel	NA

HRP= Peroxidasa de rábano; ^{IF}= Inmunofluorescencia; µL= microlitros; NA= No Aplica; ^{WB}= Western Blot



Neurological effects of inorganic arsenic exposure: altered cysteine/glutamate transport, NMDA expression and spatial memory impairment

Lucio A. Ramos-Chávez¹, Christian R. R. Rendón-López¹, Angélica Zepeda¹, Daniela Silva-Adaya², Luz M. Del Razo³ and María E. Gensebatt^{1*}

¹ Departamento de Medicina Genómica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México

² Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México, DF, México

³ Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, México, DF, México

Edited by:

Victoria Campos, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México

Reviewed by:

Annalisa Scimemi, SUNY Albany, USA

Takashi Tominaga, Tokushima Bunri University, Japan

*Correspondence:

María E. Gensebatt, Departamento de Medicina Genómica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, México
e-mail: margen@unam.mx

Inorganic arsenic (iAs) is an important natural pollutant. Millions of individuals worldwide drink water with high levels of iAs. Chronic exposure to iAs has been associated with lower IQ and learning disabilities as well as memory impairment. iAs is methylated in tissues such as the brain generating mono and dimethylated species. iAs methylation requires cellular glutathione (GSH), which is the main antioxidant in the central nervous system (CNS). In humans, As species cross the placenta and are found in cord blood. A CD1 mouse model was used to investigate effects of gestational iAs exposure which can lead to oxidative damage, disrupted cysteine/glutamate transport and its putative impact in learning and memory. On postnatal days (PNDs) 1, 15 and 90, the expression of membrane transporters related to GSH synthesis and glutamate transport and toxicity, such as xCT, EAAC1, GLAST and GLT1, as well as LAT1, were analyzed. Also, the expression of the glutamate receptor N-methyl-D-aspartate (NMDAR) subunits NR2A and B as well as the presence of As species in cortex and hippocampus were investigated. On PND 90, an object location task was performed to associate exposure with memory impairment. Gestational exposure to iAs affected the expression of cysteine/glutamate transporters in cortex and hippocampus and induced a negative modulation of NMDAR NR2B subunit in the hippocampus. Behavioral tasks showed significant spatial memory impairment in males while the effect was marginal in females.

Keywords: arsenic, gestational, neurological effects, xCT, EAAC1, GLT1, NMDAR

INTRODUCTION

Experimental, as well as epidemiological studies, provide evidence suggesting that both environment and genetics are important components in the development of neuropathologies at early age or later in life. Diet components and chronic exposure to heavy metals and metalloids have been associated with the manifestation of neurological impairments, particularly when exposure occurs during the development and maturation of the nervous system (Winneke, 2011).

Inorganic arsenic (iAs) is an ubiquitous metalloid that is used in wood preservation, as a pesticide, in electronic devices due to its semiconductor capacities and also as a chemotherapeutic agent (ATSDR, 2007). This metalloid which is considered an epidemiologically important natural pollutant can be found in arsenic-containing minerals, ores and groundwater. Globally, more than 200 million of individuals drink water with levels of iAs above the World Health Organization reference value of 10 µg/L. Increased concentrations of iAs have been found in groundwaters in Argentina, Chile, China, India, Mexico, Taiwan and the USA where people are chronically exposed to iAs by drinking water from contaminated wells as a result of geothermal activities,

mineral dissolution or deposition and weathering of atmospheric volcanic particles.

Deficits in cognitive functions as evidenced by decreased intelligence, verbal coefficients (Calderón et al., 2001) and impairments in learning and memory (Tsai et al., 2003; Rosado et al., 2007; von Ehrenstein et al., 2007; Asadullah and Chaudhury, 2008; Wasserman et al., 2014) have been associated with chronic exposure to iAs. The neurological and cognitive dysfunctions seem to be dependent on the concentration, timing and duration of exposure (Tyler and Allan, 2014).

In human and in many mammalian species iAs is reduced, methylated into trivalent and pentavalent methylated species and conjugated with glutathione (GSH, L-γ-glutamyl-L-cysteinylglycine, Thomas et al., 2004; Kumagai and Sumi, 2007). These events are associated with the generation of oxidative stress (Kumagai and Sumi, 2007). The presence of iAs and its methylated metabolites have been reported in umbilical cord blood studies from populations at risk (Concha et al., 1998; Parajuli et al., 2013) suggesting that they can cross the placenta and reach the developing fetus. An increasing number of epidemiological and animal model studies have shown that iAs exposure has harmful

effects on brain function (Vahter, 2008; Parajuli et al., 2013; Tyler and Allan, 2014). However, there is little evidence of the neurotoxic effects during gestation a crucial development stage that may impact on normal adult life.

Studies in murine models have demonstrated that iAs crosses the blood-brain barrier (BBB) and is methylated in different brain regions that express the arsenic 3 methyltransferase (AS3MT) enzyme (Rodríguez et al., 2005; Sánchez-Peña et al., 2010). Transplacental transfer of As species from pregnant mice to fetus has been documented (Devesa et al., 2006; Jin et al., 2010). Moreover, AS3MT mRNA has been detected in mouse fetuses and embryos suggesting that As could be methylated in fetal tissues (Devesa et al., 2006). iAs methylation requires the presence of S-Adenosyl methionine as the methyl donor and cellular reductants such as thioredoxin and GSH (Thomas et al., 2004). Thus, the metabolism of iAs consumes GSH, which is the main antioxidant in the central nervous system (CNS; Dringen, 2000). Inadequate GSH availability may modulate iAs biotransformation and determine disease susceptibility.

GSH penetrates the BBB poorly, therefore, CNS GSH levels depend on *de novo* synthesis which is limited by the intracellular availability of the sulfhydryl amino acid L-cysteine (L-cys; Valdovinos-Flores and Gonshebbatt, 2012). Under aerobic conditions, L-cys autooxidizes to its disulfide form cystine (L-cys₂), which is the predominant form of the amino acid in plasma (Valdovinos-Flores and Gonshebbatt, 2012). Specific membrane transporters such as xCT (SLC7A11)/4F2hc (SLC3A2), also known as the x_c⁻ L-cys₂/glutamate (L-glu) antiporter system, participates in the influx of L-cys for GSH synthesis (Valdovinos-Flores and Gonshebbatt, 2012). xCT is widely expressed in both mouse and human brain (Burdo et al., 2006). The x_c⁻ system is also an important source of extracellular glutamate and is related to oxidative protection (Shih et al., 2006). However, because xCT uptakes L-cys₂ in exchange for the excitatory L-glu, increased activity of this transporter could be deleterious and lead to excitotoxicity (Lau and Tymianski, 2010). The removal of extracellular L-glu involves EAAT3/EAAC1 (SLC1A1), part of the x-AG system in neurons and GLAST and GLT1 in glia. EAAC1 is also an important transporter for L-cys uptake in neurons (Valdovinos-Flores and Gonshebbatt, 2012). Another important amino acid transporter system with wider substrate selectivity than x_c⁻ or x-AG is the L system. LAT1 (SLC7A5) and LAT2 (SLC7A8) are the catalytic subunits of these amino acid transporters and are linked by a disulfide bridge to the heavy chain 4F2hc. *In vitro* and *in vivo* studies have provided evidence of L-cys transport by both LAT1 and LAT2 (Killian and Chikhale, 2001; Meier et al., 2002).

Glutamate is the most abundant excitatory neurotransmitter in the CNS. Its effects are mediated by ionotropic and metabotropic receptors. The ionotropic receptors (named after the agonists that activate them): α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and N-methyl-D-aspartate (NMDAR) are widely expressed in the CNS. A distinct property of NMDAR is that allows the entry of Ca²⁺, in addition to the passage of K⁺ and Na⁺. Thus, excitatory postsynaptic potentials can increase Ca²⁺ levels in the postsynaptic neuron which can

potentially act as a second messenger initiating signaling cascades. The activation of NMDAR is also voltage-dependent due to the extracellular blockage by Mg²⁺ or Zn²⁺. Then, the passage of cations (mostly Ca²⁺) occurs when the blockage is removed by a large number of excitatory inputs or the repetitive firing of the presynaptic cell or both. These properties are considered the bases of synaptic plasticity, learning and memory storage processes.

NMDAR is formed by several protein subunits producing a number of receptor isoforms. The expression of NMDAR subunits is differentially regulated during development and in response to synaptic activity. NR1/NR2A containing NMDAR receptors predominate at synaptic sites in the adult nervous system whereas NR1/NR2B receptors predominate during development and tend to be concentrated at extrasynaptic sites (Paoletti et al., 2013). NR2B subunits modulate the pharmacological and functional properties of the NMDA receptor (Mony et al., 2009). Consequently, NR2B has been implicated in modulating the synaptic function in activities such as learning, memory processing, and feeding behaviors, as well as being involved in a number of human disorders (Mehta et al., 2013). Additionally, the results of some experimental models suggest that exposure to xenobiotics might interfere with the expression of NMDAR subunits NR2A and NR2B during brain development (Olney et al., 2000; Li et al., 2012).

