



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DEPENDENCIA DEL SEXO EN LA RESPUESTA PRO-  
OXIDANTE/ANTIOXIDANTE DE LOS SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS  
POR LA EXPOSICIÓN A ARSÉNICO EN EL RATÓN C57BL/6

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
RUBÉN DARÍO CONTRERAS LÓPEZ

TUTOR:  
DRA. VERÓNICA MIREYA RODRÍGUEZ CÓRDOVA  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:  
DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, SANTIAGO DE QUERÉTARO, AGOSTO 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.

## RESUMEN

La exposición crónica a arsénico (As) a través del agua de bebida se ha relacionado con cáncer y alteraciones neurológicas. En modelos experimentales se han documentado alteraciones en marcadores dopaminérgicos y estrés oxidante en el cerebro, sin embargo se desconoce cómo influye la condición sexo en estas alteraciones, así como la relación con cambios en la actividad motora y el sistema antioxidante/prooxidante en regiones dopaminérgicas claves en el control motor.

Ratones C57BL/6 fueron expuestos a concentraciones de 0.05, 0.5 (relevantes al medio ambiente) y 50 mg As/L a través del agua de bebida durante seis meses. Para evaluar los cambios conductuales gruesos, se evaluó la actividad motora espontánea mensualmente; para identificar alteraciones en patrones motores específicos (coordinación, bradicinesia y balance) se evaluó rotarod, poste vertical y barra de equilibrio después de seis meses de exposición a As; finalmente evaluamos peroxidación de lípidos y la presencia de enzimas antioxidantes, glutatión peroxidasa (importante en catalizar la reducción de peróxidos de hidrógeno) y la superóxido dismutasa (importante en catalizar la dismutación de superóxidos de hidrógeno en agua y peróxido de hidrógeno) en el núcleo accumbens, estriado y mesencéfalo.

Encontramos que las hembras expuestas a concentraciones de 0.05 y 50 mg As/L presentaron hiperactividad a partir del cuarto mes. Los machos no modificaron su actividad locomotora espontánea; sin embargo en el desempeño de la barra de equilibrio los machos expuestos a 0.05 mg As/L tuvieron más errores respecto del grupo control; mientras que no se observaron cambios en el desempeño en el rotarod y poste vertical. Se observaron cambios en lipoperoxidación en el núcleo accumbens de machos y hembras, y en mesencéfalo de machos la glutatión peroxidasa disminuyó sólo en el estriado de machos expuestos a 0.5 mg As/L, mientras que la superóxido dismutasa no presentó cambios ni en machos, ni en hembras expuestos a As.

Los resultados muestran que los cambios conductuales y marcadores antioxidantes/prooxidantes, son susceptibles a las diferencias de sexo, región cerebral y la concentración de As en agua de bebida, siendo la vía dopaminérgica mesolímbica la más vulnerable a modificaciones de lipoperoxidación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento a las personas que participaron en el proyecto. Por su apoyo técnico a Biol. María Soledad Mendoza Trejo, Dra. Olivia Vázquez Martínez, Nutr. Héctor Valente Godínez, Dra. Isela Hernández Plata. Al comité tutorial por sus recomendaciones, correcciones y guía, Dra. Verónica Rodríguez, Dr. Mauricio Díaz, Dra. María Eugenia Gonsebatt y Dra. Magda Giordano.

Agradecimientos a:

Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Becario No: 619857

Proyecto CONACYT: 152842

Proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT: 202013

Coordinación de la Maestría en Ciencias (Neurobiología)

Leonor Casanova y Guadalupe Amador por la siempre atenta ayuda

Unidad de videoconferencia

Lourdes Lara Ayala

Al personal del INB

# ÍNDICE

Arsénico .....	1
<b>Exposición al arsénico</b> .....	1
<b>Presencia de arsénico en el mundo</b> .....	3
<b>Asia</b> .....	3
<b>Europa</b> .....	4
<b>América</b> .....	4
<b>Enfermedades por exposición a arsénico</b> .....	5
<b>Efectos de la exposición a arsénico en el sistema nervioso</b> .....	6
Modelos experimentales.....	8
Metabolismo del arsénico.....	12
Mecanismo de acción .....	14
Estatus antioxidante.....	14
<b>Especies reactivas de oxígeno</b> .....	15
<b>Antioxidantes</b> .....	16
<b>Sistema enzimático</b> .....	18
<b>Sistema no enzimático</b> .....	19
Estrés oxidante .....	20
<b>Peroxidación de lípidos</b> .....	21
<b>Marcadores de peroxidación de lípidos</b> .....	22
Sistemas dopaminérgicos .....	24
<b>Impacto del arsénico sobre marcadores dopaminérgicos</b> .....	26
Diferencias en función del sexo .....	28
Justificación .....	33
Objetivo general.....	33
<b>Objetivos particulares</b> .....	33
Hipótesis .....	34
Método.....	34
<b>Sujetos</b> .....	34
<b>Preparación de soluciones con arsénico</b> .....	35

<b>Protocolos conductuales evaluados durante la exposición a arsénico</b> .....	35
<b>Actividad locomotora espontánea</b> .....	35
<b>Coordinación motora (Rotarod)</b> .....	36
<b>Poste vertical</b> .....	38
<b>Barra de equilibrio</b> .....	39
<b>Determinación de peroxidación de lípidos</b> .....	40
<b>Determinación de dienos conjugados</b> .....	40
<b>Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)</b> .....	41
<b>Detección de enzimas antioxidantes (Western blot)</b> .....	42
Resultados.....	44
<b>Actividad locomotora espontánea</b> .....	45
<b>Coordinación motora (Rotarod)</b> .....	48
<b>Poste vertical</b> .....	48
<b>Barra de equilibrio</b> .....	49
<b>Peroxidación de lípidos</b> .....	50
<b>Determinación de enzimas antioxidantes</b> .....	52
Discusión.....	55
Referencias.....	61

## **Arsénico**

El arsénico (As) es un metaloide cristalino que se presenta en diferentes estados de oxidación (-3, +3, +5), siendo los estados de oxidación trivalente y pentavalente las formas más comunes. La toxicidad del As depende de su forma química, estado físico y los compuestos que genera, los cuales pueden ser orgánicos e inorgánicos; una vez que se ingiere el arsénico inorgánico se activan vías metabólicas de excreción que dan como resultado especies mono, di y trimetiladas; algunas de ellas son más tóxicas que su forma inorgánica original (Rahman y Hassler, 2014).

Desde el punto de vista biológico y toxicológico los compuestos del As pueden clasificarse en tres grupos principales:

- 1) Compuestos inorgánicos: derivados del estado trivalente, son trióxido de arsénico ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), tricloruro de arsénico, arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ); derivados del estado pentavalente, el pentóxido de arsénico, ácido arsénico y arseniatos.
- 2) Compuestos orgánicos: el ácido arsanílico, ácido monometilarsónico, ácido dimetilarsínico, óxido de trimetilarsina, arsenobetaína, arsenocolina y arsenoazúcares.
- 3) Compuestos formados por el gas arsina o arseniuro de hidrógeno.

La exposición a As produce alteraciones a nivel celular, bioquímico y molecular teniendo como consecuencia alteraciones en la salud, como cáncer de piel, alteraciones vasculares, neuropatías, disminución en medidas de inteligencia verbal, habilidades viso-espaciales, alteraciones en el lenguaje y memoria (Rodríguez et al., 2003; Tyler y Allan, 2014).

## **Exposición al arsénico**

Las principales vías de exposición al As son por causas naturales y antropogénicas. Dentro de las causas naturales la exposición es a través de emisiones volcánicas, chimeneas submarinas, especies minerales, cuerpos de agua; mientras que las causas antropogénicas se debe al uso de As en productos para la producción de plaguicidas, fertilizantes, en el tratamiento de pieles, tratamiento del algodón, preservación de

madera, aditivos para alimentos, productos farmacéuticos, producción de vidrio, semiconductores, uso de pinturas, colorantes y pigmentos (Tseng, 2007).

De acuerdo con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) en su reporte de 2009, las principales fuentes de As en la comida son los diferentes granos de cereal, productos a base de granos de cereal, agua embotellada, café, cerveza, pescados y vegetales. Mientras que en el reporte del 2014 encontraron que las mayores fuentes de As en alimentos fue a través de productos a base de granos, especialmente granos de arroz, leche, agua de bebida, entre otros.

La mayor concentración de As se encuentra en las algas marinas siendo de 11 mg As/kg; en relación al ácido mono-metil-arsénico (MMA) existe una mayor concentración en algas y mariscos, mientras que el ácido di-metil-arsénico (DMA) y la arsenobetaina se encuentra en pescados y mariscos (Lynch et al., 2014).

Las concentraciones de As en aguas marinas tienen una media de 2 µg As/L, y es común encontrar niveles más altos en estuarios debido a la desembocadura de aguas con sedimentos terrestres; mientras que en mares no contaminados se ha observado en muestras de flora y fauna concentraciones de As inferiores a 2.2 µg As/L (Grinham et al., 2014).

La fuente más importante de contaminación con As es a través del agua de consumo humano; la concentración de As presente en cuerpos de agua superficial o subterránea está en función del espacio y tiempo, las propiedades de los cuerpos de agua, así como de la formación de compuestos primarios o secundarios del As (Bundschuh et al., 2012), algunos mecanismos de movilización del As a los cuerpos de agua son:

- Propiedades de los cuerpos de agua: pH, potencial oxido-reducción, presencia de iones, dureza del agua, contenido de materia orgánica.
- Exposición de tiempo y espacio: agua superficial o subterránea.
- Procesos interface entre sólido y fluidos: procesos químicos como la precipitación o capacidad de disolución del agua; transformaciones microbiológicas; procesos físico-químicos como adsorción, es decir el

proceso por el cual átomos, iones, moléculas son atrapados o retenidos en la superficie del cuerpo de agua.

- Movilización del As: depende de la fuente de exposición de As, las condiciones hidrogeoquímicas, la distribución espacial de la red de flujo del agua (horizontal-vertical).
- Formación de minerales arsenicales: hidróxidos metálicos.

## **Presencia de arsénico en el mundo**

De acuerdo con la Organización para la Agricultura y la Comida de la Organización de las Naciones Unidas (FAO/WHO, 2010), el As se encuentra presente con niveles altos en el agua subterránea en países como Argentina, Chile, China, India, México, Estados Unidos de América y Bangladesh, entre otros. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido un límite de 0.010 mg As/L de agua; sin embargo hay países en los que este nivel se rebasa. En México el límite permisible es de 0.025 mg As/L de acuerdo con la modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994.

## **Asia**

Asia es el continente más afectado por intoxicación con As, es probable que más de 100 millones de personas hayan bebido agua contaminada con más de 0.010 mg As/L; las regiones más expuestas han sido Bangladesh, India y Nepal; sin embargo desde Pakistán hasta Taiwán conocido como el cinturón de As de Asia del sur y sureste ha sido mayormente afectado, incluyendo también a Mongolia, China. La principal razón de dicha contaminación ha sido el sistema de ríos que acarrea gran flujo de sedimentos drenados por el sistema fluvial Ganges-Brahmaputra-Meghna; el As es movilizado a través de procesos naturales y es incorporado al agua que después se usa para consumo en las actividades cotidianas de los habitantes de esta zona del mundo (Bundschuh et al., 2012). En Asia oriental países como Taiwán han registrado casos desde la década de los sesenta en donde los habitantes han presentado un caso particular de enfermedad vascular periférica conocida como la enfermedad del pie negro (BFD, por sus siglas en inglés) relacionada con la ingesta de As; las islas

japonesas son ricas en As debido a la presencia de la cadena volcánica, lo que deja concentraciones en aguas geotermales de más de 25.7 mg As/L.

## **Europa**

Los países que presentan mayor exposición a As en Europa son Hungría, Rumania, Eslovaquia y Croacia. En Hungría en el río Tisza, uno de los más importantes de Europa central, se encontraron zonas con concentraciones 25, 50 y 100 µg As/L y otras zonas con cantidades entre 6 y 12 mg As/L. En Finlandia se han encontrado zonas con concentraciones de 2.23 mg As/L, sin embargo no se han reportado efectos a la salud o dermatológicos debido a que en la últimas décadas se ha disminuido el uso de estas aguas.

## **América**

En Estados Unidos de América se han encontrado cuencas contaminadas con As en Arizona, Nuevo México, Nevada, California, Nueva Inglaterra, Oklahoma, Pensilvania, Oregón y Washington. Es de llamar la atención de que aunque haya ciudades con concentraciones de As similares a las encontradas en Asia exista una menor prevalencia de enfermedades relacionadas al As, lo que hace suponer que una mejor nutrición, condición de salud y menor tiempo de exposición disminuye la intensidad de los síntomas provocados por As.

Los primeros registros de intoxicación por As en América Latina son en Argentina relacionados con la ingesta de agua proveniente de aguas subterráneas y el consecuente desarrollo de enfermedades; sin embargo fue hasta las década de los 50 y 60 del siglo pasado que el problema de intoxicación por agua contaminada con As comenzó a ser detectada en otros países como México y Chile; hasta el 2011 se ha reportado altas concentraciones de As en el agua superficial y subterránea en 15 países en Latino América (Bundschuh et al., 2012).

En general, las zonas con mayor ocurrencia de altas cantidades de As son aquellas en las que hay partículas sólidas que han sido arrastradas y depositadas (depósitos aluviales y deltas). En la figura 1 se muestra un mapa de las principales zonas con

niveles altos de As en aguas subterráneas, acuíferos; así como cuerpos de agua con As relacionado con fuentes geotermales y minería (Edmunds et al., 2015).

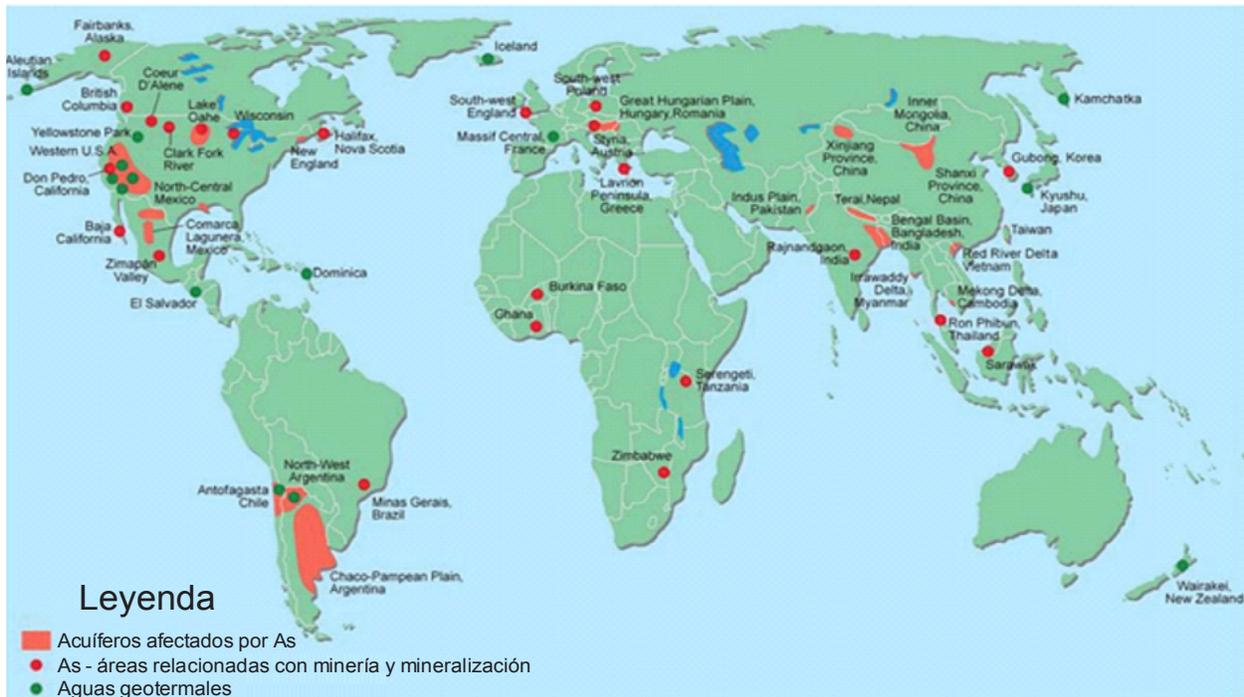


Figura 1. Se muestran una distribución de cuerpos de agua subterráneos y al aire libre contaminados con As debido a actividades de minería, procesos de mineralización del agua, así como causas geotérmicas. (Modificada de Edmunds et al., 2015).

## Enfermedades por exposición a arsénico

La exposición crónica a As es habitual debido a que es un elemento ubicuo, sin embargo, existen casos de intoxicación aguda, como ejemplo se tiene la edad media en donde el As era conocido como el “Rey de los venenos o veneno para los Reyes” debido a su potencia y discreción (Hughes et al., 2011); y aunque ha disminuido su uso como veneno puede haber intoxicaciones agudas por descuidos laborales o por consumo premeditado. Los síntomas inmediatos por intoxicación aguda de As son vómito, dolor abdominal y diarrea, entumecimiento y hormigueo en las extremidades.

Durante la exposición a largo plazo se han reportado cambios en la pigmentación de la piel, queratosis en manos y plantas de los pies, y cáncer de piel. También se puede

presentar neuropatía periférica, síntomas gastrointestinales, conjuntivitis, cáncer de órganos internos, diabetes, daños en el sistema renal, hígado, muerte de eritrocitos, disminución de grosor de hueso, hipertensión arterial y enfermedades cardiovasculares (Flora, 2011; Fowler et al., 2015; Rodríguez et al., 2003), en mujeres embarazadas hay un mayor riesgo de aborto y en exposiciones de más de 10 años se ha observado el desarrollo de cáncer (FAO/WHO, 2010).

### **Efectos de la exposición a arsénico en el sistema nervioso**

Pocos estudios han evaluado los efectos de la exposición crónica a As sobre el sistema nervioso (SN). Se ha reportado que personas que han inhalado o ingerido As presentaron neuropatía periférica, caracterizada por insensibilidad y parestesia en las extremidades; cuando se realizó la examinación histológica se encontró que la mielina estaba fragmentada, había desintegración de los axones o completa degeneración axonal (Goebel et al., 1990, citado en Rodríguez et al., 2003). En un estudio de caso cuatro personas que ingirieron As accidentalmente o en un intento de suicidio presentaron síntomas gastrointestinales, neuropatía, adormecimiento o parestesia en las extremidades inferiores, hubo pérdida de reflejos; se midió la concentración de As en la orina de cada persona desde los primeros días de exposición hasta 3 meses después, encontrado aún niveles altos de As en la orina, posteriormente se hizo un seguimiento, y aunque se observó una mejoría gradual en la velocidad de conducción nerviosa y la amplitud de los potenciales de acción musculares, en tres casos seguían alteraciones en la conducción nerviosa de fibras motoras y sensoriales medidas 6 y 8 años después de la ingestión (Le Quesne y McLeod, 1977).

En un estudio llevado a cabo en 196 sujetos, 85 sujetos expuestos a emisiones de polvo y agua contaminada que contenía As y 118 sujetos no expuestos. Se encontró que las personas expuestas presentaban reflejos anormales del tendón peroneo, tenían una pobre función sensorial en la prueba vibro-táctil-cutánea, y presentaron mayor intensidad de temblores. Además de que se encontró un aumento en la latencia de respuesta del nervio ulnar (Gerr, 2000).

A nivel central se han observado deficiencias en funciones neurológicas superiores; deficiencias en el aprendizaje, alteraciones en las medidas de inteligencia verbal, labilidad emocional y alteraciones motoras en sujetos expuestos a As (Tyler y Allan, 2014); en un estudio realizado en 591 niños de entre 6 y 8 años de edad se asoció bajo desempeño en evaluaciones cognitivas que incluyeron memoria, atención, habilidades viso-espaciales y procesamiento de vocabulario con la presencia de As en la orina en concentraciones menores a 50 µg/L (Rosado et al., 2007). En un estudio transversal realizado en niños de 7 años en promedio que estuvieron expuestos de manera crónica a As a bajas y altas concentraciones, se observó una correlación negativa entre la concentración de As en la orina y la sub-escala verbal en la escala de inteligencia WISC-RM (Calderón et al., 2001).

