



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**TÍTULO DEL PROYECTO:**

**PARTICIPACIÓN DEL TRANSPORTADOR xCT EN LA DISPOSICIÓN DE GLUTAMATO EN EL  
HIPOCAMPO DE RATÓN**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M en C. JANIKUA FLORITTA NELSON MORA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**COTUTORES DE TESIS:**

**DRA. MA. DE LOURDES MASSIEU TRIGO**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR- DIV. NEUROCIENCIAS**

**DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**CD..MX., OCTUBRE, 2018**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A las instituciones:

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención con número 384958. Así como a los proyectos de investigación financiados por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT UNAM IN 207611 ), y a la Red Temática de Salud Ambiental Infantil CONACyT 280296.

Al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, PAEP, de la UNAM por el otorgamiento de estímulos económicos para presentar este trabajo en el congreso Internacional de la Sociedad de Neurociencias en 2017.

A mis sinodales por darse el tiempo de revisar el trabajo y ayudarme a pulirlo.

También deseo agradecer a la Dra. María Eugenia Gonsebatt, por la oportunidad, por apoyarme siempre y por ayudarme a ser mejor profesionista y persona. A los Técnicos Académicos del laboratorio Dr. Pavel Petrosyan, porque sin sus regaños cariñosos jamás habría podido realizar los experimentos y al Dr. Renato León por su apoyo.

A la Dra. Lourdes Massieu, Biol. Teresa Montiel y Dra. Martha Escobar por abrirme la puerta de sus laboratorios y por darme tantas ideas para este trabajo.

## Contenido

<i>Resumen</i> .....	1
<i>Abstract</i> .....	2
<b>1. Introducción</b> .....	5
1.1. Características del arsénico y vías de exposición.....	5
1.2. Toxicidad del arsénico .....	6
1.2.1. Absorción y metabolismo del arsénico .....	7
1.2.2. Efectos de la intoxicación crónica por iAs.....	8
1.2.3. Estrés oxidante mediado por iAs.....	9
1.3. Efectos del arsénico sobre el SNC .....	11
1.4. Sinapsis glutamatérgica en el hipocampo .....	13
1.4.1. Receptores de glutamato .....	16
1.4.2. Potenciación de largo plazo (LTP; del inglés long-term potentiation).....	17
1.4.3. Recaptura de glutamato.....	18
1.4.4. El transportador xCT.....	19
1.5. Efectos tóxicos del iAs sobre la sinapsis glutamatérgica .....	20
<b>2. Planteamiento del problema</b> .....	23
<b>3. Hipótesis</b> .....	24
<b>4. Objetivos:</b> .....	25
<b>5. Material y métodos</b> .....	26
<b>6. Resultados</b> .....	31
<b>7. Discusión</b> .....	41
<b>8. Conclusiones:</b> .....	44
<b>9. Perspectivas</b> .....	47
<b>10. Bibliografía:</b> .....	47
<b>11. ANEXOS</b> .....	59

## Resumen

Se estima que más de doscientos millones de personas están expuestas a niveles de arsénico por encima de los estándares de seguridad establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El agua contaminada es la principal vía de exposición. La exposición crónica al arsénico inorgánico (iAs) está asociada a padecimientos cardiovasculares, neurotóxicos, diabetes y cáncer. Se ha documentado que esta exposición puede ocurrir por generaciones. Estudios realizados en México y diferentes partes del mundo, han demostrado que la exposición al iAs está relacionada con varios tipos de desórdenes neurológicos que pueden causar deficiencias en las tareas cognitivas de memoria y aprendizaje en la infancia. Con la finalidad de entender los mecanismos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que subyacen a los desórdenes cognitivos observados en la exposición al iAs, desarrollamos un modelo murino de exposición gestación durante el periodo de gestación al iAs que representa una exposición al iAs similar a la que ocurre en poblaciones humanas.

El iAs entra a la célula a través de transportadores donde es metilado para su más rápida eliminación, en un proceso que consume glutatión (GSH), tiorredoxina y grupos metilos. El estrés oxidante es el mecanismo más aceptado para la neurotoxicidad causada por iAs. Se ha demostrado que el iAs aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en consecuencia la eliminación de GSH, que es la principal molécula antioxidante en el sistema nervioso. El recurso limitante en la síntesis de GSH es la cisteína, que entra a la célula a través de un sistema transportador antiporter Xc- en forma de cistina y es intercambiado por una molécula de glutamato. Este transportador se conoce como sistema Xc- y funciona a favor de gradiente de concentración. Por lo tanto, el incremento de actividad en el sistema Xc-, también se ha relacionado con el aumento en la concentración de glutamato extracelular. El aumento de glutamato extracelular puede conducir a excitotoxicidad, o a cambios en el funcionamiento correcto de la sinapsis glutamatérgica, mismos que podrían impactar en el aprendizaje y memoria.

En este trabajo usamos un modelo murino de exposición al iAs, donde ratones de la cepa CD1 fueron expuestos a 20 ppm de iAs disueltos en el agua de consumo diario, durante su periodo de gestación y hasta los 90 días de vida. En este periodo se midieron las concentraciones de glutamato extracelular, mediante microdiálisis en la región hipocampal. Asimismo, en otro lote de animales se determinaron las concentraciones de GSH y glutatión oxidado (GSSG) y se cuantificó por Western Blott, la expresión de las subunidades del receptor de glutamato ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isozazolpropiónico AMPA (GluA1, GluA2) en la corteza y el hipocampo. La funcionalidad de la sinapsis fue valorada a través de la inducción del fenómeno de potenciación de largo plazo (LTP), en el hipocampo de ratones anestesiados y se utilizó la prueba de laberinto acuático de Morris, para evaluar el impacto del iAs en memoria y aprendizaje.

Nuestros resultados mostraron que los niveles de GSH y GSSG se incrementaron en el hipocampo de los ratones que recibieron iAs, sugiriendo la activación del sistema Xc-, como indicaban hallazgos previos. Sin embargo, la relación GSH/GSSG estaba reducida indicando estrés oxidante. También se encontró elevación en la concentración de glutamato extracelular

en esta misma región, en los animales tratados con iAs. Al mismo tiempo, la expresión de ambas subunidades del receptor AMPA se encontraron disminuidas, lo que se asoció con una reducción en la inducción del fenómeno de LTP y en la capacidad para resolver el laberinto acuático de Morris. En conclusión, estos hallazgos muestran que la exposición a iAs produce estrés oxidante, y un incremento de glutamato extracelular que ocasiona cambios en la fisiología sináptica y glutamatérgica, asociados a efectos negativos en los procesos cognitivos de memoria y aprendizaje analizados.

### **Abstract**

Two hundred million people in the world are estimated to be exposed to arsenic levels above the security standards established by the World Health Organization. Polluted water is the major way of exposure. Several studies worldwide have shown that iAs exposure is related with different types neurological disorders and can also cause memory and learning impairment in exposed children. Our lab has developed a murine model of iAs gestational exposure, in order to seek for the physiological, biochemical and molecular mechanism underlying the cognitive disorders seen in iAs exposure.

The induction of oxidative stress is the most accepted neurotoxic mechanism. It has been proved that iAs can induce ROS elevation, and consequently iAs exposure can deplete glutathione (GSH) the main antioxidant in the nervous system. Cysteine is the limiting amino acid for GSH synthesis which enters the cell via the Xc- antiporter which exchanges one cystine (oxidized cysteine) molecule for one glutamate molecule. Nonetheless, Xc- system higher activity is also related to elevated extracellular glutamate that can lead to excitotoxicity, or changes in the physiology of glutamatergic synapses.

CD1 animals were exposed to 20 ppm of iAs in drinking water, during gestation and up to the postnatal day 90 (PND90). Extracellular glutamate concentrations were measured by *in-vivo* microdialysis in PND 90 male mice, as well GSH and GSSG concentrations in the hippocampus. The expression of the subunits of AMPA (GluA1, GluA2) were determined by Western Blott in cortex and hippocampus. Also, glutamatergic synapse physiology was evaluated inducing LTP in hippocampal dentate gyrus in anesthetized animals. Learning and memory were evaluated using the Morris water maze test.

Our results show that both GSH and GSSG levels were increased suggesting Xc- system activation. Also, the GSH/GSSG ratio was reduced indicating oxidative stress. Extracellular glutamate levels were higher in iAs treated mice and both AMPA subunits were down-regulated. We observed an impairment in LTP induction in iAs exposed animals as well as significant changes in learning and memory using the Morris water maze.

The main chronic iAs exposure effects were observed in the hippocampus where higher glutamate levels are observed, a down-regulation of AMPA receptors a condition that was associated with alterations in LTP and impaired learning and memory.

## Abreviaturas

SCN	Sistema Nervioso Central
iAs	Arsénico Inorgánico
LTP	Potenciación de largo plazo
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado
ROS	Especies reactivas de oxígeno
AMPA	Receptor de glutamato 3cido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isozazolpropiónico
PND	Día postnatal
OMS	Organizaci3n mundial de la salud
AS3MT	Arsénico metil transferasa
AdoMet	S-adenosilmetionina
MMA	Mono metil arsénico
DMA	Dimetil arsénico
MRP	Proteína de resistencia multidroga
GR	Glutati3n reductasa
•OH	Radical hidroxilo
O <sub>2</sub> •-	Radical anión super óxido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
NO•	Óxido nítrico
NMDA	Receptor de glutamato N-metil-D-Aspartato
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
L-Glu	L-glutamato
EVC	Evento vascular cerebral
GD	Giro dentado
VGlu	Transportadores vesiculares de glutamato
CaMKII	Calcio calmodulina cinasa II

PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
EAATs	Transportadores de aminoácidos excitatorios
AP	Antero posterior
ML	Medial lateral
DV	Dorso ventral
PP	Patrón perforante
EPSP	Potencial post sináptico excitatorio
GT	Glutación total



## **1. Introducción**

### 1.1. Características del arsénico y vías de exposición.

El potencial tóxico del arsénico se ha conocido por la humanidad durante milenios. Sin embargo, su consumo inadvertido y crónico, por ejemplo, a través del agua para el consumo, genera hoy en día, problemas de salud pública a nivel mundial. El arsénico tiene un número atómico de 33, su masa atómica es de 74.921 u y se le ha denominado como un metaloide por sus propiedades químicas intermedias entre metales y no metales. El arsénico es el veinteavo elemento más común en la corteza terrestre, y su presencia es más abundante en rocas de origen volcánico. Debido a su alto potencial de oxidación, en la naturaleza se encuentra frecuentemente formando compuestos con fierro, cobre, plata, níquel, así como óxidos y sulfuros (Flora, 2015). La mayoría de los compuestos que forma el arsénico son muy solubles en agua, y por ello el arsénico puede estar presente en cuerpos de agua dulce como ríos, lagos, estanques y escorrentías (Bhattacharya 2002). El arsénico inorgánico (iAs) en la naturaleza, se encuentra principalmente en dos estados de oxidación: la trivalente ( $\text{As}^{3+}$ ) o arsenito que es frecuente en aguas anóxicas profundas y la pentavalente ( $\text{As}^{5+}$ ) o arsenato que es la forma más común en aguas superficiales. De éstas, el arsenito es la forma más tóxica (Basu et al., 2001).

La principal vía de exposición al arsénico es precisamente la ingesta de agua contaminada, que es producida de manera natural en los procesos de erosión y lixiviación de las rocas. La contaminación de cuerpos de agua por el iAs se ha reportado en diferentes países como India, China, Tailandia, Ghana, Argentina, Hungría, Canadá, Estados Unidos, Reino Unido y México (Kapaj et al., 2006). Sin embargo, debido a su origen geológico las concentraciones más altas se han reportado principalmente en Asia y América latina (Flora et al., 2011). Se ha estimado que 4.5 millones de personas en América Latina están expuestas al iAs en el agua de consumo humano en concentraciones que superan los ( $10 \mu\text{g/L}$ ), que es el valor establecido por la OMS como límite seguro para evitar efectos en la salud (Farías et al., 2008; Tyler, 2012; WHO, 2013). En el caso particular de nuestro país, se han encontrado valores de hasta  $400 \mu\text{g/l}$  (García-Vargas et al., 1991), que suponen un riesgo importante a la salud de los habitantes de esas áreas.

Aunque el arsénico se encuentra presente de manera natural en el ambiente, algunas actividades antropogénicas contribuyen al incremento de arsénico en el ambiente. Por ejemplo, el arsénico es liberado a la atmósfera durante la combustión de carbón para producción de electricidad y en la industria metalúrgica durante la extracción y fundición de metales (Tabla 1).

Tabla 1. Principales fuentes naturales y antropogénicas de arsénico en el ambiente. Modificado de Flora 2015.

Fuentes de Arsénico en el ambiente	
Naturales	Antropogénicas
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Actividad hidrotermal y geotérmica.</li> <li>- Vulcanismo</li> <li>- Incendios forestales</li> <li>- Disolución de minerales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pesticidas.</li> <li>- Producción de carbón</li> <li>- Procesamiento de petróleo y producción de productos derivados de petróleo.</li> <li>- Industria siderúrgica</li> <li>- Preservación de maderas</li> <li>- Manufactura de vidrio</li> </ul>

## 1.2. Toxicidad del arsénico

El arsénico no tiene función biológica conocida. De hecho, el consumo de concentraciones de  $6\mu\text{g/L}$  de arsénico, que son menores a las que la OMS recomienda para el agua de consumo humano muestra efectos negativos sobre la salud de poblaciones expuestas crónicamente (O'Bryant et al., 2011). Entre los efectos causados por la exposición crónica al iAs se encuentran: cambios en la pigmentación de la piel, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, diabetes, anemia, efectos reproductivos, efectos sobre el desarrollo, efectos sobre el sistema inmune, cáncer y desórdenes neurológicos (Tolins et al., 2014). Además, el consumo de agua con arsénico tiene efectos sobre los procesos cognitivos de memoria y aprendizaje (Calderón et al., 2001; Ehrenstein et al., 2007; Rocha-Amador et al., 2007; Rosado et al., 2007; O'Bryant et al., 2011).

El mecanismo de acción de los iones radicales de arsénico es complejo, porque depende de múltiples factores como: la valencia ( $\text{As}^{5+}$  ó  $\text{As}^{3+}$ ) y el estado de metilación a pH fisiológico.

Estos determinan en parte la tóxico-cinética como absorción, distribución, metabolismo unión a proteínas y excreción. (Flora, 2015).

### 1.2.1. Absorción y metabolismo del arsénico

Después de ser ingerido en el agua de consumo, hasta un 90% del arsénico es absorbido por el tracto gastrointestinal. Se ha descrito que en el lumen intestinal las formas trivalentes son absorbidas más rápidamente que las pentavalentes, independientemente del grado de metilación que tengan. El  $As^{3+}$  ingresa a las células del epitelio intestinal a través de varios sistemas que incluyen: el polipéptido B transportador de aniones orgánicos (OATPB), el transportador de glucosa 5 y la aquaporina 10. El  $As^{5+}$  entra a través del transportador de fosfatos dependiente de sodio (NAPIIB); en el enterocito el  $As^{5+}$  es metabolizado a  $As^{3+}$  y MMA, que son transportados por el torrente sanguíneo hasta el hígado (Calatayud y Laparra, 2015). En el hígado ocurre el mayor metabolismo del iAs que involucra la sucesiva metilación oxidativa, a través de la enzima arsénico metil transferasa (AS3MT) que cataliza la transferencia de un grupo metilo a partir de la S-adenosilmetionina (AdoMet). El proceso además requiere de GSH como agente reductor ya que las especies metiladas pentavalentes no son sustrato de la AS3MT y la reducción de éstas ocurre en presencia de GSH o tiorredoxina (Figura 1) (Thomas, 2007). El  $MMA^{5+}$ , es reducido en presencia de GSH a  $MMA^{3+}$ , que a su vez es convertido a  $DMA^{5+}$  por la AS3MT, el  $DMA^{5+}$  es reducido a  $DMA^{3+}$  para una tercera metilación.

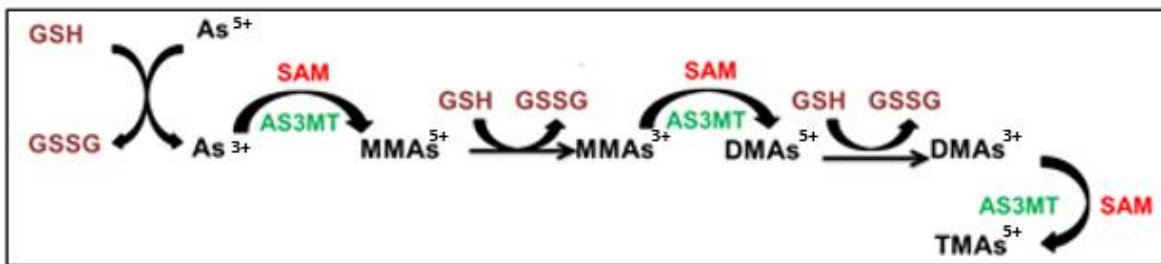


Figura 1: Esquema de la metabolización del iAs por la arsénico metil transferasa (As3MT), con la participación de GSH como agente reductor y la S-adenosil metionina como donador de metilos (modificado de Thomas et al., 2007).

La metilación oxidativa del iAs produce complejos moleculares entre las formas trivalentes del iAs y el GSH, que son necesarios para la excreción celular del arsénico a través de las proteínas de resistencia a multidroga (MRP1-2) (Liu et al., 2001). Sin embargo, la formación de estos complejos reduce la disponibilidad intracelular de GSH. Por el otro lado, la reducción de especies pentavalentes de iAs produce GSSG (glutación oxidado) que, en condiciones normales, es reducido por la enzima glutación reductasa (GR) recuperando las concentraciones de GSH disponibles. Sin embargo, se ha demostrado que  $As^{3+}$ ,  $MMA^{3+}$  y  $DMA^{3+}$  y los complejos de las formas metiladas con el GSH, son inhibidores de la GR (Stybło et al., 1997) dificultando que este proceso ocurra y por lo tanto afectando la relación intracelular de GSH/GSSG en presencia de iAs. En resumen, el metabolismo celular del iAs y su excreción, reducen la concentración libre de GSH intracelular.

Los metabolitos del iAs son eliminados del organismo a través de la orina y las heces, aunque una porción puede acumularse en tejidos ricos en grupos sulfidrilos (Escudero- Lourdes et al., 2016), como el cabello, las uñas, el riñón, el hígado, la vejiga y el cerebro (Xi et al., 2010; Jin et al., 2006).

### 1.2.2. Efectos de la intoxicación crónica por iAs

El iAs ejerce sus efectos a través de mecanismos diversos, entre ellos se encuentran: elimina grupos metilo afectando los perfiles epigenéticos, desacopla de la fosforilación oxidativa, incrementa la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), interfiere con enzimas y proteínas ricas en grupos tiol, elimina GSH, altera en la transducción de señales, la proliferación celular y reduce la reparación de DNA (Prakash et al., 2015). Sin embargo, el mecanismo más aceptado de toxicidad crónica por iAs es la inducción de estrés oxidante.

El estrés oxidante se define como el desbalance entre los prooxidantes y sistemas antioxidantes presentes en los tejidos (Lewerenz et al., 2015). Entre las moléculas prooxidantes se encuentran las especies reactivas, que son compuestos que pueden recibir o proveer uno o más electrones, lo que las hace ser inestables y ser altamente reactivas con los componentes celulares (Lushchak, 2014), algunos ejemplos de especies reactivas son las especies reactivas de oxígeno como, tales como, el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), el radical anión super óxido ( $O_2\bullet^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); y las especies reactivas de nitrógeno, tales como, el óxido nítrico ( $NO\bullet$ ), el radical dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) y el peroxinitrito

(OONO<sup>-</sup>) (Garza-Lombó et al., 2018). Las defensas antioxidantes tienen como función específica la neutralización de ROS. Algunos ejemplos de antioxidantes son moléculas como las vitaminas C y E, el GSH, y la tioredoxina (TRX) y enzimas, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la GSH peroxidasa (GPx). El aumento de especies reactivas de oxígeno durante el estrés oxidante facilita la posibilidad de interacción entre estas y elementos celulares como el DNA, proteínas y lípidos, que sufren modificaciones afectando la fisiología celular (Lobo et al., 2010).