Studies using C3H and CD1 mice show that iAs crosses the placenta modifying gene expression that could lead to aberrant gene expression later in life (Shen et al., 2007; Waalkes et al., 2007). We hypothesized that the gestational exposure to iAs would up-regulate GSH *de novo* synthesis and L-cys₂ influx via xCT and EAAC1 in brain cells. This condition could lead to increased levels of extracellular L-glu and to the modulation of NMDAR expression in brain regions such as cortex and hippocampus, where this receptor participates in learning and memory. Adult CD-1 male and female mice received 20 mg/L of iAs in drinking water for 1 month before mating. Pregnant females received continued exposure during gestation and lactation. At weaning, 50% of the pups continued drinking water with iAs while the rest drank deionized water similar to control animals. Results suggest that arsenic exposure disrupts L-cys and L-glu transport in the hippocampus by the up-regulation of xCT and EAAC1 and down-regulation of GLT1. This altered L-cys and L-glu transport was associated to the negative regulation of NR2B subunits and to impaired spatial memory.

MATERIALS AND METHODS

CHEMICALS

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) unless otherwise indicated. For western blots, primary rabbit antibodies against xCT, EAAC1, GLAST or GLT1 (ab37185, ab124802, ab416 or ab41621 respectively) were obtained from Abcam, Cambridge, MA, USA. Anti-LAT1 (sc-34554) from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA. Rabbit anti-NR2A, anti-NR2B or mouse anti-GAPDH (AB1555P or AB1557P, MAB374 respectively) from Millipore, Bedford, MA, USA. Rabbit anti mouse- β -tubulin (T4026) from Sigma-Aldrich. Secondary goat anti-rabbit antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). For immunofluorescence

staining chicken anti-MAP2 (ab5392) from Abcam. Anti-rabbit Alexa Fluor 594 (A11039) and anti-chicken Alexa 488 (A21207) secondary antibodies were obtained from Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.

ANIMALS AND TREATMENT

Seven- to eight- week-old CD-1 mice were obtained from the Animal Care Facility at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, and were maintained at 23–25°C under a 12 h light/dark cycle and a relative humidity of 50–60%. Animals had free access to food (Harlan 2018S Diet; Harlan, Indianapolis, IN, USA) and water. Mice were housed in groups of 4 animals per plastic cage and separated by sex. One group of randomly selected mice (12 male and 12 female) received 20 mg/L of iAs daily as sodium arsenite via their drinking water for 30 days (exposed group). The same number of animals were assigned to the control group and received drinking water without iAs. The dose of treatment was chosen taking into consideration reports on iAs reproductive toxicity (Golub et al., 1998). Sodium arsenite solutions were prepared freshly daily in deionized water. After 30 days of treatment, each male was mated with one (single) female. Initiation of gestation was estimated by vaginal plug formation. Then, the males were removed, and the female mice were housed individually. Throughout the experiment, water consumption was recorded daily. Body weight was recorded every 6 days during the 30 days prior to mating in both sexes, and on days 0, 7, 14 and 18 of gestation in females. The exposed females continued to receive water with 20 mg/L of iAs during the gestation and lactation period. On postnatal days (PNDs) 1 and 15 randomly selected iAs exposed and control pups from each litter were sacrificed. On PND 1 whole brains were removed. On PND 15 the brain regions could be identified and were dissected on ice to isolate cortex and hippocampus. Tissue samples were immediately frozen by immersion in liquid nitrogen and maintained at –70°C until processed. Sex differentiation in the offspring was performed based on anogenital length (Suckow et al., 2000). On PND 15 the exposed litter was divided: 50% continued to receive drinking water with iAs while the rest received deionized water similar to control animals until PND 90. These 3 groups, including controls (Control), the group exposed to iAs only during gestation and lactation (iAs-PND 15) and the group exposed to iAs during gestation, lactation and for the first 90 days (iAs-PND 90) were used for the behavioral tests. Control litters continued to drink water without iAs. At weaning, on PND 21, mice in each litter were separated from the mothers.

The experiments were performed following the guidelines stated in the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication #85-23, revised 1985) and “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Clave NOM-062-ZOO-1999)” of the “Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)” (published August, 2001).

WESTERN BLOTS

Membrane enriched fractions were obtained from frozen tissue samples as described previously (Schindler et al., 2006) for western blot determination of xCT, EAAC1, LAT1, GLAST, GLT1

and the NMDA receptor subunits NR2A and NR2B. Briefly, frozen tissues were homogenized in 10 volumes of extraction buffer containing 10 mM HEPES, 10 mM NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 5 mM EDTA, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, and 10 mg/ml aprotinin and leupeptin. The homogenates were centrifuged at 6,300 g for 10 min at 4°C. Supernatants were recovered and centrifuged at 100,000 g for 30 min at 4°C. The pellets were finally suspended in 40 mM Tris-HCl, pH 9.5, 8 M urea and 4% (w/v) Triton X-100. Protein concentrations were determined using a Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Meridian Rd, Rockford, USA). The samples (5–40 µg protein per well) were subjected to SDS-PAGE and transferred into nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Germany). The membranes were blocked with TBS containing 5% Blotto and 0.1% Tween-20 and incubated with the respective primary antibodies. The blots were probed with mouse anti-β-tubulin or anti-GAPDH after stripping, which were used as loading controls. The protein bands were visualized with appropriated HRP-linked secondary antibodies using the ECL Prime western blotting detection reagent (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA); images were captured and densitometric analysis was performed with Image J software version 1.46r software (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

IMMUNOFLUORESCENCE

On PND 15, mice were transcardially perfused with ice-cold 0.9% saline followed by ice-cold 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PB), pH 7.4. Brains were removed, postfixed at 4°C and successively immersed in 20% and 30% sucrose cryoprotection solutions. Sections (22 µm) were collected in 24-well culture plates filled with 0.9% phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. After 3 washes with PBS + 0.3% Triton X-100 (PBST), the sections were incubated overnight at 4°C in rabbit anti-xCT (1:100) or rabbit anti-EAAC1 (1:300) and chicken anti-MAP2 (1:800) primary antibodies with a 2% normal horse serum in PBST solution. After 3 washes in PB solution sections were incubated with anti-rabbit Alexa Fluor 594 and anti-chicken Alexa 488 secondary antibodies (1:300) diluted in PB solution for 2 h. Finally, sections were mounted with Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and analyzed under the microscope. Photomicrographs were acquired with an Olympus BX51WI DSU confocal microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA) coupled to a Hamamatsu EM-CCD C9100 camera (Hamamatsu, Hamamatsu, Japan).

GSH AND GSSG LEVEL DETERMINATION

Tissue GSH and GSSG levels were measured in whole brain, the cortex and hippocampus using a microplate-adapted fluorometric *o*-phthalaldehyde (OPA) method (Senft et al., 2000). Fluorescence was determined with 365 nm excitation and 430 nm emission filters in a DTX 800/880 Multimode Detector (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

METHYLATED ARSENIC SPECIES DETERMINATION

Concentrations of arsenic species were determined in urine, whole brain, the cortex and hippocampus by hydride generation

atomic absorption spectrometry using cryotrapping (HG-CT-AAS) as described previously (Hernández Zavala et al., 2008). The quantification was performed using independent calibration curves of the arsenic species. Arsenic acid disodium salt (99% pure), and dimethyl arsenic acid (DMAV; 98% pure) were obtained from Sigma-Aldrich. Methylarsonic acid (MMAV) disodium salt (99% pure) was obtained from Ventron (Danvers, MA, USA). Sodium borohydride was obtained from EM Science (Gibbstown, NJ, USA). Prior to analysis, tissue samples were digested with 2 X ultrapure grade phosphoric acid (J. T. Baker) as described by Hughes et al. (2003).