En un estudio realizado en niños originarios del sur de España que nacieron y viven cerca de una zona contaminada por alta actividad minera y química, con niveles de As en el sedimento y agua mayores a los permitidos por la norma europea de 0.01 mg/L en el agua, no encontraron diferencias relacionadas con el sexo y la edad en la cantidad de As en la orina de niños y niñas, observaron que la exposición a As post-natal está asociado con alteraciones en atención focalizada y selectiva, sin embargo no pudieron establecer una relación con el trastorno de déficit de atención e hiperactividad (Rodríguez-Barranco et al., 2015), esto sugiere que los cambios conductuales y cognitivos en personas expuestas a As en niveles cercanos a los permitidos producen alteraciones sutiles o por debajo de los parámetros clínicos, en este mismo estudio no se observaron diferencias de género, sin embargo otros estudios en niños mexicanos sí han reportado diferencias de género (Roy et al., 2011), en estudios con roedores también se han observado diferencias dependientes del sexo (Bardullas et al., 2009; Tyler et al., 2015). Estas diferencias pueden influir en el metabolismo del As, en mayor o menor predisposición a tener alteraciones en parámetros conductuales, cognitivos; sin embargo, aún no hay consenso en el impacto del sexo en la toxicidad del As.

Roy et al. (2011) encontraron una asociación entre el arsénico dimetilado (DMA) y el As total detectado en la orina de niños y niñas de 6 años de edad con problemas cognitivos y conductuales reportados en una escala que medía conducta de oposición, problemas

cognitivos, hiperactividad y trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH) realizada por sus padres y profesores, además fue relevante encontrar que los niños tenían más DMA y As total excretado en la orina que las niñas; este estudio fue realizado en una población vecina a una fundidora de metales de la ciudad de Torreón, Coah, México.

En un estudio controversial realizado en Hungría se ha intentado asociar la tasa de suicidio con el consumo de agua contaminada con As, este estudio correlaciona diferentes niveles de As en el agua, 10 µg/L; 11-33 µg/L; 31-50 µg/L y más de 51 µg/L con la tasa de suicidios entre 2005 y 2011, los autores reportan una correlación positiva entre las concentraciones de 10 µg/L, 11-13 µg/L y 31-50 µg/L con el número de suicidios; una explicación es que la exposición crónica de As puede facilitar síntomas depresivos y como consecuencia un factor de riesgo en la conducta suicida (Rihmer et al., 2015).

### **Modelos experimentales**

En modelos experimentales se ha observado alterada la actividad locomotora (Bardullas et al., 2009; Itoh et al., 1990; Rodríguez et al., 2001, 2002, 2010), un retardo en la adquisición y extinción en un modelo de aprendizaje operante (Nagaraja y Desiraju, 1994) y aumento en el número de errores en el laberinto en T (Rodríguez et al., 2001, 2002) en respuesta a la exposición a As.

Existen diferentes modelos experimentales implementados en ratas, ratones, peces, con diferentes edades, tiempos y concentraciones de exposición, en estos estudios se observa que la edad, especie, cepa, tiempo y concentraciones de exposición influyen sobre los biomarcadores evaluados; en la tabla 1 se describe un resumen de cambios conductuales reportados.

En ratones macho DDY de cuatro semanas de edad, Itoh et al. (1990) observaron que ratones expuestos a trióxido de arsénico de manera intragástrica durante 14 días tuvieron un aumento en la actividad motora espontánea en la dosis de 3 mg/kg, mientras que los ratones expuestos a dosis de 10 mg/kg tuvieron una disminución en la actividad motora espontánea, lo que muestra efectos dependientes de las

concentraciones en la conducta, mientras que en ambas concentraciones se observó una disminución en el metabolito intracelular de la dopamina (DA) el ácido dihidroxifenil acético (DOPAC) en corteza cerebral y estriado.

La administración de As en concentraciones de 0.01 mg/L en ratones expuestos desde la gestación y también a aquellos en los que se expuso a As al momento de nacer provocó una disminución en el peso de los animales medidos en los primeros 28 días de nacidos, especialmente las hembras tuvieron menos peso; este efecto en parte se debió a la disminución de nutrientes en la leche de la madre, especialmente la reducción de triacilglicéridos (Kozul-Horvarth et al., 2012). El estudio sugiere que los ratones hembras son más vulnerables a la exposición a As en etapas tempranas del desarrollo, lo que sugiere una contribución hormonal.

En otro modelo de intoxicación durante la gestación, Markwoski et al. (2012) encontraron que las crías de ratones hembra expuestas a concentraciones de 8, 25 y 80 mg As/L a través del agua de bebida, evaluadas entre los días postnatales 17 al 21 mostraron alteraciones en la marcha caracterizadas por temblores en el cuerpo o espasmos, intenso acicalamiento de las patas traseras y una inusual flexión del cuerpo, también se observó una disminución en la fuerza de agarre tanto en machos como en hembras; por otro lado en estos ratones no se encontraron alteraciones en la coordinación motora de las extremidades evaluada con el rotarod; finalmente observaron que los machos tuvieron alteración en el control inhibitorio durante tareas de reforzamiento de razón variable durante condicionamiento operante.

En ratones Kunming machos a los que se les administró vía intragástrica 0.5 mL de agua con dosis de 1, 3 ó 10 mg As/kg durante 12 semanas, se observó que las dosis de 3 y 10 mg As/kg afectaron la memoria a largo plazo evaluada con la prueba de reconocimiento de objeto novedoso, estos cambios se relacionaron con la disminución del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y con la disminución del factor de transcripción de elementos de respuesta al AMPc (CREB), los cuales se han asociado con procesos de memoria y aprendizaje (Sun et al., 2015).

En rebanadas de hipocampo provenientes de ratas Wistar jóvenes (14-21 días de edad) y adultas (2-4 meses de edad), se realizaron diferentes técnicas electrofisiológicas. Dichas rebanadas fueron puestas en solución cerebro espinal artificial la cual contenía As en forma MMA III y MMA V a concentraciones 10, 25, 50 ó 100  $\mu\text{mol}$ . Se observó una disminución en los potenciales post-sinápticos excitatorios en las rebanadas con MMA III en todas las concentraciones en comparación con el MMA V, sin embargo ni el MMA III, ni el MMA V alteró la amplitud de la respuesta a los pulsos pareados, indicando que el efecto del MMA III es en las terminales post-sinápticas posiblemente alterando los receptores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA); este efecto tuvo mayor magnitud en las rebanadas expuestas de ratas jóvenes; ese mismo efecto se observó en el protocolo de potenciación a largo plazo, sin afectar el protocolo de pulsos pareados, lo que confirma que el efecto se presentó en las terminales post-sinápticas (Krüger et al., 2009).

Zhang et al. (2014) encontraron disminución en el espesor de las densidades post-sinápticas en ratones expuestos a concentraciones de 2 y 4 mg As/L en la forma de  $\text{As}_2\text{O}_3$ , al realizar un análisis genético y su posterior comprobación por medio de PCR y Western blot, observaron que los genes que codifican las siguientes enzimas y receptores implicados en potenciación y depresión a largo plazo, PLC $\beta$ 4, CaMKII, receptores ionotrópicos a glutamato AMPA1, AMPA2, NMDA1, y receptores metabotrópicos mGLUR1, estaban regulados a la baja en el cerebelo.

En otro estudio realizado en ratones macho y hembra C57BL/6, en un modelo de exposición a una concentración de 50  $\mu\text{g}$  As/L durante 90 días, que abarcó desde el estado embrionario hasta el día 70 post-natal, con el objetivo de evaluar la relación entre el As y las modificaciones post-traduccionales en las lisinas de las histonas con función importante en el desarrollo epigenético, se observó que la exposición perinatal a As altera las modificaciones post-traduccionales de histonas en la adultez en el giro dentado y corteza frontal, y que estas alteraciones son dependientes del sexo, la región de interés y el tipo celular (Tyler et al., 2015); de acuerdo con los autores estas modificaciones podrían relacionarse con la disminución en la neurogénesis y conductas depresivas en modelos experimentales con As.

En un protocolo de intoxicación en ratones CD-1 desde la gestación y hasta el día posnatal 15 y 90 a través de agua con concentración de 20 mg As/L, se observó que los ratones expuestos a As mostraron una menor tasa de discriminación en un tarea de reconocimiento de cambio de lugar de un objeto, siendo esta conducta más evidente en los machos. También observaron una regulación a la alta en el hipocampo en el sistema de transporte de glutamato-L-cisteína y una regulación a la baja en subunidades de receptores glutamatérgicos NMDA (Ramos-Chávez et al., 2015), estos datos muestran una alteración en el sistema glutamatérgico en especial en el hipocampo, lo que podría relacionarse con alteraciones en la memoria espacial.

Estos resultados son hallazgos moleculares y electrofisiológicos que podrían estar implicados en las alteraciones sinápticas en regiones clave para las funciones motoras, así como deficiencias en la memoria y el aprendizaje.

Efectos en conducta por exposición a arsénico	Dosis	Vía de exposición	Roedor	Referencia
Aumento de la actividad motora horizontal (3 mg/kg). Disminución de la actividad motora horizontal (10 mg/kg).	3 mg/kg 10 mg/kg	Vía intragástrica (14 días de exposición).	Ratones macho DDY.	(Itoh et al., 1990).
Disminución actividad horizontal (20 mg/Kg).	5 mg/kg 10 mg/kg 20 mg/kg	Vía intragástrica (15 días de exposición).	Ratas macho Sprague Dawley.	(Rodríguez et al., 2001).
Aumento de la actividad motora en machos (0.05 mg/L). Aumento de la actividad motora en hembras (0.05; 0.5; 5 mg/L). Efecto bifásico en machos (50 mg/L).	0.05 mg/L 0.5 mg/L 5 mg/L 50 mg/L	Agua de bebida (4 meses de exposición).	Ratones: machos y hembras C57BL/6.	(Bardullas et al., 2009).
Alteraciones en la marcha. Reducción en la fuerza de agarre de patas delanteras. Actividad motora espontánea disminuida en animales con arsénico. (se observó en todas la concentraciones)	8 mg/L 25 mg/L 80 mg/L	Agua de bebida: exposición etapa gestacional.	Ratones: machos y hembras C57BL/6.	(Markowski et al., 2012).
Disminución en memoria (reconocimiento de objeto novedoso) y conducta de exploración (10 mg/kg).	3 mg/kg 10 mg/kg	Vía intragástrica (3 meses de exposición).	Ratones: machos Kunming.	(Sun et al., 2015).
Menor tasa de discriminación en tarea de reconocimiento de cambio de lugar (memoria espacial).	20 mg/L	Agua de bebida: exposición etapa gestacional.	Ratones: machos y hembras CD-1.	(Ramos-Chavez et al., 2015).

Tabla 1. Se muestra los principales efectos sobre la conducta en modelos experimentales. Se observan diferencias que dependen de la vía de exposición, dosis, tiempo y especie animal del modelo.

## Metabolismo del arsénico

El As es rápidamente absorbido con una eficiencia del 80-90% a través del tracto gastrointestinal y posteriormente, metabolizado en el hígado. Se ha reportado que hay transportadores específicos en el intestino involucrados en la absorción del As, posteriormente es transportado por la sangre a todo el cuerpo y se acumula principalmente en el hígado, riñón y pulmones (Fowler et al., 2015).

La biotransformación del As ocurre en una secuencia que reduce el As pentavalente a As trivalente; esta reacción puede ser no enzimática ante la presencia de grupos tioles como el glutatión, o puede ser enzimática en donde se requiere del donador de metilos S-adenosilmetionina (SAM) y la enzima arsénico-3-metiltransferasa (As3MT), ver figura

2; de estas reacciones se obtienen metabolitos del As como el ácido mono-metil-arsénico (MMA) o el ácido di-metil-arsénico (DMA) (Hughes, 2002).

El sitio principal de metilación del As es el hígado, sin embargo el As atraviesa la barrera hematoencefálica; en ratones machos CD-1 expuestos a  $(\text{NaAsO}_2)$  en dosis de 10 mg/kg durante 9 días por vía intragástrica se observó una concentración mayor del metabolito DMA en cerebro comparado con hígado, un resultado interesante fue que en rebanadas de cerebro expuestas a  $(\text{NaAsO}_2)$  hubo la presencia de MMA y DMA, confirmando la capacidad de metilación del cerebro (Rodríguez et al., 2005).

Es un estudio realizado por Mohri et al. (1990) en hombres y mujeres de Japón se observó que la mayor ruta de excreción de los metabolitos del As es a través de la orina y en menor medida a través de heces fecales, sin embargo la tasa de excreción varía dependiendo de la forma química y los compuestos que forma el As.

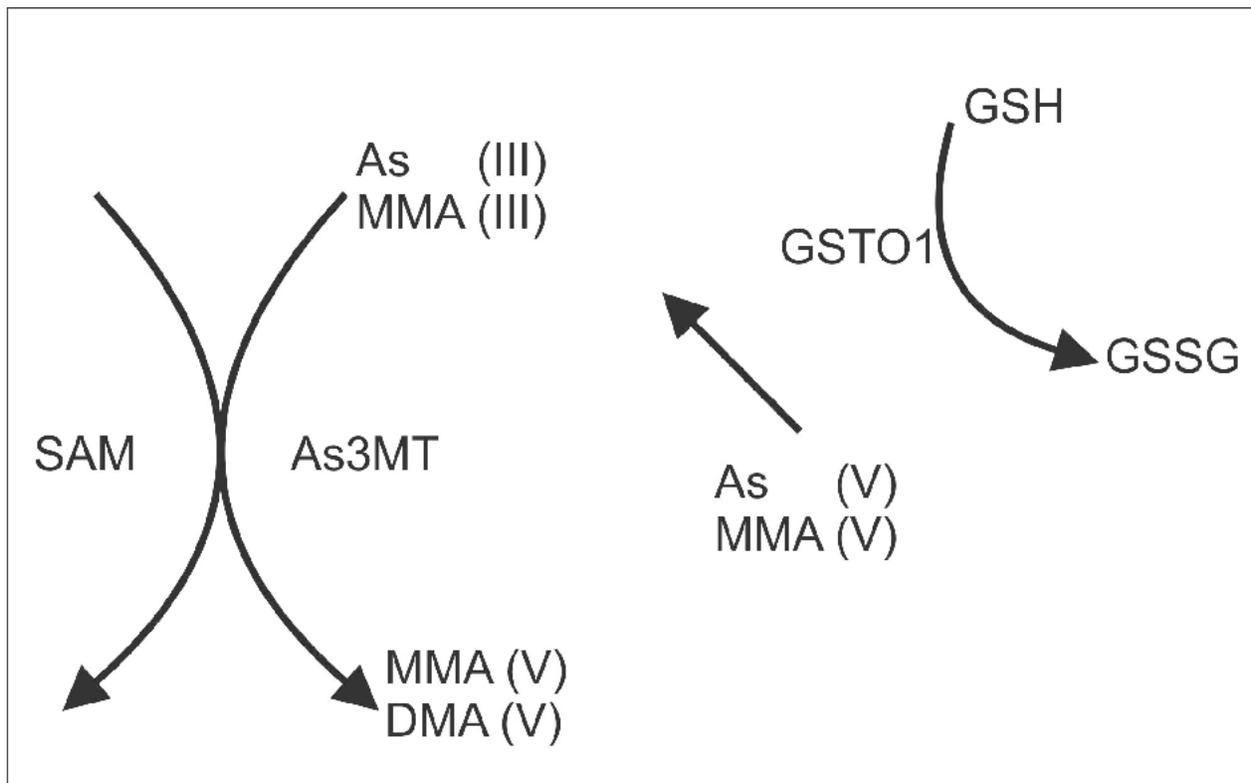


Figura 2. Vía de desintoxicación del As. Se observa la acción de la glutatión-s-transferasa que cambia la valencia del As, posteriormente se observa la enzima arsénico-3-metil-transferasa que transfiere grupos

metilo al As con ayuda del cofactor S-adenosil-metionina donador de grupos metilo. (Modificado de Lindberg et al., 2007).

### **Mecanismo de acción**

Las principales vías de toxicidad en el organismo para los arsenicales trivalentes son la unión a grupos sulfhidrilo (SH), con la consecuente inhibición de la actividad de enzimas o de proteínas, por ejemplo el As inhibe la acción de la piruvato deshidrogenasa, dando como resultado una disminución en la conversión de piruvato en acetil coenzima A (CoA), también puede inhibir las enzimas glutamato-cisteina ligasa o glutatión sintetasa reduciendo la producción de glutatión, así como consumir la poza disponible de glutatión disminuyendo la respuesta antioxidante (Rahman y Hassler, 2014); debido al proceso de metilación del As hay disminución de grupos metilo disponible (CH<sub>3</sub>-), lo que modifica el control de expresión epigenética, proliferación celular, y disminuye la eficiencia de reparación del ADN (Tyler y Allan, 2014); además hay activación de vías apoptóticas (Yen et al., 2011); el As en su forma pentavalente puede funcionar como un análogo del fosfato capaz de incorporarse a la fosforilación de ADP a ATP alterando la transducción de señales.

Otro mecanismo de toxicidad es a través de inducir estrés oxidante, que es un desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y los sistemas de defensa antioxidante; la metilación del As y la alteración de las vías metabólicas son fuentes principales de ERO y posterior toxicidad celular, así como su papel carcinógeno (Fowler et al., 2015).

### **Estatus antioxidante**

Existe un complejo sistema antioxidante enzimático y no enzimático que contrarresta los efectos dañinos de ERO, de nitrógeno (ERN) y de otros oxidantes sobre moléculas biológicas. La determinación de especies reactivas, así como los niveles de antioxidantes y su actividad puede relacionarse con el daño provocado por estrés oxidante inducido por el As. Cabe mencionar que condiciones bajas o moderadas de especies reactivas tiene efectos benéficos, por ejemplo en defensa contra agentes

infecciosos, en señalización celular los radicales hidroxilo estimulan la actividad de la guanilato ciclasa para formar el segundo mensajero monofosfato guanosina cíclica (GMPc) (Valko et al., 2007).

### **Especies reactivas de oxígeno**

Las ERO se producen de manera normal en el interior de las células como resultado de la acción enzimática y de vías metabólicas, ver figura 3, que incluyen los complejos mitocondriales I, II, IV (Prakash et al., 2015) durante la cadena del transporte de electrones, la acción de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, xantina oxidasa, monoamina oxidasa, y de las proteínas citocromo P450 (CYP) (Yan, 2014). Otras fuentes de ERO son peroxisomas, procesos inflamatorios, fagocitosis, vías araquidónicas, isquemias y ejercicio físico; existen factores externos que también generan ERO como son fumar, contaminantes, radiación, drogas, pesticidas, solventes y el ozono (Carocho y Ferreira, 2012).

Existen enzimas que son responsables de la producción de especies reactivas en condiciones normales, ver figura 3, como la enzima CYP, CYP2E1, CYP4A, la enzima xantina oxido-reductasa, el óxido nítrico sintasa (NOS), la enzima NADPH oxidasa, la coenzima NADPH; sin embargo, existen tóxicos que pueden perturbar el balance provocando un aumento en la formación de radicales libres o una inhibición de los mecanismos de defensa antioxidante (Shankar, 2014; Valko et al., 2007). En cantidades normales, es decir sin que provoquen estrés oxidante, las ERO son parte de las vías de señalización que permiten el funcionamiento normal de las células, manteniendo la homeostasis.

Las ERO incluyen radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidropéroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), radicales hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), óxido nítrico (NO), y otras especies no radicales libres como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), ácidos hipoclorosos (HOCL) y peroxinitritos ( $ONOO^-$ ) (Carocho y Ferreira, 2012). Las principales ERO generadas son peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y los radicales libres superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) (Wu, 2013). La reactividad de los radicales libres se debe a que estas moléculas tienen un electrón no apareado en el último orbital, lo que

los hace fácilmente reactivos, y pueden desencadenar una cascada de reacciones, mientras que las especies no radicales son menos reactivas sin embargo, son capaces de iniciar y propagar el daño oxidante.

### **Antioxidantes**

Los antioxidantes son sustancias y factores que de manera significativa retardan o previenen la oxidación de sustratos, a través de capturar o apagar las especies reactivas, o de regular a la alta las defensas antioxidantes dando como resultado una prevención o remoción del daño oxidante en la molécula objetivo (Carocho y Ferreira, 2013).

El sistema enzimático de respuesta antioxidante está compuesto por tres importantes enzimas primarias, glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), las cuales previenen la formación o neutralizan los radicales libres; por otro lado, la glutatión reductasa (GR) y la glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa son enzimas secundarias que no neutralizan directamente los radicales libres, sin embargo actúan de manera conjunta con las enzimas primarias. Los sistemas no enzimáticos están compuestos principalmente por glutatión y vitaminas A, C y E. También existen factores de transcripción como el factor nuclear derivado de eritroides (Nrf2) que está asociado con la respuesta celular ante estrés oxidante favoreciendo la transcripción de RNA mensajeros de elementos de respuesta antioxidante (Shankar, 2014). En la figura 3 se pueden apreciar algunos elementos del sistema enzimático y no enzimático.