### 1.2.3. Estrés oxidante mediado por iAs

Diversos experimentos han demostrado que el iAs produce aumento de ROS, tanto de manera directa como indirecta. Las principales ROS producidas por el arsénico son: el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el radical hidroxilo (•OH), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el oxígeno en singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) y los radicales peroxilo (Flora, 2011). Se ha establecido que en condiciones normales, el 90% de las ROS en células eucariontes son producidas en la mitocondria (Lushchak, 2014). En ratas adultas expuestas a 25 ppm de iAs durante 12 semanas, el iAs favorece la producción de ROS en la mitocondria al disminuir la actividad de los complejos mitocondriales I, II y IV (Prakash et al., 2015). Además, como se mencionó antes, el metabolismo del iAs involucra la producción de DMA<sup>3+</sup> que, en presencia de oxígeno, puede formar anión superóxido y un radical dimetilarsínico, que en adición de otra molécula de oxígeno molecular se produce radical peroxil dimetilarsínico que puede ser dañino para las células (Flora, 2011). También se ha propuesto que las especies metiladas de As pueden liberar el ion hierro redox activo (forma ferrosa) de la ferritina, el hierro libre puede generar ROS al promover la conversión de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en radical •OH a través de la reacción de Haber-Weiss (Ahmad et al., 2000). El GSH también participa en las reacciones de reducción durante la metilación del iAs, lo que reduce su concentración libre y de manera indirecta se produce un desbalance entre las defensas antioxidantes y los prooxidantes que generan estrés oxidante (Halliwell y Whiteman, 2004; Flora, 2011).

Es importante destacar que el GSH es la principal molécula antioxidante del sistema nervioso central (SNC) (Sato et al., 2004) por lo que su disminución lo hace vulnerable al estrés oxidante. Se ha demostrado que la exposición al iAs disminuye los niveles de GSH en el

cerebro de crías de rata (Xi et al., 2010), y de ratas adultas (Chaudhuri et al., 1999). Estos cambios se ven acompañados de la inhibición de enzimas antioxidantes en el cerebro como la glutatión peroxidasa (Xi et al., 2010) y glutatión reductasa (Chaudhuri et al., 1999), esta última es importante para mantener la relación GSH/GSSG dentro de la célula. La disminución del GSH en presencia de iAs parece acompañarse del aumento en su síntesis y exportación (Dringen et al., 2016). De hecho, recientemente se demostró que la exposición a al iAs, se incrementa la expresión del transportador xCT (Ramos-Chávez et al., 2015), que es parte esencial de la maquinaria de síntesis de GSH. El transportador xCT es un sistema antiporter que libera una molécula de glutamato al espacio extracelular y a cambio, introduce una molécula de cistina, que en el interior celular, se reduce a cisteína, que es el aminoácido limitante para la síntesis de GSH. Sin embargo, la actividad incrementada de este transportador podría ser deletérea y conducir a excitotoxicidad (Lau y Tymianski, 2010). El estado del GSH (relación GSH/GSSG) dentro de la célula es dinámico y sirve como un indicador de estrés celular o de bienestar y viabilidad celular (Kosower y Kosower, 1978). Los cambios en el estado del GSH, afectan a la célula de diversas maneras, por ejemplo, puede modular la actividad de proteínas que poseen residuos con cisteínas sensibles a los cambios redox (Janssen-Heininber et al., 2008), como es el caso los transportadores de aminoácidos excitatorios (Trotti et al., 1997) y receptores NMDA (Lipton et al., 2002) ampliamente expresados en el SNC.

Los cambios en el estado redox celular inducidos por el iAs pueden disminuir la viabilidad celular e inducir su muerte. El cerebro es un órgano especialmente susceptible a la formación de ROS debido a su alto consumo de oxígeno (20% del total corporal), a la gran cantidad de lípidos no saturados, que son blanco de la lipoperoxidación lipídica y la presencia de metales de transición como el cobre y el fierro (que pueden llevar a la formación de ROS a través de la reacción de Fenton) (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009). Aunado a ello, posee una baja expresión de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GHS-Px).

Sin embargo, la acumulación de iAs y la susceptibilidad a sus efectos varía en las diferentes regiones cerebrales. Por ejemplo, el hipocampo es una estructura especialmente sensible al metaloide en la que se han observado alteraciones funcionales y morfológicas que podrían

ser las responsables de las alteraciones en el aprendizaje y la memoria que se han documentado ampliamente en las poblaciones humanas expuestas (Tyller y Allan, 2014).

### 1.3. Efectos del arsénico sobre el SNC

La exposición continua al iAs tiene efectos deletéreos sobre el sistema nervioso central ya que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (Tollins et al., 2014). Sus efectos se han asociado a síntomas múltiples como: dolor de cabeza (Morton y Caron, 1989), dificultad de concentración, confusión y ansiedad (Bolla-Wilson and Bleecker, 1987; Franzblau y Lilis, 1989), alteraciones de sueño, vértigo, irritabilidad, falta de concentración, depresión (Mukherjee et al., 2003), neuropatías periféricas (Aposhian et al., 2004), incremento en la probabilidad de evento vascular cerebral (EVC) (Chiou et al., 1994; Meliker et al., 2007), y efectos sobre la memoria y el aprendizaje (Tollins et al., 2014, Tyller y Allan, 2014). La severidad de los efectos por exposición al iAs depende de factores como la dosis, la duración de la exposición y la etapa de vida en que la exposición inicia (Mukherjee et al., 2006). De hecho, algunos estudios sugieren que el SNC en desarrollo (gestación e infancia temprana), es más susceptible a los efectos tóxicos del iAs (Basha y Reddy, 2015; Luo y Shu, 2015; Piao et al., 2015). La exposición intrauterina conduce a cambios que se hacen aparentes mucho tiempo después en la vida (Vahter, 2008). Existen estudios epidemiológicos que indican que la exposición durante el desarrollo del SNC está asociada al incremento en la morbilidad de enfermedades en el sistema nervioso (Grandjean y Murata 2007). Por otro lado, varios autores han demostrado que la exposición al iAs en niños de edad escolar, tiene efectos como déficit de memoria y aprendizaje, reducción en el IQ verbal, reducción en el IQ general, déficit de atención y resolución de problemas, (Calderón et al., 2001; Rocha-Amador et al., 2007; Wang et al., 2007; Rosado et al., 2007; Tabla 2).

Localización	Tamaño de la población de estudio	Edad de la población	Diseño del estudio	Métrica de exposición	Nivel de exposición (Media)	Test psicológico *	Efectos observados	Referencias
México	41	6-9	Estudio transversal	As en la orina ajustado a creatinina	62.9ug/g de creatinina	Intelectual WISC-RM	↓IQ verbal, memoria a largo plazo, abstracción lingüística	Calderón et al. 2001
México	132	6-10	Estudio transversal	As en orina ajustado a creatinina y As en el agua bebida	UAs 12.6,116.52.5 ug/g de creatinina; As en el agua bebida 5.8, 169, 195 ug/L	Intelectual WISC-RM	UAs, ↓ escala de IQ, agua bebida con As ↓ función IQ, IQ verbal, escala completa de IQ	Rocha-Amador et al. 2007
México	602	6-8	Estudio transversal	As en la orina	58.1 ug/L	Intelectual WISC-RM, CAT, NLST, VSAFD, PPVT, MAT	↓Memoria, resolución de problemas, atención.	Rosado et al. 2007
Tailandia	529	6-9	Estudio transversal	As en el cabello	3.52ug/L	Intelectual WISC-III	↓ escala completa IQ	Siripitaya-Kunkit et al. 1999
Bangladesh	299	8-11	Estudio transversal	As en sangre y As en orina ajustado a creatinina	As en sangre 4.81ug/L, UAs 246.54 ug/g de creatinina	Intelectual WISC-IV	As en sangre ↓ escala completa IQ, memoria de trabajo, comprensión verbal.	Wasserman et al. 2011

Tabla 2. Efectos cognitivos de la exposición al As en niños modificado de: Tollins et al., 2014.

En modelos de roedores que reproducen los efectos cognitivos del iAs se demostraron que procesos neurobiológicos múltiples, que incluyen: neurogénesis, y vías de señalización glutamatérgicas, colinérgicas y monoaminérgicas, subyacen a las alteraciones en el aprendizaje y memoria de las tareas conductuales. Trabajos recientes han demostrado que la exposición al iAs genera alteraciones en la morfología y función del hipocampo que son responsables de las disfunciones cognitivas. En particular, las tareas como el laberinto acuático de Morris, el laberinto en Y, el laberinto radial de 8 brazos y el laberinto radial en agua, que dependen directamente de la función hipocampales (Luo et al. 2009, Jing et al. 2012, Martínez-Finley et al. y Cronican et al. 2013). Además del mal desempeño en las



pruebas conductuales, los roedores presentaron cambios ultraestructurales en las neuronas hipocampales, como el hinchamiento de las mitocondrias y la expansión del retículo endoplasmático rugoso, así como cambios en la función de la sinapsis glutamatérgica. Esta última dada por la regulación negativa en la expresión de la subunidad NR2A del receptor NMDA (Luo et al., 2009). La fisiología de la sinapsis glutamatérgica en el hipocampo está estrechamente ligada a la inducción del fenómeno de potenciación a largo plazo (LTP), una forma de plasticidad sináptica que subyace a los cambios sinápticos que ocurren durante la formación de la memoria (Rivera-Olvera, 2015).

### Sinapsis glutamatérgicas en el hipocampo

El hipocampo es una estructura bilateral del cerebro. La evidencia obtenida de pacientes humanos, y en modelos animales sugieren que esta estructura juega un papel importante en algunas formas de memoria (Andersen et al., 2007). Morfológicamente está compuesto por dos regiones, el giro dentado (GD) y el *Cornu Ammonis* (CA). La región del CA se subdivide en CA1, CA2 y CA3. Cada una de las regiones está compuesta por una capa principal de células nerviosas, en el giro dentado son las células granulares, mientras que en la región de CA son las células piramidales (Figura 2). Tanto las células granulares como las piramidales están organizadas en una vía trisináptica única, que es glutamatérgica y excitatoria (Taupin, 2007).

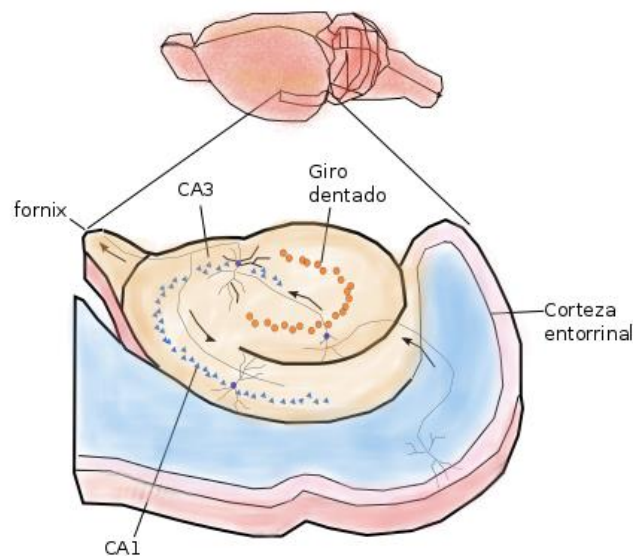


Figura 2. Algunos microcircuitos del hipocampo. 1) La información arriba de la corteza entorrinal vía el patrón perforante del giro dentado. 2) Las células granulares del giro dentado emiten sus axones (fibras musgosas) que

hacen sinapsis con las células piramidales en CA3. 3) Los axones de las neuronas del área CA3 (colaterales de Schaffer), hacen sinapsis con las neuronas piramidales en el área CA1. Tomado y redibujada de Bear et al., 2007.

El glutamato es el principal neurotransmisor en el hipocampo y participa en procesos como: la transmisión sináptica excitatoria rápida, aprendizaje, memoria, plasticidad sináptica, sinaptogénesis y desarrollo neuronal (Agranoff et al., 1999; Gibbs y Hertz, 2005). Además de sus funciones como neurotransmisor el glutamato tiene un papel importante en otros procesos celulares como la regulación de procesos bioenergéticos, forma parte de proteínas y péptidos como el GSH, controla el balance osmótico, está involucrado en la síntesis de ácidos grasos y en la detoxificación del grupo amino de los aminoácidos. Sirve también como precursor para la síntesis de GABA, principal neurotransmisor inhibitorio. Es por ello que cualquier cambio en los niveles normales de glutamato tiene un efecto en la función del cerebro que a veces pueden reflejarse como cambios conductuales (Farooqui et al., 2008).

El glutamato no puede atravesar la barrera hematoencefálica. La mayor parte de la síntesis *de novo* de glutamato ocurre en los astrocitos (Hertz et al., 1999), a partir de glucosa y otros metabolitos del ciclo del ácido cítrico (alfa-cetoglutarato y oxaloacetato), la principal fuente de carbón para la síntesis de glutamato proviene de la glucosa, mientras que el nitrógeno del glutamato proviene de otros aminoácidos que pueden ser transportados al cerebro (Mc Geer et al., 1987). Sin embargo, es importante aclarar que no todo el glutamato proviene de la síntesis *de novo*. El ciclo glutamato-glutamina es importante para mantener las pozas de glutamato (Squirre et al., 2008; Brady et al., 2007. Figura 3)

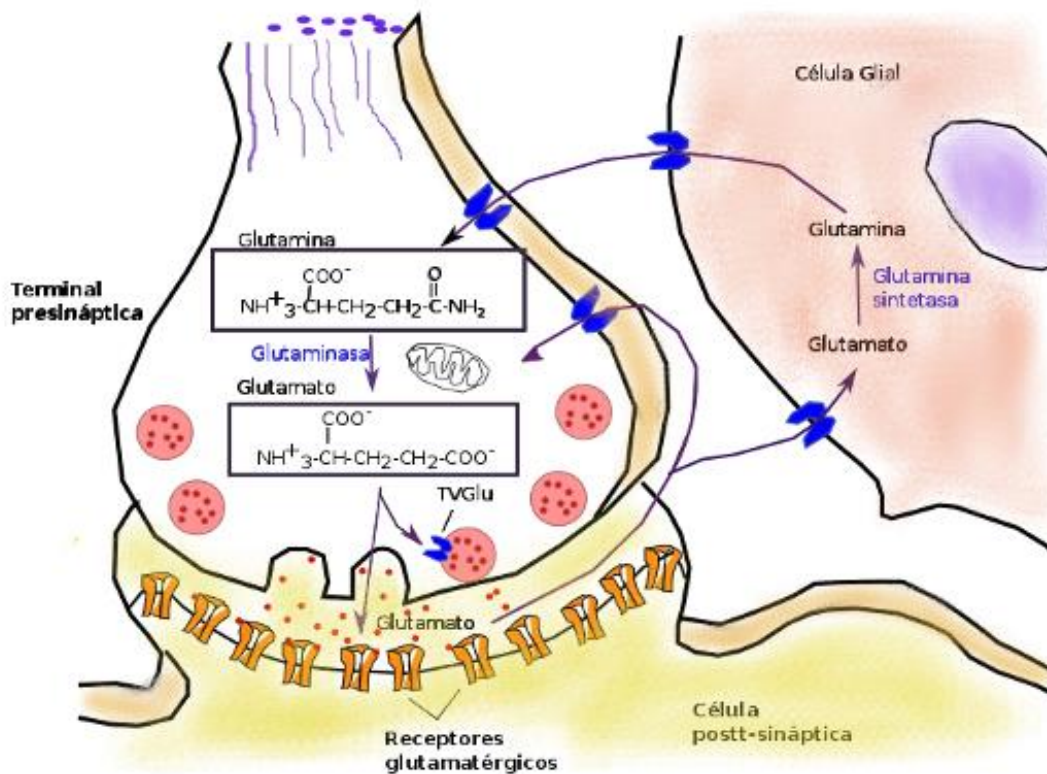


Figura 3. Síntesis de glutamato en el ciclo neurona glía. La acción del glutamato liberado en la hendidura sináptica es terminada con su recaptura, a través de los transportadores de aminoácidos excitatorios (TAEs) presentes en neuronas y glía. En las células gliales el glutamato es convertido en glutamina por acción de la glutamina sintetasa. La glutamina es liberada al espacio extracelular y recapturada por las neuronas donde es reconvertida a glutamato por la glutaminasa. El glutamato es almacenado en vesículas, mediante los transportadores vesiculares de glutamato (VGLU). Tomado y redibujado de Purves et al., 2004.

El glutamato como otros neurotransmisores, se acumula en vesículas sinápticas, que son compartimentos ácidos en las terminales nerviosas que liberan su contenido por exocitosis (Borisova et al., 2011). El empaquetamiento y almacenaje del glutamato en las vesículas requiere de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs), que son complejos proteicos multiméricos, localizados en la membrana vesicular (Brady et al., 2007). Estos transportadores utilizan el gradiente electroquímico de protones como fuerza impulsora (Farooqui et al., 2008). Una vez liberado el glutamato puede alcanzar concentraciones muy altas en la hendidura sináptica (1-5 mM) (Clements, 1996). Esto permite la activación de los receptores postsinápticos a glutamato ionotrópicos y metabotrópicos. Sin embargo, la función del neurotransmisor termina rápidamente cuando difunde fuera de la hendidura y es

recapturado a través de los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs). Si esto no ocurre, los receptores se sobreactivan y el incremento de calcio intracelular, puede conducir a excitotoxicidad (muerte neuronal causada por la activación de los receptores de aminoácidos excitatorios como los del glutamato (Olney, 1979). También se ha sugerido que si el glutamato no es recapturado rápidamente y difunde en los alrededores de la terminal, puede activar a receptores extrasinápticos (Segovia et al., 2001), que inducen cascadas de señalización que también derivan en excitotoxicidad (Lai et al., 2014).

### 1.3.1. Receptores de glutamato

Los receptores de glutamato son proteínas transmembranales que se unen de manera específica a este neurotransmisor en el lado extracelular de la membrana. Están presentes tanto en la membrana presináptica como postsináptica, y su activación inicia procesos de señalización intracelular. Hay dos tipos de receptores a glutamato: los ionotrópicos y los metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos están directamente acoplados a un canal de cationes y son responsables de mediar la respuesta sináptica excitatoria rápida. Por otro lado, los receptores metabotrópicos ejercen su función a través de proteínas G y la activación de segundos mensajeros. Estos receptores están involucrados en la generación de la respuesta sináptica lenta y la modulación de la excitabilidad neuronal (Monaghan et al., 1989; Schoepp et al., 1990).

#### Receptores ionotrópicos:

Los receptores ionotrópicos se nombran de acuerdo a su agonista preferencial el N-methyl-D-aspartato (NMDA), el ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazole propionato (AMPA) y el kainato (KA).

Los receptores NMDA son canales iónicos compuestos por tetrámeros de diferentes subunidades (Neal et al., 2012) que están codificadas por 7 genes. Entre ellos NR1, NR2A-NR2D y NR3A-NR3B. Se ensamblan funcionalmente con dos subunidades obligatorias NR1 (GluN1; la subunidad con sitio de unión a glicina) y dos subunidades que pueden ser del tipo NR2 (GluN2; la subunidad donde se une el glutamato) o NR3. La expresión o presencia de las subunidades en los receptores varía dependiendo de la etapa de desarrollo y de la región del cerebro. Las subunidades NR2A y NR2B son las subunidades accesorias predominantes

en el hipocampo (Baranowska-Bosiacka et al., 2012), en esta estructura los complejos NMDA extrasinápticos están compuestos predominantemente por la subunidad NR2B mientras que en los sinápticos predominan las subunidades NR2A (Toscano 2005). La expresión de las distintas subunidades del receptor NMDA, puede ser regulada por el nivel de actividad presente en la sinapsis. Por ejemplo, una disminución en la actividad sináptica hace que en la densidad postsináptica disminuya la subunidad NR2A mientras que incrementa a las subunidades NR2B (Toscano 2005).

Los receptores AMPA, median la transmisión sináptica excitatoria rápida y son permeables principalmente a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Están conformados por tetrámeros de las 4 subunidades (GluA1-GluA4, antes  $\text{GluR}_1 - \text{GluR}_2$ ) y las propiedades fisiológicas del receptor dependen de la combinación de subunidades (Brady et al., 2007). Por ejemplo, los receptores que no tiene la subunidad  $\text{GluR}_2$  son muy permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ . En el hipocampo los receptores AMPA son principalmente tetrámeros de las subunidades  $\text{GluR}_1$ -  $\text{GluR}_2$  (Farooqui et al., 2007).