BEHAVIORAL TEST "PLACE RECOGNITION TASK"

The object location task was conducted using the methodology described by Mumby et al. (2002), which was adapted to mice. Behavioral testing was performed in a 30 cm H × 60 cm W × 60 cm L acrylic open field box with white walls. Two objects of identical shape, size and color (white, black or red) were used in each trial. The objects and box were cleaned with a mixture of 10% ethanol, 10% dextran in distilled water, prior to each trial to eliminate any odor cues. Throughout the experimental period, the distal environmental cues were kept constant, and dark conditions were maintained in the experimental room. For three consecutive days, mice were habituated individually to the context and experimenter, by performing one session per day for 10 min. On day 4, the test was conducted in two phases: the exploration phase for recognition of object location, and the test phase, for discrimination of the location change. In the exploration phase, the two objects were placed in identical orientations with respect to two opposite corners of the box (10 cm from the corners) and the animals were allowed to explore the objects for 5 min. The animals were then returned to their homecage for 15 min and in the meantime the cage was cleaned and one of the objects was moved to a new location (opposite corner, at half the initial distance from the corner but maintaining an identical orientation with respect to the corner of the box). The animal was returned to the arena and let explore the objects for 5 min. The sessions were recorded with a video camera and analyzed by a trained observer. The behavior measurements included the frequency and cumulated time in seconds in which an animal approached (touch with body or vibrissae) and contacted each object with the paws during exploration. The discrimination index (DI) was calculated based on the formula $DI = \frac{\text{time spent exploring the re-placed object}}{\text{time spent exploring both objects}}$. Animals that explored the unmoved objects for less than 10 s during the test phase were not included in the study. DI was also determined in the exploration phase for each object, to verify object or place preference.

STATISTICAL ANALYSIS

The data are expressed as the means ± SE. The number of animals tested is indicated in each case. Student's *t*-test or one way analysis of variance (ANOVA) were used to assess statistical significance followed by Dunnett's multiple comparison test or Tukey's *post hoc* test. A *p* value <0.05 was considered statistically significant in all cases.

RESULTS

ARSENIC EXPOSURE

Parental exposure to 20 mg/L of iAs during 30 days was well tolerated and did not alter body weight, water consumption or mating behavior (data not shown). No differences in body weight between control and exposed females were observed during gestation. A significant decrease in water consumption was observed in exposed female mice during lactation and until weaning (Figure 1A). The litter size between exposed and unexposed groups was also similar (data not shown). The exposed litter did not show signs of overt toxicity, i.e., ataxia, redness, swelling, fetal malformations or death at birth and throughout the experiment. (Figure 1A). The estimated average intake of iAs for males was 2.69 ± 0.69 mg/kg per day during the 30 days prior to mating, while females ingested 2.72 ± 0.88 mg/kg/day. During gestation, the amount of iAs ingested was 2.92 ± 1.17 mg/kg/day (20–21 days), and during lactation the amount increased to 10.73 ± 1.9 mg/kg/day. A significant decrease in water intake was observed in the exposed group.

ARSENIC SPECIES IN THE URINE OF THE MOTHER AND IN THE WHOLE BRAIN AND REGIONS OF THE OFFSPRING WITH GESTATIONAL EXPOSURE ON PND 1 AND PND 15

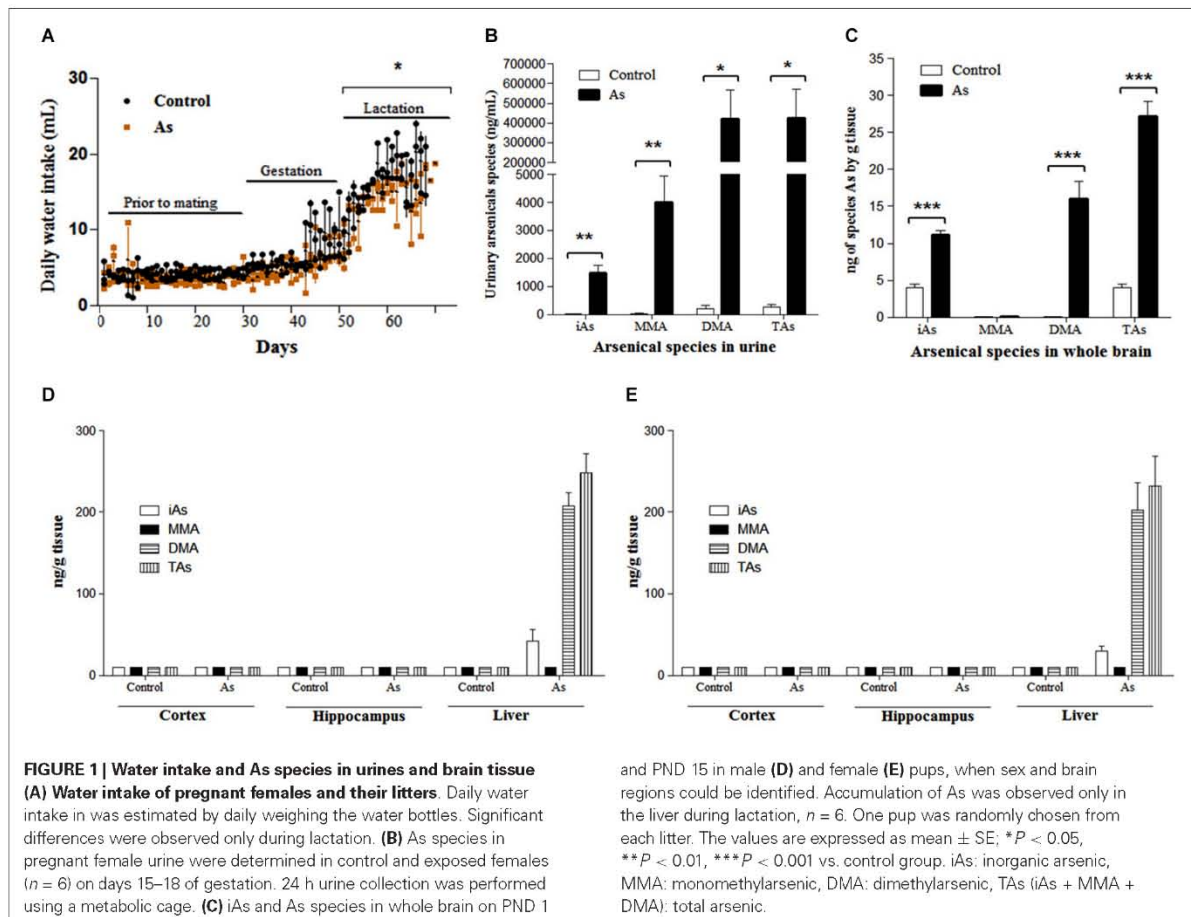
As species levels were determined in the urine of pregnant females between days 15–18 of gestation. The main As species in exposed female urine was DMA followed by MMA and iAs. Total As levels among exposed females was 1500 times higher than that in controls (Figure 1B). On PND 1, the whole brain of the exposed litter showed DMA (58.9%) and iAs (41%) as the main As species. The levels of As species in control litters were 6.7 times lower than those of the exposed offspring (Figure 1C). During lactation (PND 15), the levels of As species in the male and female cortex and hippocampal regions were not different between controls and exposed mice (Figures 1D,E). As species accumulation was observed in the livers of exposed mice (Figures 1D,E).

EFFECTS OF GESTATIONAL EXPOSURE ON GSH LEVELS IN WHOLE BRAIN ON PND 1, AND IN THE CORTEX AND HIPPOCAMPUS ON PND 15 MICE

We hypothesized that the gestational exposure to iAs would modulate GSH levels in brain cells. On PND 1, the gestationally exposed litter showed significantly increased levels of oxidized GSH (GSSG) in the whole brain (Figure 2A). At this stage, sex or brain regions could not be clearly differentiated. On PND 15, no changes in GSH or GSSG levels were observed between the cortex and hippocampal regions from exposed and control male mice (Figure 2B). However, female mouse hippocampal regions showed a significant increase in GSH levels contents (Figure 2C).