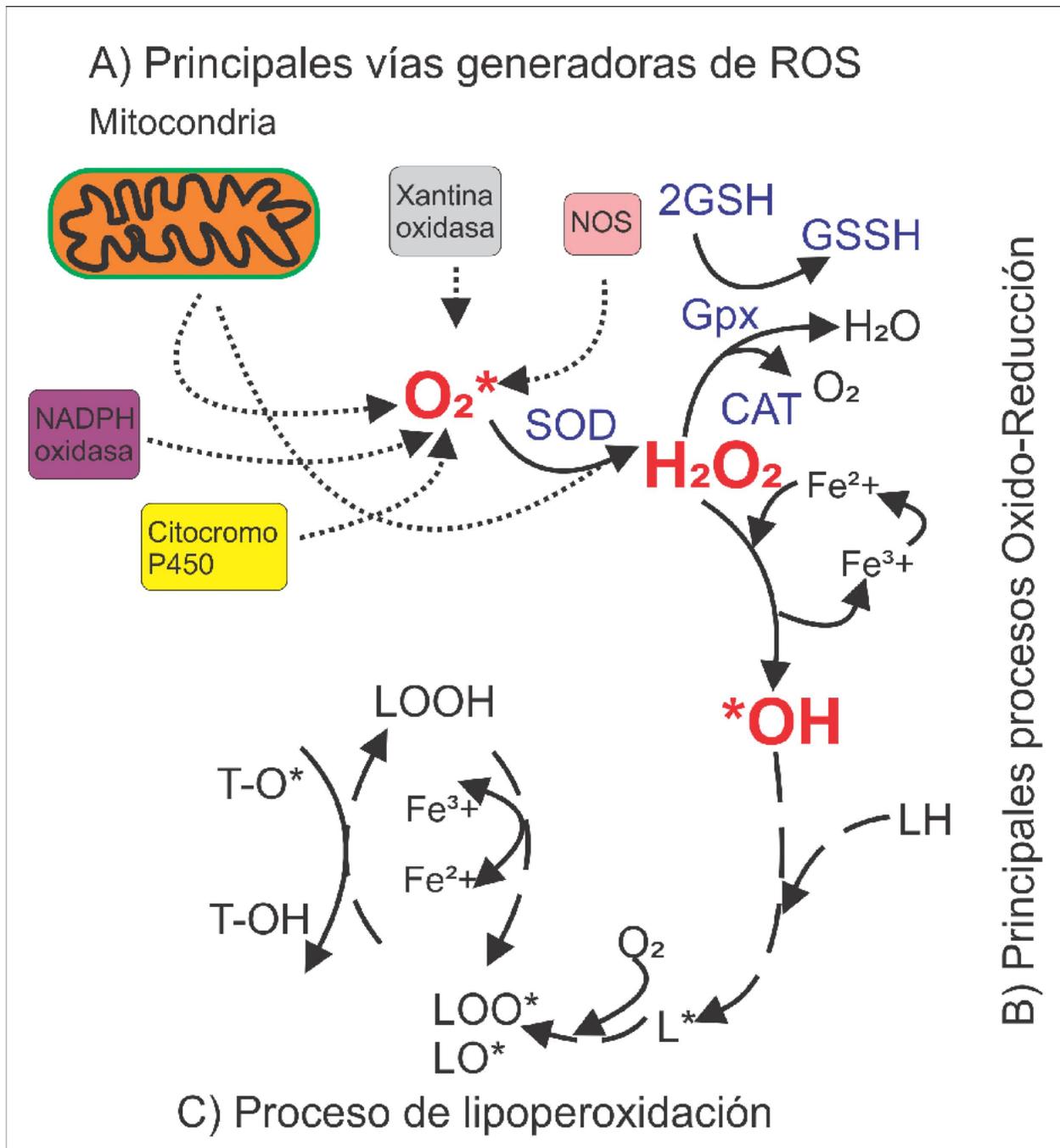


Figura 3. Se muestra en A) las principales vías de generación de especies reactivas de oxígeno, en B) los principales procesos oxido-reducción y en C) la acción de especies reactivas sobre ácidos grasos poliinsaturados causando lipoperoxidación. En rojo se observan las principales especies reactivas de oxígeno y en azul las principales agentes antioxidantes. (Figuras modificadas de Valko et al., 2007; Yang et al., 2015).

## Sistema enzimático

La GPx es una enzima antioxidante intracelular que reduce los peróxidos y los radicales hidroxilos al donar un electrón, durante este proceso el GSH es oxidado quedando como glutatión disulfuro (GSSG), el cual vuelve a ser reducido por acción de la enzima GR usando como cofactor al NADPH (Kalyanaraman, 2013). Se ha reportado la presencia de GR y GPx en el cerebro, a este respecto, se ha descrito la presencia de GPx en la lámina II de la corteza cerebral, giro dentado y el núcleo pontino del ratón (Martínez-Sámano, 2011).

Las enzimas SOD y CAT suelen trabajar de manera conjunta, la SOD reduce los radicales hidroxilo y los  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ , los cuales son después reducidos a  $H_2O$  y  $O_2$  por acción de la CAT, previniendo así la formación de radicales hidroxilo y como consecuencia la peroxidación de lípidos (Wu et al., 2013).

Existen al menos tres tipos de SOD, por un lado la CuZn-SOD que se encuentra principalmente en el citoplasma de la célula, la Mn-SOD que se encuentra en la matriz mitocondrial y la EC-SOD que se encuentra fuera de la célula. El mecanismo de acción es el mismo en todas las variaciones de SOD, el cual consiste en que los iones del metal localizado en el sitio activo de la enzima cataliza la dismutación de electrones entre dos moléculas de  $O_2^-$ . En la CuZn-SOD, el sitio catalítico es el metal Cu, el cual cambia del estado cúprico ( $Cu^{2+}$ ) al estado cuproso ( $Cu^+$ ) durante la reacción (Turrens, 2010). En suma, la evaluación de los cambios en la actividad de estos sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos puede medir o indicar el estatus antioxidante del organismo como respuesta al medio interno y al ambiental.

En modelos experimentales de exposición a As se ha observado un aumento en la concentración de antioxidantes. En cerebro de peces cebra expuestos a  $50 \mu\text{g/L}$  de  $As_2O_3$  durante 90 días se observó un aumento de GR a los días 7, 30 y 90; un aumento de GPx a los 30 días; y un aumento de CAT a los 15, 60 y 90 días; aumento de SOD Cu/Zn; también se observó un aumento en la tasa de transcripción de ARNm para Nrf2 a los 30 y 90 días de exposición a  $As_2O_3$  (Sharkar et al., 2014). Lo anterior muestra que

la activación del sistema antioxidante y su mantenimiento es necesario para controlar y disminuir los daños provocados por la exposición a As.

### **Sistema no enzimático**

Dentro de los mecanismos antioxidantes no enzimáticos el glutatión es un tripéptido (L- $\gamma$ -glutamil-L-cistenilglicina) que se encuentra en diferentes concentraciones (0.5 - 10 mM) en diferentes tipos celulares (Shankar, 2014). El GSH es sintetizado en el citoplasma celular por la acción de la enzima  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetasa ( $\gamma$ -GluCys) y la glutatión sintetasa. El glutatión puede estar en su forma reducida (GSH) o en su forma oxidada (GSSG). Las funciones principales del glutatión es mantener el potencial de óxido-reducción celular, debido a que mantiene el estado reducido de los grupos tiol en las proteínas, es parte importante en la desintoxicación de xenobióticos, participa en la proliferación celular y en la activación de vías apoptóticas (Martínez-Sámamo et al., 2011).

En el sistema nervioso de ratas tratadas con 100 mg As/L en agua de bebida durante 60 días, ocurrió una reducción de los niveles de GSH, GR, GPx, reportándose que las áreas con más disminución de GSH fueron la corteza, el hipocampo y el estriado, lo que se correlacionó con un aumento en la concentración de As y de peroxidación de lípidos; en un estudio complementario se observó que el estriado presentó un aumento en la concentración de proteínas carboniladas (Shila et al., 2005a; Shila et al., 2005b) las cuales son marcadores de daño oxidante debido a que algunos aminoácidos de la cadena polipeptídica principal, así como las cadenas laterales, de las proteínas son susceptibles a ser oxidadas.

Dentro del metabolismo del As, el GSH tiene un papel fundamental ya que reduce el As de su forma pentavalente a trivalente, además influye sobre la tasa de metilación primaria y secundaria conocidas como MMA y DMA; en ratones intoxicados con 10 mg As/kg de peso por vía intragástrica durante 9 días, se observó una disminución en la actividad de la GR la cual es una enzima clave durante el reciclado del GSSG a GSH, lo que sugiere que puede haber una disminución de GSH ante la exposición repetida y a dosis altas de As (Rodríguez et al., 2005).

En otro estudio, realizado en ratones intoxicados a través del agua de bebida, se observó que la administración de GSH intraperitoneal favorece la metilación del As extra-hepático, lo que deja ver que niveles altos de GSH favorecen la metilación del As en cerebro (Wang et al., 2011). Se ha observado que el As metilado puede ser aún más agresivo que el As; sin embargo, este efecto sólo ocurre en las formas metiladas trivalente siendo el MMA III la forma más tóxica (Antonelli et al., 2014), por otro lado, en humanos se ha descrito que la mayor forma metilada que se excreta es el DMA V (Styblo et al., 2000), lo que sugiere que la metilación favorecida por GSH es una importante vía de desintoxicación; sin embargo una metilación deficiente puede provocar igual o mayores alteraciones que el As.

Otras proteínas como la tiorredoxina o la NADPH quinona oxido-reductasa (NQO-1) pueden participar como agentes antioxidantes. La tiorredoxina es una proteína de bajo peso molecular que participa como antioxidante gracias a sus dos grupos tiol que mantienen el potencial oxido-reducción, actúa de manera similar al GSH. La NQO-1 es una flavoenzima que tiene un rol importante en proteger contra quinonas endógenas y exógenas, las cuales son agentes oxidantes, a través de catalizar la reducción de sus sustratos (ej. benzoquinonas) con 2 ó 4 electrones, este proceso ayuda a prevenir el ciclo oxido-reducción evitando la generación de radicales libres (Nebert et al., 2002).

Las vitaminas A, C y E también participan como agentes antioxidantes. La vitamina A es un carotenoide que se produce en el hígado, resulta de la ruptura de los  $\beta$ -carotenos, su efecto antioxidante reside en la posibilidad de combinarse con los radicales peroxilo antes de que ocurra peroxidación de lípidos; la vitamina C o ácido ascórbico es un antioxidante hidrosoluble con gran poder reductor, es efectivo para neutralizar ERO; la vitamina E es un potente antioxidante lipofílico, interrumpe la peroxidación de lípidos al donar un hidrógeno a los radicales peroxilo formando radicales tocoferilo los cuales pueden ser eliminados por acción de la GPx (Carocho y Ferreira, 2013).

### **Estrés oxidante**

Se refiere a un desbalance entre la producción de ERO y los sistemas antioxidantes que da como resultado una reducción en el control óxido-reducción. En un estado de

óxido-reducción balanceado las ERO son necesarias ya que participan en las funciones fisiológicas normales, sin embargo una excesiva presencia de ERO provoca daños en componentes celulares como ADN, proteínas y lípidos (Wu et al., 2013; Hou, 2014).

El daño a proteínas puede ocurrir a través de tres distintas vías:

- 1) Modificación de aminoácidos específicos.
- 2) Activación y acoplamiento de péptidos dependiente de radicales libres.
- 3) Formación de entrecruzamientos de proteínas debido a productos de peroxidación.

El daño al ADN puede ocurrir debido a modificaciones químicas y estructurales como la producción de sitios libres de bases nitrogenadas, modificaciones de las bases, modificación de los marcos de lectura, rompimiento de las cadenas y entrecruzamientos de complejos proteína-ADN.

### **Peroxidación de lípidos**

La peroxidación se inicia por el ataque de cualquier especie química con suficiente reactividad como para tomar un átomo de hidrogeno del grupo metileno unido a un carbono flanqueado por dobles enlaces; el hecho de que existan dobles enlaces, debilita los enlaces carbono-hidrógeno del átomo de carbono adyacente, es por ello que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son más susceptibles de ataques por especies reactivas.

Estudios epidemiológicos de tratamientos con As han observado disminución de antioxidantes y aumento en la peroxidación de lípidos. Un estudio reciente reportó en un cultivo con hepatocitos humanos que la exposición crónica o aguda a As activa las vías de señalización para la activación del Nrf2 dando como resultado un aumento en la síntesis de GSH, el cual es el mayor agente antioxidante (Hou et al., 2014); por otro lado, cuando se analizó la expresión de agentes antioxidantes en el cerebro de ratas expuestas a concentraciones de 0.05, 0.5 ó 50 mg As/L de As en agua, se observó un aumento en la expresión de ARNm para Nrf2 y para tiorredoxina en la corteza prefrontal

y núcleo accumbens (NAcc); también se observó aumentado el contenido de DA (Rodríguez et al., 2010).

### **Marcadores de peroxidación de lípidos**

Los marcadores estándar de la peroxidación de lípidos son la detección de dienos conjugados y aldehídos reactivos a través de la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) dando un color rosa intenso que se puede leer por espectrofotometría; entre ellos uno de los más conocidos es el malondialdehído (MDA), ver figura 4.

La lipoperoxidación se divide en tres pasos:

- 1) Fase de inicio: Inicia cuando se remueve un átomo de hidrógeno del carbono metilo de la cadena lateral, la captura del hidrógeno deja un electrón desapareado en el átomo de carbono dando como resultado un radical alquilo en el ácido graso ( $L^*$ ); posteriormente ocurre un arreglo en las insaturaciones de la cadena dando origen a un sistema de dienos conjugados.
- 2) Fase de propagación: Al agregar una molécula de oxígeno al radical alquilo se produce un radical peroxilo conjugado ( $LOO^*$ ), el cual puede abstraer un hidrógeno de otro PUFA, produciendo un hidroperóxido ( $LOOH$ ) y un nuevo radical alquilo ( $L^*$ ); este paso se puede repetir durante muchas veces, de tal manera que un simple evento oxidante en la cadena lateral del PUFA se puede magnificar y propagar.
- 3) Fase de terminación: Con los productos del paso anterior se pueden presentar varias reacciones; dos radicales alquilo, dos radicales peroxilo, o combinaciones. Otros productos terminales pueden ser reacciones de radicales alquilo o peroxilo con sustratos no lipídicos como proteínas, antioxidantes o aminoácidos. El MDA y otros aldehídos se generan como una reacción secundaria de la fase de propagación en donde ocurre la conversión de los radicales peroxilo de los PUFA en peróxidos cíclicos que son inestables y se escinden separándose de los grupos acilos de los fosfolípidos.

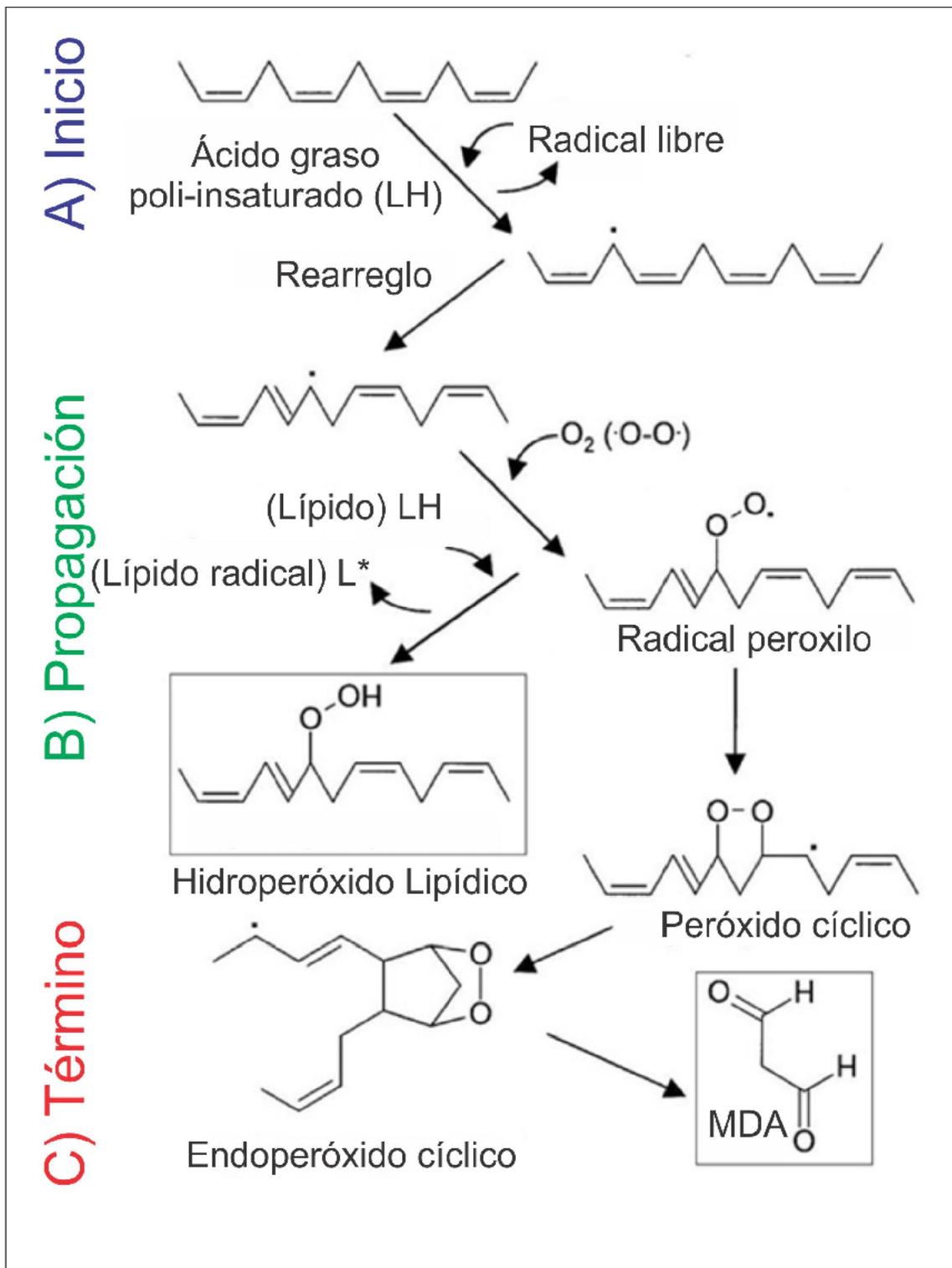


Figura 4. Se muestra el ataque de especies reactivas sobre cadenas de ácidos grasos poliinsaturados, se pueden apreciar tres fases en la lipoperoxidación, A) Inicio, B) Propagación y C) Término. Imagen modificada de Image Alchemy V1.12, URL: <https://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/method-simultaneous-determination-freeprotein-malondialdehyde-lipidproteinhydroperoxides/attachment/handmade-software-inc-image-alchemy-v1-12/>.

En ratones macho expuestos a  $As_2O_3$  en concentraciones de 0.5 ó 5 mg As/L durante 6 semanas se ha observado un aumento de MDA y otros aldehídos en plasma y corteza cerebral, disminución de GSH, así como de expresión de mensajeros para NQO-1 y GPx, en este mismo protocolo se observó inducción de procesos apoptóticos, así como activación de caspasa-3 (Yen et al., 2011). En peces cebrá expuestos a concentraciones de 50  $\mu$ g As/L se observó un aumento de ERO, de dienos conjugados y malondialdehído a los 15, 60 y 90 días de exposición (Sankar et al., 2014).

En ratas Wistar tratadas con 100 mg As/L durante 60 días se ha observado un aumento en la peroxidación de lípidos y de proteínas, así como una disminución en los niveles de GSH y GR, disminución de grupos sulfhidrilo acoplados a proteínas, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, así como la actividad de la GPx; se observaron mayores cambios en hipocampo, corteza y estriado (Shila et al., 2005a; Shila et al., 2005b).

### **Sistemas dopaminérgicos**

La DA es parte del grupo de catecolaminas que pueden actuar como hormonas o neurotransmisores en el sistema nervioso central (SNC) y periférico, se sintetiza a partir del aminoácido esencial fenilalanina, en seguida por acción de la enzima fenilalanina hidroxilasa se convierte en tirosina, posteriormente se convierte en L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por acción de la enzima limitante tirosina hidroxilasa (TH) y finalmente el L-DOPA por acción de la enzima descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos produce DA (Daubner et al., 2011).

Las neuronas dopaminérgicas con origen en el mesencéfalo constituyen el mayor número de células dopaminérgicas en el SNC, y están agrupadas principalmente en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) y el área tegmental ventral (ATV), en humanos el número de células dopaminérgicas en el mesencéfalo consiste en aproximadamente 590,000 neuronas durante los primeros 40 años de vida; otro grupo de células dopaminérgicas se encuentra en el hipotálamo posterior y la zona incierta del tálamo ventral y un grupo más se encuentra en las interneuronas periglomerulares del bulbo olfatorio y en las interneuronas amácrinas de la retina (Prakash y Wusrt, 2006).