Los receptores AMPA son regulados a través de la fosforilación en residuos de serina, treonina, y tirosina, presentes en las subunidades GluA1, GluA2 y GluA4, por la acción de la calcio calmodulina cinasa II (CaMKII) y la proteína cinasa C (PKC). La fosforilación es un mecanismo rápido, a corto plazo y dinámico que modula las propiedades electrofisiológicas, morfológicas (tráfico para la externalización o internalización y formación de agrupaciones de receptores), y bioquímicas (composición de subunidades y síntesis) de los receptores AMPA, así como interacciones proteína-proteína entre los receptores AMPA y las proteínas intracelulares con las que interactúan (Wang et al., 2005). El tráfico de los receptores GluA1 y GluA2 de las pozas intracelulares a su inserción en la membrana en las porciones sinápticas, puede alterar la fuerza de la sinapsis y ha sido reconocido como uno de los mecanismos centrales que ocurren durante la LTP (del inglés long-term potentiation).

### 1.3.2. Potenciación de largo plazo

La unión de glutamato con sus receptores postsinápticos causa cambios en la neurona postsináptica a través de la activación de segundos mensajeros, que puede conducir a la

regulación del número y composición de los receptores presentes en la membrana postsináptica. A la modulación de la respuesta sináptica excitatoria ante estímulos con diferente frecuencia o intensidad, se le conoce como plasticidad sináptica (Bear et al., 2007). Uno de los procesos de plasticidad sináptica más estudiados es la formación del fenómeno de la potenciación a largo plazo (LTP). Que consiste en el incremento de larga duración de la eficiencia sináptica después de breves periodos de estimulación en sinapsis específicas, Los incrementos en la eficiencia sináptica pueden durar semanas, meses o incluso años (Brady et al., 2007). El proceso de formación de la LTP dependiente de NMDA ocurre cuando se activa este receptor y permite la entrada de calcio. El calcio también activa cascadas de proteínas cinasas, entre ellas la CaMKII. Las moléculas blanco de las cinasas incluyen a todos los elementos celulares que, al activarse, incrementan la sensibilidad a glutamato en la célula postsináptica. Entre ellas está la proteína cinasa A (PKA) a través de la cual se activa el factor de transcripción CREB, que a su vez estimula la expresión de proteínas que regulan la transcripción de otras proteína cinasas y de los receptores AMPA. El daño en los receptores NMDA está asociado con la pérdida de la LTP y deterioro de los procesos de memoria y aprendizaje en el hipocampo (Toscano, 2005).

### 1.3.3. Recaptura de glutamato

El glutamato juega un papel central en la formación de la LTP, por esta razón su concentración en el espacio sináptico está regulada de manera estricta. La actividad del glutamato termina cuando es removido del espacio extracelular a través de los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs). La remoción del glutamato tiene dos pasos, primero la unión del glutamato con el transportador y segundo la translocación del glutamato al interior de la célula. Los transportadores están localizados en regiones aledañas a las terminales sinápticas (Seal y Amara 1999). Hasta el momento se han caracterizado 5 transportadores de glutamato: el transportador de glutamato y aspartato (GLAST/ EAAT1), y el transportador 1 de glutamato (GLT-1/ EAAT2) se localizan principalmente en astrocitos; el resto de los transportadores (EAAC1 /EAAT3, EAAT4 y EAAT5) son específicos de neuronas. EAAT4 está presente en cerebelo mientras que EAAT5 se expresa en retina. La recaptura de glutamato ocurre en contra del gradiente de concentración y emplea como fuerza

impulsora el gradiente electroquímico a través de la membrana. El glutamato transportado al interior junto con tres iones  $\text{Na}^+$  y un  $\text{H}^+$ , al mismo tiempo un ion de  $\text{K}^+$  es transportado al exterior celular. La bomba de sodio potasio dependiente de ATP, aporta energía para la absorción de glutamato de manera indirecta, ya que por cada molécula de glutamato que es transportada se gasta una molécula de ATP para intercambiar los tres iones de  $\text{Na}^+$  a cambio de dos iones potasio y de este modo mantener el potencial de membrana (Brady et al; 2012).

#### 1.3.4. El transportador xCT

El glutamato presente en el espacio extracelular puede provenir también de fuentes no sinápticas, el glutamato puede ser liberado por otros mecanismos de las neuronas y la glía, el transportador de xCT es el principal responsable del glutamato liberado de esta forma (Williams y Featherstone, 2014). De hecho, la delección del gen xCT en ratones induce a la disminución masiva de glutamato extracelular a menos del 50% en el hipocampo (de Bundel et al., 2011; Massie et al., 2011).

El sistema Xc- es un transportador “antiporter” de cistina/glutamato que funciona a favor del gradiente de concentración, con una estequiometria de 1:1 y que introduce una molécula de cistina mientras saca una molécula de glutamato al espacio extracelular (Valdovinos-Flores y Gonsebatt, 2013; Massie et al., 2015). Por ello, el sistema Xc- tiene un efecto a ambos lados de la membrana (Seib et al., 2011). El sistema Xc- está compuesto por dos subunidades, la cadena pesada 4F2hc (codificada por el gen *slc3a2*) y la cadena ligera denominada xCT, que le confiere especificidad (codificada por el gen *slc7a11*). Ambas subunidades están unidas por un puente disulfuro (Lewerenz et al., 2012).

La cistina importada por el sistema Xc- en el medio intracelular se reduce a cisteína que es empleada para la síntesis de la molécula antioxidante GSH (Valdovinos-Flores y Gonsebatt 2013; Massie et al., 2015). Mientras que el glutamato exportado por el trasportador puede modular la fisiología de la transmisión sináptica glutamatérgica a través de la activación de los receptores pre y postsinápticos, localizados en la vecindad de la hendidura sináptica (Baker et al., 2002). Por ejemplo, la activación de receptores mGluR 2,3 que son capaces de regular la liberación presináptica de glutamato y dopamina. En cuanto a los receptores intrópicos de glutamato, recientemente se demostró que los ratones sin la subunidad xCT

funcional (xCT<sup>-/-</sup>), presentan un incremento en la expresión de receptores AMPA en las sinapsis CA1-CA3 del hipocampo, que se acompaña del aumento de la transmisión sináptica glutamatérgica. El efecto es revertido al incubar el tejido en una solución con concentraciones similares de glutamato a la de los ratones silvestres. Los autores proponen que esto sugiere que la acción de xCT modula la abundancia de los receptores AMPA como parte de sus funciones normales en la célula (Williams y Featherstone, 2014). Otros autores han demostrado que el glutamato liberado por xCT activa a los receptores extrasinápticos NMDA (Pow, 2001; Baker et al., 2002; Moran et al., 2005; Kupchik et al., 2012). De este modo, altas concentraciones de glutamato extracelular podrían inducir a excitotoxicidad (Qin et al., 2006; Hardingham y Bading 2010; Bridges et al., 2012). De hecho, el aumento en la actividad del sistema Xc<sup>-</sup> ha sido observada en diversas patologías, donde el incremento en el eflujo de L-Glutamato a través de este sistema puede ser lo suficientemente excesivo como para alcanzar niveles excitotóxicos y contribuir a la pérdida neuronal (Piani y Fontana, 1994; Brager y Basile, 2001; Seib et al., 2011; Van Lifferinge et al., 2016).

#### 1.4. Efectos tóxicos del iAs sobre la sinapsis glutamatérgica

Los efectos de este metal sobre la neurotransmisión glutamatérgica son variados. A nivel presináptico se ha observado una disminución en la presencia de vesículas sinápticas (Luo et al., 2009). Mientras que a nivel postsináptico se han reportado cambios en la composición de los receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos.

Diversos artículos presentan evidencia de cambios a nivel de los receptores NMDA, sin embargo, los cambios observados en la regulación de las distintas subunidades no siempre concuerdan. Las diferencias pueden deberse a que la forma y dosis en que el iAs es administrado suelen ser diferentes, dificultando la comparación. Los tres estudios que a continuación se mencionan fueron realizados en el hipocampo. Luo et al. (2009) reportan una reducción en los receptores NR2A sin cambios en el receptor NR1 ni NR2B en ratas tratadas crónicamente con arsenito de sodio (2-68 ppm) durante 3 meses. Por otro lado, Huo et al. (2014), trataron ratas con una dosis de 2.7g/kg (que equivale 2700 ppm) de sulfuro de arsénico durante 6 semanas y observaron una disminución de 26% en la expresión de la



subunidad NR1 y un incremento en la subunidad NR2A. Finalmente, nuestro grupo de trabajo ha documentado el efecto de la exposición gestacional a As sobre la cantidad de las subunidades NR2A y NR2B de los receptores ionotrópicos NMDA en hipocampo y corteza (Ramos-Chávez et al., 2015). Se observó en el hipocampo de ratones de 15 días de edad, una disminución en las subunidades NR2B y NR2A. Este mismo efecto se vio a los 3 meses de edad en los animales que sólo se expusieron al iAs hasta el destete. En cambio, los ratones expuestos crónicamente, no presentaron diferencias significativas en la expresión de las subunidades a los tres meses de edad. Sin embargo, en ellos se vio una tendencia al alza en la subunidad NR2A y a la baja en la subunidad NR2B. En la prueba de reconocimiento de objeto y lugar, se observó una disminución en el periodo de exploración del objeto reposicionado en los ratones que habían sido expuestos crónica y gestacionalmente al iAs. Estos cambios conductuales observados podrían deberse a las alteraciones en la expresión de las subunidades del receptor NMDA descritas arriba. En conjunto, estos resultados sugieren que el iAs tiene efectos negativos sobre el hipocampo ya que ambas pruebas conductuales dependen de la correcta función de esta estructura.

En el hipocampo, los receptores NMDA y AMPA tiene un papel importante en la formación de LTP, un mecanismo de plasticidad sináptica que se cree que subyace a los procesos cognitivos de memoria y aprendizaje.

En cuanto a los efectos del iAs sobre las subunidades del receptor AMPA (GluA1-GluA4) sólo existe un reporte realizado por Maewaka et al. (2013) donde reportan que la exposición a 0.01  $\mu\text{M}$  de arsenito de sodio ocasiona la disminución en la subunidad del receptor GluA1 en cultivos celulares de astrocitos, pero no en las subunidades GluA2 y GluA3 que fueron analizadas en conjunto. Sin embargo, se desconoce el efecto del iAs sobre las subunidades de este receptor en el hipocampo o los efectos en animales íntegros. Tampoco se ha estudiado la correlación entre los cambios en las subunidades del receptor AMPA y los procesos de memoria y aprendizaje en presencia del iAs.

También se han encontrado evidencias del efecto del As sobre la LTP en rebanadas de hipocampo de rata adulta expuestas a especies metiladas de arsénico particularmente DMA<sup>3+</sup> que genera una reducción de entre 60-70% en la amplitud de la LTP en la vía de las colaterales de Schafer-CA1. El efecto sobre el fenómeno de la LTP parece ser más fuerte en las rebanadas de cerebros jóvenes (17 días) que en la de adultos (40 días) (Kruger et al.,

2005). Estos hallazgos son relevantes porque la especie DMA de arsénico es el metabolito más abundante en los tejidos después del consumo de iAs (Ramos-Chávez et al., 2015). Finalmente, la exposición al iAs puede alterar las concentraciones de glutamato extracelular y de este modo dañar la sinapsis glutamatérgica. En el 2014 Huo et al., demostraron que la exposición al iAs de la forma (As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>) durante 6 semanas, genera el aumento de la especie de DMA en el hipocampo, que está acompañada del aumento en la concentración de glutamato extracelular en esta estructura. Se desconoce si la fuente de glutamato extracelular es vesicular o podría provenir de la actividad incrementada del transportador xCT. En sus experimentos también observaron la inhibición de la síntesis del RNAm y de la disminución en la expresión de la proteína GLT-1 (principal recapturador de glutamato), sugiriendo que la disfunción del recapturador podría incrementar el glutamato extracelular.

## **2. Planteamiento del problema**

En la actualidad existen pocos estudios que investiguen el efecto de la exposición al iAs durante el desarrollo *in utero*. (Vahter, 2009 en Rámos-Chavez et al., 2014). Sin embargo, se han reportado efectos neurotóxicos en niños e infantes, en poblaciones expuestas. Aunque el mecanismo que hace más vulnerable al cerebro en desarrollo no se entiende completamente, los cambios que ocurren en el cerebro durante el desarrollo en presencia de iAs parecen ser irreversibles (Tollins et al. 2014). El efecto neurotóxico de la exposición a dosis bajas de iAs provoca problemas de memoria y aprendizaje (Siripitayakunkit et al. 1991; Ehrenstein et al., 2007; Rosado et al., 2007 y Dong et al., 2009).

En nuestro grupo de trabajo se demostró recientemente que la exposición gestacional y crónica al iAs conduce al aumento de GSSG en el cerebro de las crías en el primer día post natal (PND1), sugiriendo un cambio en el estado oxidante del cerebro, que se acompañó del aumento en la presencia de los transportadores L-cys (LAT1), el sistema transportador X<sub>c</sub><sup>-</sup>, (L-cys 2) y EAAC1. Esto sugiere que en presencia de iAs se promueve la síntesis de GSH, ya sea por el metabolismo asociado a la eliminación del metaloide, porque hay cambios en el estado redox celular, o por ambas cosas. Los ratones de 15 días de edad también mostraron un aumento en la presencia del transportador X<sub>c</sub><sup>-</sup> en la corteza cerebral y el hipocampo, mientras que los animales de 3 meses, sólo en el hipocampo (Ramos-Chávez et al., 2015). Aunque el transportador participa en la homeostasis del estado redox, los cambios provocados por el iAs en su función podrían incrementar la concentración extracelular de glutamato, afectando su neurotransmisión o promoviendo excitotoxicidad.

Existen pocos reportes del incremento de glutamato extracelular en presencia de iAs, en uno de ellos Huo et al., (2014) probaron que el consumo de realgar (As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>) incrementa los niveles de glutamato extracelular en el hipocampo, contribuyendo a la generación de excitotoxicidad en estas condiciones. Estos autores además reportaron que la acumulación de glutamato en el espacio extracelular se acompañaba de cambios en la composición de las subunidades NMDA, que a su vez afectaban la función sináptica glutamatérgica. En el modelo experimental empleado en nuestro grupo de trabajo, se encontraron cambios en la presencia de proteínas de las subunidad NR2A y NR2B del receptor NMDA en las fracciones membranales (Ramos-Chávez et al., 2015) que en conjunto con la modulación positiva

observados en el transportador Xc- y una negativa en el recapturador de glutamato GLT-1 , permiten suponer un aumento en la concentración extracelular de glutamato.

Es importante explorar si el incremento en la presencia del transportador Xc- ocurre como consecuencia de los cambios en el estado oxidante de las células del hipocampo, y si a través de este mecanismo, se producen cambios en la concentración de glutamato extracelular en el hipocampo. En este panorama, también es necesario evaluar si los cambios en la concentración extracelular de glutamato se relacionan con la modificación en la abundancia de las diversas subunidades de receptores AMPA y NMDA en la misma estructura. Explorar estas relaciones y asociarlas con los posibles cambios en procesos cognitivos, permitirá entender mejor el papel del transportador Xc- en la neurotoxicidad por iAs.

### 3. Hipótesis

La exposición crónica al iAs desde el desarrollo embrionario y en las etapas críticas del desarrollo del cerebro, generará estrés oxidante, aumento del glutamato extracelular en el hipocampo afectando negativamente la plasticidad sináptica que se reflejará como una reducción en la LTP y en el desempeño de pruebas de memoria y aprendizaje.

#### 4. Objetivos:

1. Determinar la concentración de GSH, GSSG en el SNC de ratones expuestos a arsenito de sodio a los 3 meses de edad.
2. Cuantificar la concentración de glutamato extra e intracelular en las condiciones experimentales y controles por medio de microdiálisis.
3. Medir los cambios en la expresión de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA.
4. Caracterizar y comparar el fenómeno de inducción de LTP en animales control (sin tratamiento del iAs) y tratados gestacional y crónicamente con iAs
5. Valorar el efecto del tratamiento con iAs en tareas de memoria espacial, a través de la prueba de laberinto acuático de Morris.

## 5. Material y métodos

### **Protocolo experimental**

Se obtuvieron ratones machos y hembras de 8 semanas de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los animales fueron mantenidos en cajas con 4 animales cada una, en condiciones de fotoperiodo de luz oscuridad 12:12, a 23°C y con alimentación *ad libitum*. Los animales fueron separados en dos grupos: As y control. El grupo As (hembras y machos) recibió 20 mg/l o ppm de arsenito de sodio en el agua de consumo, que fue remplazada diariamente por una solución fresca. En el día 30 de exposición los animales fueron separados en cajas con un macho y una hembra para la cruce. El grupo As continuó ingiriendo 20ppm de arsenito de sodio, el inicio de la gestación se estimó a partir de que se presentó el tapón vaginal, sin embargo, el macho solo fue separado de la caja cuando el crecimiento del vientre de las hembras fue evidente. Los sacrificios se realizaron en los días postnatales 1, 15 y 90 para la obtención de tejidos para las diferentes pruebas. En el caso de los ratones sacrificados en el día posnatal (PND1) debido a la pequeña cantidad de tejido en estos animales, se utilizó el cerebro completo para hacer las determinaciones. A los ratones sacrificados en el PND15 y 90 el cerebro fue disectado en frío para la obtención de las regiones corteza e hipocampo, y los tejidos fueron congelados a -80° C hasta el momento de las determinaciones.

### **Determinación del sistema GSH**

La concentración de GSH y GSSG fue medida en el hipocampo y corteza de los ratones en el PND 90, empleado el método fluorométrico de O-ftalaldehído (Senft et al., 2000), adaptado para microplacas de 96 pozos. Las lecturas de fluorescencia fueron tomadas a 365nm de excitación y 430 nm de emisión con el lector de placas Beckman Coulter DTX 800/880 Multimode Detector.

### **Determinación de glutamato extracelular**

#### *Experimentos de microdiálisis*

Estos experimentos fueron llevados a cabo en el laboratorio de la Dra. Lourdes Massieu bajo la supervisión y asistencia de la Biól. Teresa Montiel. Para estos experimentos se usaron

ratones del PND 90, los animales fueron anestesiados con isoflurano y fijados en el aparato estereotáxico. Se emplearon sondas de 1 mm de largo y 0.5 mm de diámetro (CMA 12 Harvard Apparatus), que fueron implantadas en la región del giro dentado en el hipocampo en las coordenadas: AP -1.82 a partir de Bregma, ML -1.1 a partir de la línea media y DV -2.0 desde la duramadre. La cánula de microdiálisis fue perfundida continuamente con Ringer Krebs (NaCl 118mM, KCl 4.5mM, MgSO<sub>4</sub> 2.5mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.0mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5mM, NaHCO<sub>3</sub> 25mM, y glucosa 10mM), a un flujo continuo de 2µl/min con una bomba de microinyección, las fracciones fueron colectadas y conservadas en frío en un colector automático de fracciones (BASi Bionalytical System). Después de 45 minutos de estabilización post operatoria, se inició con la colección de las fracciones (50µl), 3 basales con Ringer Krebs. Las muestras fueron almacenadas a -80° C hasta su determinación.

### ***Determinación por HPLC***

La concentración de L-Glu fueron medidos mediante cromatografía de alta eficacia o high-performance liquid chromatography (HPLC), por la Dra. Verónica Rodríguez, siguiendo la metodología empleada por Mejía-Toiber et al (2010). Brevemente, las concentraciones de glutamato fueron determinadas en un equipo HPLC 1100 Series Agilent Technologies (Agilent Technologies), usando columnas de fase reversa C18 (ESA HR 80 column ESA, Inc) y un sistema de detección electroquímica (Coulouchem III, ESA, Inc). Después de la derivatización de la precolumna con O-ftalaldehído, la fase móvil fue un buffer de 50 mM de fosfato de sodio, con 25% metanol, y pH 6.75. La velocidad del flujo fue de 1.2 mL/min. La curva de calibración fue construida con una solución estándar de L-glu, para estimar correctamente el contenido de L-Glu en las muestras.