CHANGES IN GSH LEVELS INDUCED BY iAS EXPOSURE ARE ASSOCIATED WITH CHANGES IN THE EXPRESSION OF xCT, EAAC1 AND LAT1 TRANSPORTERS AND MODULATION OF NMDAR SUBUNITS IN DIFFERENT BRAIN REGIONS

Changes in GSH could be due to the modulation of cysteine and glutamate transporters. Western blot analysis was performed to



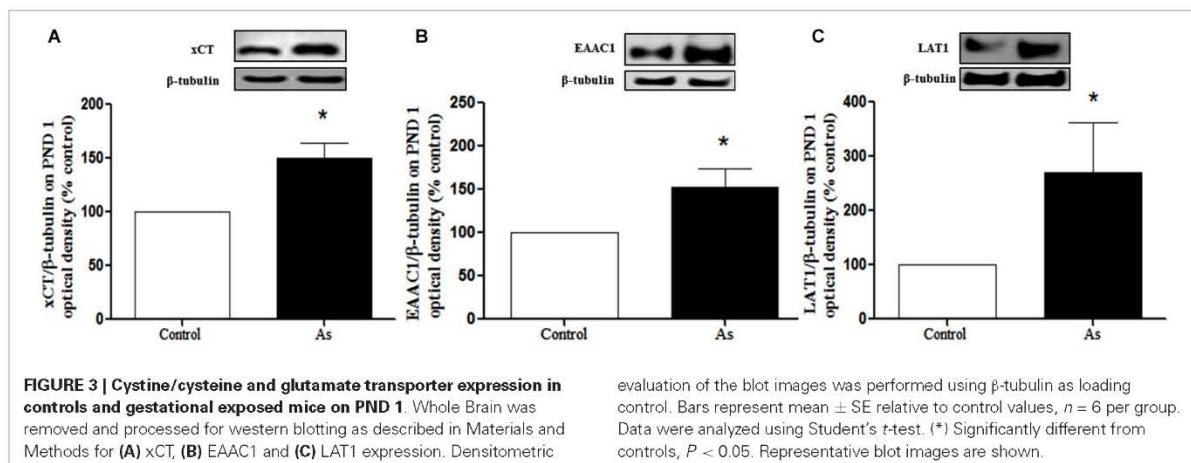
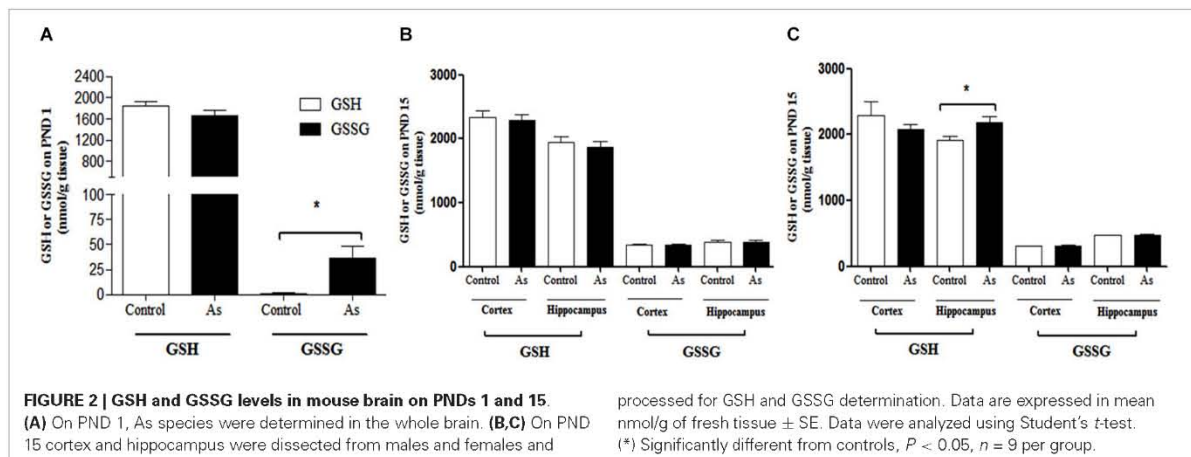
explore the expression of xCT, EAAC1 and LAT1 transporters in the whole brain on PND 1 and in the cortex and hippocampus on PND 15 and 90. The expression of xCT, EAAC1 and LAT1 transporters (Figures 3A–C respectively) was significantly increased in the brains of pups at PND 1. This up-regulation continued at PND 15 for xCT and EAAC1 (Figures 4C,D) but not for LAT1 (data not shown) in gestationally exposed male and female mice. The expression of xCT and EAAC1 was observed mainly in hippocampal neurons (Figures 4A,B). Increased extracellular levels of glutamate have been associated with modulation of NMDAR subunits. At the same time, iAs exposure down-regulated the NR2A NMDA receptor subunits in the male hippocampus in PND 15 pups (Figure 4E), while the NR2B subunit was down-regulated in both the male and female cortex and hippocampus (Figure 4F).

On PND 15, gestationally exposed offspring were divided, and one half received drinking water with 20 mg/L of sodium arsenite while the other half received water without arsenic until PND 90. The place recognition task was performed at this time-point. The animals were then sacrificed and the hippocampal regions were examined for transporter expression. Exposed male showed increased xCT expression, although

continued exposure (iAs-PND 90) seemed to significantly diminish the levels of xCT as compared with the animals that were only exposed during gestation and until PND 15 (iAs-PND 15; Figure 5A). No change in EAAC1 expression was observed in any of the groups (Figure 5B). However, the expression of GLT1 was down-regulated in the animals exposed during gestation and until PND 15 (iAs-PND 15), and no changes were observed in GLAST (Figures 5C,D). With respect to the NMDA receptor subunits, the expression of both NR2A and NR2B was significantly down-regulated in those animals exposed only during the gestation period and until PND 15 (iAs-PND 15; Figures 5C,D). Female mouse hippocampal regions showed marginal up-regulation of xCT expression in both conditions (iAs-PND 15 and -PND 90; $p < 0.08$) and non-statistically significant changes in the expression of GLAST, GLT1 or NMDAR subunits (data not shown).

ARSENIC GESTATIONAL EXPOSURE DISRUPTS THE PLACE RECOGNITION TASK PERFORMANCE “SPATIAL MEMORY”

The place recognition task was used in 90 day old animals to determine if iAs exposure had an impact on the spatial memory,



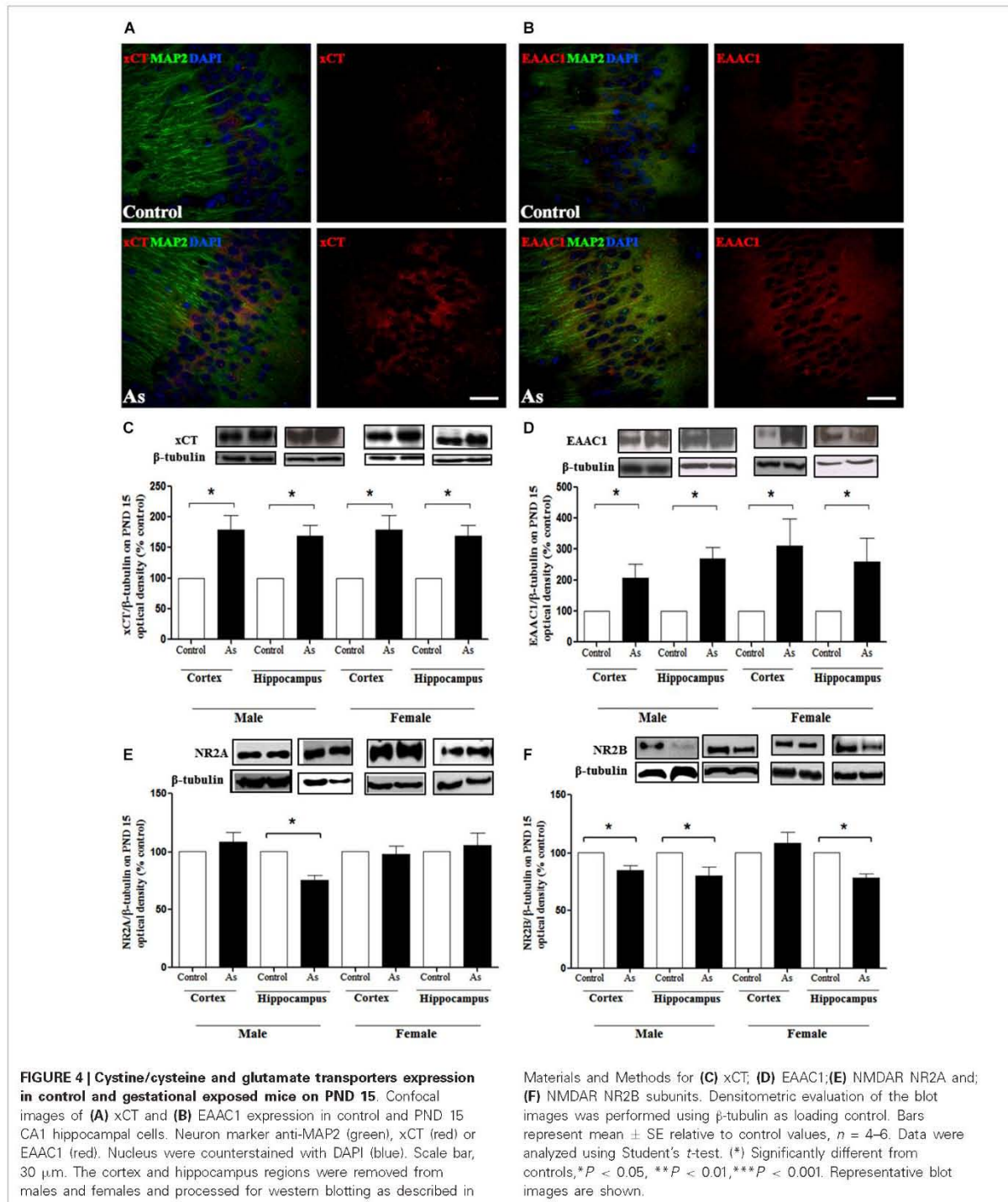
a function in which the hippocampal formation is strongly involved. The cognitive discrimination ability when an object changes location was evaluated in the different experimental groups of male and female mice including the control group, the iAs-PND 15 and iAs-PND 90 groups. During the recognition phase, no preference was observed for the location of the object or the object itself, which was measured as the time devoted to exploring each object (Figure 6A). In the test phase, iAs-PND 15 and iAs-PND 90 males showed significantly decreased recognition of the object location (Figure 6B). In contrast, this effect was marginally significant in iAs-PND 15 females and not significant in those with longer exposure (iAs-PND 90; Figure 6B).