Las dos vías dopaminérgicas más importantes son la vía nigroestriatal y la vía mesolímbica, ver figura 5. La vía nigroestriatal surge de la SNpc y envía proyecciones a la porción dorsal del estriado; este sistema se ha relacionado con el control del movimiento voluntario y la postura, la pérdida de neuronas en esta vía se asocia con la enfermedad de Parkinson (Hegarty et al., 2013); mientras que la vía mesolímbica tiene su origen en ATV que proyecta hacia el NAcc, amígdala y tubérculo olfatorio, la cual se ha relacionado con la regulación de conductas sociales y emocionales, conductas de recompensa, motivación y alimentación (Gillies et al., 2014).

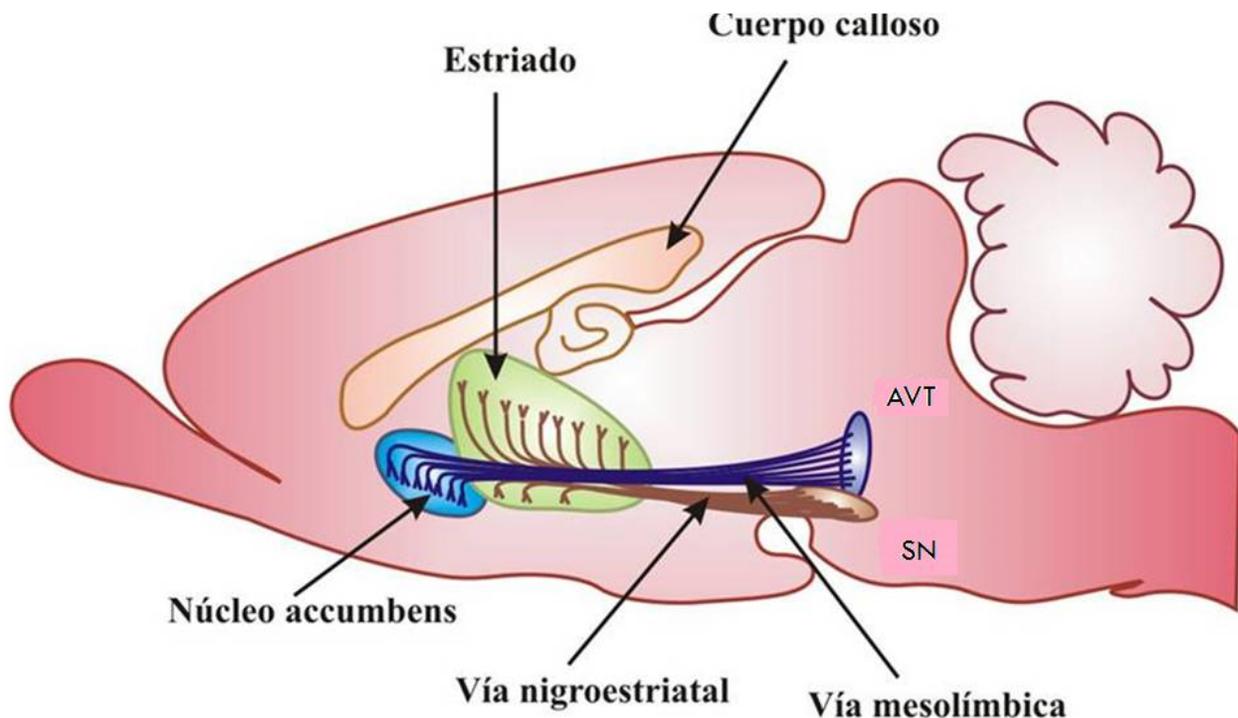


Figura 5. Se muestran las principales vías dopaminérgicas en el sistema nervioso.

Se conoce que de manera normal durante el envejecimiento hay pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra (Fahn y Cohen, 1992), lo que representa vulnerabilidad en la vía nigroestriatal. Ahora bien, el estrés oxidante se ha relacionado con la enfermedad de Parkinson, caracterizada por pérdida de neuronas en la sustancia nigra.

Hay cuatro características especiales en la sustancia nigra que la hacen susceptible al estrés oxidante: 1) actividad de la enzima monoamino oxidasa, 2) autooxidación de DA,

3) acumulación de hierro y 4) presencia de neuromelanina. En particular la desaminación de la DA a través de la enzima monoamino oxidasa dentro de las terminales nerviosas dopaminérgicas, así como el recambio de DA genera  $H_2O_2$ . Aunque el  $H_2O_2$  es pobremente reactivo, este puede atravesar fácilmente la membrana celular, su toxicidad reside en que por la reacción de Fenton que a partir de  $Fe^{2+}$  y  $H_2O_2$  se generan radicales hidroxilo ( $*OH$ ), el cual es altamente reactivo provocando alteraciones en el ADN y peroxidación de lípidos (Halliwell, 1992); el  $H_2O_2$  puede ser removido con la acción de enzimas como la CAT y GPx.

En condiciones patológicas como la enfermedad de Parkinson se ha observado un incremento de ERO (Cohen, 1988, citado en Halliwell, 1992), disminución de la enzima catalasa y aumento de peroxidación de lípidos (Fahn y Cohen, 1992). La DA que queda en el espacio sináptico, aproximadamente el 70% es capturada por el transportador de dopamina (DAT), y un segundo transportador localizado en las vesículas llamado transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT-2) toma la DA del citoplasma y la vesícula evitando que sea metabolizada y que genere ERO.

### **Impacto del arsénico sobre marcadores dopaminérgicos**

Las alteraciones encontradas sobre el sistema dopaminérgico varían entre diferentes métodos experimentales, siendo la especie animal, la concentración y el tiempo de exposición las variables que se relacionan con estos cambios. Los siguientes experimentos muestran un panorama general sobre cambios en marcadores dopaminérgicos en diferentes condiciones experimentales.

En un protocolo realizado en el estriado de ratones macho y hembra CD-1 se observó que la administración de reserpina (bloqueador de VMAT-2) aumentó la DA en las muestras medidas mediante HPLC siendo mayor en las hembras, lo que sugiere que las hembras tienen más vesículas o una mayor actividad de VMAT-2 en comparación con los machos, de manera interesante la gonadectomía tanto en machos como en hembras no influyó en la cantidad de DA (Dluzen et al., 2008).

En ratones macho C57BL/6 expuestos a las siguientes condiciones: control; 1; 10; 100 mg As/L durante 3 semanas se observó que en la concentración de 100 mg As/L

disminuyó la concentración de DA en el estriado y la corteza cerebral, así como la cantidad de la enzima TH evaluada por Western blot; sin embargo, en las concentraciones de 1 y 10 mg As/L no hubo diferencias ni en DA, ni en TH, finalmente en esta misma dosis hubo una regulación a la alta de receptores dopaminérgicos D1, D2, D3, D4 en el estriado (Kim et al., 2014).

En ratones DDY intoxicados con As por vía intragástrica durante 14 días usando dosis de 3 y 10 mg/kg se observó un aumento de DOPAC en la corteza cerebral, una disminución de DOPAC y ácido homovanílico (HVA) en el estriado, mientras que en el hipotálamo hubo un aumento de DOPAC (Itoh et al., 1990).

En ratones BALB/c expuestos durante 14 días a 11 ó 13.8 mg As/kg por vía intragástrica se observó un aumento de DA en el estriado, incremento de DOPAC en el hipotálamo con la concentración de 13.8 mg As/kg; un aumento de DOPAC en la corteza con la concentración de 11 mg As/kg (Mejía et al., 1997). Ahora bien, cuando ratones macho y hembra de la cepa C57BL/6 fueron tratados con 0.05, 0.5, 5 ó 50 mg As/L se observó una disminución en los niveles de DA, aumento en los niveles de DOPAC y un aumento en la relación DOPAC/DA en el estriado de las hembras, efecto no observado en los machos (Bardullas et al., 2009).

Otro estudio realizado en ratas Wistar jóvenes y adultas intoxicadas con 5 mg As/kg por vía intragástrica desde el nacimiento hasta el día postnatal 60, reportó una disminución de DA en el cerebelo, núcleo accumbens, hipocampo e hipotálamo, mientras que hubo un aumento de DA en el tallo cerebral y corteza motora, por otro lado, en los animales adultos intoxicados se reportó una disminución de DA en estriado y cerebelo (Nagaraja y Desiraju, 1993).

Ratas Sprague-Dawley expuestas a 20 mg As/kg durante 15 días por vía intragástrica tuvieron un aumento de DA en el mesencéfalo, mas no se observaron diferencias en el metabolito HVA; por otro lado, en ratas expuestas a 10 mg As/kg por vía intragástrica se observó un aumento de DA en la corteza cerebral durante la segunda semana de exposición; sin embargo, a la semana 3 ó 4 no se encontraron diferencias significativas,

finalmente ni en el estriado, ni en el mesencéfalo se observaron cambios en esta dosis en ninguna semana de exposición (Rodríguez et al., 2001).

En la Tabla 2 se hace una breve descripción de cambios reportados sobre el sistema dopaminérgico en modelos experimentales de exposición a As.

Efectos por exposición a arsénico	Dosis	Vía de exposición	Roedor	Referencia
Aumento en corteza de DOPAC y 5HT (ambas dosis). Disminución en estriado DOPAC y HVA (ambas dosis).	3 mg/kg 10 mg/kg	Vía intragástrica (14 días de exposición).	Ratones macho DDY	(Itoh et al., 1990)
Disminución de DA en cerebelo, núcleo accumbens, hipocampo e hipotálamo. Aumento de DA en tallo cerebral y corteza motora.	5 mg/kg	Vía intragástrica (nacimiento a día postnatal 60).	Ratas macho Wistar	(Najaraga y Desiraju 1993)
Aumento de DA en estriado. Aumento de DOPAC en hipotálamo y corteza.	11 mg/kg 13.8 mg/kg	Vía intragástrica (14 días de exposición).	Ratones macho BALB/c	(Mejía et al., 1997)
Aumento de DA en mesencéfalo (20 mg/Kg). Aumento de DA en corteza (10 mg/Kg).	5 mg/kg 10 mg/kg 20 mg/kg	Vía intragástrica (15 días de exposición).	Ratas macho Sprague Dawley	(Rodríguez et al., 2001)
Alteración neuroquímica DA. Regulación a la baja de TH.	0.05 mg/L 0.5 mg/L 5 mg/L 50 mg/L	Agua de bebida (4 meses de exposición).	Ratones machos y hembras C57BL/6	(Bardullas et al., 2009)
Disminución de DA en la corteza y estriado (100 mg/L) . Disminución en TH (100 mg/L).	1 mg/L 10 mg/L 100 mg/L	Agua de bebida (21 días de exposición)	Ratones machos C57BL/6	(Minjeong et al., 2014)

Tabla 2. Principales cambios son el sistema dopaminérgico en modelos experimentales de exposición a As.

### Diferencias en función del sexo

Muchos de los estudios realizados sobre toxicidad en humanos o modelos experimentales de As se han realizado en hombres o machos, respectivamente; sin embargo, en los últimos años se ha observado que la diferencia de sexo es un factor

que influye en la toxicología. A este respecto las diferencias en la respuesta a los tóxicos se podrían deber a: 1) Parámetros fisiológicos como el peso corporal, capacidad pulmonar, diferencias en el contenido de agua y grasa corporal; 2) Factores fisiológicos como ciclo hormonal, embarazo, amamantamiento, menopausia; 3) Estilos de vida, diferencias en la dieta, hábitos, actividad física, factores desencadenadores de estrés; 4) Diferencias en mecanismos de absorción de químicos, como disminución o aumento de transportadores de metales, aumento o disminución de metales como hierro, diferencias en el transporte y acoplamiento de los metabolitos de las sustancias tóxicas, en la tasa de excreción, diferencias en la cantidad de enzimas y hormonas (Vahter et al., 2007).

El SNC es sexualmente dimórfico, las diferencias de sexo en estructuras e interacción de hormonas en el SN permite que haya una variedad de respuestas conductuales (Gochfeld, 2007), es importante recordar que estas variaciones pueden ser más marcadas en diferentes etapas cronológicas de la vida. Una de las diferencias más importantes entre machos y hembras es el ciclo hormonal, en donde hay variación en las hormonas esteroideas, de éstas los estrógenos se han relacionado con neuroprotección, además de que contribuye a las diferencias en la morfología y neuroquímica del cerebro. En este sentido la primer estructura en la que se observaron diferencias entre sexos fue el hipotálamo, sin embargo hay diferencias en el cerebelo, hipocampo, así como en los sistemas noradrenérgico, serotoninérgico y dopaminérgico (McEwen, 2001).

La administración crónica de  $17\beta$ -estradiol tanto en ratas machos como en hembras disminuye la producción de ERO mitocondrial, medido a través de la relación aconitasa/fumarasa que es un indicador de estrés oxidante mitocondrial, también, se observó un aumento en la actividad de la Mn-SOD lo que sugiere un mecanismo de acción del estradiol; por otro lado la administración de testosterona no modificó los niveles de ERO, ni la actividad de Mn-SOD (Razmara et al., 2007).

Se ha observado mayor cantidad de transportador de 5-HT en el tallo cerebral, incremento de receptores 5-HT<sub>1A</sub> en la amígdala, corteza, hipocampo, incremento de

receptores tipo 5-HT<sub>2A</sub> en la corteza cingulada en hembras que en machos (Weiss, 2011).

Se han sugerido diferencias en la actividad del sistema dopaminérgico en relación al sexo tanto en humanos como en otros mamíferos; se ha observado mayor función dopaminérgica en mujeres que en hombres, mayor transportador de DA y éstos no difieren durante el ciclo menstrual (Cosgrove et al., 2007). Específicamente, el núcleo estriado de las mujeres tiene una mayor capacidad de sintetizar DA en la terminal pre-sináptica, mayor acumulación de precursores, así como mayor densidad de transportadores de DA (Gillies et al., 2014).

Estudios en humanos utilizando resonancia magnética funcional y tomografía por emisión de positrones durante un protocolo de administración de anfetaminas (agonista dopaminérgico y noradrenérgico) y registrando la liberación de DA en el núcleo estriado ventral, putamen anterior y núcleo caudado anterior y posterior con radioligando [<sup>11</sup>C] raclopride (antagonista de receptores D<sub>2</sub>), se observó que hay mayor liberación de DA en hombres comparado con mujeres, por otro lado en las mujeres se observó que la liberación de DA no cambio con las fases de ciclo menstrual (Munro et al., 2006).

En años recientes se ha observado que algunos metales como el plomo, mercurio, manganeso, pesticidas a base de organofosforados y organoclorados, así como contaminantes orgánicos, han demostrado ser disruptores endócrinos a través de bloquear, mimetizar, desplazar, o actuar sobre mecanismos de acción de las hormonas lo que interfiere con el rol natural de las hormonas (Weiss, 2012).

En cuanto a la toxicidad por metales, específicamente relacionados con As, existen pocos trabajos que tomen en cuenta las diferencias de sexo en la respuesta del organismo a la toxicidad, se sugieren diferencias de sexo en la biotransformación del As (Vahter et al., 2007).

En un estudio reciente que analizó el perfil de metabolitos en ratones silvestres y *knockout* para la enzima As3MT, no se observaron diferencias en los metabolitos en concentraciones de 10 mg As/L lo que sugiere que se requieren concentraciones mayores para poder tener un efecto consistente; sin embargo al comparar a los ratones

sin As<sub>3</sub>MT se encontraron diferencias relacionadas con el factor sexo sobre metabolitos de lípidos, amino ácidos y carbohidratos (Huang et al., 2016).

En un estudio realizado entre 2002 y 2003 en 166,934 habitantes de Bangladesh que habían consumido agua con As por lo menos durante seis meses, se encontraron 504 casos de lesiones en la piel causadas por la ingesta de As, mediante un análisis de regresión lineal multivariada se observó que los hombres tenían mayor riesgo de desarrollar lesiones en la piel en comparación con las mujeres, aunque no pudo determinarse el mecanismo o la causa (Rahman et al., 2006).

Se han observado diferencias en la tasa de metabolismo del As relacionada con el sexo, en un estudio realizado en población de Hungría, Rumania y Eslovaquia se compararon los niveles de metabolitos de As, y se encontró que los hombres tenían más As inorgánico, MMA y bajos niveles de DMA en comparación con las mujeres, lo que sugiere una mayor capacidad de metabolismo por parte de las mujeres; los factores que pueden explicar estas diferencias son polimorfismos en genes que codifican para enzimas que participan en el metabolismo del As, además se observó que los machos son más susceptibles a mutaciones en alelos que codifican para enzimas metil-transferasas en relación a las mujeres ya que ellas requieren la mutación de ambos (Lindberg et al., 2007).

Wang et al. (2013) encontraron que ratones de la cepa Kunming expuestos a trióxido de arsénico en concentraciones de 1, 2 ó 4 mg As/L tuvieron un aumento en la concentración de cobre (Cu), disminución en la concentración de hierro (Fe), selenio (Se) y cromo (Cr); al analizar los datos con el sexo como variable se observó que el Cu aumento en el cerebelo de las hembras, mientras que la concentración de Se aumentó en el cerebro y cerebelo de ratones machos, sin embargo no se observaron diferencias relacionadas con el sexo en la concentración de Fe, ni Cr; estos metales son esenciales en el funcionamiento del SN, por tanto el desequilibrio debido al As altera funciones enzimáticas, procesos oxido-reducción, metabolismo, por tanto estas diferencias podrían participar en las alteraciones relacionadas al sexo.

En un trabajo realizado en ratones C57BL/6, se observó que las hembras tenían más del doble de contenido de DA y DOPAC en el núcleo estriado en la condición control en relación con los machos, mientras que el HVA estaba en las mismas concentraciones; por otro lado, las hembras tratadas con 0.5, 5 ó 50 mg As/L de NaAsO<sub>2</sub> presentaron una disminución en los niveles de DA, DOPAC y un aumento en la relación DOPAC/DA, efecto no observado en los machos (Bardullas et al., 2009); este trabajo muestra que de manera basal hay mayor presencia de DA en las hembras y que ante la exposición a As hay una mayor actividad presináptica, lo que podría favorecer la generación de ERO.

Nuestro trabajo pretende explicar cómo se modifica la actividad motora y la actividad del sistema antioxidante/prooxidante en las vías dopaminérgicas nigroestriatal y mesolímbica dependiente del sexo ante la exposición a As utilizando diferentes concentraciones de NaAsO<sub>2</sub> en el agua de bebida.

## **Justificación**

La principal vía de intoxicación por As es a través del agua de bebida contaminada. Se ha reportado que ante la exposición a dosis bajas de As se presentan enfermedades como cáncer, hipertensión, lesiones en la piel, daños en sistema renal, alteraciones conductuales y cognitivas; sin embargo existe poca evidencia acerca del efecto que tiene el sexo sobre cambios conductuales y sobre marcadores de estrés oxidante en vías dopaminérgicas relacionadas con la actividad motora.

Conocer el efecto que el sexo puede tener sobre la toxicidad por As en cambios motores y marcadores de estrés oxidante permitirá verificar hallazgos que se han reportado en la clínica, además agregar conocimiento sobre la importancia de abordar el problema desde una perspectiva de diferencias sexuales.

El presente trabajo pretende conocer si la condición de sexo modifica la expresión de marcadores del sistema pro-oxidante/antioxidante, sobre vías dopaminérgicas relevantes en tareas motoras, como respuesta a la toxicidad por  $\text{NaAsO}_2$  en el agua de bebida en condiciones relevantes al medio ambiente en ratones expuestos durante seis meses a este metaloide.

## **Objetivo general**

- Analizar los cambios en el sistema pro-oxidante/antioxidante de los sistemas dopaminérgicos relacionados con actividad motora y la relación que guarda con el sexo después de la exposición crónica a diferentes concentraciones de  $\text{NaAsO}_2$  en el agua de bebida.

## **Objetivos particulares**

- Registrar semanalmente cambios en el peso de ratones hembra y macho de la cepa C57BL/6 expuestos a agua de bebida en condiciones control, 0.05, 0.5 ó 50 mg As/L.

- Evaluar mensualmente la actividad locomotora en ratones hembra y macho de la cepa C57BL/6 en condiciones control, 0.05, 0.5 ó 50 mg As/L en el agua de bebida.
- Cuantificar los niveles de enzimas relacionadas con el estatus pro-oxidante/antioxidante SOD-Mn, GPx1 en el estriado, núcleo accumbens y mesencéfalo de ratones hembra y macho de la cepa C57BL/6 en condiciones control, 0.05, 0.5 ó 50 mg As/L en el agua de bebida.
- Evaluar TBARS y dienos conjugados en el estriado, núcleo accumbens y mesencéfalo de ratones hembra y macho de la cepa C57BL/6 en condiciones control, 0.05, 0.5 ó 50 mg As/L en el agua de bebida.