### **Western Blot**

Se empleó el método de Schindler et al. (2006) para obtener proteínas membranales a partir de tejido congelado. Para ello el tejido fue homogenizado en 2 volúmenes de buffer de extracción BCL (10 mM HEPES, 10 mM NaCl, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM EDTA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, y 10 mg/ml aprotinina y leupeptina), después de incubar en hielo por 10 min, se agregaron 0.1 volúmenes de sacarosa 2.5M y se centrifugó a 6300 x g a 4°C durante 10 min. El sobrenadante fue colectado y almacenado en hielo, el pellet fue resuspendido en 2 volúmenes de buffer CLB que contenía 0.1 volúmenes

de sacarosa 2.5 M y nuevamente centrifugado a 6300 x g a 4° C durante 10 min. Se combinaron los sobrenadantes obtenidos en las dos centrifugaciones y se centrifugaron a 100,000 x g durante 30 min. El pellet fue recuperado y reconstituido en buffer (40 mM Tris-HCl, pH 9.5, 8 M urea y 4% (w/v) Triton X-100). La concentración de proteínas fue determinada con el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Las proteínas (30 µg) fueron separadas con voltaje constante de 100mV en geles de poliacrilamida-SDS al 8% y posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa en condiciones de amperaje constante 200mA. Se verificó que la electrotransferencia ocurriera de manera efectiva tiñendo con rojo Ponceau, después las membranas fueron bloqueadas con leche en TBS-Tween 20 durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario GluA1 (ab109450 Abcam), GluA2 (ab133477, Abcam), Sinaptofisina o β-tubulina (T4026 Sigma-Aldrich). Las proteínas fueron evidenciadas mediante un anticuerpo secundario ligado a peroxidasa de rábano (HRP) y usando el reactivo para detección ECL Prime (GE Healthcare Bio-Sciences) fueron reveladas y digitalizadas en el escáner C-DiGit de LI-COR. La densitometría fue analizada con el programa Image J (versión 1.49v).

### **Registros electrofisiológicos**

Estos experimentos fueron llevados a cabo en el laboratorio de la Dra. Martha Escobar con el apoyo del Dr. Luis Rodríguez Durán.

Los animales fueron anestesiados durante los procedimientos quirúrgicos y electrofisiológicos con pentobarbital (50 mg/Kg), la temperatura del animal fue mantenida empleando una compresa de gel. Cada ratón fue fijado en el aparato estereotáxico y el cráneo fue expuesto. Las respuestas fueron registradas unilateralmente usando un electrodo monopolar de acero inoxidable, localizado en el giro dentado (GD) en las coordenadas: AP -1.8 a partir de Bregma, ML -1.5 a partir de la línea media y DV -2 desde la superficie del cráneo, las respuestas fueron evocadas unilateralmente a través de un electrodo de estimulación bipolar trenzado de acero inoxidable de 100 µm de diámetro, que fue colocado en el patrón perforante (PP) en las coordenadas: AP -3.8 a partir de Bregma, ML -2.5 a partir de la línea media y DV -1.5 desde la superficie del cráneo. La estimulación fue suministrada por un estimulador Grass S48 y aplicada al electrodo de estimulación a través de una unidad



PSIU6. Las respuestas evocadas fueron enviadas a un amplificador Grass P5. La señal fue digitalizada para su almacenamiento y análisis en una computadora provista del software Datawave SciWorks (Longmont, CO).

#### ***Curvas entrada /salida o input/ output (I/O)***

Las curvas I/O fueron generadas con el propósito de determinar la eficiencia sináptica basal para un rango determinado de intensidades de estimulación, se midió la relación entre la entrada de corriente y la salida de voltaje (I/O) en la vía del PP-GD, utilizando múltiplos de una intensidad basal (1x-10x). La intensidad basal fue determinada como la estimulación necesaria para evocar una respuesta de 0.2mV.

#### ***Facilitación por pulsos pareados (PPF)***

Los pulsos pareados fueron evaluados a través de la variación sistemática del intervalo entre los pulsos (10-240 ms). La intensidad de la corriente del estímulo aplicado correspondía con el 50% de amplitud máxima del potencial post sináptico excitatorio (EPSP)

#### ***Inducción del fenómeno de potenciación de largo plazo (LTP)***

Se estableció una línea base de 20 minutos evocando respuestas cada 20ms. La intensidad de la corriente del estímulo aplicado correspondía con el 50% de amplitud máxima del potencial post sináptico excitatorio (EPSP). El fenómeno de LTP fue inducido después de aplicar estimulación de alta frecuencia 5 trenes, cada uno de 10 ráfagas con 20 pulsos a 400Hz. El tiempo inter-tren fue de 15s.

#### **Prueba conductual del laberinto acuático de Morris.**

Para la prueba de laberinto acuático de Morris se emplearon animales de 90 días de edad, 8 del grupo control y 8 animales expuestos al iAs. Las pruebas fueron realizadas a las 19:00 h, bajo luz roja, para evitar interferir con el ciclo circadiano de los animales.

El laberinto acuático consistió de una tina blanca, circular de plástico con un diámetro de 1.54 m y una profundidad de 0.60 m. El tanque se llenó con agua de la llave a 22° C hasta una profundidad de 35 cm, la temperatura del agua revisada diariamente y ajustada a 22° C

$\pm 1^\circ$  C. El laberinto estaba ubicado en un cuarto con pistas externas a la tina. Además, se colocaron 4 pistas en el perímetro de la alberca en cuatro puntos distribuidos equitativamente, dividiendo a la alberca en 4 cuadrantes. Las pistas permanecieron en la misma posición durante todos los días del entrenamiento y en el día de la prueba de memoria. Los animales fueron alojados en el mismo cuarto en el que se encontraba el tanque.

Los animales fueron colocados en el tanque desde alguna de las 8 posiciones de inicio que correspondían con las 4 pistas en el borde de la alberca (NE, SE, NW y SW) o el punto medio entre ellas, que correspondían con las pistas en el cuarto (N, S, E y W), las posiciones de inicio se eligieron azarosamente.

La plataforma de escape estaba hecha de acrílico transparente (10 x 10 cm) y 34 cm de alto; de modo que se cubría totalmente cuando era colocada dentro del tanque. La posición de la plataforma fue constante durante los 6 días del entrenamiento, al centro del cuadrante denominado como SW.

El entrenamiento consistió en colocar a los ratones en la tina viendo hacia las paredes de ésta y permitir durante 60 segundos que nadaran libremente, hasta encontrar la plataforma de escape. Una vez que el ratón encontraba la plataforma se le permitió permanecer en ella durante 60 segundos el primer día y 20 segundos los días subsecuentes del entrenamiento. Si el ratón no conseguía encontrar la plataforma era guiado hasta ella, para el tiempo de reconocimiento. Después del tiempo de reconocimiento el ratón era retirado del tanque y se le regresaba a su caja, hasta el inicio del siguiente ensayo. A lo largo de 6 días cada animal realizó 4 ensayos.

Las sesiones fueron videograbadas y posteriormente analizadas. El tiempo que tardaban en llegar a la plataforma se denominó como latencia de escape y se empleó como medida de la adquisición. Esta variable se midió reproduciendo los videos y cronometrando el tiempo. El séptimo día se realizó la prueba de memoria y para ello se retiró la plataforma del tanque. Los ratones fueron introducidos en la alberca mirando a la pared, desde el punto más lejano al sitio donde estuvo la plataforma durante el entrenamiento (denominado NE). Se permitió a los ratones explorar en busca de la plataforma durante 60 segundos y después fueron retirados de la alberca. El tiempo y la distancia que recorrieron en el cuadrante donde se había ubicado la plataforma, fue empleado como medida de memoria. Los videos del día de prueba

de memoria fueron analizados usando el software EthovisionXT (software 11.5.126, Wageningen, The Netherlands).

## 6. Resultados

### **Concentración de GSH y GSSG**

En la corteza de ratones machos expuestos gestacionalmente y hasta PND 90 al iAs, se observó una disminución del 11% en la concentración de GSH, también se observó un incremento del 40% en la concentración de GSSG, ambos cambios son estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ). En esta estructura no se observaron cambios en la concentración de glutatión total (GT) (Figura 4A). Sin embargo, la relación GSH/GSSG se redujo un 37% en los ratones expuestos al iAs, este cambio es estadísticamente significativo (prueba de “t” de Student,  $P < 0.05$ ; Fig 4C). Por otro lado, en el hipocampo se observó un aumento en la concentración de GSH del 26% que es estadísticamente significativo (prueba de “t” de Student,  $P < 0.05$ ) con respecto al de los animales control. Además, se observó un aumento del 157% en la concentración de GSSG en los animales tratados. El incremento en GSH y GSSG se ve reflejado como un aumento del 29% en la concentración de GT. Los cambios en la concentración de GSSG y GT también son estadísticamente significativos (T de Student,  $P < 0.05$ ; Fig 4B). Sin embargo, en esta estructura la relación GSH/GSSG es tres veces menor en los ratones tratados con As (“t” de Student,  $P < 0.05$ ; Fig 4D).

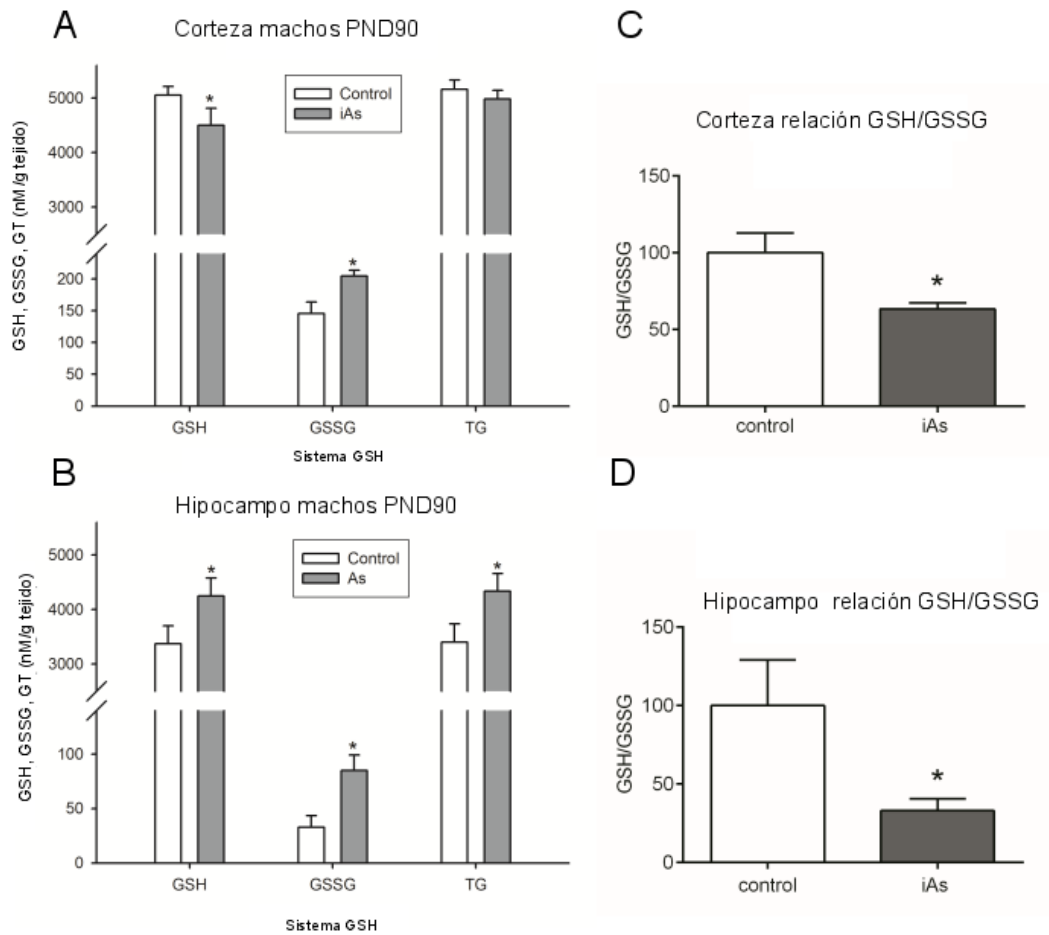


Fig 4. Determinación del sistema GSH en machos de ratón CD1 en el PND 90 controles y expuestos a 20ppm de arsenito de sodio durante la gestación y toda la vida. A la izquierda se presenta la concentración de GSH, GSSG y GT en la A) corteza y B) Hipocampo. En el panel derecho se muestra la relación GSH/GSSG en C) corteza y D) hipocampo. n=6. “t” de Student, el asterisco indica una  $P < 0.05$ , se grafica la media  $\pm$  EE.

### Concentración de glutamato extracelular en hipocampo.

Como en experimentos previos del laboratorio se había observado la inducción del transportador xCT en hipocampo de los animales expuestos, y se ha reportado que este contribuye de manera importante con los niveles extracelulares de L-glu, se evaluó en ratones anestesiados la concentración de éste, en el hipocampo de los ratones usando microdiálisis. Se observó un incremento del 46% en la concentración basal de glutamato extracelular en los ratones expuestos al iAs ( $477.8 \pm 81.9$  ng/mL), con respecto a lo observado en los animales control ( $326.8 \pm 43.2$  ng/mL; Fig 5).

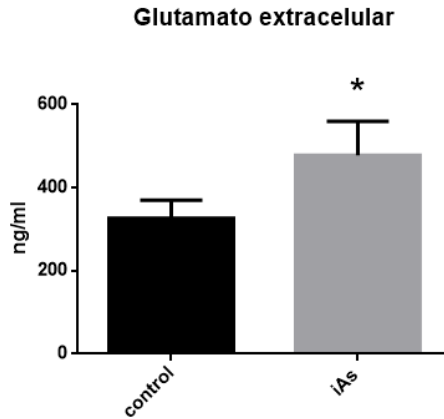


Fig 5. Cuantificación por microdiálisis de la concentración extracelular de glutamato. Los asteriscos representan las diferencias estadísticas entre los animales control e iAs (prueba de t de Student,  $P < 0.05$ ;  $n=6$ ).

### **Cambios en las subunidades del receptor AMPA**

Se realizaron determinaciones de la expresión de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA en la fracción membranal de homogenados de hipocampo y corteza de 6 ratones contrales y 6 tratados con iAs al PND90. Se usó la expresión de  $\beta$ -tubulina como control de carga. En la corteza no se observaron cambios significativos en presencia de iAs en las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA. Sin embargo, se observó una tendencia a la disminución de la subunidad GluA1. En contraste, en el hipocampo se observó una disminución en la presencia de ambas subunidades GluA1 57% y GluA2 53%, ambos con diferencias estadísticamente significativa (prueba de “t” de Student,  $P < 0.05$ ; Fig. 6).

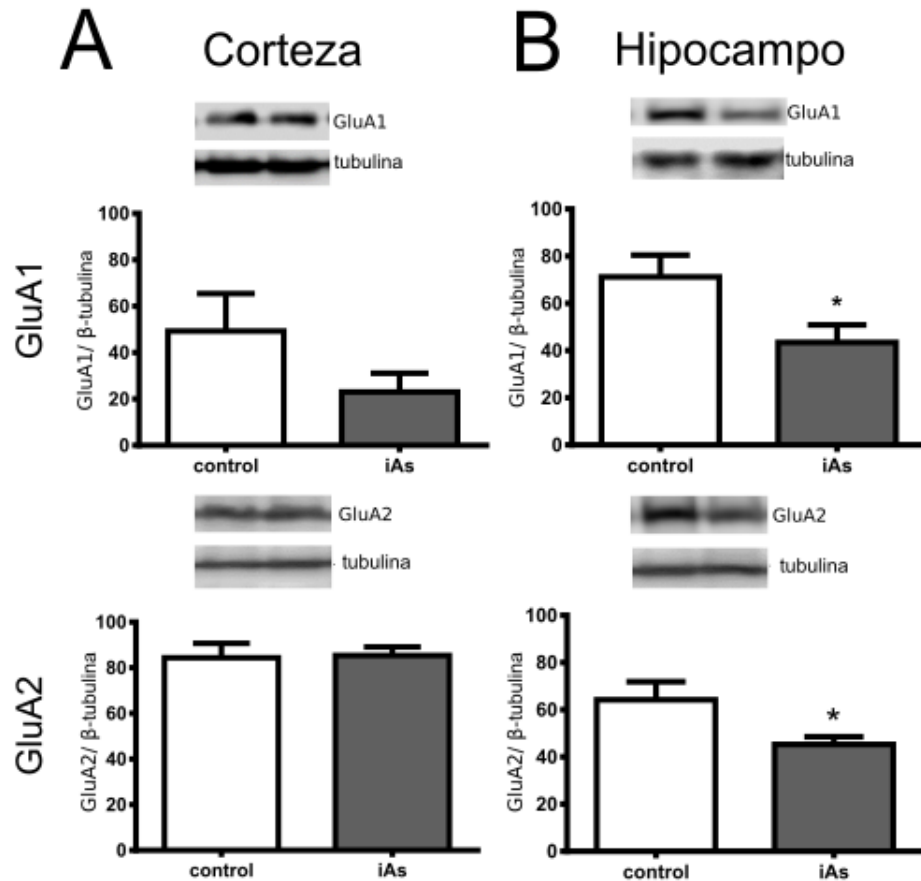


Fig 6. Cuantificación relativa de expresión de proteína de la subunidad GluA1 y GluA2 del receptor AMPA en la corteza e hipocampo de ratones macho en el PND90. A) En la parte superior se muestran las inmunotinciones con suero anti GluA1 y tubulina. En el panel inferior se muestra las inmunotinciones con suero anti GluA2 y tubulina. Los datos fueron analizados usando la prueba de “t” de Student, con asteriscos se marcan las diferencias significativas con respecto a los controles  $P < 0.05$ . GluA1 control  $n=5$ , iAs  $n=6$ ; GluA2 control  $n=6$ ; iAs  $n=6$ . Se grafica la media  $\pm$  ee.

## LTP

Después de la estimulación de alta frecuencia se registró durante 2h la respuesta postsináptica (Fig. 7), y se observó que tanto en los animales control como en los que recibieron iAs en el agua de consumo, fue posible inducir el fenómeno de la LTP. Después del estímulo de alta frecuencia se observó un incremento en las pendientes del potencial postsináptico excitatorio (EPSP slope) de 75% en los animales control y de 38% en los animales tratados con iAs con

respecto al valor de pendiente basal. La diferencia en el incremento de la pendiente EPSP entre los grupos resultó significativa en una prueba de ANOVA de una vía con medidas repetidas (F de 2406.48,  $P < 0.001$ ), y en la prueba *post hoc* de LSD ( $P < 0.001$ ). Esto sugiere que la capacidad para inducir el fenómeno de la LTP en los animales tratados con iAs esta disminuida. El fenómeno de la LTP también fue analizado a través de los cambios en la pendiente de la espiga poblacional (fig. 8), en la que se observó un aumento del 179% en los animales control y del 84% en los animales tratados, con respecto al valor de la pendiente basal. El análisis de la prueba de ANOVA de una vía con medidas repetidas resulto significativo (F de 5926.73,  $P < 0.001$ ), y en la prueba *post hoc* de LSD ( $P < 0.001$ ).

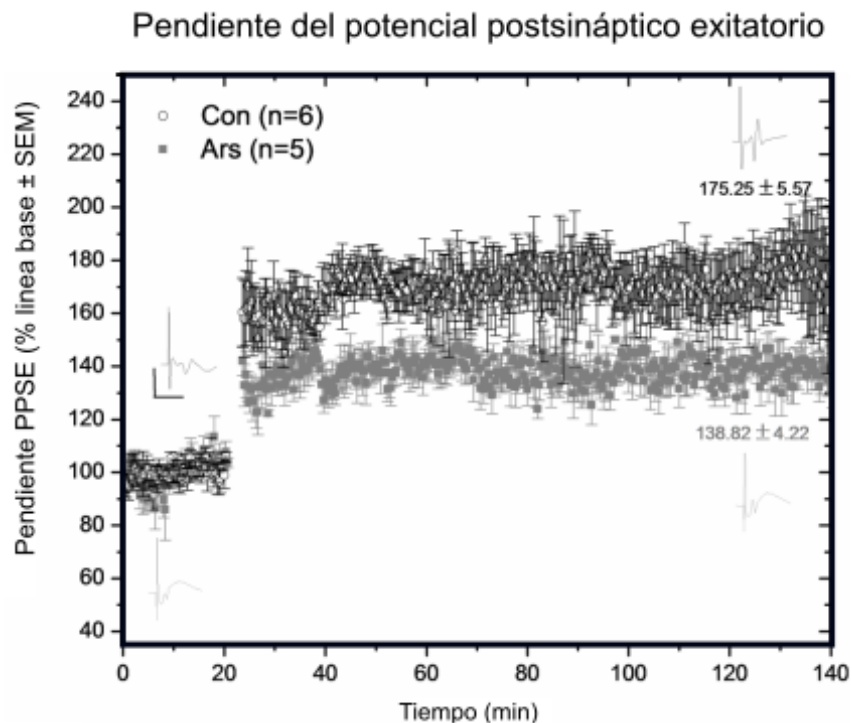


Fig 7. Efecto del iAs sobre la capacidad para inducir el fenómeno de LTP de la pendiente del potencial postsináptico excitatorio. Los trazos muestran ejemplos representativos de los EPSP previo a la estimulación y durante los últimos 20 minutos de registro. Los números al interior de cada gráfica representan la media  $\pm$  ee, del cambio en la pendiente de los EPSP. La flecha indica el momento de estimulación de alta frecuencia.