DISCUSSION

iAs is an ubiquitous metalloid, present in man-made products as well as in food and water. The presence of iAs in drinking water causes health detrimental effects worldwide. Chronic

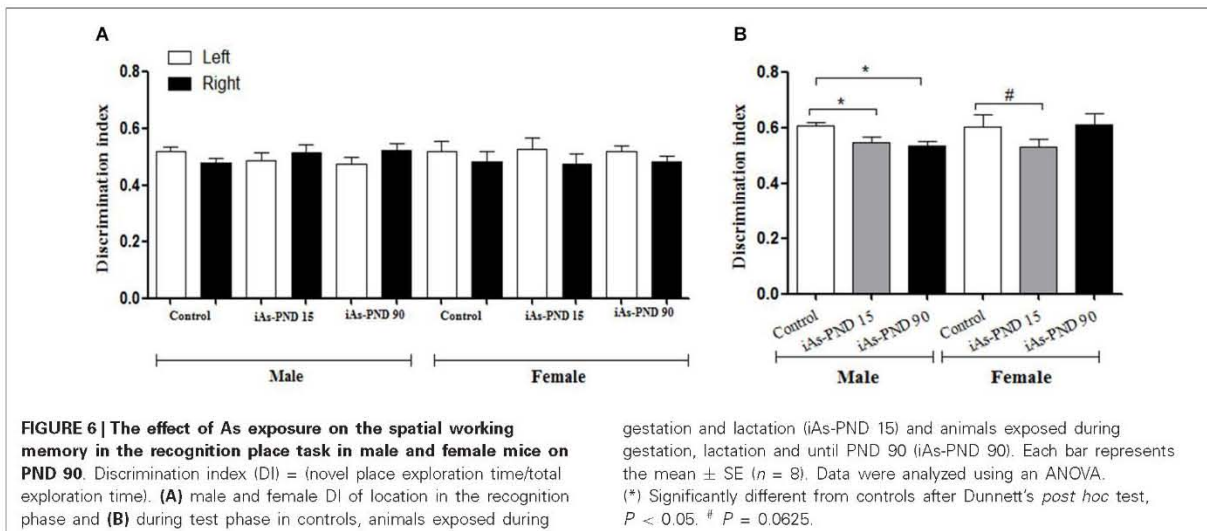
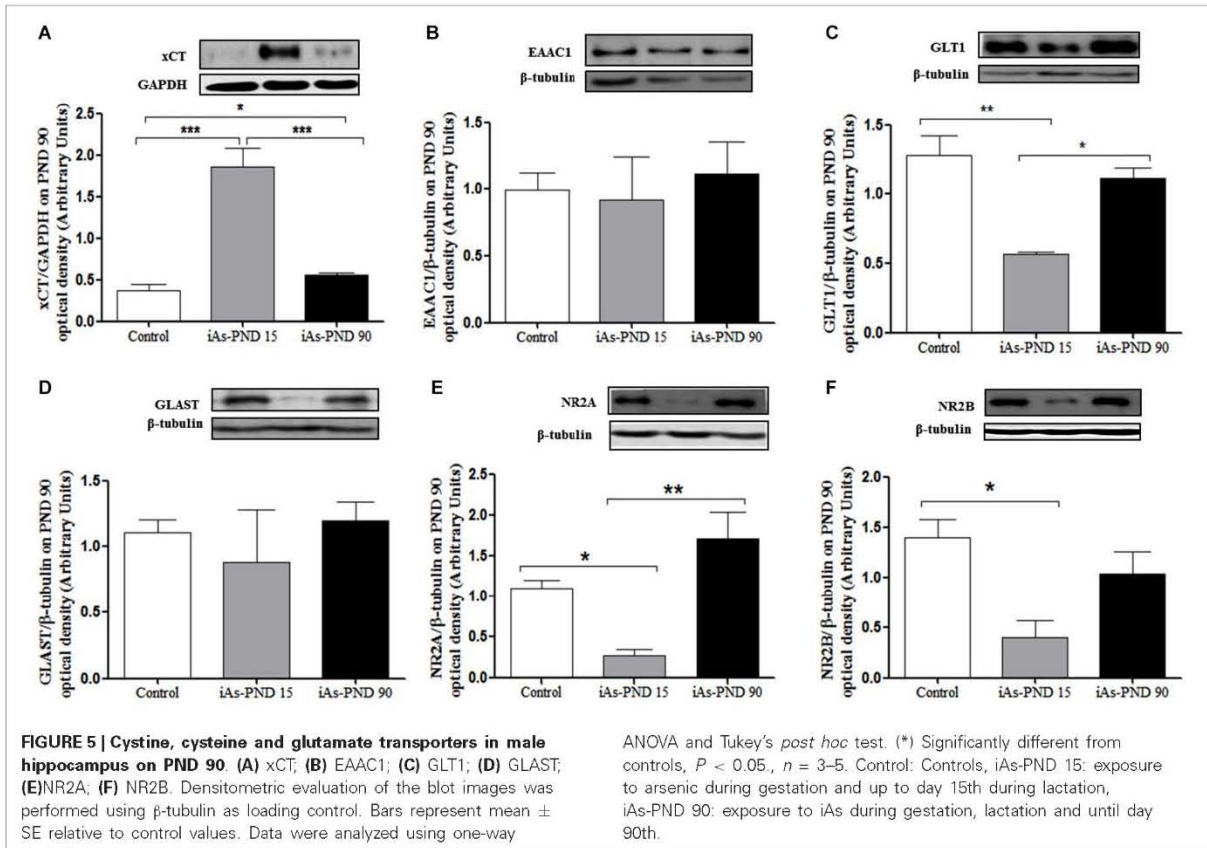
exposure usually occurs through generations, however, few studies have investigated *in utero* developmental effects of iAs exposure (Vahter, 2008) while the impact at a molecular levels remains less understood. In exposed populations, As species can be present in cord blood (Concha et al., 1998; Hall et al., 2007) indicating that arsenic is transferred to the fetus. Moreover, the presence of As in cord blood has been inversely associated with neurodevelopmental indicators (Parajuli et al., 2013) and correlate with cognitive deficits that include alterations in pattern memory, functional memory, full scale IQ and verbal IQ (Tyler and Allan, 2014).

NMDA glutamate receptors participate in learning and memory. Overstimulation of these receptors by excess of glutamate can cause cell death during glucose and oxygen deprivation (Jung et al., 2012) and memory deficits due to xenobiotic exposure (Olney et al., 2000; Li et al., 2012). L-cys₂/ L-glu, L-cys and L-glu transporters participate in GSH



synthesis in the CNS and are modulated by oxidative stress. The hypothesis of this work was that exposure to iAs during gestation would increase oxidative stress up-regulating xCT. This

condition might increase the efflux of L-glu that could lead to the activation of transporters to remove the extracellular glutamate. At the same time, oxidative stress and excess of glutamate might



modulate NMDAR subunit expression (Scimemi et al., 2009) in the developing brain which might be reflected later as memory impairment.

Mice metabolize iAs and clear iAs metabolites from tissues more efficiently than humans (ATSDR, 2007). Results of the present study show that whole brain and liver tissues of mice

exposed to 20 mg/L contained on average concentrations of total As species of 28 and 260 ngAs/g, respectively (Figures 1D,E). Similar concentrations have been found in liver samples from residents of an arsenic endemic area who drink water containing between 0.22–2 mg/L of iAs. In this case, human liver samples showed concentrations of 100–1,200 ngAs/g of liver tissue, respectively (Mazumder, 2005).