### **Hipótesis**

- Las hembras tendrán mayores alteraciones en las pruebas de actividad locomotora y habrá efectos dependientes de las concentraciones de NaAsO<sub>2</sub>.
- Las hembras tendrán mayores alteraciones en la expresión de marcadores del estatus pro-oxidante/antioxidante y habrá efectos dependientes de las concentraciones de NaAsO<sub>2</sub>.

### **Método**

Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de Bioética del Instituto de Neurobiología y se llevaron a cabo en el Instituto de Neurobiología-UNAM bajo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación NOM-062-ZOO-1999.

### **Sujetos**

En este estudio utilizamos ratones macho y hembra de la cepa C57BL/6 de dos meses de edad, de entre 20 y 30 g de peso, nacidos y criados bajo condiciones estándar de

laboratorio; con acceso a comida y agua *ad libitum*, en condiciones de ciclo luz/oscuridad invertido

Se evaluó la actividad locomotora mensualmente durante la exposición a As. Después de seis meses de tratamiento se usó una batería de pruebas que evalúan alteraciones motoras específicas como Rotarod (coordinación motora de las extremidades), poste vertical (bradicinesia) y la barra de equilibrio (coordinación y balance); posteriormente, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y decapitados; se extrajeron ambos hemisferios y diseccionaron los dos estriados, los dos núcleos accumbens y el mesencéfalo para posteriormente procesar el tejido y medir peroxidación de lípidos mediante la técnica TBARS y dienos conjugados, finalmente se analizó la presencia de enzimas antioxidantes mediante la técnica de Western blot.

### **Preparación de soluciones con arsénico**

El agua con  $\text{NaAsO}_2$  se preparó cada tercer día a concentraciones de 0.05, 0.5 mg/L, mientras que el agua a 50 mg/L se preparó semanalmente. Las soluciones de As se prepararon a partir de una solución madre que contenía 1000 mg As/L como arsenito de sodio disuelto en agua desionizada; el pH de las soluciones se ajustó a 7 para reducir la oxidación de la solución a arsenato de sodio. Los grupos control recibieron agua desionizada con pH 7.

Cada semana, a partir del día de inicio de la intoxicación, se midió el peso corporal con una báscula digital; se obtuvo el peso promedio mensual por cada animal para realizar el análisis comparativo.

### **Protocolos conductuales evaluados durante la exposición a arsénico**

#### **Actividad locomotora espontánea**

Cada mes, a partir del día de inicio de la intoxicación, se evaluó la actividad motora de cada animal durante 25 horas para comparar el periodo luz/oscuridad. Se usó una caja transparente equipada con sensores infrarrojos horizontales y verticales (Fig. 6) (Accuscan Instruments Inc., Columbus, OH, USA). Durante la evaluación los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*.



Figura 6. Se muestra fotografía de la caja de registro para actividad locomotora espontánea.

Se registró la actividad horizontal, número de estereotipias y distancia en el centro.

**Actividad horizontal:** Número total de interrupciones en el sensor horizontal.

**Número de estereotipia:** Número de veces que ocurrió comportamiento repetitivo en el animal. Para considerar una estereotipia el animal tiene que activar un sensor o serie de sensores en la caja de registro por más de un segundo; y para considerar una estereotipia de otra es necesario que el animal deje de hacer la conducta cuando menos un segundo.

**Distancia en el centro:** La distancia que el animal recorre en el centro de la caja.

Durante el sexto mes se realizaron pruebas motoras complementarias, los animales fueron evaluados en el Rotarod, poste vertical y la barra de equilibrio.

### **Coordinación motora (Rotarod)**

Permite evaluar la habilidad para mantener el balance sobre el rodillo; evalúa la coordinación motora de las extremidades traseras y delanteras (Fig. 7). Requiere de una función del cerebelo intacta.

La prueba consiste en una fase de habituación, entrenamiento y prueba.

**Habitación:** Se coloca al animal durante 60 segundos sobre el rodillo sin movimiento, se realizaron 4 ensayos por día durante 2 días; entre cada ensayo se deja un intervalo de 20 minutos de reposo.

**Entrenamiento:** Durante esta fase se realizaron 4 ensayos por cada velocidad (6, 12, 18, 24 rpm) con duración de 60 segundos, en total se realizaron 24 ensayos; entre cada ensayo se deja un intervalo de 20 minutos de reposo.

**Prueba:** Durante este día se realiza en protocolo de aceleración, consiste en colocar al animal sobre el rodillo, el cual iniciará con una velocidad de 4 revoluciones por minuto (rpm) hasta alcanzar la velocidad máxima de 42 rpm en un tiempo de 300 segundos. Este protocolo se realiza durante cinco días.

En esta prueba se evalúa la latencia para la caída del rodillo; se considera caída cuando el animal cae del rodillo o cuando se detiene y como consecuencia gira sobre el rodillo. La prueba se realizó durante la fase de oscuridad con luz roja para permitir la visibilidad del experimentador.



Figura 7. Se muestra imagen del Rotarod en donde se realizaron los experimentos.

## Poste vertical

Esta prueba es sensible a cambios en la DA estriatal. Mide la latencia del ratón para girar en el extremo superior de un poste y descender (Fig. 8).

Características del aparato: posee un poste vertical con superficie rugosa (55 cm de altura y 8 mm de diámetro).

**Prueba:** Consiste en colocar al animal sobre un poste vertical con la cabeza mirando hacia arriba, se realizaron cuatro ensayos por cada animal durante un día con intervalo de tiempo de 3 minutos entre cada ensayo. Esta prueba no requiere de habituación o entrenamiento.

Se evaluó la latencia para descender del poste vertical. El tiempo comienza en el momento en que se deja al animal en la punta superior mirando hacia arriba y termina cuando el animal desciende y ha colocado las 4 patas sobre el suelo.

La prueba se realizó en condiciones de silencio e iluminación total.



Figura 8. Se muestra fotografía de la prueba poste vertical, se aprecia un ejemplo del ratón descendiendo por el poste.

## **Barra de equilibrio**

Evalúa alteraciones motoras causadas por daño en la corteza sensorio-motora, se requiere una coordinación motora fina, así como mantener el balance (Fig. 9). Es sensible a cambios dopaminérgicos en el estriado y alteraciones en corteza motora.

La prueba consiste en una fase de entrenamiento y prueba. Las características del aparato son las siguientes: Tiene una barra de madera con superficie plana (7 mm de grosor, 120 cm de largo, 5 cm de ancho) colocada a una altura de 50 cm del piso; en el extremo se coloca una caja negra que funge como plataforma de escape.

La prueba se realizó en condiciones de silencio e iluminación total.

**Entrenamiento:** La fase de entrenamiento dura dos días y consiste en colocar al animal sobre la barra horizontal en distancias de 10, 40, 80 y 120 cm alejado de la caja de escape. En cada día se realiza un ensayo por distancia, hay un intervalo de tiempo de 2 minutos entre ensayos.

**Prueba:** Durante el tercer día, se realiza la prueba, la cual consiste en colocar al animal a 10 cm de la caja de escape, tiene la finalidad de que el animal recuerde la tarea. Posteriormente se coloca al animal a 120 cm de la caja de escape, durante esta fase se evalúa la latencia para llegar a la caja de escape y el número de errores que el animal comete.

La latencia se considera como el tiempo que le toma al roedor desde su colocación en la barra horizontal hasta que consigue entrar a la caja de escape con sus cuatro patas.

Un error se considera cuando el animal durante su traslado a la caja de escape pierde la posición sobre la barra de cualquiera de las patas traseras o cuando al dar el paso no consigue colocar la pata sobre la barra, se considera un error por cada pata que pierda la posición.



Figura 9. Se muestra fotografía de ratón ejecutando prueba de barra de equilibrio.

### **Determinación de peroxidación de lípidos**

#### **Determinación de dienos conjugados**

La formación de dienos conjugados puede ser cuantificada a través de espectrofotometría a una longitud de onda de 233 nm. Las muestras de estriado (STR), núcleo accumbens (NAcc) y mesencéfalo (Mes) se homogenizaron con buffer de fosfatos (PBS, pH= 7.4) con los siguientes volúmenes, STR (200  $\mu$ L), NAcc (250  $\mu$ L) y Mes (600  $\mu$ L). La cantidad de proteína se cuantificó mediante el método de Lowry. Las muestras se congelaron a -70 °C.

La detección de dienos conjugados se determinó de acuerdo al protocolo de referencia de Klaassen y Plaa (1969). A continuación se detallan los pasos llevados a cabo.

Se descongeló la muestra. Se rotularon los tubos de ensayo y se colocaron en una gradilla. Posteriormente se preparó el reactivo de Folch que consiste en dos partes de cloroformo y una parte de metanol (2:1). En cada tubo de ensayo se colocó 1 mL de agua desionizada, 50  $\mu$ L de la muestra procesada, 4 mL del reactivo de Folch. Esto se

hizo para cada muestra. Posteriormente se agitó la muestra en un vortex durante 15 s y se llevó a centrifugar a 3000 rpm durante 8 min. Se retiró de la centrifuga y se formaron dos fases. Se tomó 1 mL de la fase inferior y se pasó a un vial, en donde se dejó que se evaporara hasta sequedad. Una vez secos los viales, se agregó 1 mL de ciclohexano y se agitó en vortex durante 20 s; como blanco se colocó sólo ciclohexano en una celdilla de cuarzo y se leyó en el espectrofotómetro a 233 nm. Finalmente, se leyó cada muestra a 233 nm y se registró el resultado.

### **Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)**

El proceso se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico con MDA y otros aldehídos reactivos. Una molécula de aldehído reacciona con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico dando un cromóforo con absorbancia a 532 nm. Se realizaron dos ensayos, el primero llamado basal en donde sólo se llevan a cabo reacciones con el ácido tiobarbitúrico y otro llamado reto en donde se agregó  $\text{Fe}^{2+}$  el cual reacciona con los productos hidroperóxido (LOOH) de la fase de la propagación de peroxidación de lípidos, dando como resultado un aumento en los niveles de TBARs, este ensayo proporciona información acerca del daño provocado por estrés oxidante.

Para la detección de TBARS se tomó el protocolo de referencia de Luna-Moreno et al. (2007). A continuación se describen los pasos llevados a cabo.

En los tubos del *ensayo basal* se colocó 200  $\mu\text{L}$  de buffer TRIS 0.15 M; mientras que los tubos del *ensayo reto* se depositaron 180  $\mu\text{L}$  de buffer TRIS 0.15 M + 20  $\mu\text{L}$   $\text{FeSO}_4$ . En seguida se colocaron 60  $\mu\text{L}$  de muestra en cada tubo y se incubaron en agua a 37°C durante 30 minutos. Se retiraron los tubos de ensayo del agua y se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de ácido acético al 20%; 300  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico al 0.8% y 100  $\mu\text{L}$  de agua desionizada; posteriormente se agitaron en el vortex y se colocaron los tubos de ensayo con la mezcla en agua previamente calentada a 92°C durante 45 minutos, después, se retiraron los tubos del agua y se enfriaron. Posteriormente se agregó cloruro de potasio (KCl 0.5 M) a los tubos y se agitaron en el vortex. Se añadió 1 mL de la solución piridina/butanol (1:15) y se agitó en vortex. Después se tomaron 700  $\mu\text{L}$  de la fase superior (cromóforo) y se llevan a tubos eppendorff para centrifugar a 7000 rpm durante

5 minutos; en seguida, se toman 600  $\mu$ L de la mezcla y se deposita en la celdilla de cuarzo. Finalmente, se lee en espectrofotómetro a 532 nm.

### **Detección de enzimas antioxidantes (Western blot)**

Esta técnica permite la detección, separación y cuantificación de proteínas específicas por medio de anticuerpos. Se puede dividir en tres momentos, la electroforesis como primer paso permite que las proteínas presentes en una muestra dada se desplacen dentro de una gel de poliacrilamida separándolas de acuerdo con su peso molecular; en un segundo momento se realiza la transferencia en donde las proteínas separadas se transfieren a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y finalmente se deja incubando la membrana con anticuerpos primarios y secundarios específicos para las proteínas de interés.

Para la detección de las enzimas antioxidantes SOD2 y GPx1 se realizaron ensayos con el fin de estandarizar la técnica para la correcta determinación de las enzimas, a continuación se describe la metodología empleada.

Las muestras empleadas fueron homogeneizadas en un buffer que contenía 50 mM de TRIS-HCl; 50 mM de NaCl; 5 mM de EDTA; 1 mM de EGTA; 1% de TRITON X-100; 0.1% de SDS; 10 % de glicerol y 0.1% de coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas; posteriormente se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry.

Con las muestras homogeneizadas se realizaron experimentos para determinar las condiciones de agente reductor, temperatura, concentración de proteínas y tiempos de incubación adecuados para cada región del cerebro y cada sexo con la finalidad de obtener una señal que pudiese determinarse a través del análisis de quimioluminiscencia.

Electroforesis: Una vez que las condiciones fueron establecidas; las muestras en concentraciones para estriado (8  $\mu$ g), núcleo accumbens (8  $\mu$ g) fueron cargadas en gel de acrilamida al 30%, y se corrieron con buffer de electroforesis a 100 volts durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Transferencia: Los geles fueron puestos en un sándwich con papel filtro y membrana PVDF (previamente equilibrada con metanol) en buffer de transferencia a 15 volts durante 74 minutos.

Inmunodetección: Las membranas fueron puestas en solución bloqueadora *blotto* al 5% durante 120 minutos; se realizaron tres lavados con TBS-*tween* 1X de 10 minutos cada uno. Posteriormente se dejó incubando la membrana con el anticuerpo primario durante 18 horas, se retiró el anticuerpo y se realizaron tres lavados con TBS-*tween* 1X de 10 minutos cada uno; en seguida, se colocó el anticuerpo secundario durante 2 horas, se retiró el anticuerpo y se realizaron tres lavados con TBS-*tween* 1X de 10 minutos cada uno. Finalmente, en el cuarto de revelado se agregó solución químico luminiscente (ECL) y se incubó durante 5 minutos, la membrana se llevó a un caja de revelado en donde se colocaba una placa fotográfica hasta obtener la señal.

Las imágenes se analizaron con el software libre *Image J* para análisis por densitometría de las bandas obtenidas y digitalizadas en escáner convencional.

## Resultados

Al analizar el peso de los animales no se observaron diferencias entre los tratamientos ni en machos, ni en hembras en ningún mes (Tabla 3). Se puede apreciar que los animales de cada grupo fueron ganando peso como resultado de su desarrollo cronológico.

	<i>Control</i>		<i>0.05 mg As/L</i>		<i>0.5 mg As/L</i>		<i>50 mg As/L</i>	
	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>
<b>1er mes</b>	28.09 ± 0.48	23.15 ± 0.39	28.65 ± 0.72	23.49 ± 0.45	27.86 ± 0.60	23.14 ± 0.40	29.11 ± 0.96	22.74 ± 0.38
<b>2do mes</b>	28.67 ± 0.68	23.84 ± 0.42	29.83 ± 0.44	24.05 ± 0.34	30.12 ± 0.61	23.98 ± 0.33	29.46 ± 1.05	23.66 ± 0.38
<b>3er mes</b>	30.0 ± 0.62	24.02 ± 0.36	31.04 ± 0.38	24.37 ± 0.43	31.18 ± 0.66	24.58 ± 0.46	30.54 ± 1.29	24.26 ± 0.28
<b>4to mes</b>	30.05 ± 0.54	24.57 ± 0.43	31.79 ± 0.48	24.99 ± 0.46	30.87 ± 0.56	25.25 ± 0.47	31.55 ± 1.14	25.21 ± 0.38
<b>5to mes</b>	30.15 ± 0.56	24.88 ± 0.41	32.06 ± 0.46	25.02 ± 0.48	31.74 ± 0.53	25.99 ± 0.46	31.82 ± 1.05	25.67 ± 0.31
<b>6to mes</b>	30.49 ± 0.51	24.66 ± 0.57	31.98 ± 0.43	25.09 ± 0.49	31.38 ± 0.39	25.97 ± 0.46	31.32 ± 1.12	25.50 ± 0.33
<b>7mo mes</b>	30.87 ± 0.57	24.90 ± 0.63	32.37 ± 0.42	25.29 ± 0.57	32.84 ± 0.41	26.29 ± 0.49	31.45 ± 0.94	25.98 ± 0.29
<b>8vo mes</b>	30.82 ± 0.79	24.72 ± 0.74	31.53 ± 0.36	24.62 ± 0.56	31.76 ± 0.44	26.33 ± 0.58	30.48 ± 0.68	25.62 ± 0.35
<b>9no mes</b>	31.27 ± 0.60	25.05 ± 0.76	32.27 ± 0.41	25.05 ± 0.60	32.30 ± 0.49	26.41 ± 0.54	31.30 ± 0.92	26.24 ± 0.36

Tabla 3. Relación de peso de ratones expuestos durante los meses de tratamiento con NaAsO<sub>2</sub>. Las columnas en negro son valores para machos, mientras que las columnas en azul pertenecen a las hembras. No se presentaron diferencias entre los tratamientos ni en machos, ni en hembras.

## Actividad locomotora espontánea

Se analizó la conducta motora a los 2, 4 y 6 meses de exposición a As. Durante el 2do mes no se encontraron efectos ni en hembras, ni en machos expuestos a As sobre la conducta motora espontánea medida durante todo el ciclo luz/oscuridad (figura 10), sin embargo al analizar la conducta en cada fase del ciclo se observó que durante la fase de oscuridad los machos expuestos a 0.05 mg As/L tuvieron una menor actividad horizontal comparada con el grupo control ( $F_{(3,148)} = 3.887$ ,  $p < 0.05$ ), mismo efecto se encontró en el número de estereotipias ( $f_{(3,148)} = 3.893$ ,  $p < 0.05$ ), en la distancia en el centro no hubo cambios; durante la fase de luz no hubo cambios en ninguna variable en los machos. Las hembras no mostraron ningún cambio en ninguna variable, en ninguna fase.

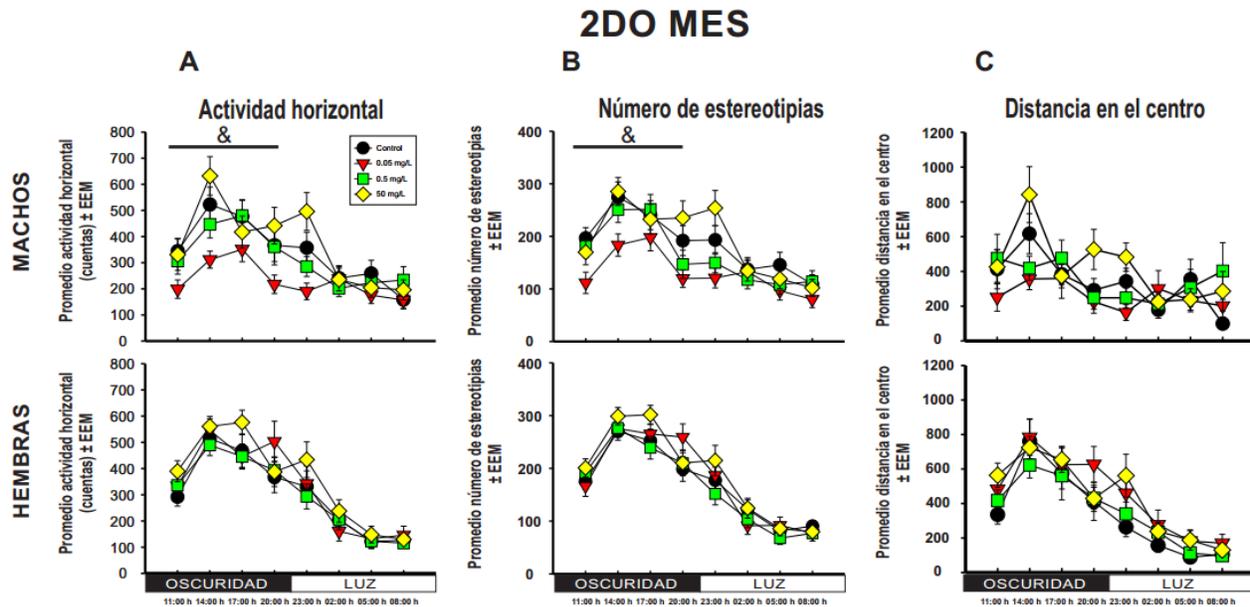


Figura 10. Evaluación de actividad locomotora durante 2do mes de exposición a As, cada bloque representa 3 horas. En el panel superior se muestran los machos y en el panel inferior se muestran las hembras. A) Actividad horizontal, B) Número de estereotipias y C) Distancia en el centro. & Diferente el grupo 0.05 mg As/L contra control durante oscuridad  $p < 0.05$ .