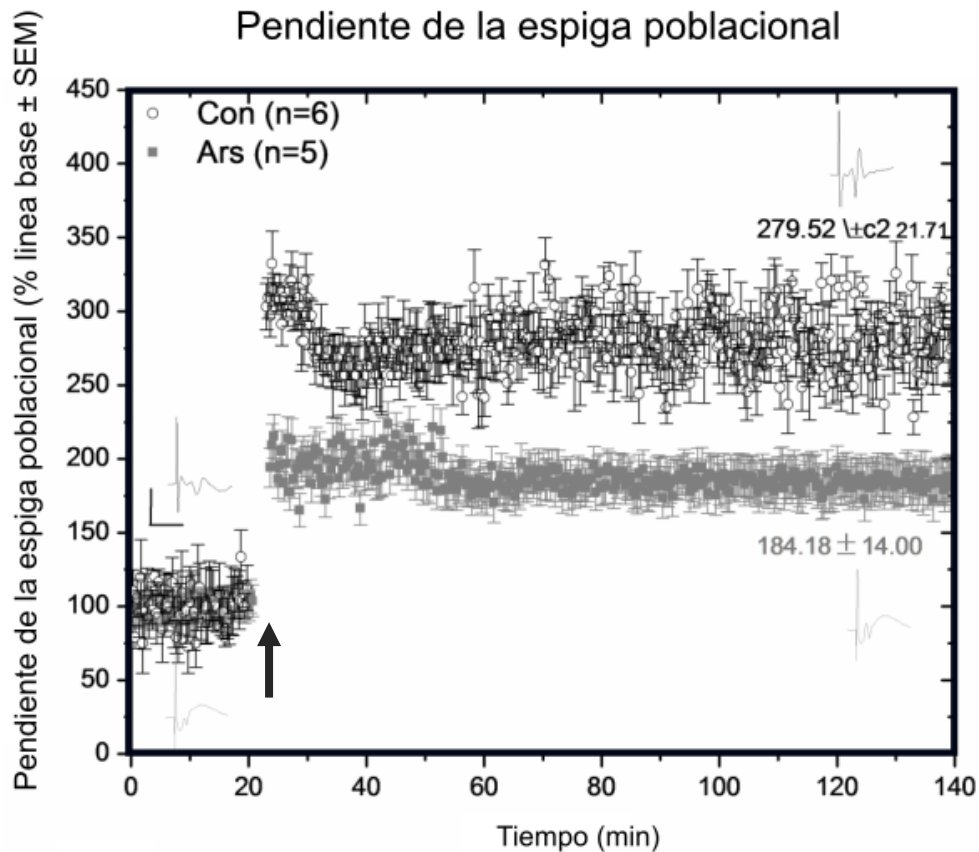


Fig 8. Efecto del iAs sobre la capacidad para inducir el fenómeno de LTP de la pendiente de la espiga poblacional. Los trazos muestran ejemplos representativos de los EPSP previo a la estimulación y durante los últimos 20 minutos de registro. Los números al interior de cada gráfica representan la media  $\pm$  ee del cambio en la pendiente de los EPSP. La flecha indica el momento de estimulación de alta frecuencia.

#### *Curvas I/O*

Para evaluar la excitabilidad basal se realizaron curvas de I/O, en la figura 9A se muestra que antes de la estimulación de alta frecuencia hay una disminución significativa en la excitabilidad basal de los animales expuestos al iAs.

#### *Facilitación por pulsos pareados*

Para evaluar si el iAs tuvo efectos sobre la presinapsis se realizó la prueba de facilitación por pulsos pareados que refleja el incremento en la probabilidad de liberación de glutamato presináptico. Para ello se hizo una variación sistemática del tiempo inter pulso (10-240ms). Como se muestra en la figura 9B Los animales control presentaron facilitación cuando el



intervalo interpulsos fue igual o mayor a 100 ms. En contraste, un menor número de los animales expuestos al iAs presentaron la facilitación en los mismos intervalos interpulsos que los animales control.

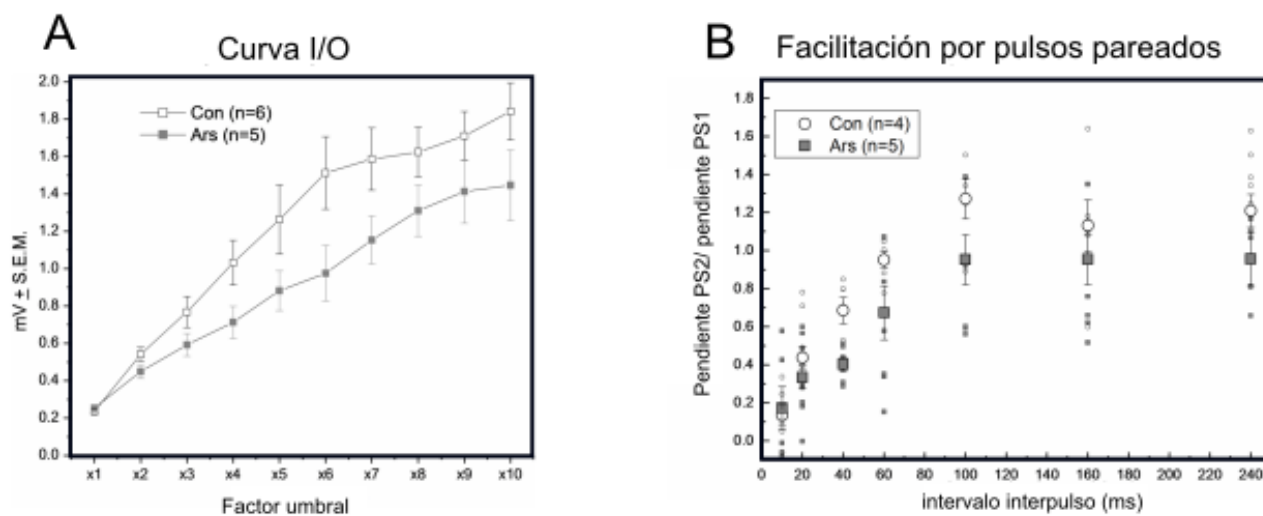


Fig. 9. A) Curvas de I/O de la amplitud del EPSP (media  $\pm$  ee.), para los animales control y expuestos al iAs. B) Prueba de facilitación por pulsos pareados variando el intervalo interpulso de 10 a 240 ms. Se grafica la relación de la pendiente del segundo pulso con respecto al primero. Arriba del valor de uno se considera que hubo facilitación. Cada punto representa la media  $\pm$  ee.

## Pruebas conductuales

### Entrenamiento

Para evaluar el impacto de la exposición al iAs sobre la conducta de los animales, se empleó la prueba de laberinto acuático de Morris. Como se observa en la figura 10, los animales de ambos grupos, control e iAs redujeron significativamente el tiempo de búsqueda de la plataforma. Sin embargo, esta disminución fue observable más temprano en los animales control (día 4) que en los animales iAs (día 6).

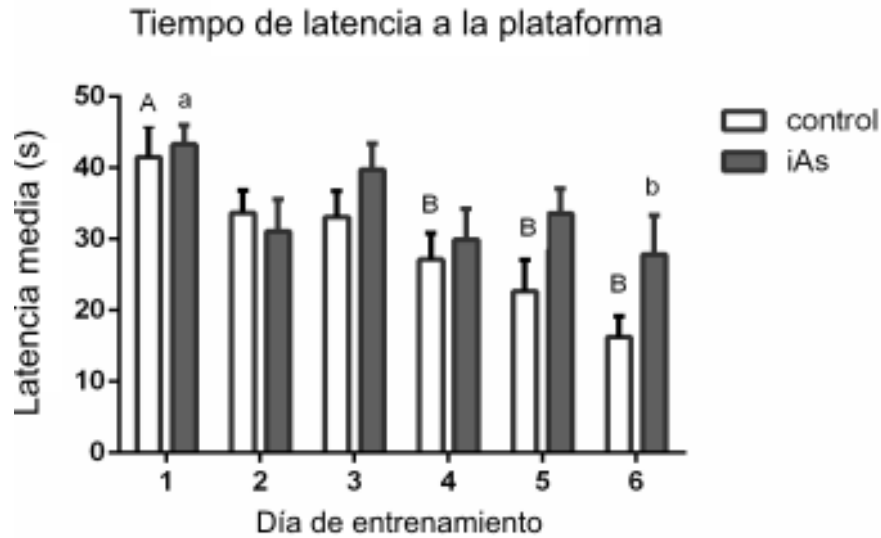


Fig. 10. Tiempo de latencia media a la plataforma de los grupos control y experimental durante las sesiones de entrenamiento. Las diferencias significativas están marcadas con diferentes letras. En mayúsculas el grupo control y en minúsculas el grupo iAs. Los datos fueron analizados con una ANOVA de dos vías para medidas repetidas,  $F = 1.196$ , la prueba *post hoc* fue Sidak,  $P < 0.05$ ;  $n = 8$ .

#### *Prueba de memoria.*

Para esta prueba se analizó un solo intento por animal y se retiró la plataforma, con ayuda del software Ethovision se analizó la distancia y el tiempo acumulado en los cuadrantes del tanque el día de la prueba de memoria. Los animales control mostraron una preferencia por el cuadrante SW (Anova de una vía  $p < 0.05$ ), donde se encontraba la plataforma, la distancia en este cuadrante resultó estadísticamente diferente de los cuadrantes NE y SE (prueba *post hoc* de comparación múltiple Tukey  $p < 0.05$ ) (Fig 11 A). En cambio, no se observó preferencia por ningún cuadrante en los animales expuestos al iAs (Fig 11 B). El análisis de ANOVA de 2 vías ( $p < 0.05$ ), mostró diferencias significativas dependiendo del tratamiento, la prueba *post hoc* Fisher LSD ( $p < 0.05$ ) mostró diferencias significativas en la distancia recorrida en el cuadrante de la plataforma (SW) y en el cuadrante NE por ambos grupos (Fig 11 C).

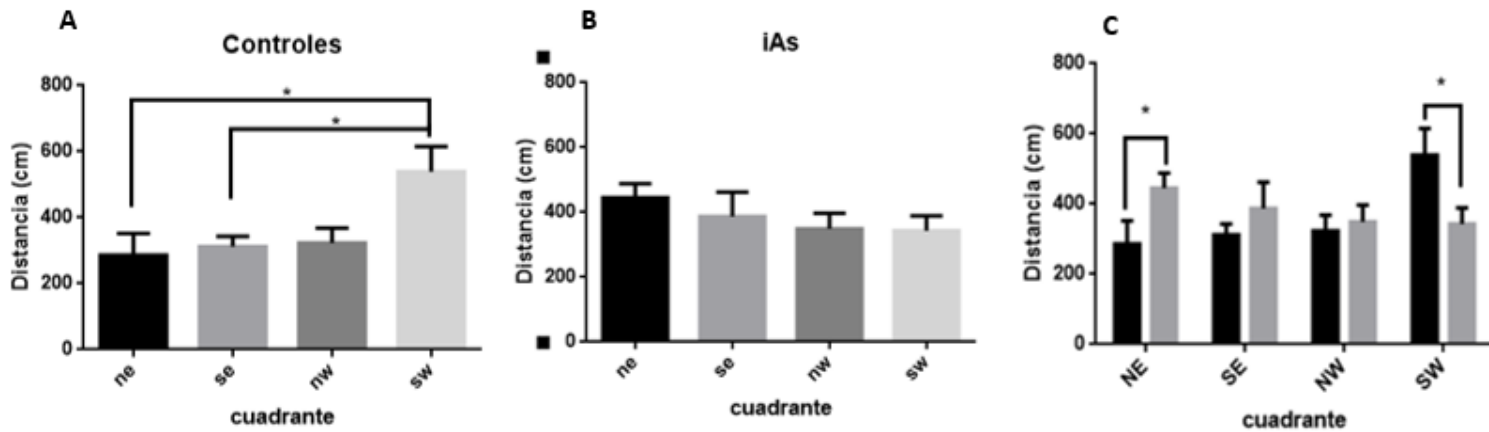


Fig 11. A) Distancia recorrida en cada cuadrante por los animales control. Los asteriscos indican diferencias significativas (ANOVA de una vía  $F= 4.163$ ,  $p< 0.012$ ) en la prueba post hoc de Tukey. B) Distancia recorrida en cada cuadrante por los animales iAS. C) comparación de la distancia recorrida por los grupos control y experimental en cada cuadrante. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos en la prueba post hoc Fisher LSD  $p< 0.05$ .

La distancia que nadaron los animales control sobre la plataforma también fue mayor, que la de los animales tratados (t de Student  $p<0.05$ ) (Figura 12).

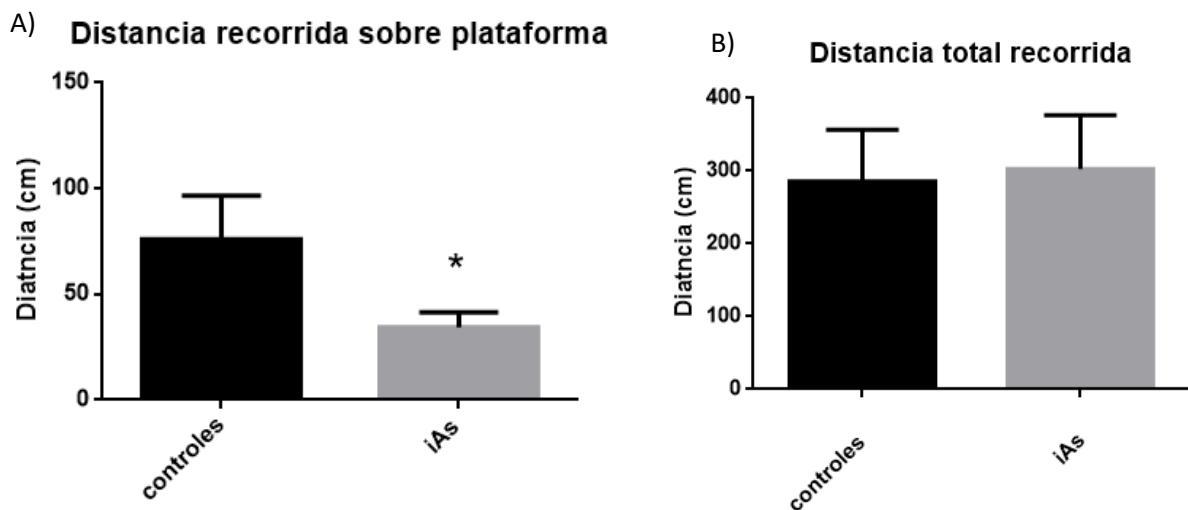


Figura 12. A) Distancia nadada por los ratones sobre el sitio en el que se encontraba la plataforma. B) Distancia total recorrida.

El análisis del tiempo que pasaron los ratones en los diferentes cuadrantes demostró que los animales control presentan una predilección por el cuadrante en el que se encuentra la plataforma (ANOVA de una vía  $F= 4.78$ ,  $p < 0.05$ . Fig 13A). Mientras que los animales tratados no mostraron predilección por ningún cuadrante (Fig. 13 B). Finalmente, el análisis de ANOVA de 2 vías ( $p < 0.05$ ) mostró diferencias significativas en el tiempo que los animales de los dos grupos pasaron en el cuadrante SW con la prueba *post hoc* Fisher LSD ( $p < 0.05$ , Fig 13 C).

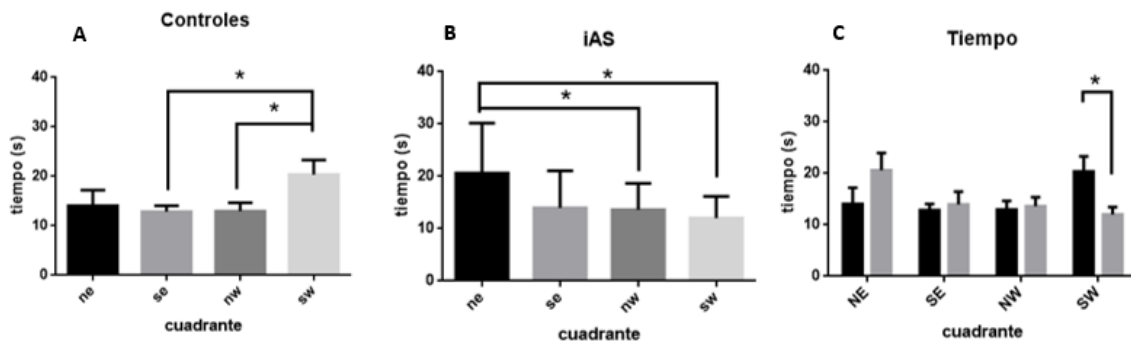


Figura 13. A) Tiempo que nadaron en cada cuadrante los animales control. Los asteriscos indican diferencias significativas (ANOVA de una vía  $F= 4.78$ ,  $p < 0.05$ ) en la prueba *post hoc* de Tukey. B) Tiempo que nadaron en cada cuadrante los animales iAS. C) comparación del tiempo que nadaron los grupos control y experimental en cada cuadrante. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos en la prueba *post hoc* Fisher LSD  $p < 0.05$ .

El mapeo de las trayectorias seguidas por los animales durante 60s, muestran diferencias dependiendo del tratamiento al que fueron sometidos, en la figura 14, se muestran dos trayectorias representativas de un animal control y un animal arsénico.

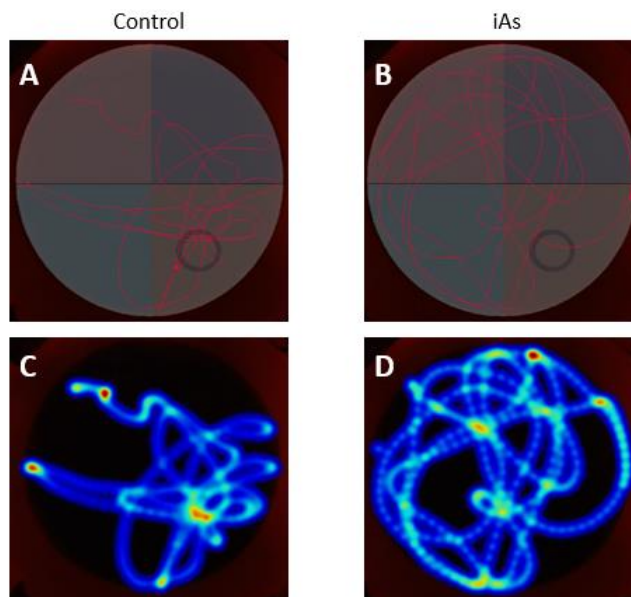


Figura 14. Trayectoria de nado en la prueba de memoria (60 segundos). A) Trayectoria de un ratón control, B) Trayectoria de un ratón iAs, los diferentes colores, marcan los cuadrantes (NE, NW, SE y SW). El círculo morado indica la zona en la que la plataforma fue ubicada durante el entrenamiento. C) Mapa de calor de un animal control, D) Mapa de calor de un animal iAs, los colores rojos representan las zonas donde el animal paso más tiempo.

## 7. Discusión

Se estima que en México aproximadamente más de 450,000 personas están expuestas a niveles de iAs en el agua para consumo humano que exceden los 50  $\mu\text{g/L}$ , incluyendo a los residentes de la comarca Lagunera y Durango (Laine et al., 2015). Sin embargo, tomando en consideración la historia geológica del país, que ha originado grandes áreas de rocas volcánicas, es posible que sean más las poblaciones expuestas inadvertidamente al iAs. La gente expuesta al iAs proveniente de fuentes naturales, frecuentemente se expone por periodos largos de tiempo y ocasionalmente por generaciones (Schelbush et al., 2015), de modo que la exposición puede ocurrir desde etapas tempranas de la vida, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario. La exposición prenatal se ha asociado con nacimientos pretérmino y bajo peso al nacer (Vahter 2009), sin embargo, los efectos sobre la memoria y el aprendizaje sólo son observables en etapas posteriores de la vida, de modo que es difícil calcular el impacto negativo que tiene sobre la calidad de vida de las personas expuestas, o el impacto que tiene sobre los recursos económicos de un país.