The levels of iAs in drinking water (20 mg/L) did not cause any visible signs of toxicity to mice before mating or during gestation in CD1 mouse. Control and exposed litters were similar in size (number of individuals), weight and sex composition. In contrast, in a similar study using the FVB/NJ mouse strain reduced fertility was observed (He et al., 2007) most likely due to different strain sensitivity. iAs exposed lactating females, significantly diminished water consumption (Figure 1A). To verify the iAs toxicokinetics, As species were determined in pregnant female urine and in the brain and liver tissues from the offspring. DMA was the main As species observed in exposed female urine during late gestation (Figure 1B) similar to results documented in human studies (Concha et al., 1998). In the newborn brains, iAs and DMA were the predominant species (Figure 1C). On PND 15, brain regions could be identified and the cortex and hippocampus were isolated. At this time, the levels of As species in exposed nursing males or females were not different from control males or females (Figures 1D,E). This was not the case for the liver where the main species was DMA. The As species accumulation after gestational exposure observed in this study was similar to that reported by Jin et al. (2010) for albino mice. It has been shown that As accumulation in milk is very low in humans (Concha et al., 1998). Thus, these results indicate that the presence of As in the newborn brains resulted from absorption through the placenta and was eliminated from the brain but not from the liver during lactation. This could reflect differences in the kinetics at the organ level that affect the disposition of As metabolites (Devesa et al., 2006).

The presence of iAs and DMA in the brain of newborn exposed litters suggests that the placenta does not limit the passage of As species and could be associated with the higher levels of oxidized GSH (GSSG; Figure 2A). At the same time, the transporter systems x_c^- (xCT), x-AG (EAAC1) and LAT1 were up-regulated (Figures 3A–C respectively) suggesting an increased in L-cys transport for GSH synthesis due to the elevation of GSSG. In lactating litters, (PND 15) the levels of GSH or GSSG in the cortex and hippocampus were not different from those determined in control animals (Figures 2B,C) most likely due to the lower levels of As species (Figures 1D,E). However, the up-regulation of xCT and EAAC1 transporters continued (Figures 4A,B) and was also observed in CA1 hippocampal cells by immunofluorescence (Figures 4A,B). Increased expression of both xCT and EAAC1 could protect against glutamate toxicity (Lewerenz et al., 2006) reducing NMDAR activation (Scimemi et al., 2009). At the same time, a significant down-regulation of the NR2B subunit in both sexes and NR2A subunit in the hippocampus of exposed PND 15 males but not females, was observed. This observation suggests that the alteration of L-cys and glutamate transport may modify NR2B expression in the hippocampus due to gestational exposure. Prenatal stress

(Zhao et al., 2013), ethanol (Brady et al., 2013), high fat diets (Page et al., 2014) and nicotine (Wang et al., 2011) have been associated with down-regulation of NR2B or the NR2B/NR2A ratio. The reduced expression of NR2B in the NMDAR has been observed in connection with cognitive impairments and neuropathologies (Paoletti et al., 2013). On PND 90, exposed litters showed significantly impaired place recognition performance compared to controls. Males were more affected than females (Figure 6B), suggesting that hippocampal neurons were affected by As exposure. Animals were sacrificed to investigate transporters and NMDAR subunit expression on PND 90 hippocampus. xCT expression remained to be up-regulated (Figure 5A) especially in those animals exposed to iAs during gestation and until PND 15. However, on PND 90, EAAC1 expression was not different between control and exposed litters. GLT1, another transporter that participates in the removal of glutamate, was also down regulated in animals exposed during gestation. These results suggest that glutamate levels might be increased in the hippocampus of these mice, leading to NR2A and NR2B down-regulation (Figures 5C,D,F) and memory deficits (Figure 6B). These observations are consistent with findings where extracellular glutamate increase initiates adaptive responses that involve a gradual down-regulation of the expression of NMDA receptors in response to environmental toxics or a glutamate transport blocker in neuronal models (Cebers et al., 2001; Win-Shwe et al., 2009). PND 90 males exposed during gestation and that continued to drink water with arsenic also showed memory deficits, increased expression of xCT and marginal down-regulation of NR2B but not NR2A, suggesting that synaptic efficiency could be affected. Further research is needed to clarify these observations. Taken together, our data may support the idea of GSH as an important neuronal reservoir to prevent excitotoxicity (Koga et al., 2011).

Our results indicate that gestational exposure to iAs impairs NMDAR subunits expression in the hippocampus affecting spatial memory. This impairment is associated with increased oxidative damage at birth and altered L-cys₂/ glutamate and L-cys transport, which might in turn down-regulate NR2B expression (Paoletti et al., 2013). NMDAR subunit expression changes during brain development. NR2B is more abundant during the second week of postnatal development as neurons mature and become enriched at extrasynaptic sites (Roulet et al., 2010; Qiu et al., 2011). Gestational and postnatal exposure disrupts this pattern down-regulating NR2B especially on PND15 when this subunit is more predominant. Mouse hippocampus EAAC1, does not alter the activation of receptors at the synaptic cleft but reduces the recruitment of NR2B-containing NMDAR in perisynaptic/extrasynaptic sites (Scimemi et al., 2009). Then, the increased expression of EAAC1 observed in iAs exposed mice, could further alter the glutamate lifetime in the extracellular space impairing NMDAR activation and the induction of long term potentiation.

Cognitive impairment was observed in the rat after realgar (a mineral drug containing arsenic) exposure. Excess of extracellular glutamate was observed in hippocampus. Glutamate accumulation in the synaptic cleft was related to decreased expression of NR1 and up-regulation of NR2A subunit leading to

calcium overload, down-regulation of GLT1 and ultrastructural changes in hippocampal neurons (Tao-guang et al., 2014). Interestingly, increased activity of xCT transport is accompanied with an increase in glutamate levels and neuronal death via overstimulation NMDAR (Jackman et al., 2012). Also, xCT^{-/-} mice show significantly lower extracellular hippocampal glutamate concentrations and optimal spatial working memory (De Bundel et al., 2011) suggesting that xCT constitutes a source for non-vesicular glutamate release. Additionally, down-regulation of NR2B can occur through ubiquitination if NMDAR agonists are increased (Ehlers, 2003). Then, disrupted glutamate transport by increased xCT activity might be responsible for the down-regulation of NR2B. *In vitro* cultures of hippocampal neurons have shown that both NR2B and NR2A show endocytosis trafficking through endosomes (Scott et al., 2004). This event could be disrupted by prenatal As exposure. Also, adult rats exposed to different concentrations of sodium arsenite during 3 months after weaning, showed cognitive impairments and a dose-dependent down-regulation of NR2A in both mRNA and protein levels in hippocampus (Luo et al., 2009, 2012). Similarly, NR2A up-regulation was observed on PND 90 in male mouse hippocampus (Figure 5E). The NMDAR NR2A subunit in adult rat is sensitive to arsenic induced neurotoxicity (Luo et al., 2009, 2012).

Additionally, the persistent lower expression of NR2B subunit in males might be due to epigenetic changes. iAs methylation consumes GSH and SAM which affects DNA methylation (Reichard and Puga, 2010; Tyler and Allan, 2014). According to Reichard and Puga (2010) the epigenetic modifications observed during mouse gestational exposure to iAs suggest target gene-specific methylation changes, some of which are hypomethylated while others suffer hypermethylation. Thus, hypermethylation of NR2B promoter and/or hypomethylation of NR2B repressors could lead to the down-regulation of NR2B. In this respect, rats exposed during gestation to 3 and 36 ppm of sodium arsenite in drinking water showed changes in the methylation status of genes involved in neuronal plasticity in cortex and hippocampus (Martínez et al., 2011). Histone modifications have been also observed in mice prenatally exposed to 100 µg/L of sodium arsenite which could be associated with altered learning in adults (Cronican et al., 2013). Also, there are evidences that the changes in the activity-dependent NR2B expression (Lee et al., 2008) or NR2B expression during chronic intermittent ethanol treatment (Qiang et al., 2010) are due to epigenetic modifications.

The altered activity/expression of the NR2B subunit due to post-transcriptional modifications (Qiu et al., 2011), ubiquitination (Ehlers, 2003) or epigenetic modifications (Lee et al., 2008; Qiang et al., 2010; Tyler and Allan, 2014) have been implicated in the modulation of learning and memory processing, pain perception, feeding behavior as well as being involved in neurological disorders. Our results show that NMDAR subunit expression by prenatal exposure to iAs is affected, which may in turn alter memory early in life, which is in line with what has been reported in some human populations (Tyler and Allan, 2014). Learning and memory are complex processes involving several brain regions and neuronal networks. This work shows

how As species might disrupt the expression of key components that could lead to behavioral alterations and the development of neuropathologies later in life. It remains important to identify the environmental agents that might impair neural development, maturation and physiology by interfering with the biochemistry of crucial neurotransmitters and aminoacids such as glutamate and cysteine.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Sc. Luz del Carmen Sanchez-Peña for arsenic species analysis, M. Sc. Tzipe Govezensky for supervision in the statistical analyses, Pavel Petrosyan, Ph.D, MVZ Diana Hernández-Loranca and MVZ Oscar Hernández Campos for their help handling mice and Miguel Tápia-Rodríguez, Ph. D. for his assistance during the confocal analysis of brain slices. Lucio A. Ramos-Chávez received a scholar fellowship from CONACYT No. 211718 and DGEPI UNAM. This work was supported by grant from PAPIIT (UNAM) IN 207611 and CONACYT 102287 to María E. Gonsebatt. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D degree in the posgrado en Ciencias Biológicas at the Universidad Nacional Autónoma de México.