Durante el cuarto mes se observaron efectos de tratamiento, hubo un aumento en la actividad horizontal ( $F_{(3,41)} = 3.018$ ,  $p < 0.05$ ) entre las hembras expuestas a 50 mg As/L y el grupo control; un aumento en el número de estereotipias ( $F_{(3,41)} = 4.877$ ,  $p < 0.05$ )

entre las hembras expuestas a 50 mg As/L comparado con el grupo control. No se observaron diferencias en la distancia en el centro (figura 11). Al analizar la conducta de las hembras en cada fase se observó que durante la fase de oscuridad las hembras expuestas a 50 mg As/L recorrieron mayor distancia en el centro comparado con el grupo control ( $F_{(3,176)} = 3.459$ ,  $P < 0.05$ ), en las otras variables no se observaron cambios dependientes de la fase.

No hubo diferencias en ninguna variable en los machos tratados con As. Al analizar la conducta entre fases del ciclo luz/oscuridad no se observaron diferencias en los machos en ninguna variable.

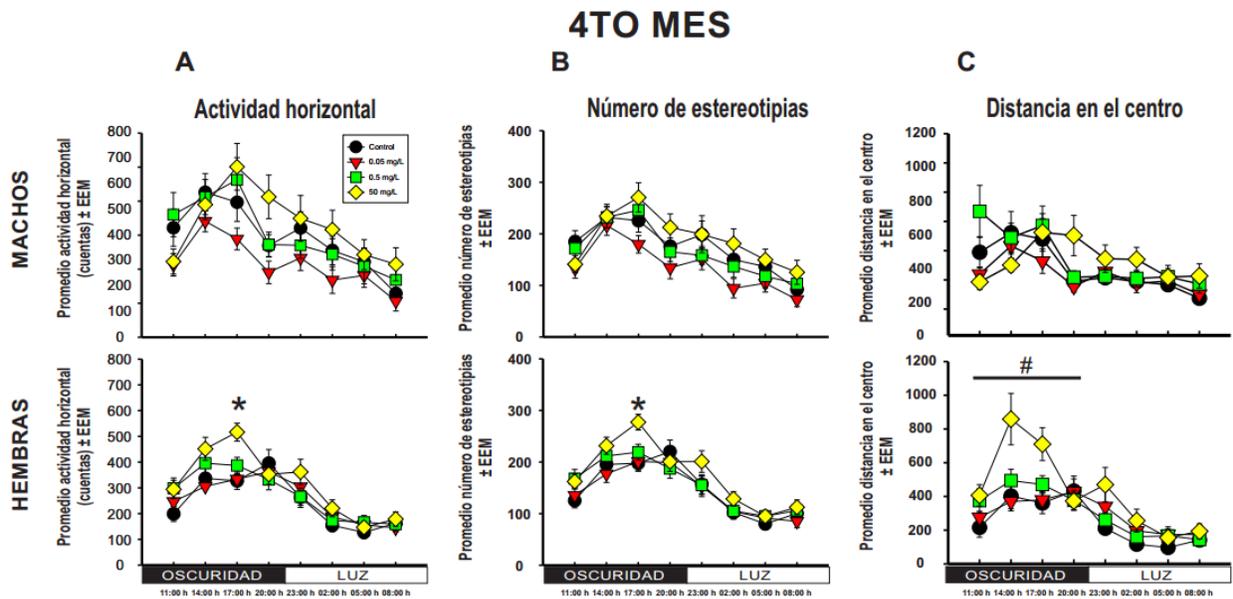


Figura 11. Evaluación de actividad locomotora durante 4to mes de exposición a As, cada bloque representa 3 horas. En el panel superior se muestran los machos y en el panel inferior se muestran las hembras. A) Actividad horizontal, B) Número de estereotipias y C) Distancia en el centro. \* Diferente el grupo 50 mg As/L contra control; # grupo 50 mg As/L durante oscuridad  $p < 0.05$ .

Durante el sexto mes, se observó en las hembras efecto de tratamiento sobre la actividad horizontal ( $F_{(3,41)} = 4.348$ ,  $p < 0.05$ ), hubo un aumento en el grupo expuesto a 50 mg As/L respecto del grupo control; en el número de estereotipias el grupo expuesto a 50 mg As/L tuvo un aumento respecto del control ( $F_{(3,41)} = 3.526$ ,  $p < 0.05$ ); en la distancia en el centro, el grupo expuesto a 50 mg As/L tuvo un aumento ( $F_{(3,41)} = 2.924$ ,  $p < 0.05$ ) respecto del control (Figura 12). Al evaluar la conducta en cada fase se observó que las hembras expuestas a 50 mg As/L tuvieron mayor actividad horizontal

durante la fase de oscuridad y luz confirmando el efecto en toda la fase, mientras que el número de estereotipias aumentó en la fase de oscuridad.

Los machos expuestos al sexto mes de tratamiento no mostraron diferencias en ninguna de las variables analizadas durante la actividad motora, aunque se aprecia que los machos expuestos a 0.05 mg As/L pasaron menos tiempo en el centro sin ser esto significativo. Al comparar a los grupos en cada fase no se observaron diferencias en ninguna variable, en ninguna fase.

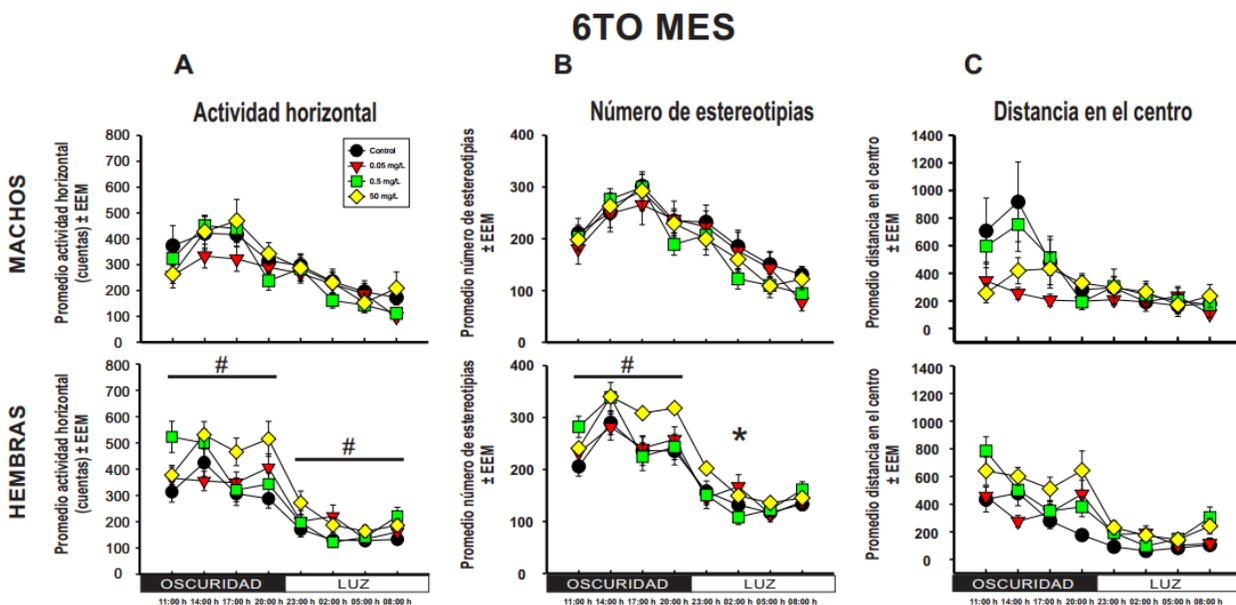


Figura 12. Evaluación de actividad locomotora durante 6to mes de exposición a As, cada bloque representa 3 horas. En el panel superior se muestran los machos y en el panel inferior se muestran las hembras. A) Actividad horizontal, B) Número de estereotipias y C) Distancia en el centro. Diferente dentro del bloque, \* grupo 50 mg As/L contra control; # grupo 50 mg As/L durante fase oscuridad y luz respectivamente  $p < 0.05$ .

## Coordinación motora (Rotarod)

Durante el sexto mes, después de evaluar la actividad locomotora espontánea se realizó la tarea de coordinación motora. No se encontraron diferencias en la latencia para caída en ningún grupo, ni en machos ni en hembras (Figura 13).

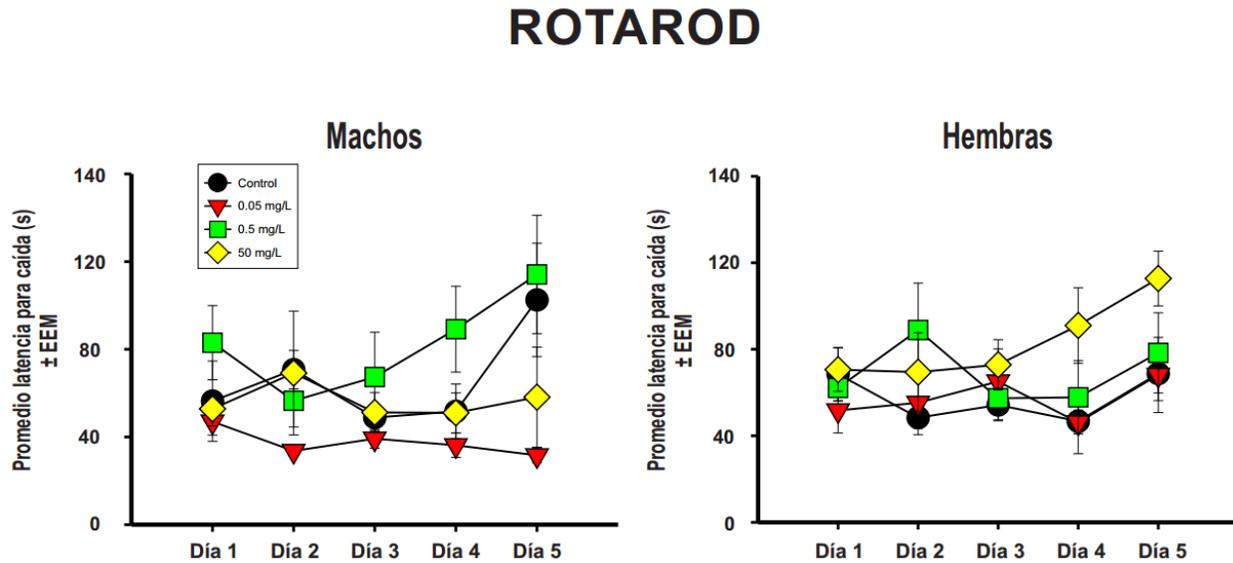


Figura 13. Latencia para caída. No se observan diferencias en ninguna condición de exposición a As ni en machos ni en hembras a lo largo de los cinco días que duró la prueba.

## Poste vertical

Después de evaluar el Rotarod se realizó la prueba de poste vertical. Al comparar la latencia para descender del poste vertical no se observaron diferencias en ningún grupo expuesto a As ni en machos ni en hembras (Figura 14).

## POSTE VERTICAL

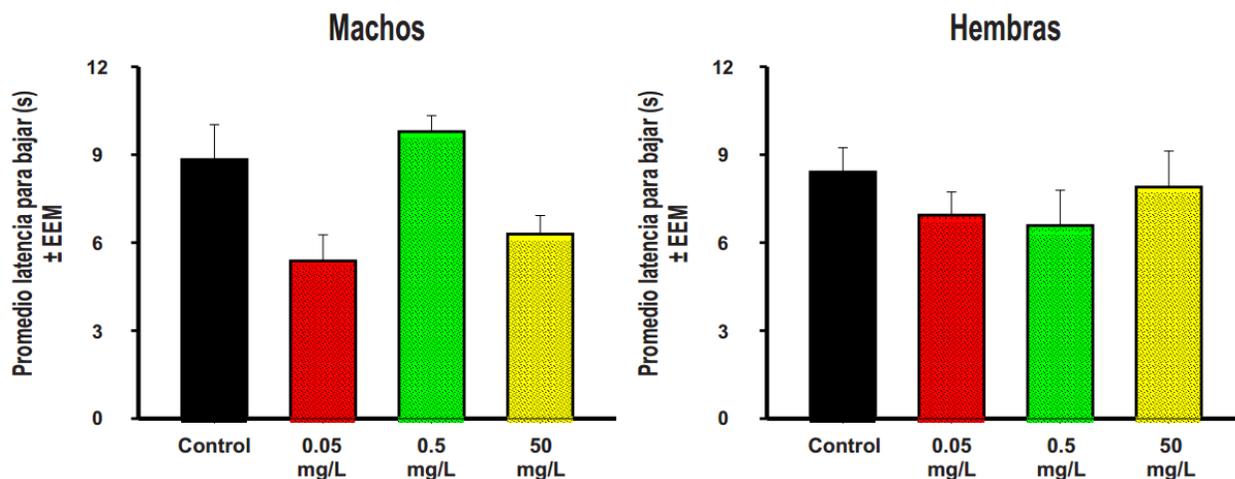


Figura 14. Latencia para bajar del poste vertical. No se observan diferencias en ningún grupo expuesto a As, ni en machos ni en hembras.

### Barra de equilibrio

Después de evaluar el poste vertical se realizó la prueba de barra de equilibrio. Se observó que los machos expuestos a la concentración de 0.05 mg As/L tuvieron más errores en comparación con el grupo control ( $F_{(3,19)} = 4.324$ ,  $p < 0.05$ ); por otro lado ningún grupo de hembras presentó diferencias en el número de errores (Figura 15). En esta misma prueba se observó efecto dependiente de sexo ( $F_{(7,1)} = 13.562$ ,  $p < 0.05$ ), los machos control tuvieron más errores comparado con las hembras control, mismo efecto se encontró en las concentraciones de 0.05 mg As/L y 0.5 mg As/L; no se observó efecto en los grupos de 50 mg As/L.

## BARRA DE EQUILIBRIO

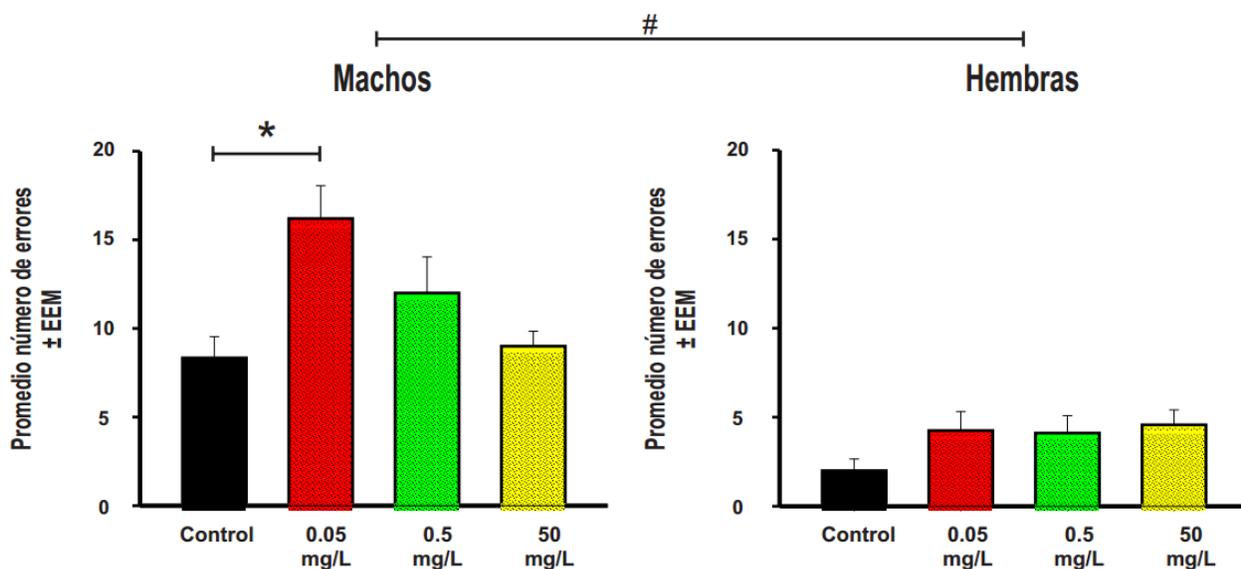


Figura 15. Número de errores. Se observa que los machos expuestos a 0.05 mg/L de As tuvieron más errores al desplazarse por la barra de equilibrio en comparación con los machos control; en las hembras no se observó ningún efecto. Diferente \* grupo 0.05 mg As/L contra control; # diferencias entre la condición sexo  $p < 0.05$ .

Al finalizar las pruebas motoras los animales fueron sacrificados y posteriormente se cuantificó la presencia de dienos conjugados, TBARS y enzimas antioxidantes mediante Western blot.

### Peroxidación de lípidos

Al medir dienos conjugados, encontramos que los ratones macho expuestos a 0.5 y 50 mg As/L mostraron un aumento de dienos conjugados en el NAcc en comparación del grupo control ( $F_{(3,28)} = 4.821$ ,  $p < 0.05$ ); al comparar el mesencéfalo, se observó que los animales expuestos a 0.5 mg As/L mostraron un aumento en comparación con el grupo control ( $F_{(3,28)} = 7.668$ ,  $p < 0.05$ ). Ahora bien, cuando comparamos a las hembras, se observó un aumento en NAcc en los ratones expuestos a 0.05 ó 50 mg As/L en comparación con el grupo control ( $F_{(3,28)} = 4.885$ ,  $p < 0.05$ ). No se observaron cambios, ni en el estriado o el mesencéfalo (Figura 16).

De manera interesante al analizar el sexo como factor se observó que las hembras tienen menos dienos conjugados en el estriado comparado con los machos ( $F_{(7,1)} =$

19.79,  $p < 0.05$ ); por el contrario, en el mesencéfalo se observó un aumento de dienos conjugados en las hembras comparado con los machos ( $F_{(7,1)} = 2.52$ ,  $p < 0.05$ ).

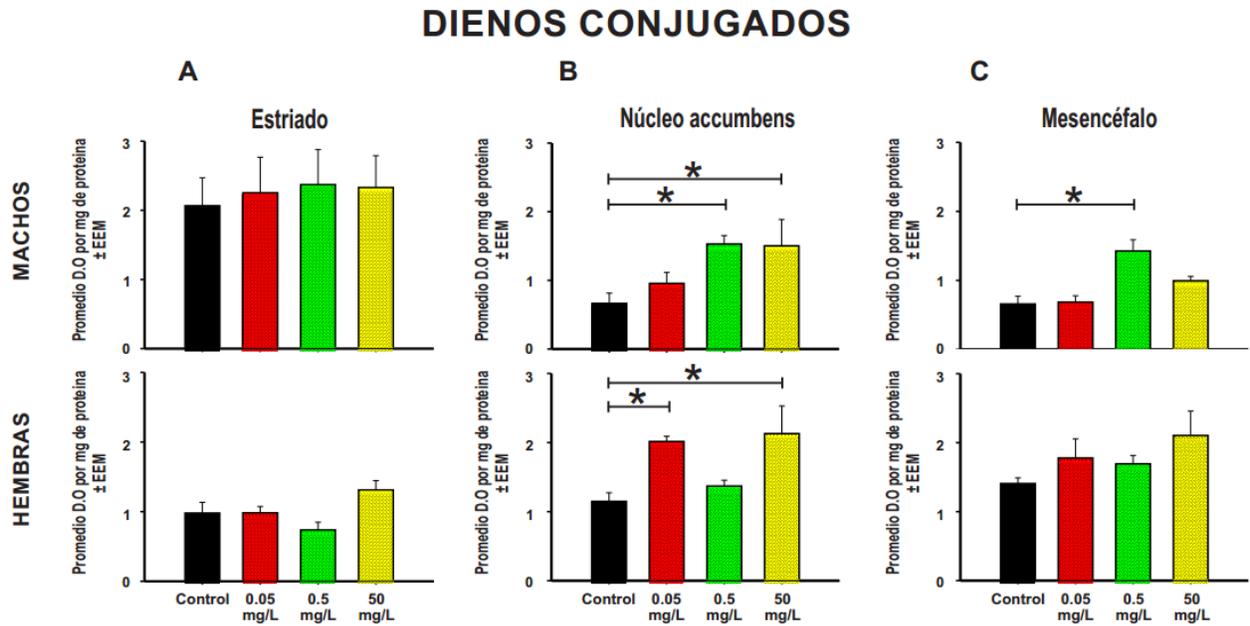


Figura 16. Medición de dienos conjugados., A) estriado, B) núcleo accumbens y C) mesencéfalo. En el panel superior se muestran los machos y en el panel inferior se muestran las hembras. \* Diferente en comparación con el grupo control,  $p < 0.05$ .