Los estudios epidemiológicos y toxicológicos muestran claramente que el iAs es un neurotóxico que afecta la función intelectual y los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* corroboran ampliamente los efectos neurotóxicos del iAs (Tollins et al., 2014). Otros estudios sugieren que el principal mecanismo de la neurotoxicidad es el estrés oxidante (Flora, 2015).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que existe un desbalance en el sistema antioxidante del GSH/GSSG ya que los ratones de 90 días expuestos al iAs mostraron un incremento de GSSG en la corteza (fig. 4A.) y el hipocampo (fig. 4B) siendo esta última estructura donde hubo el mayor cambio. Aunque en ambas estructuras hubo una disminución significativa en la relación GSH/GSSG, el cambio de nuevo fue mayor en el hipocampo. Estos resultados indican la existencia de un estado prooxidante en el tejido nervioso

muestreado, y que estas dos regiones presentan susceptibilidad distinta frente a la exposición al iAs, las variaciones observadas en las dos regiones pueden ser explicadas ya que en el hipocampo se ha observado que hay una mayor concentración de AS3MT que conlleva a una mayor acumulación de DMA (Sánchez-Peña et al., 2010) que podría generar un mayor cambio en el estado redox al reducir la concentración intracelular de GSH como se explicó antes, además el hipocampo es una región de gran plasticidad sináptica ya que recibe todo el tiempo información multisensorial. Durante la exposición crónica al iAs, en el hipocampo el GSH y el GT están aumentados lo que sugiere un incremento en la maquinaria de síntesis. Considerando el papel del sistema Xc- y su mayor abundancia en esta región cerebral en comparación con la corteza (datos no publicados de nuestro laboratorio) es posible suponer que en el hipocampo hay además un incremento en la exportación de glutamato hacia el espacio extracelular.

El incremento en la concentración de GSH total en el hipocampo (Fig 4B), es consistente con el reporte previo de aumento en la expresión del transportador xCT en el hipocampo, de animales de 90 días en este modelo experimental, como la estequiometría del transportador antiporter xCT es 1:1 Glu/Cys se decidió evaluar la concentración extracelular de glutamato, como indicador indirecto del incremento en la actividad del transportador, lo que quedó demostrado con la cuantificación de glutamato extracelular en los experimentos de microdiálisis (Fig 5). Otros autores han encontrado el mismo fenómeno de incremento de glutamato en el hipocampo como resultado de la exposición a arsénico (Nagaraja y Desiraju, 1993; Huo et al., 2014).

Una consecuencia del incremento del glutamato extracelular puede relacionarse con el hallazgo sobre los cambios de expresión de las subunidades de los receptores ionotrópicos de glutamato en la exposición crónica al iAs (Luo et al., 2009), por lo que era importante establecer si en el modelo de exposición gestacional estos cambios también ocurrían. Ramos-Chávez et al., (2015), demostraron que en los animales expuestos gestacionalmente al iAs presentaban cambios en la expresión de las subunidades de los receptores NMDA.

Por otro lado, los receptores AMPA y NMDA están relacionados con los procesos moleculares que subyacen al fenómeno de LTP. En la exposición gestacional al iAs las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA presentan una disminución significativa en los animales tratados con iAs (fig. 6). Más recientemente, Williams et al. (2014) demostraron

que en rebanadas de cerebro de hipocampo de animales carentes de xCT (xCT<sup>-/-</sup>) se observó menor cantidad de glutamato extracelular y un incremento en el contenido de receptores AMPA. El efecto se revertía cuando las rebanadas se incubaban por varias horas en presencia de glutamato. De la misma manera, encontraron que cuando la presencia de los receptores AMPA en la terminal sináptica se regulaba de manera negativa, se reducían los potenciales miniatura postsinápticos que dependen de este receptor. Los autores proponen que el glutamato exportado a través del transportador xCT puede modular la respuesta en la sinapsis glutamatérgica a través de modificar los receptores AMPA post sinápticos. Posiblemente este sea el mecanismo que explica lo observado en los animales expuestos al iAs en este trabajo. Ya que observamos un incremento en la concentración de glutamato extracelular asociada a la disminución en las subunidades del receptor AMPA. Este fenómeno podría ser un mecanismo homeostático para evitar la sobreactivación sináptica en presencia de altas concentraciones de glutamato extracelular. Otra posible explicación a la reducción a la concentración de receptores es que la población de neuronas este disminuida por muerte, pero esta posibilidad no ha sido explorada aún.

La exposición al iAs afecta diferencialmente las estructuras del cerebro, siendo el hipocampo una de las más vulnerables. Aquí, la inducción del fenómeno de la LTP se considera uno de los mecanismos que subyacen a la memoria. Por lo que es importante analizar los efectos del iAs sobre este proceso. Los resultados de este trabajo sugieren que el iAs produce disfunciones en las sinapsis glutamatérgica del hipocampo, ya que los animales expuestos al iAs presentan una menor capacidad para inducir el fenómeno de LTP (Fig. 7 y 8). De hecho, la respuesta sináptica basal también esta disminuida como se observa en la fig. 9A. Los efectos deletéreos del iAs son evidentes también en la fisiología presináptica, donde los animales expuestos este metal tienen una menor facilitación por pulsos pareados (Fig 9B). Los cambios en la fisiología de la sinapsis glutamatérgica encontrados mencionados arriba, pueden deberse en parte a la reducción de las subunidades del receptor AMPA (Fig. 6) y a los previamente reportados en receptores NMDA (Ramos-Chávez et al., 2015).

La sensibilidad particular del hipocampo a los efectos neurotóxicos del iAs, puede jugar un papel importante en los cambios electrofisiológicos encontrados en los ratones expuestos hasta el día 90, ya que en esta estructura se acumula una mayor concentración de DMA que en otras estructuras del cerebro (Sánchez-Peña et al., 2010). Esta especie metilada de iAs se

ha relacionado con una disminución en la capacidad de inducir el fenómeno de LTP en hipocampo de rata, estudiado en preparaciones de rebanadas de cerebro (Kruger et al., 2009). Una forma de evaluar los efectos cognitivos de memoria y aprendizaje en este modelo es a través de la prueba conductual del laberinto acuático de Morris. Como se observa en la figura 12B, los animales control y expuestos al iAs no mostraron cambios en la velocidad de nado entre ellos, lo que implica que el iAs en las concentraciones empleadas en este estudio no afectan la capacidad motriz de los animales. Sin embargo, la capacidad de aprender la posición de la plataforma durante los días de entrenamiento fue más lenta en los animales expuestos (Fig 10). En el día de la prueba sin plataforma los animales expuestos a arsénico mostraron un patrón de nado prácticamente homogéneo en todo el estanque a diferencia de los controles que pasaron más tiempo nadando en el cuadrante que correspondía a la plataforma durante el entrenamiento. Estos resultados sugieren que posiblemente los problemas cognitivos que se han reportados en niños expuestos crónicamente al iAs, pudieran tener como fundamento el cambio en la regulación de la sinapsis glutamatérgica en el hipocampo.

## **8. Conclusiones:**

La exposición gestacional y crónica al iAs alteró la relación GSH/GSSG en la corteza y el hipocampo. Indicando que el estado redox de las células en estos dos tejidos puede estar alterado. Además, en el hipocampo se observó un incremento en la concentración de GT. La síntesis de GSH requiere de cistina, que es proporcionada por el transportador xCT, esto podría explicar el incremento en la concentración de la proteína reportada previamente en los animales expuestos al iAs. El hecho de que en hipocampo de los ratones tratados con iAs hubo un incremento en la concentración de glutamato extracelular apoya esta hipótesis.

La expresión de las subunidades GluA1 y GluA2 se encontró disminuida en los animales expuestos al iAs. Sugiriendo que la elevación de los niveles de glutamato puede afectar su homeostasis. En concordancia con los cambios observados en la expresión de las subunidades del receptor AMPA, la capacidad para inducir el fenómeno de LTP se encontró disminuida en los animales expuestos al iAs. Los resultados obtenidos en este trabajo señalan que la disfunción está tanto en la presinapsis como en la postsinapsis.



Finalmente, los animales tratados con iAs mostraron un peor desempeño en la resolución de la prueba del laberinto acuático de Morris, en conjunto los resultados permiten inferir que los cambios provocados por el iAs sobre la disposición glutamato y sobre otros elementos de la sinapsis glutamatérgica como los receptores inotrópicos de glutamato, pueden ser responsables de los efectos negativos en los procesos cognitivos de memoria y aprendizaje, observados en las poblaciones expuestas al iAs. La figura 15 resume los efectos del arsénico sobre la sinapsis glutamatérgica.

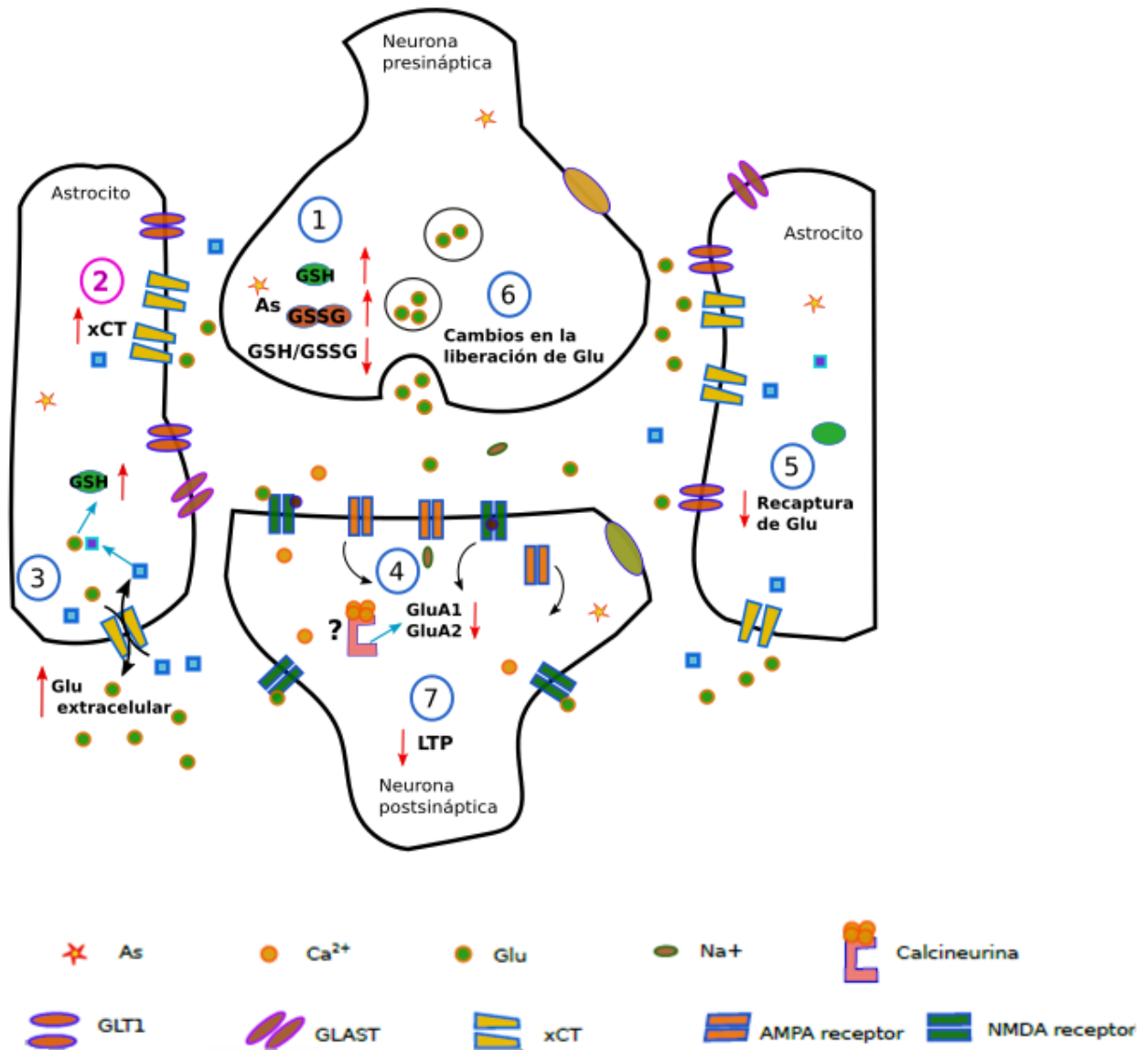


Figura 15. Efectos del iAs sobre la sinapsis glutamatergica del hipocampo. 1) Desbalance en sistema GSH. 2) Incremento en la expresión y posiblemente en la actividad del transportador xCT. 3) Elevación de la concentración extracelular de glutamato. 4) Disminución en la expresión de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor de glutamato AMPA. 5) Desregulación en la recaptura de glutamato. 6) cambios presinápticos en la liberación de glutamato. 7) Disminución en la capacidad para inducir el fenómeno de la LTP.

## **9. Perspectivas**

Aunque los resultados de este trabajo sugieren un estado pro oxidante dado el cambio en el sistema GSH como resultado a la exposición al iAs, es necesario en futuro analizar si es suficiente para generar efectos negativos en las células como lipoperoxidación o daños en el DNA. Además, se puede evaluar si la exposición al iAs en este modelo es suficiente para causar cambios morfológicos en organelos celulares susceptibles al daño oxidante como la mitocondria o el retículo endoplásmico.

Los periodos de desensibilización son diferentes entre las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA, como consecuencia podrían ocurrir cambios en el flujo de calcio intracelular que estos producen como resultado de la actividad basal de las neuronas, que podría ser evaluado a través de técnicas como registros de calcio intracelular. Por otro lado, las diferencias en la expresión de las subunidades podrían conducir a cambios en las cascadas de señalización que dependen de la activación de estos, por lo que sería interesante evaluar el estado de los elementos río a bajo de los receptores.

Finalmente, aunque en este trabajo se observó que en presencia de iAs en el hipocampo ocurre la regulación a la baja de las subunidades GluA1 y GluA2 del receptor AMPA, es necesario estudiar cuáles son los procesos moleculares que subyacen a esta modulación.

## **10. Bibliografía:**

- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. 2007 The hippocampus book, 1th ed Oxford University Press. New York, 2007.
- Ahmad S, Kitchin K, Cullen, W. 2016 Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. Arch. Biochem. Biophys. 382: 195–202; 2000.
- Agranoff B. W., Cotman C. W., and Uhler M. D. 1999. Learning and memory. In: Siegel G. J., Agranoff B. W., Albers R. W., Fisher S. K., and Uhler M. D. (eds.),

Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia and New York, pp. 1027–1050

- Aposhian HV, Zakharyan RA, Avram MD, Sampayo-Reyes A, Wollenberg ML. 2004. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Aug 1;198(3):327-35.
- Baker D.A., Xi Z.X., Shen H., Swanson C.J. and Kalivas P.W. 2002. The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *J Neurosci* 22, 9134-9141.
- Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Rybicka M, Nowacki, Chlubek D. 2012. Neurotoxicity of lead. Hypothetical molecular mechanisms of synaptic function disorders. *Neurologia i Neurochirurgia Polska* 2012; 46, 6: 569-578
- Barger SW, Basile AS. 2001. Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function. *J Neurochem* 76:846–854.
- Basha R y Reddy R. 2015. Developmental Arsenic Exposure: Behavioral Dysfunctions and Neurochemical Perturbations. Capitulo 19 del libro *Flora*. 2015. Handbook of arsenic toxicology Academic Press, Elsevier. United States of America. Pp. 752.
- Basu, A.; Mahata, J.; Gupta, S.; Giri, A. K. 2001. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat. Res.* 488:171–194.
- Bear, Mark F., Barry W. Connors, and Michael A. Paradiso. 2007. *Neuroscience: Exploring the brain*. 3d ed. Philadelphia: Lippincott.p898
- Bhattacharya P, Frisbie SH, Smith E, Naidu R, Jacks G, Sarkar B.2002. Arsenic in the environment, a global perspective. In: Sarkar B, editor. *Handbook of heavy metals in the environment*. New York: Marcell Dekker; 2002. pp. 147–215.
- Brady ST, Siegel GJ, Albers RW et al. 2012. *Basic neurochemistry, principles of molecular, cellular, and medical neurobiology*, 8th edn. Elsevier, Boston
- Bridges R, Lutgen V, Lobner D, Baker DA. 2012. Thinking outside the cleft to understand synaptic activity: contribution of the cystine-glutamate antiporter (System xc-) to normal and pathological glutamatergic signaling. *Pharmacol Rev.* 2012 Jul;64(3):780-802. doi: 10.1124/pr.110.003889.

- Bolla-Wilson K, Bleecker ML. 1987. Neuropsychological impairment following inorganic arsenic exposure. *J Occup Med.* 1987 Jun;29(6):500-3.
- Borisova T, Krisanova N, Sivko R, Kasatkina L, Borysov A, Griffin S, Wireman M. 2011. Presynaptic malfunction: The neurotoxic effects of cadmium and lead on the proton gradient of synaptic vesicles and glutamate transport. *Neurochemistry International* 59 (2011) 272–279
- Calderón J, Navarro ME, Jimenez-Capdeville ME, 2001. Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ Res*;85:69e76.
- Calatayud M y Laparra JM. 2015. Arsenic through the gastrointestinal tract. capitulo 10 del libro *Flora. 2015. Handbook of arsenic toxicology Academic Press, Elsevier. United States of America. Pp. 752.*
- Chaudhuri AN, Basu S, Chattopadhyay S, Das GS. 1999. Effect of high arsenic content in drinking water on rat brain. *Indian J. Biochem. Biophys.* 36: 51–54.
- Choi DW .1994. Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann N Y Acad Sci.* Dec 15;747:162-71.
- Clements, J.D., 1996. Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci.* 19, 163–171.
- Cronican A, Fitz NF, Carter A, Saleem M, Shiva S, Barchowsky A, Koldamova R, Schug J, Lefterov I. 2013. Genome-wide alteration of histone H3K9 acetylation pattern in mouse offspring prenatally exposed to arsenic. *PLoS One.* 2013;8(2):e53478
- De Bundel D, Schallier A, Loyens E 2011. Loss of system x(c)— does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *J Neurosci* 31:5792–5803
- Dong J, Su SY. 2009. The association between arsenic and children’s intelligence: a meta-analysis. *Biol Trace Elem Res*;129:88e93.
- Dringen R, Spiller S, Neumann S, Koehler Y. 2016. Uptake, Metabolic Effects and Toxicity of Arsenate and Arsenite in Astrocytes. *Neurochem Res.* 2016 Mar;41(3):465-75. doi: 10.1007/s11064-015-1570-9. Epub 2015 Apr 11.

- Ehrenstein O, Poddar S, Yuan Y. 2007. Children's intellectual function in relation to arsenic exposure. *Epidemiology*;18:44e51.
- Escudero-Lourdes C. 2016. Toxicity mechanisms of arsenic that are shared with neurodegenerative diseases and cognitive impairment: Role of oxidative stress and inflammatory responses. *Neurotoxicology*. 2016 Mar;53:223-35. doi: 10.1016/j.neuro.2016.02.002. Epub 2016 Feb 8.
- Farías S, Bianco de Salas G, Servant R, Mitre B, Escalante J, Ponce R. 2008. Survey of arsenic in drinking water and assessment of the intake of arsenic from water in Argentine Pune. *Natural Arsenic in Ground Water*. In: Bundschuh, J.; Bhattacharya, P., editors. *Arsenic in the environment*. Vol. Volume 1. 2008. Chapter 41
- Farooqui A, Ong WY, Horrocks LA. 2008. Neurochemical aspects of excitotoxicity. Springer Science, Business Media, New York, pp 1–32
- Flora S .2015. *Handbook of Arsenic Toxicology*. Chapter 1: Arsenic: Chemistry, Occurrence and exposure. 1th ed. Elsevier, San Diego Ca. pp 1-41.
- Flora SJ. 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med* 51(2):257–281. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.008
- Franzblau A, Lilis R. 1989. Acute arsenic intoxication from environmental arsenic exposure *Arch Environ Health*. 1989 Nov-Dec;44(6):385-90..
- Garcia-Vargas, G. G.; Delrazo, L. M.; Cebrian, M. E.; Albores, A.; Ostroskywegman, P.; Montero, R.; Gonsebatt, M. E.; Lim, C. K.; Dematteis, F. 1994. Altered urinary porphyrin excretion in a human-population chronically exposed to arsenic in Mexico. *Hum. Exp. Toxicol.* 13:839–847; 1994.
- Garcia-Vargas, G. G.; Garcia-Rangel, A.; Aguilar Romo, M.; Garcia Salcedo, J.; Del Razo, L. M.; Ostrosky Wegman, P.; Denava, C. C.; Cebrian, M. E. 1991. A pilot-study on the urinary-excretion of porphyrins in human populations chronically exposed to arsenic in Mexico. *Hum. Exp. Toxicol.* 10:189–193.
- Garza-Lombó C, Posadas Y, Quintanar L, Gonsebatt ME, Franco R. 2018. Neurotoxicity Linked to Dysfunctional Metal Ion Homeostasis and Xenobiotic Metal Exposure: Redox Signaling and Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2018 Jun 20;28(18):1669-1703.