REFERENCES

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2007). *Toxicological Profile for Arsenic*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Asadullah, M. N., and Chaudhury, N. (2008). Poisoning the mind: arsenic contamination and cognitive achievement of children. *World Bank Policy Research Working Paper*.
- Brady, M. L., Diaz, M. R., Iuso, A., Everett, J. C., Valenzuela, C. F., and Caldwell, K. K. (2013). Moderate prenatal alcohol exposure reduces plasticity and alters NMDA receptor subunit composition in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 33, 1062–1067. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1217-12.2013
- Burdo, J., Dargusch, R., and Schubert, D. (2006). Distribution of the cystine/glutamate antiporter system xc⁻ in the brain, kidney and duodenum. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 549–557. doi: 10.1369/jhc.5a6840.2006
- Calderón, J., Navarro, M. E., Jiménez-Capdeville, M. E., Santos-Díaz, M. A., Golden, A., Rodríguez-Leyva, I., et al. (2001). Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ. Res.* 85, 69–76. doi: 10.1006/enrs.2000.4106
- Cebers, G., Ceber, A., Kovács, A. D., Högberg, H., Moreira, T., and Liljequist, S. (2001). Increased ambient glutamate concentration alters the expression of NMDA receptor subunits in cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int.* 39, 151–160. doi: 10.1016/s0197-0186(01)00014-6
- Concha, G., Vogler, G., Lezcano, D., Nermell, B., and Vahter, M. (1998). Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. *Toxicol. Sci.* 44, 185–190. doi: 10.1093/toxsci/44.2.185
- Cronican, A. A., Fitz, N. F., Carter, A., Saleem, M., Shiva, S., Barchowsky, A., et al. (2013). Genome-wide alteration of histone H3K9 acetylation pattern in mouse offspring prenatally exposed to arsenic. *PLoS One* 8, 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0053478
- De Bundel, D., Schallier, A., Loyens, E., Fernando, R., Hirohisa, M., Van Liefferinge, J., et al. (2011). Loss of system x(c)⁻ does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *J. Neurosci.* 31, 5792–5803. doi: 10.1523/jneurosci.5465-10.2011
- Devesa, V., Adair, B. M., Liu, J., Waalkes, M. P., Diwan, B., Styblo, M., et al. (2006). Arsenicals in maternal and fetal mouse tissues after gestational exposure to arsenite. *Toxicology* 224, 147–155. doi: 10.1016/j.tox.2006.04.041
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62, 649–671. doi: 10.1016/s0301-0082(99)00060-x
- Ehlers, M. D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Neurosci.* 6, 231–242. doi: 10.1038/nn1013

- Golub, M. S., Macintosh, M. S., and Baumrind, N. (1998). Developmental and reproductive toxicity of inorganic arsenic: animal studies and human concerns. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 1, 199–241. doi: 10.1080/10937409809524552
- Hall, M., Gamble, M., Slavkovich, V., Liu, X., Levy, D., Cheng, Z., et al. (2007). Determinants of arsenic metabolism: blood arsenic metabolites, plasma folate, cobalamin and homocysteine concentrations in maternal-newborn pairs. *Environ. Health Perspect.* 115, 1503–1509. doi: 10.1289/ehp.9906
- He, W., Greenwell, R. J., Brooks, D. M., Calderón-Garcidueñas, L., Beall, H. D., and Coffin, J. D. (2007). Arsenic exposure in pregnant mice disrupts placental vasculogenesis and causes spontaneous abortion. *Toxicol. Sci.* 99, 244–253. doi: 10.1093/toxsci/kfm162
- Hernández-Zavala, A., Matoušek, T., Drobná, Z., Paul, D. S., Walton, F., Adair, B. M., et al. (2008). Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer). *J. Anal. At Spectrom.* 23, 342–351. doi: 10.1039/b706144g
- Hughes, M. F., Kenyon, E. M., Edwards, B. C., Mitchell, C. T., DelRazo, L. M., and Thomas, D. J. (2005). Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191, 202–210. doi: 10.1016/s0041-008x(03)00249-7
- Jackman, N. A., Melchior, S. E., Hewett, J. A., and Hewett, S. J. (2012). Non-cell autonomous influence of the astrocyte system χ_c^- on hypoglycaemic neuronal cell death. *ASN Neuro.* 4, 23–32. doi: 10.1042/an20110030
- Jin, Y., Wang, G., Zhao, F., Liao, Y., Sun, D., Zhong, Y., et al. (2010). Distribution of speciated arsenicals in mice exposed to arsenite at the early life. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1323–1326. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.02.012
- Jung, Y. J., Suh, E. C., and Lee, K. E. (2012). Oxygen/Glucose deprivation and reperfusion cause modifications of postsynaptic morphology and activity in the CA3 area of organotypic hippocampal slice cultures. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 16, 423–429. doi: 10.4196/kjpp.2012.16.6.423
- Killian, D. M., and Chikhale, P. J. (2001). Predominant functional activity of the large, neutral amino acid transporter (LAT1) isoform at the cerebrovasculature. *Neurosci. Lett.* 306, 1–4. doi: 10.1016/s0304-3940(01)01810-9
- Koga, M., Serritella, A. V., Messmer, M. M., Hayashi-Takagi, A., Hester, L. D., Snyder, S. H., et al. (2011). Glutathione is a physiologic reservoir of neuronal glutamate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 596–602. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.087
- Kamagai, Y., and Sumi, D. (2007). Arsenic: signal transduction, transcription factor and biotransformation involved in cellular response and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 243–262. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.12.0505.105144
- Lau, A., and Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Arch.* 460, 525–542. doi: 10.1007/s00424-010-0809-1
- Lee, S., Kim, W., Ham, B. J., Chen, W., Bear, M. F., and Yoon, B. J. (2008). Activity-dependent NR2B expression is mediated by MeCP2-dependent epigenetic regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 930–934. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.082
- Lewerenz, J., Klein, M., and Methner, A. (2006). Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system χ_c^- protects from oxidative glutamate toxicity. *J. Neurochem.* 98, 916–925. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03921.x
- Li, Z., Chadalapaka, G., Ramesh, A., Khoshbouei, H., Maguire, M., Safe, S., et al. (2012). PAH particles perturb prenatal processes and phenotypes: protection from deficits in object discrimination afforded by dampening of brain oxidoreductase following in utero exposure to inhaled benzo(a)pyrene. *Toxicol. Sci.* 125, 233–247. doi: 10.1093/toxsci/kfr261
- Luo, J. H., Qiu, Z. Q., Shu, W. Q., Zhang, Y. Y., Zhang, L., and Chen, J. A. (2009). Effects of arsenic exposure from drinking water on spatial memory, ultra-structures and NMDAR gene expression of hippocampus in rats. *Toxicol. Lett.* 184, 121–125. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.10.029
- Luo, I., Qiu, Z., Zhang, L., and Shu, W. Q. (2012). Arsenite exposure altered the expression of NMDA receptor and postsynaptic signaling proteins in rat hippocampus. *Toxicol. Lett.* 211, 39–44. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.02.021
- Martínez, L., Jiménez, V., García-Sepúlveda, C., Ceballos, F., Delgado, J. M., Nino-Moreno, P., et al. (2011). Impact of early developmental arsenic exposure on promoter CpG-island methylation of genes involved in neuronal plasticity. *Neurochem. Int.* 58, 574–581. doi: 10.1016/j.neuint.2011.01.020
- Mazumder, D. N. (2005). Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 169–175. doi: 10.1016/j.taap.2004.08.025
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., and Sharma, P. L. (2013). Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 698, 6–18. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.032
- Meier, C., Ristic, Z., Klausner, S., and Verrey, F. (2002). Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *EMBO J.* 21, 580–589. doi: 10.1093/emboj/21.4.580
- Mony, L., Kew, J. N. C., Gunthorpe, M. J., and Paoletti, P. (2009). Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br. J. Pharmacol.* 157, 1301–1317. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00304.x
- Mumby, D. C., Gaskin, S., Glenn, M. J., Schramek, T. E., and Lehmann, H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places and contexts. *Learn. Mem.* 9, 49–57. doi: 10.1101/lm.41302
- Olney, J. W., Farber, N. B., Wozniak, D. F., Jevtovic-Todorovic, V., and Ikonomidou, C. (2000). Environmental agents that have the potential to trigger massive apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Environ. Health Perspect.* 108, 383–388. doi: 10.2307/3454524
- Page, K. C., Jones, E. K., and Anday, E. K. (2014). Maternal and postweaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning and memory function. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 306, 527–537. doi: 10.1152/ajpregu.00319.2013
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400. doi: 10.1038/nrn3504
- Parajuli, R. P., Fujiwara, T., Umezaki, M., and Watanabe, C. (2013). Association of cord blood levels of lead, arsenic and zinc with neurodevelopmental indicators in newborns: a birth cohort study in Chitwan Valley, Nepal. *Environ. Res.* 121, 45–51. doi: 10.1016/j.envres.2012.10.010
- Qiang, M., Denny, A., Chen, J., Ticku, M. K., Yan, B., and Henderson, G. (2010). The site specific demethylation in the 5'-regulatory area of NMDA receptor 2B subunit gene associated with CIE-induced upregulation of transcription. *PLoS One* 5, 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0008798
- Qin, S., Li, X. Y., and Zhuo, M. (2011). Post-translational modification of NMDA receptor GluN2B subunit and its roles in chronic pain and memory. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 22, 521–529. doi: 10.1016/j.semdb.2011.06.003
- Reichard, J. F., and Puga, A. (2010). Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation. *Epigenomics* 2, 87–104. doi: 10.2217/epi.09.45
- Rodríguez, V. M., Del Razo, L. M., Limón-Pacheco, J. H., Giordano, M., Sánchez-Peña, L. C., Uribe-Quero, E., et al. (2005). Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicol. Sci.* 84, 157–166. doi: 10.1093/toxsci/kfi057
- Rosado, J. L., Ronquillo, D., Kordas, K., Rojas, O., Alatorre, J., Lopez, P., et al. (2007). Arsenic exposure and cognitive performance in Mexican schoolchildren. *Environ. Health Perspect.* 115, 1371–1375. doi: 10.1289/ehp.9961
- Roulet, F. I., Wollaston, L., Decatanzaro, D., and Foster, J. A. (2010). Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience* 170, 514–522. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.069
- Sánchez-Peña, L. C., Petrosyan, P., Morales, M., González, N. B., Gutiérrez-Ospina, G., Del Razo, L. M., et al. (2010). Arsenic species, AS3MT amount and AS3MT gene expression in different brain regions of mouse exposed to arsenite. *Environ. Res.* 110, 428–434. doi: 10.1016/j.envres.2010.01.007
- Schindler, J., Jung, S., Niedner-Schatteburg, G., Pflauf, E., and Nothwang, H. G. (2006). Enrichment of integral membrane proteins from small amounts of brain tissue. *J. Neural Transm.* 113, 995–1013. doi: 10.1007/s00702-006-0508-4
- Scimemi, A., Tian, H., and Diamond, J. S. (2009). Neuronal transporters regulate glutamate clearance, NMDA Receptor activation and synaptic plasticity in the hippocampus. *J. Neurosci.* 29, 14581–14595. doi: 10.1523/jneurosci.4845-09.2009
- Scott, D. B., Michailidis, I., Mu, Y., Logothetis, D., and Ehlers, M. D. (2004). Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. *J. Neurosci.* 24, 7096–7109. doi: 10.1523/jneurosci.0780-04.2004