Cuando comparamos TBARS en la condición basal y reto con hierro, no se observaron cambios ni en machos, ni en hembras en ninguna de las condiciones experimentales. Sin embargo, fue de llamar la atención que TBARS en la condición basal e hierro fueron menores en el mesencéfalo tanto de machos como de hembras (Figura 17).

## TBARS BASAL/HIERRO

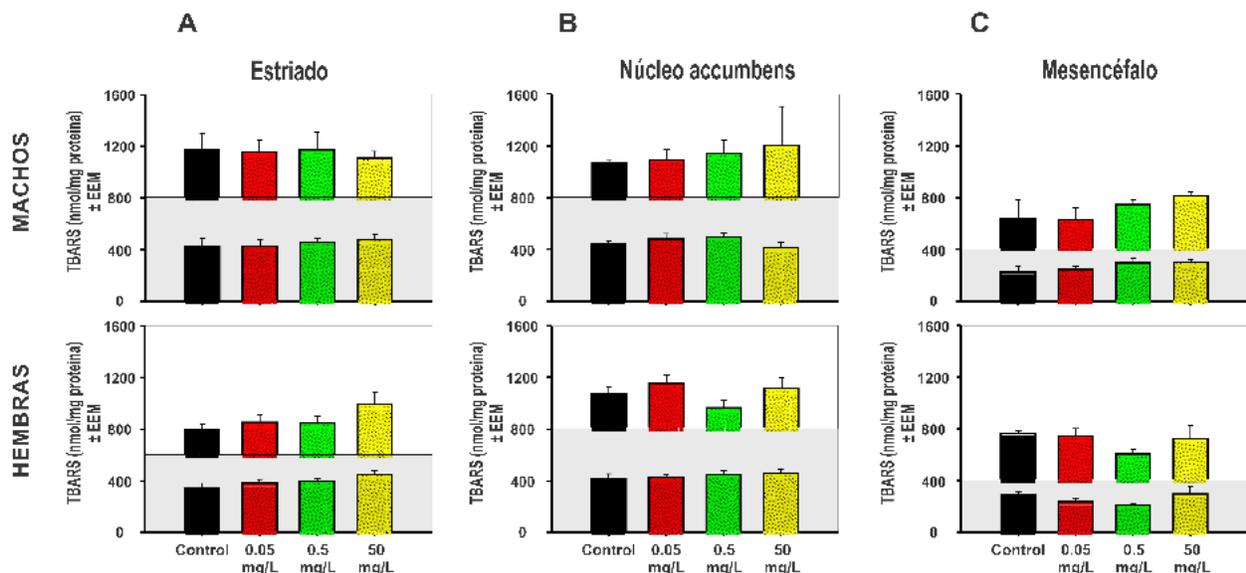


Figura 17. Evaluación de TBARS, se observa en el área sombreada la condición basal, mientras que el área no sombreada contiene la condición reto con hierro. En el panel superior se muestran los machos y en el panel inferior se muestran las hembras. A) Estriado, B) Núcleo accumbens y C) Mesencéfalo.

### Determinación de enzimas antioxidantes

Se determinó la presencia de las enzimas antioxidantes SOD2 y Gpx1 a través de Western blot, se realizaron cuatro repeticiones de cada muestra que consistía en una mezcla de cuatro tejidos del mismo grupo para cada ensayo. En la figura 18 se observan los geles que se usaron para analizar los cambios en cada estructura y en cada concentración para hembras y machos. Se encontró que no se modificó la presencia de la enzima SOD2 en ningún grupo experimental o estructura analizada, ni en machos, ni en hembras, por el contrario la enzima Gpx1 disminuyó en el estriado de ratones macho expuestos a concentraciones de 0.5 mg As/L (Kruskal-Wallis,  $X^2(3, N=16) = 8.978, p < 0.05$ ), se puede observar que las hembras expuestas a 0.5 mg As/L también mostraron una tendencia a disminuir la Gpx1 (Kruskal-Wallis,  $X^2(3, N=15) = 7.62 p = 0.054$ ), finalmente no se observaron diferencias en el núcleo accumbens o mesencéfalo, ni en machos ni en hembras (Figura 19).

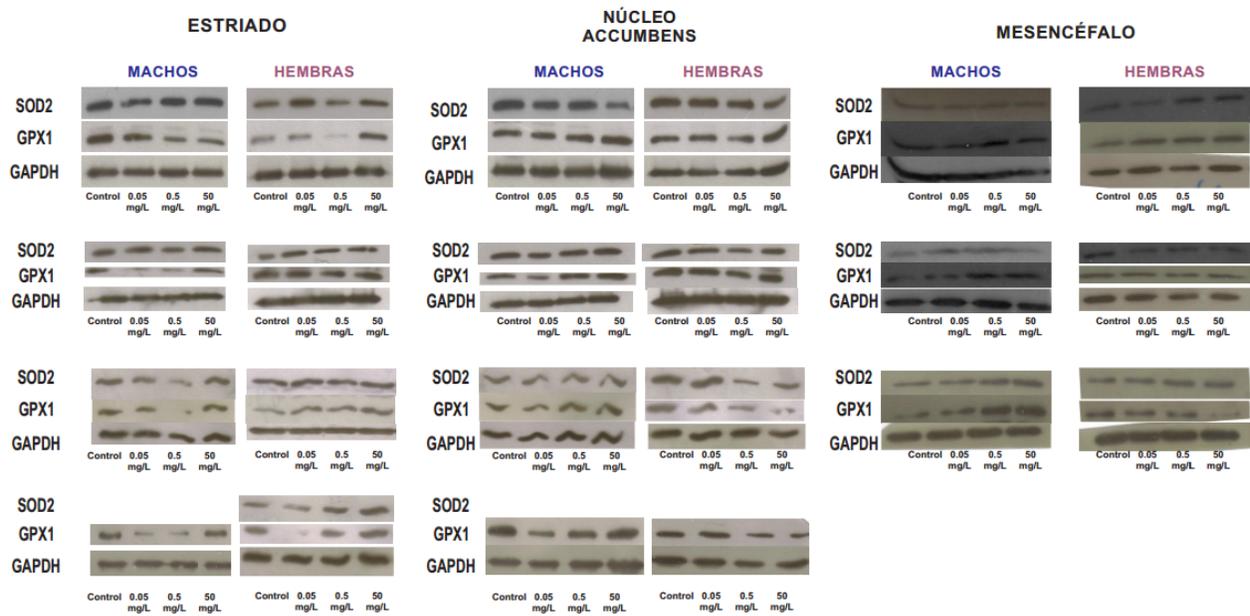


Figura 18. Imágenes representativas de geles de poliacrilamida para la determinación de la enzima superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) y glutatión peroxidasa (GPx1) para machos y hembras en el Estriado, Núcleo accumbens y Mesencéfalo. Cada carril representa una mezcla de 4 tejidos en cada condición.

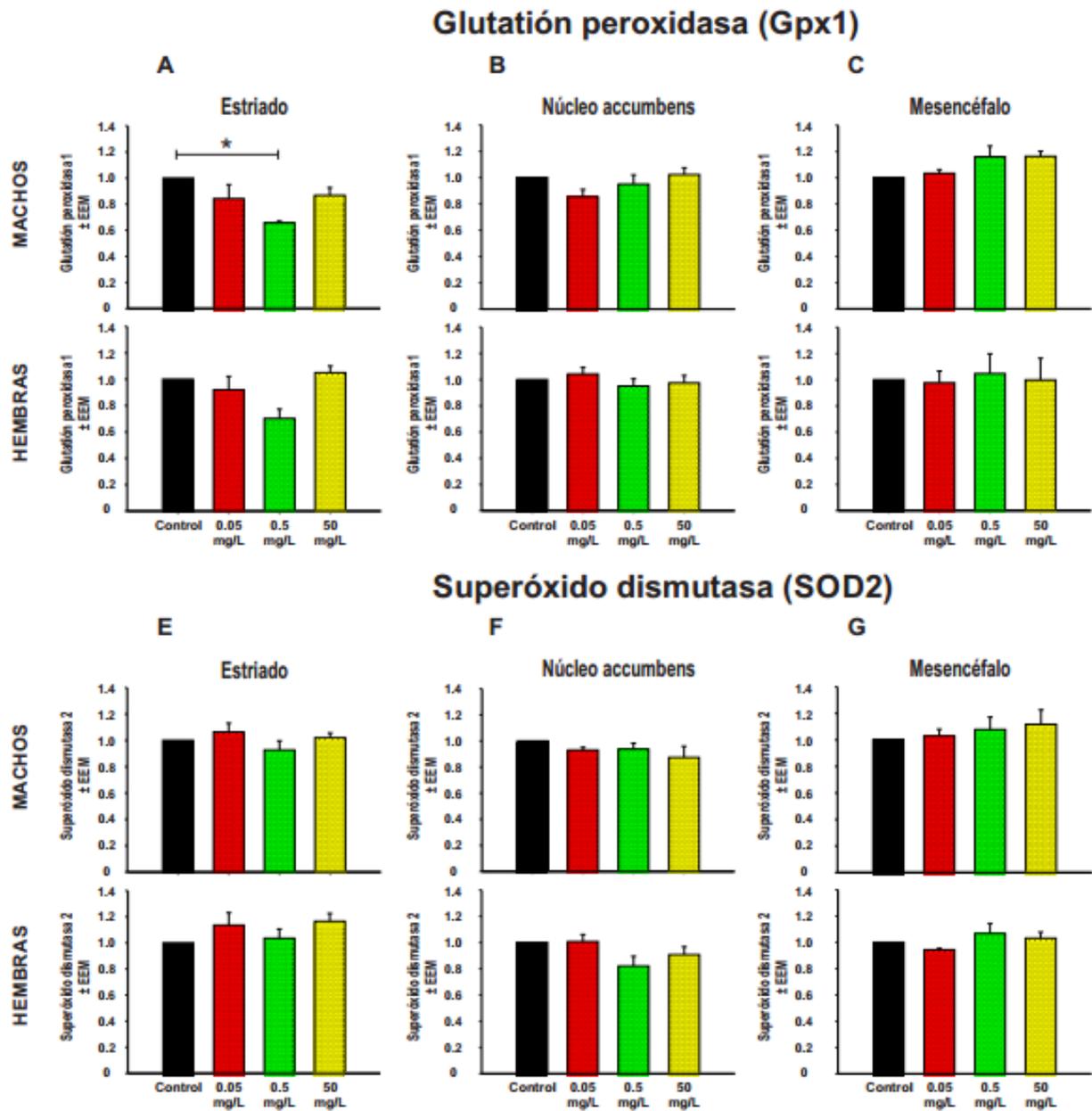


Figura 19. Análisis por densitometría del Western Blot en muestras de Estradiol, Núcleo accumbens y Mesencéfalo de machos y hembras. Se muestra el cociente Gpx1/GAPDH y SO2/GAPDH. Cada barra representa una mezcla de 4 tejidos en cada condición. \* Diferente en comparación con el grupo control,  $p < 0.05$ .

## Discusión

Los resultados muestran que la exposición crónica a diferentes concentraciones de As provoca alteraciones en la actividad locomotora, peroxidación de lípidos, presencia de enzimas antioxidantes, y que estos cambios son dependientes del sexo y de la concentración de As.

En general observamos que los machos no presentaron cambios en la actividad motora espontánea, excepto durante el segundo mes de exposición en donde los animales expuestos a 0.05 mg As/L mostraron menor actividad motora durante la fase de oscuridad, este efecto aunque no significativo en los siguientes meses se sigue observando.

Durante el cuarto mes de exposición a As las hembras expuestas a 50 mg As/L mostraron mayor actividad horizontal y estereotipias comparado con los grupos control, y este efecto fue evidente durante la fase de oscuridad; en el sexto mes las hembras expuestas a 50 mg As/L continuaron con el aumento en la actividad motora en comparación con el grupo control, siendo más evidente en la fase de oscuridad.

La conducta motora en los roedores es dependiente del ciclo luz/oscuridad por tanto el análisis en cada fase del ciclo nos permite distinguir con mayor precisión si hay alguna alteración dentro del ciclo, está documentado que los roedores se mueven más durante la fase de oscuridad, nuestros resultados son coherentes con este hecho, así mismo se observa que el patrón de actividad disminuye durante la fase de luz lo que sugiere que no hay alteración en el patrón de actividad dependiente del ritmo circadiano, aunque se puede apreciar que hay horas en las que es más evidente la hiperactividad motora, estos resultados son similares a lo reportado previamente (Bardullas et al., 2009).

La actividad motora espontánea brinda información general del estado fisiológico y neurológico del sujeto (Thomas, 2011). En este sentido este resultado puede ser evidencia de un daño o alteración más robusta en las hembras; por otro lado en experimentos donde se busca diferenciar entre conducta de exploración y actividad motora espontánea se ha observado que los cambios en la actividad motora se relacionan con alteraciones en el sistema dopaminérgico (File, 1984); en experimentos

previos del laboratorio se ha observado hiperactividad motora en las hembras expuestas a As durante cuatro meses, así como disminución de DA en concentraciones de 0.5, 5.0 y 50 mg As/L (Bardullas et al., 2009); en ratones expuestos a As en dosis de 3 mg/kg vía oral se ha observado hiperactividad motora, mientras que en dosis de 10 mg/kg disminuye, en este mismo trabajo se sugiere que el As estimula el metabolismo de la DA (Itoh et al., 1990); en ratas expuestas a As por 12 meses se ha observado disminución de actividad motora y aumento de DA en la concentración de 50 mg As/L a través del agua de bebida (Rodríguez et al., 2010); en nuestro experimento esta podría ser una explicación para la hiperactividad de los ratones hembra, mientras que en los machos la transmisión dopaminérgica parecería estar estable.

En este mismo sentido el aumento en el número de estereotipias puede ser resultado de alteraciones en el circuito cortical-estriatal-tálamo-cortical, en donde se ha sugerido que las estereotipias tienen un correlato biológico (Crittenden, 2014).

Durante el sexto mes de tratamiento con As y al evaluar la conducta motora en el Rotarod y el poste vertical no observamos diferencias en ningún grupo expuesto a As ni en machos, ni en hembras, estos resultados sugieren que la función de cerebelo podría no estar alterada y que no hay una alteración clara en el sistema estriatal medido con el poste vertical. En un trabajo en donde se utilizaron ratones expuestos a As durante la gestación y fueron evaluados en el día posnatal 60 no se encontraron alteraciones en el Rotarod, aunque sí encontraron alteraciones motoras en la marcha (Markowski et al., 2012).

En la prueba de la barra de equilibrio se observó que los machos expuestos a As en la concentración de 0.05 mg As/L tuvieron más errores en comparación con el grupo control, la conducta se caracterizaba por mala coordinación en las patas traseras, frecuentemente se deslizaba su pata izquierda o derecha fuera de la barra, en ocasiones al momento de tratar de corregir el paso no lograban subir la pata a la barra y la arrastraban, este resultado llama nuestra atención porque sugiere que aunque no hay alteraciones gruesas en la actividad motora en machos medida con la actividad locomotora espontánea, puede haber alteraciones motoras finas; en humanos residentes en Japón expuestos a concentraciones de hasta 180 mg As/L en el agua por

un periodo entre 8 y 37 años se han observado sólo ligeras alteraciones motoras, sin daño en el sistema cerebelar, sin embargo la conducción nerviosa sensorial medida a través de potenciales evocados sí está alterada (Mochizuki et al., 2016).

La barra de equilibrio es una prueba motora sensible a alteraciones en la corteza sensorio-motora (Fujimoto et al., 2004), sin embargo también puede implicar alteraciones periféricas, en humanos expuestos a As se han observado reflejos anormales del tendón peroneo, pobre función sensorial en la prueba vibro táctil cutánea y un aumento en la latencia de respuesta del nervio ulnar (Gerr, 2000), por otro lado en trabajadores expuestos a As se observó la presencia de mioespasmos, dolor en las extremidades bajas y parestesia, estos síntomas estaban relacionados con la duración de exposición al As (Sinczuk-Walczak, 2014). En ratones intoxicados durante la gestación también se han observado alteraciones en la fuerza de agarre (Markowski et al., 2012).

Los resultados de la actividad motora sugieren que las alteraciones motoras pueden variar dependiendo del sexo, en nuestro trabajo observamos que las hembras expuestas a As son hiperactivas, mientras que los machos tienen alteraciones más finas en la conducta motora, lo que podría sugerir diferentes blancos de toxicidad tanto en machos como en hembras.

La presencia de dienos conjugados es un indicador del estado de oxidación del sistema *in vivo*, es decir al momento del sacrificio de los animales; además es el inicio de la cadena de eventos de peroxidación de lípidos. Los cambios en dienos conjugados observados en el NAcc y mesencéfalo son indicadores de estrés oxidante, sin embargo los niveles de TBARS, indicadores del final de la cadena de lipoperoxidación, no se modificaron; estos resultados pueden explicarse debido al metabolismo del As, se sabe que los principales órganos que se encargan de metabolizar y eliminar el As son el hígado y el riñón, además de la sangre, de tal manera que el As que llega al cerebro es menor (Jain, 2015), y aunque el cerebro tiene la capacidad de metilar el As (Rodríguez et al., 2005) y como consecuencia generar metabolitos altamente reactivos (Watanabe y Hirano, 2013), es muy probable que el sistema antioxidante sea capaz de mantener el estado redox ante la presencia de As, principalmente la vitamina E que es lipofílica

puede estar frenando la propagación de los eventos de lipoperoxidación; en ratas Wistar macho expuestas a 2 y 10 mg/kg de As a través de sonda intragástrica, se observó que la administración de alfa-tocoferol no disminuyó la concentración de As y previno el aumento de TBARS (García-Chávez et al., 2006).

Por otro lado, se ha observado en población humana que el sexo es uno de los mayores factores que influyen en el metabolismo debido a polimorfismos en genes que codifican para enzimas que participan en el proceso de metilación como la AS3MT, y metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) que participa como agente limitante del ciclo del grupo metilo, además que hay mayor porcentaje de MMA en hombres en comparación de las mujeres indicando una tasa de metilación más baja y mayor presencia de As (Linberg, 2007).

Cuando se evaluó la presencia de enzimas antioxidantes sólo se observó una disminución en GPx en el estriado de machos, mientras que en NAcc y mesencéfalo no se observaron alteraciones, asimismo en la SOD no se observaron alteraciones ni en machos, ni en hembras.

La disminución de GPx en machos puede ser resultado de un desequilibrio en los niveles de selenio, el cual es importante en la regulación de la GPx, a través de formar el compuesto  $(GS)_2AsSe$  como vía de desintoxicación del As (Gailer, 2009). El selenio se ha establecido como un antagonista en interacción con el As y se ha sugerido que forma interacciones AsIII-SeIV (Gailer, 2007), en un trabajo reciente se ha observado que la administración de selenio a través de la dieta en ratones macho expuestos a As en concentraciones de 0.35 mg/L en el agua de bebida durante tres meses protege contra arterosclerosis (Khron, 2016); también es conocido que las hembras tienen una mayor expresión de GPx debido a la presencia de estradiol que regula a la alta la GPx (Lubos, 2011), lo cual explica que las hembras no hayan tenido cambios, así mismo, se ha observado que los estrógenos tienen efectos antioxidantes a través de disminuir la presencia de especies reactivas y no así los andrógenos (Razmara et al., 2007); de igual forma, los estrógenos son predominantes en las hembras especialmente en etapas reproductivas (Ciu, 2013).

Por otro lado en las regiones que nosotros evaluamos hay núcleos específicos como la sustancia nigra que contienen altos niveles de hierro, se sabe que en enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer y Huntington hay una gran acumulación de este metal provocando que a través de reacciones de Fenton y Haber-Weiss se generen radicales hidroxilo tóxicos (Rauchova, 2012), probablemente el As altere estas reacciones y la concentración de hierro y sea la razón de los cambios observados en los ratones macho.

Se ha demostrado que el mesencéfalo es el inicio de las vías dopaminérgicas mesolímbica y nigroestriatal, por tanto el aumento observado en dienos conjugados podría estar comprometiendo la función de estas vías. Por otro lado, una estructura que tuvo aumento de dienos conjugados consistentemente en machos y en hembras fue el NAcc, el cual tiene un papel muy importante en la modulación de la actividad locomotora, se ha observado que el bloqueo de la transmisión dopaminérgica en el NAcc disminuye la inhibición de sus proyecciones eferentes, lo que da lugar a una disminución en la actividad motora, por el contrario un incremento en la transmisión dopaminérgica en el NAcc provoca un aumento en la actividad motora (Schaub, 1996).

Los cambios en el NAcc inducidos por la administración de As son consistentes con trabajos previos (Bardullas, 2009; Rodríguez, 2010), así mismo los cambios, aunque discretos, en el estriado son consistentes con trabajos previos (Bardullas et al., 2009; Rodríguez, 2010; Shila et al., 2005a; Shila et al., 2005b).