- Gibbs M. E. and Hertz L. 2005. Importance of glutamate-generating metabolic pathways for memory consolidation in chicks. *J. Neurosci. Res.* 81:293–300.
- Grandjean P, Murata K. 2007. Developmental arsenic neurotoxicity in retrospect. *Epidemiology* 007;18:25–6.
- Halliwell, B.; Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142:231–255; 2004.
- Hardingham G.E. and Bading H. 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11, 682-696.
- Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. 1999. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res.* 1999 Aug 15;57(4):417-28
- Huo T, Li W, Zhang Y, Yuan J, Gao L, Yuan Y, Yang H, Jiang H, Sun G. 2014. Excitotoxicity Induced by Realgar in the Rat Hippocampus: the Involvement of Learning Memory Injury, Dysfunction of Glutamate Metabolism and NMDA Receptors. *Mol Neurobiol* (2014) 51:980–994.
- Janssen-Heininger YM, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, Stamler JS, Rhee SG, and van der Vliet A. 2008. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med* 45:1–17.
- Jin, Y., Xi, S., Li, X., Lu, C., Li, G., Xu, Y., et al., 2006. Arsenic speciation transported through the placenta from mother mice to their newborn pups. *Environ. Res.* 101 (3), 349–355. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2005.11.006>.
- Jing J, Zheng G, Liu M, Shen X, Zhao F, Wang J, Zhang J, Huang G, Dai P, Chen Y, Chen J, Luo W. 2012. Changes in the synaptic structure of hippocampal neurons and impairment of spatial memory in a rat model caused by chronic arsenite exposure. *Neurotoxicology.* 2012 Oct;33(5):1230-8.
- Kapaj S, Peterson H, Liber K, Bhattacharya P. 2006. Human health effects from chronic arsenic poisoning—a review. *J Environ Sci Health* 2006;41:2399e428.
- Kosower y kosower Kosower NS, Kosower EM. 1978. The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 54: 109-160. En Simo S. Oja, Pirjo Saransaari and Arne

Schousboe. 2007. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology Amino Acids and Peptides in the Nervous System. 3<sup>o</sup> Ed. Springer.2007. New York, USA. Pp. 418.

- Krüger, Reppes, Hippler, Hartmann, Hirner, Straub, Binding y Mußhoff. 2007 Effects of monomethylarsonic and monomethylarsonous acid on evoked synaptic potentials in hippocampal slices of adult and young rats Toxicol Appl Pharmacol. Apr 1;236(1):115-23
- Kupchik YM, Moussawi K, Tang XC, Wang X, Kalivas BC, Kolokithas R, Ogburn KB, Kalivas PW. 2012. The effect of N-acetylcysteine in the nucleus accumbens on neurotransmission and relapse to cocaine. Biological psychiatry. 2012;71(11):978–986.
- Lai TW, Zhang S, Wang YT. 2014. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. Prog Neurobiol. 2014 Apr;115:157-88.
- Laine JE, Bailey KA, Rubio-Andrade M, Olshan AF, Smeester L, Drobná Z, Herring AH, Stýblo M, García-Vargas GG, Fry RC. Maternal arsenic exposure, arsenic methylation efficiency, and birth outcomes in the Biomarkers of Exposure to ARsenic (BEAR) pregnancy cohort in Mexico. Environ Health Perspect. 2015 Feb;123(2):186-92. doi: 10.1289/ehp.1307476.
- Lau A, Tymianski M. 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. Pflugers Arch. Jul;460(2):525-42. doi: 10.1007/s00424-010-0809-1
- Lewerenz J, Maher P. 2015. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-what is the evidence? Front Neurosci 9:469.
- Lewerenz J., Sato H., Albrecht P., Henke N., Noack R., Methner A. and Maher P. 2012. Mutation of ATF4 mediates resistance of neuronal cell lines against oxidative stress by inducing xCT expression. Cell Death Differ 19, 847-858.
- Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutat Res. 2009 Mar 31;674(1-2):137-47. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.015. Epub 2008 Oct 8.



- Liu, J.; Chen, H.; Miller, D. S.; Saavedra, J. E.; Keefer, L. K.; Johnson, D. R.; Klaassen, C. D.; Waalkes, M. P. 2001. Overexpression of glutathione-S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Mol. Pharmacol.* 60:302–309.
- Lipton SA, Choi YB, Takahashi H, Zhang D, Li W, Godzik A, and Bankston LA 2002. Cysteine regulation of protein function—as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends Neurosci* 25:474–480.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4: 118–126.
- Luo JH, Qiu ZQ, Shu WQ, Zhang YY, Zhang L, Chen JA. 2009 Effects of arsenic exposure from drinking water on spatial memory, ultrastructures and NMDAR gene expression of hippocampus in rats. *Toxicol Lett*;184:121e5.
- Luo J y Shu W. 2015. Arsenic-Induced Developmental Neurotoxicity. Capitulo 15 del libro SJS Flora. 2015. Handbook of arsenic toxicology Academic Press, Elsevier. United States of America. Pp. 752.
- Lushchak VI. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014 Dec 5;224:164-75.
- Maekawa F, Tsuboi T, Oya M, Aung KH, Tsukahara S, Pellerin L, Nohara K. 2013. Effects of sodium arsenite on neurite outgrowth and glutamate AMPA receptor expression in mouse cortical neurons. *Neurotoxicology.* Jul;37:197-206
- Martinez-Finley EJ, Ali AMS, Allan AM. 2009. Learning deficits in C57BL/6J mice following perinatal arsenic exposure: consequence of lower corticosterone receptor levels? *Pharmacol, Biochem and Behav* 2009;94:271e7.
- Massie A, Boillée S, Hewett S, Knackstedt L, Lewerenz J. 2015. Main path and byways: non-vesicular glutamate release by system xc (-) as an important modifier of glutamatergic neurotransmission. *J Neurochem.* 2015 Dec;135(6):1062-79. doi: 10.1111/jnc.13348. Epub 2015 Sep 29.
- Massie A., Schallier A., Kim S.W., Fernando R., Kobayashi S., Beck H., De Bundel D., Vermoesen K., Bannai S., Smolders I., Conrad M., Plesnila N., Sato H. and Michotte Y. 2011. Dopaminergic neurons of system x(c)(-)-deficient mice are

highly protected against 6-hydroxydopamine-induced toxicity. *Faseb Journal* 25, 1359-1369.

- Mejía-Toiber J, Márquez-Ramos JA, Díaz-Muñoz M. 2010. Glutamatergic excitation and GABA release from a transplantable cell line. *Cell Transplant* 19:1307–1323.
- Meliker JR, Wahl RL, Cameron LL, Nriagu JO. 2007. Arsenic in drinking water and cerebrovascular disease, diabetes mellitus, and kidney disease in Michigan: a standardized mortality ratio analysis. *Environ Health*. 2007 Feb 2;6:4.
- McGeer P. L., Eccles J. C., y McGeer E. G. 1987. Putative excitatory neurons: Glutamate and aspartate. In: McGeer P. L., Eccles J. C., and McGeer E. G. (eds.), *Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain*. Plenum Press, New York.
- Monaghan D. T., Bridges R. J., y Cotman C. W. 1989. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29:365–402.
- Moran M. M., McFarland K., Melendez R. I., Kalivas P. W., Seamans J. K. 2005. Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor presynaptic inhibition of excitatory transmission and vulnerability to cocaine seeking. *J. Neurosci.* 25, 6389–6393.
- Morton, W.E., Caron, G.A., 1989. Encephalopathy: an uncommon manifestation of workplace arsenic poisoning. *Am. J. Ind. Med.* 15, 1–5.
- Mukherjee A, SenguptaMK, HossainMA, Ahamed S, Das B, Nayak B, Lodh D, RahmanMM, Chakraborti D. 2006. Arsenic contamination in groundwater: a global perspective with emphasis on the Asian scenario. *J. Health Popul. Nutr.* 24: 142–163.
- Nagaraja TN, Desiraju T. 1993. Regional alterations in the levels of brain biogenic amines, glutamate, GABA and GAD activity due to chronic consumption of inorganic arsenide in developing and adult rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 1993;50:100e7.
- Neal A y Guilarte T. 2010. Molecular Neurobiology of Lead (Pb<sup>2+</sup>): Effects on Synaptic Function. *Mol Neurobiol.* 2010 December ; 42(3): 151–160.

- O'Bryant SE, Edwards M, Menon CV, Gong G, Barber R. 2011. Long-term low-level arsenic exposure is associated with poorer neuropsychological functioning: a Project FRONTIER study. *Int J Environ Res Public Health*. Mar;8(3):861-74.
- Olney JW, Fuller T, de Gubareff T. 1979. Acute dendrotoxic changes in the hippocampus of kainate treated rats. *Brain Res*. 1979 Oct 26;176(1):91-100.
- Piani D, Fontana A. 1994. Involvement of the cystine transport system xc<sup>-</sup> in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J Immunol* 152:3578–3585.
- Piao F, Li S, Guan H. 2015. Developmental Arsenic Exposure Impacts Fetal Programming of the Nervous System. Capítulo 16 del libro *Flora*. 2015. Handbook of arsenic toxicology Academic Press, Elsevier. United States of America. Pp. 752.
- Prakash C, Soni M, Kumar V. 2015. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in arsenic neurotoxicity: A review. *J Appl Toxicol*. 2016 Feb;36(2):179-88. doi: 10.1002/jat.3256. Epub 2015 Oct 29.
- Pow D. 2001. Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to aminoadipic acid, a selectively transported substrate. *Glia*. 2001 Apr 1;34(1):27-38.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM. 2004. *Neuroscience*. 3<sup>rd</sup> ed. Sunderland, Massachusetts (USA): Sinauer Associates Inc. Publishers; 2004.
- Qin S, Colin C, Hinnens I, Gervais A, Cheret C, and Mallat M. 2006. System xc<sup>-</sup> and apolipoprotein E expressed by microglia have opposite effects on the neurotoxicity of amyloid-beta peptide 1–40. *J Neurosci* 26:3345–3356.
- Ramos-Chávez LA, Rendón-López CR, Zepeda A, Silva-Adaya D, Del Razo LM, Gonsbatt ME. 2015. Neurological effects of inorganic arsenic exposure: altered cysteine/glutamate transport, NMDA expression and spatial memory impairment. *Front Cell Neurosci*. Feb 9;9:21.
- Rivera-Olvera A. 2015. Interacción metaplástica del condicionamiento de aversión a los sabores y la potenciación de largo plazo dependiente del BDNF en la neocorteza de ratas adultas. Tesis de licenciatura en Psicología, facultad de Psicología, UNAM.

- Rocha-Amador D, Navarro ME, Carrizales L, Morales R, Calderón J. 2007. Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. *Cad Saude Publica*;23:579e87.
- Rosado JL, Ronquillo D, Katarzyna K, 2007. Arsenic exposure and cognitive performance in Mexican schoolchildren. *Environ Health Perspect*;115:9.
- Sánchez-Peña LC, Petrosyan P, Morales M, González NB, Gutiérrez-Ospina G, Del Razo LM, Gonsbatt ME. 2010. Arsenic species, AS3MT amount, and AS3MT gene expression in different brain regions of mouse exposed to arsenite. *Environ Res. Jul*;110(5):428-34.
- Seal RP, Amara SG. 1999. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:431-56.
- Seib TM, Patel SA, Bridges RJ. 2011. Regulation of the system x(C)-cystine/glutamate exchanger by intracellular glutathione levels in rat astrocyte primary cultures. *Glia*. 2011 Oct;59(10):1387-401.
- Sato H. Et al. 2004. Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 325:109-116 Tennesi L, D'Emilia DM, Troy CM et al (1998) Role of caspases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem* 71:946–959
- Segovia G., Porrás A., Del Arco A. y Mora F. 2001. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective.
- Seib TM, Patel SA, Bridges RJ. 2011. Regulation of the system x(C)-cystine/glutamate exchanger by intracellular glutathione levels in rat astrocyte primary cultures. *Glia*. 2011 Oct;59(10):1387-401. doi: 10.1002/glia.21176. Epub 2011 May 17.
- Senft AP, Dalton TP, Shertzer HG (2000) Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Anal Biochem* 280(1):80–86.
- Siripitayakunkit U, Visudhiphan P, Pradipasen M, Vorapongsathron T. 1991. Association between chronic arsenic exposure and children's intelligence in Thailand. In: Chappell WR, Abernathy CO, Calderon RL, eds. *Arsenic Exposure and Health Effects III*. Oxford, UK: Elsevier Science Ltd; 1991:141e9.

- Schindler J, Jung S, Niedner-Schatteburg G, Friauf E, Nothwang HG. 2006. Enrichment of integral membrane proteins from small amounts of brain tissue. *J Neural Transm (Vienna)*. 2006 Aug;113(8):995-1013.
- Schlebusch CM, Gattepaille LM, Engström K. 2015. Human adaptation to arsenic-rich environments. *Mol Biol Evol* 32(6):1544–1555.
- Schoepp D., Bockaert J., and Sladeczek F. 1990. Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:508–515.
- Styblo, M., Serves, S. V., Cullen, W. R., and Thomas, D. J. 1997. Comparative inhibition of yeast glutathione reductase by arsenicals and arsenothiols. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 27–33.
- Squire L, Berg D, Bloom F, du Lac S, Ghosh A, Spitzer N. 2008. *Fundamental Neuroscience* 3th edition. Academic Press. San Diego, California. P 1152.
- Taupin P 2007. *The hippocampus, neurotransmission and plasticity in the nervous system*. 1th ed. Nova Science Publishers; 2007.
- Thomas, D.J., 2007. Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222 (3), 365–373.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2007.02.007>.
- TolinsM , MD, Mathuros Ruchirawat, PhD, and Philip Landrigan, MD, MSc.2014. The Developmental Neurotoxicity of Arsenic: Cognitive and Behavioral Consequences of Early Life Exposure. *Annals of Global Health*. 2014;80:303-314.
- Toscano C y Guilarte T. 2005. Lead neurotoxicity: From exposure to molecular effects. *Brain Research Reviews* 49 (2005). 529 – 554.
- Trotti, D., D. Rossi, O. Gjesdal, L. M. Levy, G. Racagni, N. C. Danbolt, and A. Volterra. 1996. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J. Biol.Chem.* 271: 5976–5979.
- Tyller R, Chen Y, Bundschuh, Oliver J, Navoni J, Olmos V, Lepori E, Ahsan H, Parvez F. 2012. Arsenic Exposure in Latin America: Biomarkers, Risk Assessments and Related Health Effects. *Sci Total Environ*. 2012 July 1; 429: 76–91.  
doi:10.1016/j.scitotenv.2011.08.051.

- Tyler CR, Allan AM, 2014. The Effects of Arsenic Exposure on Neurological and Cognitive Dysfunction in Human and Rodent Studies: A Review. *Curr Envir Health Rpt* (2014) 1:132–147. DOI 10.1007/s40572-014-0012-1
- Vahter M. 2008. Health effects of early life exposure to arsenic. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:204–11.
- Vahter M. 2009. Effects of arsenic on maternal and fetal health. *Annu Rev Nutr* 29:381–399.
- Valdovinos-Flores C, Gonsebatt ME. 2013. The role of amino acid transporters in GSH synthesis in the blood–brain barrier and central nervous system. *Neurochem Int* 61(3):405–414.
- Van Liefferinge J, Bentea E, Demuyser T, Albertini G, Follin-Arbelet V, Holmseth S, Merckx E, Sato H, Aerts JL, Smolders I, Arckens L, Danbolt NC, Massie A. 2016. Comparative analysis of antibodies to xCT (Slc7a11): Forewarned is forearmed. *J Comp Neurol*. 2016 Apr 1;524(5):1015-32
- Wang SX, Wang ZH, Cheng XT. 2007. Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children’s IQ and growth in Shanyin County, Shanxi Province, China. *Environ Health Perspect* 2007;115:643e7.
- Williams L, Featherstone D. 2014. Regulation of hippocampal synaptic strength by glial xCT. *J Neurosci* 34(48):16093–16102.
- WHO (World Health Organization). 2016. Guidelines for Drinking-waterquality: incorporating First and Second addenda to Third Edition. In e Recommendations, Vol. 1. Geneva: WHO Press. Available at:[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/](http://www.who.int/water_sanitation_health/)acceso el 21 de enero de 2016.
- Xi S, Guo L, Sun W, Jin Y, Sun G.2010 Prenatal and early life arsenic exposure induced oxidative damage and altered activities and mRNA expressions of neurotransmitter metabolic enzymes in offspring rat brain. *J Biochem Mol Toxicol*;24:6.

## ***11. ANEXOS***



## Gestational exposure to inorganic arsenic (iAs<sup>3+</sup>) alters glutamate disposition in the mouse hippocampus and ionotropic glutamate receptor expression leading to memory impairment

Janikua Nelson-Mora<sup>1</sup> · Martha L. Escobar<sup>2</sup> · Luis Rodríguez-Durán<sup>2</sup> · Lourdes Massieu<sup>3</sup> · Teresa Montiel<sup>3</sup> · Verónica M. Rodríguez<sup>4</sup> · Karina Hernández-Mercado<sup>1</sup> · María E. Gensebatt<sup>1</sup>

Received: 5 August 2017 / Accepted: 8 November 2017  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2017

### Abstract

Early life exposure to environmental pollutants and toxic chemicals has been linked to learning and behavioral alterations in children. iAs exposure is associated with different types neurological disorders such as memory and learning impairment. iAs is methylated in the brain by the arsenic III-methyltransferase in a process that requires glutathione (GSH). The xCT-antiporter cell membrane transporter participates in the influx of cystine for GSH synthesis in exchange for glutamate in a 1:1 ratio. In CD-1 mice gestationally exposed to 20 ppm of sodium arsenite in drinking water, we have previously observed up-regulation of xCT in the male mouse hippocampus which caused glutamatergic synapse alterations affecting learning and memory processes. Here, we used the same gestational iAs exposure model to investigate whether the up-regulation of xCT and down-regulation of GLT-1 transporters were associated with higher levels of extracellular glutamate and changes in the expression of the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) glutamate receptor, responsible for excitatory fast synaptic transmission. The induction of LTP in the perforant-dentate gyrus pathway (PP-DG) of the hippocampus was also studied, as well as learning and memory formation using the water maze test. Changes in GSH levels were also tested in the hippocampus of animals exposed to iAs. Results showed increased GSH synthesis ( $p < 0.05$ ), associated with significantly higher extracellular glutamate levels in iAs exposed mice. Exposure was also significantly associated with AMPA subunits down-regulation, deficient LTP induction, and lower excitability of the PP-DG pathway. In addition, animals showed deficient learning and memory in the Morris Water Maze test.

**Keywords** Arsenic neurotoxicity · AMPA receptors · Extracellular glutamate · LTP · Morris water maze

### Abbreviations

AdoMet	S-Adenosylmethionine
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
As3MT	Arsenic III-methyltransferase
BBB	Blood-brain barrier
DG	Dentate gyrus
EPSP	Excitatory post-synaptic potential
GSH	Glutathione
iAs	Inorganic arsenic
LTP	Long-term potentiation
NMDA	N-Methyl-D-aspartate
OPA	o-Phthalaldehyde
PND	Post-natal day
PP	Perforant pathway
PP-DG	Perforant-dentate gyrus pathway
PPF	Paired-pulse facilitation
RRP	Relative refractory periods

✉ María E. Gensebatt  
margen@unam.mx

<sup>1</sup> Dep. de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-228, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico, Mexico

<sup>2</sup> División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico, Mexico

<sup>3</sup> División de Neurociencias, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico, Mexico

<sup>4</sup> Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Campus Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, 76230 Querétaro, Mexico

Published online: 04 December 2017

Springer



TG Total GSH  
 WHO World Health Organization

## Introduction

Early life exposure to environmental pollutants and toxic chemicals has been linked to learning and behavioral alterations in children and adolescents (Lanphear 2015; Bennett et al. 2016). The nervous system not only coordinates and regulates the homeostasis of the different organ systems but is also responsible for higher cognitive functions such as memory and learning. Several studies have demonstrated the physiological and psychological impacts of toxic agents on the developing nervous system affecting the quality of life of individuals (Lanphear 2015).