- Senft, A. P., Dalton, T. P., and Shertzer, H. G. (2000). Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe *o*-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* 280, 80–86. doi: 10.1006/abio.2000.4498
- Shen, J., Liu, J., Xie, Y., Diwan, B. A., and Waalkes, M. P. (2007). Fetal onset of aberrant gene expression relevant to pulmonary carcinogenesis in lung adenocarcinoma development induced by in utero arsenic exposure. *Toxicol. Sci.* 95, 313–320. doi: 10.1093/toxsci/kfl151
- Shih, A. Y., Erb, H., Sun, X., Toda, S., Kalivas, P. W., and Murphy, T. H. (2006). Cystine/glutamate exchange modulates glutathione supply for neuroprotection from oxidative stress and cell proliferation. *J. Neurosci.* 26, 10514–10523. doi: 10.1523/jneurosci.5178-06.2006
- Suckow, M. A., Danneman, P., Brayton, C. (2000). *The Laboratory Mouse*. New York Washington, D.C: CRC Press LLC, 7.
- Tao-guang, H., Wei-kai, L., Ying-hua, Z., Jie, Y., Lan-yue, G., Yuan, Y., et al. (2014). Excitotoxicity induced by realgar in the rat hippocampus: the involvement of learning memory injury, dysfunction of glutamate metabolism and NMDA receptors. *Mol. Neurobiol.* doi: 10.1007/s12035-014-8753-2. [Epub ahead of print].
- Thomas, D. J., Waters, S. B., and Styblo, M. (2004). Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 319–326. doi: 10.1016/j.taap.2003.10.020
- Tsai, S. Y., Chou, H. Y., The, H. W., Chen, C. M., and Chen, C. I. (2003). The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence. *Neurotoxicology* 24, 747–753. doi: 10.1016/s0161-813x(03)00029-9
- Tyler, C. R., and Allan, A. M. (2014). The effects of arsenic exposure on neurological and cognitive dysfunction in human and rodent studies: a review. *Curr. Environ. Health Rep.* 1, 132–147. doi: 10.1007/s40572-014-0012-1
- Vahter, M. (2008). Health effects of early life exposure to arsenic. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102, 204–211. doi: 10.1111/j.1742-7843.2007.00168.x
- Valdovinos-Flores, C., and Gensebatt, M. E. (2012). The role of amino acid transporters in GSH synthesis in the blood-brain barrier and central nervous system. *Neurochem. Int.* 61, 405–414. doi: 10.1016/j.neuint.2012.05.019
- von Ehrenstein, O. S., Poddar, S., Yuan, Y., Mazumder, D. G., Eskenazi, B., Basu, A., et al. (2007). Children's intellectual function in relation to arsenic exposure. *Epidemiology* 18, 44–51. doi: 10.1097/01.ede.0000248900.65613.a9
- Waalkes, M. P., Jie, L., and Bhattachandra, A. D. (2007). Transplacental arsenic carcinogenesis in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 271–280. doi: 10.1016/j.taap.2006.12.034
- Wang, H., Dávila-García, M. I., Yarl, W., and Gondré-Lewis, M. C. (2011). Gestational nicotine exposure regulates expression of AMPA and NMDA receptors and their signaling apparatus in developing and adult rat hippocampus. *Neuroscience* 188, 168–181. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.04.069
- Wasserman, G. A., Liu, X., Lioacono, N. J., Kline, J., Factor-Litvak, P., Van Geen, A., et al. (2014). A cross-sectional study of well water arsenic and child IQ in Maine schoolchildren. *Environ. Health* 13:23. doi: 10.1186/1476-069x-13-23
- Winneke, G. (2011). Developmental aspects of environmental neurotoxicology: lessons from lead and polychlorinated biphenyls. *J. Neurol. Sci.* 308, 9–15. doi: 10.1016/j.jns.2011.05.020
- Win-Shwe, T. T., Mitsushima, D., Yamamoto, S., Fujitani, Y., Funabashi, T., Hirano, S., et al. (2009). Extracellular glutamate level and NMDA receptor subunit expression in mouse olfactory bulb following nanoparticle-rich diesel exhaust exposure. *Inh. Toxicol.* 21, 828–836. doi: 10.1080/08958370802538068
- Zhao, D., Liu, D., Chen, X., Wang, K., Zhang, A., Kang, J., et al. (2013). Prenatal stress disturbs hippocampal KIF17 and NR2B in spatial cognition in male offspring. *J. Neurosci. Res.* 91, 535–544. doi: 10.1002/jnr.23172

Conflict of Interest Statement: The Guest Associate Editor Victoria Campos declares that, despite being affiliated to the same institution as author Daniela Silva-Adaya, the review process was handled objectively and no conflict of interest exists. The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 17 October 2014; accepted: 13 January 2015; published online: 09 February 2015.

Citation: Ramos-Chávez LA, Rendón-López CRR, Zepeda A, Silva-Adaya D, Del Razo LM and Gensebatt ME (2015) Neurological effects of inorganic arsenic exposure: altered cysteine/glutamate transport, NMDA expression and spatial memory impairment. *Front. Cell. Neurosci.* 9:21. doi: 10.3389/fncel.2015.00021

This article was submitted to the journal *Frontiers in Cellular Neuroscience*.

Copyright © 2015 Ramos-Chávez, Rendón-López, Zepeda, Silva-Adaya, Del Razo and Gensebatt. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.