Durante las últimas décadas se ha argumentado sobre el beneficio que tienen las especies reactivas sobre mecanismos celulares que permiten el correcto funcionamiento celular, son innegables los cambios observados, sin embargo éstos pueden representar una forma de adaptación ante el As, el hecho de estar expuesto de manera crónica favorece que el sistema tenga compensaciones, de tal manera que los cambios pueden ser benéficos dentro de estas condiciones de toxicidad a las que estuvieron expuestos los animales; un experimento que nos daría luz sobre esto es hacer un seguimiento mes a mes o con intervalos de tiempo cortos para poder determinar cómo el sistema se regula y cómo modula la conducta de los animales.

En nuestros experimentos observamos que los efectos dependientes de las concentraciones no son lineales, por el contrario, en la determinación de dienos conjugados como en la enzima Gpx1 en hembras y machos se puede apreciar un efecto con forma de “U”, en donde la respuesta máxima se encuentra en las concentración de 0.5 mg As/L, este efecto conocido como hormesis se ha descrito en condiciones fisiológicas normales y como respuesta a agentes tóxicos (Calabrese et al., 2007), existen diferentes factores que favorecen la hormesis, sin embargo se ha sugerido que es inducida por vías de señalización que involucran especies reactivas, las cuales activan factores de transcripción para favorecer efectores horméticos como antioxidantes, proteínas chaperonas, factores de crecimiento (Mattson, 2008); esto es relevante porque uno de los mecanismos de acción de toxicidad del As es a través de favorecer la generación de ERO.

Estos resultados confirman la susceptibilidad del sistema nervioso ante la exposición de As en concentraciones relevantes al medio ambiente, además de mostrar evidencia de que el sexo influye sobre los cambios conductuales y estatus prooxidantes y antioxidantes.

### **Limitaciones de la investigación**

En relación a las diferencias relacionadas al sexo, este estudio no diferenció entre los diferentes estadios del ciclo menstrual de las hembras, sin embargo se puso atención a realizar los experimentos en diferentes días para poder equilibrar las diferencias debidas al ciclo menstrual.

El análisis de lipoperoxidación y enzimas antioxidantes se realizó al final de la exposición a As, está documentado que hay efectos bifásicos durante la exposición crónica a As, por tanto este estudio no es capaz de identificar las variaciones debidas al tiempo de exposición, lo que no permite identificar cambios puntuales en los marcadores de estrés oxidante.

## Referencias

- Antonelli R, Shao K, Thomas DJ, Sams R, Cowden J. 2014. AS3MT, GSTO, and PNP polymorphisms: Impact on arsenic methylation and implications for disease susceptibility. *Environ Res* 132, 156-167.
- Bardullas U., Limón-Pacheco JH, Giordano M, Carrizales L, Mendoza-Trejo MS, Rodríguez VM. 2009 Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. *Toxicol Appl Pharm* 239, 169-177.
- Bundschuh J, Litter M, Parvez F, Román-Ross G, Nicolli H, Jiin-Shuh J, et al. 2012 One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *Sci Total Environ* 429, 2-35.
- Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, Bolger PM, Borak J, Cai L, et al. 2007. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharm* 222, 122-128.
- Calderón J, Navarro ME, Jiménez-Cadeville ME, Santos-Díaz MA, Golden A, Rodríguez-Leyva I, Borja-Aburto V, Díaz-Barriga F. 2001. Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ Res* 85(2), 69-76.
- Carocho M, Ferreira IC. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 51, 15-25.
- Ciu J, Shen Y, Li R. 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: From periphery to brain. *Trends in Mol Med* 16(3), 197-209.
- Cosgrove KP, Mazure CM, Staley JK. 2007. Evolving knowledge of sex differences in brain structure, function, and chemistry. *Biol Psychiat* 62, 847-855.
- Thomas C, Marcaletti S, Feige JN. 2011. Assessment of spontaneous locomotor and running activity in mice. *Curr Protoc in Mouse Biol* 1, 185-198.
- Tseng CH. 2007. Metabolism of inorganic and non-cancerous health hazards associated with chronic exposure in humans. *J Environ Biol* 28(2), 349-357.
- Chinta SJ, Andersen JK. 2005. Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol* 37(5), 942-946.

- Crittenden JR, Lacey CJ, Lee T, Bowden HA, Graybiel AM. 2014. Severe drug-induced repetitive behaviors and striatal overexpression of VACHT in ChAT-ChR2-EYFP BAC transgenic mice. *Front Neural Circuits* 8, 1-12.
- Daubner SC, Le T, Wang S. 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys* 508, 1-12.
- Dluzen DE, Bhatt S, McDermontt JL. 2008. Differences in reserpine-induced striatal dopamine output and content between female and male mice: implications for sex differences in vesicular monoamine transporter 2 function. *Neuroscience* 154(4), 1488-1496.
- Edmunds WM, Ahmed KM, Whitehead PG. 2015. A review of arsenic and its impacts in groundwater of the Ganges-Brahmaputra-Meghna delta, Bangladesh. *Environ Sci: Processes Impacts* 17(6), 1032-1046.
- Fahn S, Cohen G. 1992. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: Evidence supporting it. *Ann Neurol* 32(6), 804-812.
- FAO/WHO. 2010. Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Summary and conclusions, issued 16.
- File SE, Tucker JC. 1984. Prenatal treatment with clomipramine: Effects on the behavior of male and female adolescent rats. *Psychopharmacology* 82(3), 221-224.
- Fowler B, Chou S, Jones R, Sullivan D, Chen C. 2015. Arsenic. *Handbook of the Toxicology of Metals*. Elsevier: Academic Press.
- Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK. 2004. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 28(4), 365-378.
- Flora S. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biol Med* 51(2), 257-281.
- Gailer J. 2007. Arsenic-selenium and mercury-selenium bonds in biology. *Coord Chem Rev* 251, 234-254.
- Gailer J. 2009. Chronic toxicity of As(III) in mammals: The role of  $(GS)_2AsSe^-$ . *Biochimie* 91(10), 1268-1272.
- García-Chávez E, Jiménez I, Segura B, Del Razo LM. 2006. Lipid oxidative damage and distribution of inorganic arsenic and its metabolite in the rat nervous system after arsenite exposure: Influence of alpha tocopherol supplementation. *Neurotoxicology* 27(6), 1024-1031.

- Gillies GE, Virdee K, McArthur S, Dalley JW. 2014. Sex-dependent diversity in ventral tegmental dopaminergic neurons and developmental programming: A molecular, cellular and behavioral analysis. *Neuroscience* 282, 69-85.
- Gochfeld M. 2007. Framework for gender differences in human and animal toxicology. *Environ Res*, 104(1), 4-21.
- Gerr F, Letz R, Ryan PB, Green RC. 2000. Neurological effects of environmental exposure to arsenic in dust and soil among humans. *Neurotoxicology* 21(4), 475-487.
- Grinham A, Kvennefors C, Fisher PL, Gibbes B, Albert S. 2014. Baseline arsenic levels in marine and terrestrial resources from a pristine environment: Isabel Island, Solomon Island. *Mar Pollut Bull* 88(1-2), 354-360.
- Halliwell B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59(5), 1609-1623.
- Hegarty SV, Sullivan AM, O'Keeffe GW. 2013. Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev Biol* 379(2), 123-138.
- Huang MC, Douillet C, Su M, Zhou K, Wu T, Chen W, Galanko, JA, et al. (2016). Metabolomic profiles of arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase knockout mice: effect of sex and arsenic exposure. *Arch Toxicol*, 1-14.
- Hughes MF. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 133(1), 1-16.
- Itoh T, Zhang YF, Murai S, Saito H, Nagahama H, Miyate H. et al. 1990. The effect of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice. *Toxicol Lett* 54(2-3), 345-353.
- Jain A, Agrawal S, Flora S. 2015. Arsenic and nicotine co-exposure lead to some synergistic effects on oxidative stress and apoptotic markers in young rat blood, liver, kidneys and brain. *Toxicology Reports* 2, 1334-1346.
- Kalyanaraman B. 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 1, 244-257.
- Kozul-Horvath CD, Zandbergen F, Jackson BP, Enelow RI, Hamilton JW. 2012. Effects of low-dose drinking water arsenic on mouse fetal and postnatal growth and development. *PLOS ONE* 7(5), 1-9.

- Krohn RM, Lemaire M, Negro-Silva LF, Lemarié C, Bolt A, Mann KK, Smits JE. 2016. High-selenium lentil diet protects against arsenic-induced atherosclerosis in a mouse model. *J Nutr Biochem* 27, 9-15.
- Krüger K, Straub H, Hirner AV, Hippler J, Binding N, Musshoff U. 2009. Effects of monomethylarsonic and monomethylarsonous acid on evoked synaptic potentials in hippocampal slices of adult and young rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 236, 115-123.
- Le Quesne PM, McLeod JG. 1977. Peripheral neuropathy following a single exposure to arsenic. Clinical course in four patients with electrophysiological and histological studies. *J Neurol Sci* 32(3), 437-451.
- Yang LJ. 2014. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biology* 2, 165-169.
- Lindberg AL, Kumar R, Goessler W, Thirumaran R, Gurzau E, Koppova K, et al. 2007. Metabolism of low-dose inorganic arsenic in central European population: Influence of sex and genetic polymorphisms. *Environ Health Perspect* 115(7), 1081-1086.
- Lubos E, Loscalzo J, Handy D. 2011. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 15(7), 1957-1997.
- Lynch HN, Greenberg GI, Pollock MC, Lewis AS. 2014. A comprehensive evaluation of inorganic arsenic in food and considerations for dietary intake analyses. *Sci Total Environ* 496, 299-313.
- Martínez-Sámano J, Torres-Durán P, Juárez-Oropeza M. 2011. El glutati6n y su asociaci6n con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Revista de Educaci6n Bioquímica* 30(2), 56-67.
- Markowski VP, Reeve EA, Onos K, Assadollahzadeh M, McKay N. 2012. Effects of prenatal exposure to sodium arsenite on motor and food-motivated behaviors from birth to adulthood in C57BL6/J mice. *Neurotoxicol Teratol* 34(2), 221-231.
- Mattson MP. 2008. Hormesis defined. *Ageing Res Rev* 7, 1-7.
- Mejía JJ, Díaz-Barriga F, Calder6n J, Ríos C, Jiménez-Capdeville ME. 1997. Effects of lead-arsenic combined exposure on central monoaminergic systems. *Neurotoxicol Teratol* 19(6), 489-497.

- Mia K, Ki-Ho C, Mal-Soon S, Jae-Min L, Ham-Sam C, Chang-Ju K, et al. 2014. Berberine prevents nigrostriatal dopaminergic neuronal loss and suppresses hippocampal apoptosis in mice with Parkinson's disease. *Int J Mol Med* 33(4), 870-878.
- Kim M, Seo S, Sung K, Kim K. 2014. Arsenic exposure in drinking water alters the dopamine system in the brain of C57BL/6 mice. *Biol Trace Elem Res* 162(1-3), 175-180.
- Mohri T, Hisanaga N, Ishinishi N. 1990. Arsenic intake and excretion by Japanese adults: A 7-day duplicate diet study. *Food Chem Toxic* 28(7), 521-529.
- Mochizuki H, Yagi K, Tsuruta K, Taniguchi A, Ishii N, Shiomi K, Nakasato M. 2015. Prolonged central sensory conduction time in patients with chronic arsenic exposure. *J Neurol Sci* 361, 39-42.
- Munro C, McCaul M, Wong D, Oswald L, Zhou Y, Brasic J, et al. 2006. Sex differences in striatal dopamine release in healthy adults. *Biol Psychiatry* 59(10), 966-974.
- McEwen BS. 2001. Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 91 (6), 2785-2801.
- Nebert DW, Roe AL, Vandale SE, Bingham E, Oakley GG. 2002. NAD(P)H: Quinone oxidoreductase (NQO1) polymorphism, exposure to benzene, and predisposition to disease: A huge review. *Genet Med* 4(2), 62-70.
- Nagaraja TN, Desiraju T. 1994. Effects on operant learning and brain acetylcholine esterase activity in rats following chronic inorganic arsenic intake. *Hum Exp Toxicol* 13(5), 353-356.
- Parvez F, Wasserman GA, Factor-Litvak P, Liu X, Slavkovich V, Siddique A, et al. 2011. Arsenic exposure and motor function among children in Bangladesh. *Environ Health Persp* 119(11), 1665-1670.
- Prakash C, Soni M, Kumar V. 2015. Biochemical and molecular alterations following arsenic-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in rat brain. *Biol Trace Elem Res* 167(1), 121-129.
- Prakash N, Wurst W. 2006. Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell Mol Life Sci* 63(2), 187-206.
- Rahman MA, Hassler C. 2014. Is arsenic biotransformation a detoxification mechanism for microorganisms? *Aquat Toxicol* 146, 212-219.

- Rahman M, Vahter M, Sohel N, Yunus M, Wahed Ma, Streatfield PK, et al. 2006. Arsenic exposure and age and sex-specific risk for lesions: A population-based case-referent study in Bangladesh. *Environ Health Perspect* 114(12), 1847-1852.
- Ramos-Chávez LA, Rendón-López CR, Zepeda A, Silva-Adaya D, Del Razo LM, Gonsebatt ME. 2015. Neurological effects of inorganic arsenic exposure: Altered cysteine/glutamate transport, NMDA expression and spatial memory impairment. *Front Cell Neurosci* 9, 9-21.
- Rauchová H, Vokurková M, Koudelová J. 2012. Hypoxia-induced lipid peroxidation in the brain during postnatal ontogenesis. *Physiol Res* 61(1), 89-101.
- Ravenscroft P, Brammer H, Richards K. 2009. Arsenic in Asia. En T. Ravenscroft P, Brammer H, Richards K (Eds.), *Arsenic Pollution: A global synthesis*. (pp. 318-386), United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Razmara A, Duckles SP, Krause D, Procaccio V. 2007. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res* 24, 1176, 71-81.
- Rihmer Z, Hal M, Kapitány B, Gonda X, Vargha M, Döme P. 2015. Preliminary investigation of the possible association between arsenic levels in drinking water and suicide mortality. *J Affect Disorders* 182, 23-25.
- Rodríguez VM, Carrizales L, Jiménez-Capdeville ME, Dufour L, Giordano M. 2001 The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat. *Brain Res Bull* 55(2), 301-308.
- Rodríguez VM, Carrizales L, Mendoza MS, Fajardo OR, Giordano M. 2002. Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 24(6), 743-750.
- Rodríguez VM, Jiménez-Capdeville ME, Giordano M. 2003. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicol Lett* 145, 1-18.
- Rodríguez VM, Del Razo LM, Limón-Pacheco JH, Giordano M, Sánchez-Peña LC, Uribe-Querol, E, et al. 2005. Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in CD1 mice brain and liver. *Toxicol Sci* 84(1), 157-166.
- Rodríguez VM, Limón-Pacheco JH, Carrizales J, Mendoza-Trejo MS, Giordano M. 2010 Chronic exposure to low levels of inorganic arsenic causes alterations in locomotor activity and in the expression of dopaminergic and antioxidant system in the albino rat. *Neurotoxicol Teratol* 32(6), 640-647.

- Rodríguez-Barranco M, Gil F, Hernández AF, Alguacil J, Lorca A, Mendoza R, et al. 2015. Postnatal arsenic exposure and attention impairment in school children. *Cortex* 74, 370-382.
- Roy A, Kordas K, López P, Rosado JL, Cebrian ME, García-Vargas GG, Ronquillo D, Stoltzfus RJ. 2011. Association between arsenic exposure and behavior among first-graders from Torreon, Mexico. *Environ Res* 111(5), 670-676.
- Rosado JL, Ronquillo D, Kordas K, Rojas O, Alatorre J, Lopez P, Garcia-Vargas G, Del Carmen Camaño M, Cebrián ME, Stoltzfus RJ. 2007. Arsenic exposure and cognitive performance in Mexican schoolchildren. *Environ Health Persp* 115(9), 1371-1375.
- Sinczuk-Walczak H, Janasi BM, Trzcinka-Ochocka M, Stanislawska M, Szymczack M, Halatek T, Walusiak-Skorupa J. 2014. Neurological and neurophysiological examinations of workers exposed to arsenic levels exceeding hygiene standards. *Int J Occup Med Environ Health* 27(6), 1013-1025.
- Sankar S, Mukherjee S, Chattopadhyay A, Bhattacharya S. 2014. Low dose of arsenic trioxide triggers oxidative stress in zebra fish brain: Expression of antioxidant genes. *Ecotoxicol Environ Saf* 107, 1-8.
- Shila S, Subathra M, Devi MA, Panneerselvam C. 2005. Arsenic intoxication-induced reduction of glutathione level and the activity of related enzymes in rat brain regions: Reversal by DL-alpha-lipoic acid. *Arch Toxicol* 79(3), 140-146.
- Shila S, Kathirvel R, Jayavelu T, Chinnakkannu P. 2005. Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL-alpha-lipoic acid. *Toxicol Lett* 155(1), 27-34.
- Schaub CL, Schmelzeis MC, Mittleman G. 1997. The effects of limbic lesions on locomotion and stereotypy elicited by dopamine agonists in the rat. *Behav Brain Res* 84(1-2), 129-143.
- Styblo M, Del Razo LM, Vega L, Germolec DR, LeCluyse EL, Hamilton GA, Reed W, Wang C, Cullen WR, Thomas DJ. 2000. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch Toxicol* 74(6), 289-299.
- Sun BF, Wang QQ, Yu Y, Xiao CL, Kang CS, Ge G, et al. 2015. Exercise prevents memory impairment induced by arsenic exposure in mice: Implication of hippocampal BDNF and CREB. *PLOS ONE* 10(9), 1-15.

- Turrens J. 2010. Superoxide dismutase and catalase. En T. McQueen M (Ed.), *Comprehensive Toxicology*. (219-227), United Kingdom: El Sevier.
- Tyler CR, Allan AM. 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.
- Tyler CR, Hafez AK, Solomon ER, Allan AM. 2015. Developmental exposure to 50 parts-per-billion arsenic influences histone modifications and associated epigenetic machinery in a region and sex specific manner in the adult mouse brain. *Toxicol Appl Pharm* 288(1), 40-51.
- Vahter M, Akesson A, Lidén C, Ceccatelli S, Berglund M. 2007. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environ Res* 104(1), 85-95.
- Vahter M, Gochfeld M, Casati B, Thiruchelvam M, Falk-Filippson A, Kavlock R, Marafante E, Cory-Slechta D. 2007. Implications of gender differences for human health risk assessment and toxicology. *Environ Res* 104(1), 70-84.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1), 44-84.
- Wang Y, Zhao F, Jin Y, Zhong Y, Yu X, Li G, Lv X, Sun G. 2011. Effects of exogenous glutathione on arsenic burden and NO metabolism in brain of mice exposed to arsenite through drinking water. *Arch Toxicol* 85(3), 177-184.
- Watanabe T, Hirano S. 2013. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Arch Toxicol* 87(6), 969-79.
- Weiss B. 2012. The intersection of neurotoxicology and endocrine disruption. *Neurotoxicology* 33(6), 1410-1419.
- Weiss B. 2011. Same sex, no sex, and unaware sex in neurotoxicology. *Neurotoxicology* 32(5), 509-517.
- WHO. 2008. Arsenic in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/75).
- Wu JQ, Kosten TR, Zhang XY. 2013 Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46, 200-206.

- Wang X, Zhang J, Zhao L, Hu S, Piao F. 2013. Effect of subchronic exposure to arsenic on levels of essential trace elements in mice brain and its gender difference. *Biometals* 26(1), 123-131.
- Yang KC, Kyle JW, Makielski JC, Dudley SC. 2015. Mechanisms of sudden cardiac death: Oxidants and metabolism. *Circ Res* 116 (12), 1937-1955.
- Yen CC, Ho TJ, Wu CC, Chang CF, Su CC, Chen YW, Jinn TR, Lu TH, Cheng PW, Su YC, Liu SH, Huang CF. 2011. Inorganic arsenic causes cell apoptosis in mouse cerebrum through an oxidative stress-regulated signaling pathway. *Arch Toxicol* 85(6), 565-75.
- Hong Y, Wang Y, Wang H, Xu Y. 2014. Induction of glutathione synthesis in human hepatocytes by acute and chronic arsenic exposure: Differential roles of mitogen-activated protein kinases. *Toxicology* 325, 96-106.
- Zhang C, Li S, Sun Y, Dong W, Piao F, Piao Y, et al. 2014. Arsenic down-regulates gene expression at the postsynaptic density in mouse cerebellum, including genes responsible for long-term potentiation and depression. *Toxicol Lett* 228(3), 260-269.