In the case of inorganic arsenic (iAs), the World Health Organization (WHO) estimates that more than 200 million people around the world are exposed to high levels of iAs in drinking water. This condition has been reported in countries such as India, China, Thailand, Ghana, Argentina, Hungary, Canada, United States, United Kingdom, and México (Kapaj et al. 2006). Particularly, in México, levels higher than 400 ppb have been reported (García-Vargas et al. 1991; DelRazo et al. 1997), which are well above the 10-ppb level recommended by WHO.

Adults in an exposed population show higher incidences of different types of cancers, cardiovascular diseases, and diabetes. In children, cardiovascular, immunological, respiratory, and neurological effects have been shown (Tolins et al. 2014; Osorio-Yañez et al. 2015; Ahmed et al. 2017). Impaired memory and learning have been reported in iAs-exposed children (Calderón et al. 2001; Von Ehrenstein et al. 2007; Rocha-Amador et al. 2007; Rosado et al. 2007; O'Bryant et al. 2011).

iAs and its methylated metabolites have been reported to be present in the urine of pregnant women and in umbilical cord blood (Concha et al. 1998; Parajuli et al. 2013; Ahmed et al. 2017), suggesting that iAs and its metabolites cross the placenta and reach the developing fetus. Indeed, Devesa et al. (2006) and Jin et al. (2010) have shown transplacental transfer of iAs and its methylated metabolites from pregnant mice to the fetus.

Using a murine model, we have shown that iAs crosses the blood-brain barrier (BBB) and is methylated in several regions of the brain, such as the cortex and hippocampus where the arsenic III-methyltransferase (As3MT) is expressed (Rodríguez et al. 2005; Sánchez-Peña et al. 2010). This enzyme catalyzes the methyl group transfer from *S*-adenosylmethionine (AdoMet) in an oxidative methylation process. Cellular reductants such as thioredoxin or glutathione (GSH) activate the formation of methylated iAs metabolites (Thomas 2007).

It has been reported that hippocampal morphology and function is affected by iAs exposure, altering neurogenesis in glutamatergic synapses (Tyler and Allan 2014). We have observed that gestational exposure to iAs leads to altered cysteine/glutamate transport, which was associated with down-regulation of the NR2A and NR2B subunits of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate ionotropic receptor in the hippocampus (Ramos-Chávez et al. 2015).

Glutamate (L-glu) is the main excitatory amino acid neurotransmitter in the brain (Bridges et al. 2012). In the hippocampus, 90% of the synapses are glutamatergic; thus, the extracellular L-glu concentration is tightly regulated by quick reuptake mechanisms and specific membrane transporters. Extracellular L-glu is removed by GLAST, and GLT1 transporters in glia and EAAT3/EAAC1 (SLC1A1), in neurons. EAAC1 is also important for the uptake of L-cys in neurons (Valdovinos-Flores and Gensebatt 2013). At the same time, xCT (SLC7A11)/4F2hc (SLC3A2) is an antiporter membrane transporter which participates in the influx of cystine for GSH synthesis in exchange for L-glu in a 1:1 ratio. Therefore, increased activity of the xCT/4F2hc transporter could elevate extracellular L-glu to excitotoxic levels (Valdovinos-Flores and Gensebatt 2013). Moreover, xCT knock-out mice show a 50% reduction in extracellular glutamate concentrations, underlining the importance of this transporter in L-glu homeostasis (De Bundel et al. 2011; Massie et al. 2011).

Earlier, we investigated the impact of gestational iAs exposure in the hippocampus of male mice. At post-natal days (PNDs) 1 and 15, up-regulation of xCT and EAAC1 was observed, while xCT up-regulation and GLT1 down-regulation occurred at PND 90. These changes in cystine/glutamate transport were associated with a down-regulation of NR2B and NR2A NMDA receptor subunits. We attributed this effect to a modulatory effect of elevated extracellular L-glu over NMDA receptor expression (Ramos-Chávez et al. 2015).

Other important glutamatergic receptors in the hippocampus are the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors, responsible for excitatory fast synaptic transmission. These ionotropic receptors are mainly Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-permeable channels (Mayer and Westbrook 1987). They are composed of tetramers of four subunits (GluA1 to GluA4). AMPA receptors' physiological properties are directly related to the subunit combinations in the receptor. In the hippocampus, AMPA receptors are mainly tetramers of 2 GluA1 and 2 GluA2 subunits (Farooqui et al. 2008). Receptor trafficking of the GluA1 and GluA2 subunits from the intracellular pools to the membrane in synaptic areas might alter the synapses strength, one of the central mechanisms of the induction of long-term potentiation (LTP), which is considered to be the mechanism through which memory is formed (Brady et al. 2012).

The molecular events leading to LTP are initiated by the activation of the  $Mg^{2+}$ -blocked NMDA receptors in a voltage-dependent manner. First, AMPA receptors are activated by  $\iota$ -glu release, allowing an inward sodium current that depolarizes the cell membrane leading to NMDA receptor activation, starting an inward calcium current. This molecular event induces a protein kinase-signaling cascade that activates the CREB transcription factor, which can promote the synthesis and migration of AMPA receptors to the membrane. The increased presence of AMPA receptors in the post-synaptic membrane potentiates the cell response to extracellular glutamate, making the cell more responsive for an extended period of time, inducing the LTP phenomenon (Bear et al. 2007).

Here, we used a gestational iAs exposure model in CD1 male mice to investigate whether the up-regulation of xCT and down-regulation of GLT-1 transporters at PND 90 previously observed (Ramos-Chávez et al. 2015), correlated with the elevation of extracellular glutamate concentration and changes in AMPA receptor expression. The induction of LTP in the perforant–dentate gyrus pathway (PP–DG) of the hippocampus was also studied, as well as learning and memory formation using the water maze test. Changes in GSH levels were also tested in the hippocampus of exposed animals.

Our results showed increased GSH synthesis in the hippocampus of iAs-exposed animals associated with higher extracellular  $\iota$ -glu levels. AMPA subunits were down-regulated in exposed animals, which in turn exhibited deficient LTP induction and a lower excitability of the PP–DG pathway. In addition, animals showed deficient learning and memory in the water maze test.

## Materials and methods

### Chemicals

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) unless otherwise indicated.

### Animal treatments

Eight-week-old female and male CD1 mice were obtained from the Unit of Animal Models at the Instituto de Investigaciones Biomédicas (Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM). All efforts were made to optimize the number of animals and avoid their suffering. Four animals were maintained in each cage, with a 12:12-h light: dark cycle, constant temperature of 23 °C and ad libitum feeding. The arsenic group was exposed to 20 mg/L of sodium arsenite in the drinking water. Arsenical solutions were prepared daily to avoid oxidation. Control animals received

drinking water without arsenic. Exposure started 1 month before mating in both male and female mice and continued during the whole experiment. To allow mating, one female and one male were located in the same cage. The presence of a vaginal plug was checked daily to establish the beginning of the pregnancy; at this point, the males were removed from the cage, leaving only one female per box during the gestational and lactation periods. At weaning, the litters continued drinking water with arsenic until the experiment was over. Male mice were used for all experiments. Animals were sacrificed at PND 90.

Brains were rapidly extracted, and the regions of the cortex and hippocampus were dissected on ice. The tissue was stored at  $-80$  °C until determinations were made (Ramos-Chávez et al. 2015).

### GSH and GSSG determination

Hippocampus and cortex GSH and GSSG levels were determined using the fluorometric *o*-phthalaldehyde (OPA) method (Senft et al. 2000), modified for its use in a 96-well Greiner microplate. Fluorescence measures were taken at 365-nm excitation and 430-nm emission in a Beckman Coulter DTX 800/880 Multimode Detector (Indianapolis, IN, USA).

### Extracellular glutamate determination

Animals were anesthetized with isoflurane and then fixed on a stereotaxic frame. Microdialysis probes (CMA 12 Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), 1 mm in length and 0.5 mm in diameter, were implanted in the dentate gyrus region of the hippocampus using the following coordinates: AP  $-1.82$  from Bregma, ML  $-1.1$  from the midline and DV  $-2.0$  from the dura. Animals were maintained under isoflurane anesthesia during the experiment. Microdialysis probes were perfused with Ringer Krebs (NaCl 118 mM, KCl 4.5 mM,  $MgSO_4$  2.5 mM,  $NaH_2PO_4$  4.0 mM,  $CaCl_2$  2.5 mM,  $NaHCO_3$  25 mM, and glucose 10 mM) with a microinjection pump (BAS MD 1001, West Lafayette, IN, USA) at a constant flow of 2  $\mu$ L/min. The autosampler system collected 50  $\mu$ L fractions that were kept at 4 °C in an automatic collector. After a post-implantation stabilization of 45 min, three samples were taken at 20-min intervals. The samples were stored at  $-80$  °C until its determination by HPLC.

### HPLC determination

$\iota$ -glu levels were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described by Mejta-Toiber et al. (2010). Briefly,  $\iota$ -glu concentrations were determined in an 1100 Series Agilent Technologies HPLC

equipment (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), using a reverse-phase, C18 column (ESA HR 80 column, ESA, Inc., Chelmsford, MA, USA) and an electrochemical detection system (Coulchem III, ESA, Inc, Chelmsford, MA, USA). After precolumn derivatization with O-phthalaldehyde, the mobile phase was a 50-mM sodium phosphate buffer containing 25% methanol, pH 6.75, at a flow rate of 1.2 mL/min. A calibration curve was constructed with a L-glu standard solution, for correct estimation of the L-glu content in the samples.

### Western blots

Proteins from membrane-enriched fractions were used (Schindler et al. 2006; Ramos-Chávez et al. 2015). Briefly, the tissue was homogenized in two volumes of extraction buffer BLC (10 mM HEPES, 10 mM NaCl, 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mM EDTA, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM PMSF, and 10 mg/mL aprotinin and leupeptin). After a 10-min incubation on ice, 0.1 volumes of buffer BCL with 2.5 M of sucrose were added to the sample, which was then centrifuged at  $6300\times g$  at 4 °C for 10 min. The supernatant was separated and maintained on ice, while the pellet was resuspended on two volumes of BLC buffer with 0.1 volumes of 2.5 M sucrose and newly centrifuged at  $630\times g$  at 4 °C for 10 min. Then, both supernatants were mixed and centrifuged for 30 min at  $100,000\times g$ . The recovered pellet was reconstituted in buffer (40 mM Tris-HCl, pH 9.5, 8 M urea and 4% (w/v) Triton X-100). The final protein concentration was determined using the Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Chelmsford, MA, USA). Electrophoresis with an 8% SDS-polyacrylamide gel was used to separate 30- $\mu\text{g}$  protein samples with a constant voltage of 100 mV and then electrotransferred to a nitrocellulose membrane with a constant amperage of 200 mA. Effective electrotransference was verified by staining with Ponceau red, and then, the membranes were blocked with TBS containing 0.1% Tween 20 (TBST) and 5% Blotto overnight at 4 °C. After the membranes were washed, they were incubated with primary antibodies against GluA1 (ab109450 Abcam) (Cambridge, MA, USA) and GluA2 (ab133477, Abcam). Beta tubulin expression was used as the loading control, using rabbit anti mouse- $\beta$  tubulin (T4026) antibodies from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Secondary goat anti-rabbit antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Protein expression was visualized using the ECL system (GE Healthcare Bio-Science, Pittsburgh, PA, USA) and captured with a CDiGit scanner (LI-COR, Lincoln, NB, USA); densitometry was analyzed using ImageJ (vs. 1.49).

### Electrophysiological recordings

Male animals were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg). The animal temperature was maintained with gel thermal pads. Mice were fixed on a stereotaxic frame, and the skull was exposed. Unilateral responses were registered with a stainless steel monopolar electrode located in the dentate gyrus (DG) in the coordinates: AP - 1.82 from Bregma, ML - 1.5 from the midline and DV - 2.0 from the dura (Huang et al. 2012). Responses were unilaterally evoked by a bipolar concentric stainless steel stimulation electrode (100- $\mu\text{m}$  diameter) located in the perforant pathway (PP) at the following coordinates: AP - 3.8 from Bregma, ML - 2.5 from the midline and DV - 1.5 from the dura. Constant 0.2-mV current stimulation was provided by a Grass S48 stimulator and delivered to the stimulating electrode through a Grass Stimulus Isolation Unit (PSUI6). Evoked responses were sent to an amplifier Grass P5. The electric signal was digitalized, stored, and analyzed using the software Datawave SciWorks (Broomfield, CO, USA).

### Input/output curves

To determine the basal synaptic efficiency, I/O curves were generated by systematic variation of the stimulus current ( $1\times$ – $10\times$ ). The relation between the entrance current and the output voltage was measured in the PP-DG. The basal intensity was determined as the minimum stimulation required to evoke a 0.2-mV response.

### Paired-pulse facilitation (PPF)

Paired pulses were evaluated by the systematic variation of the interval length between pulses (10–240 ms). The stimulus current intensity corresponded to 50% of the excitatory post-synaptic potential (EPSP) maximum amplitude.

### Long-term potentiation induction

Baseline was established after 20 min of evoked responses. The applied stimulus intensity corresponded to 50% of the EPSP maximum amplitude. LTP was induced by delivering 5 high-frequency conditioning stimulus trains, each consisting of 10 bursts of 20 pulses each (40 Hz) with 15 s of inter-train time.

### Behavioral analysis

To evaluate the learning and memory effects of the iAs treatment, using the water maze test, 2 batches of 8 PND

90 mice were tested (control and iAs-exposed mice). All tests were performed at 19:00 h under red light.

The pool was a circular plastic tub (1.54 m diameter, 0.60 m depth). The tub was filled with warm water at  $22 \pm 1$  °C to a depth of 0.35 m. Visual clues were located at 4 equidistant points inside the pool at the border level (marked as NE, NW, SE, and SW). Animals were kept in the same room of the pool for the 7 days of the experiment. Animals were introduced into the pool in one of the randomly assigned places: N, S, E, W, NE, NW, SE, and SW. A square (10 × 10 cm) transparent acrylic escape platform was provided and located in the quadrant marked as SW, hidden at approximately 1.5 cm below the water surface.

In the training phase, animals were placed in the pool facing the pool wall and allowed to explore for 60 s. If the animal located the platform in the first day, it was allowed to stay there for 60 s. From days 2 to 6, the animal was allowed to stay on the platform for only 20 s; if the animal was unable to locate the platform, it was directed manually to it and then allowed to stay there for 60 s (first day) or 20 s (day 2 to 6). Each animal was trained 4 times each day, resting in its cage between trials. The memory test was performed on day 7. For the test, the platform was removed, and the animal was placed in the pool at the farthest point from the platform location, allowed to explore for 60 s, and then removed from the water. All sessions were video recorded and then analyzed using Ethovision XT software (11.5.126, Wageningen, The Netherlands).

### Statistical analysis of the data

Data are expressed as average  $\pm$  SE. Student's *t* test or two-way ANOVA tests were used followed by a post hoc Fisher LSD or Sidak tests. A  $P < 0.05$  was considered statistically significant in all cases.

### Ethics

The experiments reported in this article were carried out following the guidelines stated in "Principles for the Care and Use of Laboratory Animal" (NIH publication 8th edition) and the Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) titled "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" (Clave NOM-062-ZOO-1999) (published in August 2001).

### Results

Parental exposure to 20 mg/L of iAs beginning 30 days pre-mating was well tolerated and did not alter body weight, water consumption, or mating behavior (Ramos-Chávez

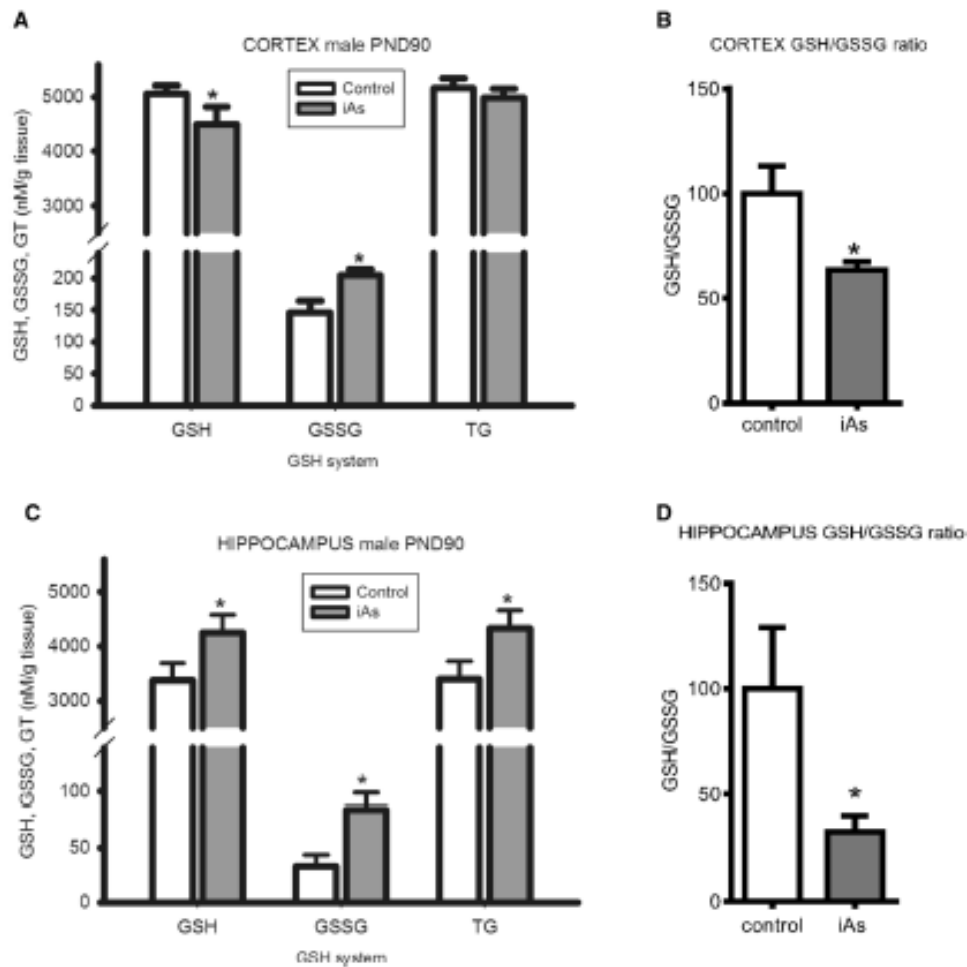
et al. 2015). No differences between control and exposed pregnant females were observed (data not shown). There were no differences in the litter size, weight, or gender proportion (data not shown). The exposed litters did not show signs of overt toxicity throughout the duration of the experiment. Animal weight was registered once a week, while water consumption was determined daily.

### GSH and GSSG levels

According to our previous results, increased levels of xCT transporter were expressed in the hippocampus of iAs exposed mice at PND90. xCT mediates cystine uptake for GSH synthesis in exchange for L-glu. Thus, we investigated GSH and GSSG levels in mice cerebral cortex and hippocampus at PND 90. Cortex GSH levels were significantly reduced (11%), while GSSG levels were 40% increased (Student's *t* test,  $P < 0.05$ ) in iAs-exposed animals. However, no changes were observed in the total GSH concentration (TG) in this structure (Fig. 1a). As a consequence, the GSH/GSSG ratio was diminished by 37% in the iAs-exposed animals (Student's *t* test,  $P < 0.001$ ) (Fig. 1b). In contrast, in the hippocampus, GSH and GSSG levels were increased in exposed animals by 26 and 157%, respectively. Thus, a 29% TG increase was observed (Student's *t* test,  $P < 0.05$ ; Fig. 1c); nonetheless, the GSH/GSSG ratio was still significantly diminished in the treated animals, due to the increase in GSSG (Student's *t* test,  $P < 0.001$ ; Fig. 1d). These results show that GSH content is differentially affected by iAs in the cortex and the hippocampus, suggesting an active GSH synthesis in hippocampus, as have been observed in cultured nervous cells (Singh et al. 2016).

### Extracellular glutamate quantification in the hippocampus

In previous experiments, up-regulation of xCT and down-regulation of GLT1 transporters were observed in the hippocampus of mice exposed to iAs. Since both transporters participate in the regulation of extracellular glutamate concentration, we investigated whether the basal extracellular concentration of glutamate was elevated in the hippocampus of iAs exposed mice at PND90 using microdialysis. The average  $\pm$  SD basal extracellular glutamate concentration determined in the hippocampus of control mice was  $326.8 \pm 43.20$  ng/mL, while in iAs-treated mice, we observed  $477.8 \pm 81.94$  ng/mL, which represents a 46% increase (Student's *t* test,  $P < 0.05$ ;  $n = 6$ ), suggesting either altered removal or basal release of this neurotransmitter.



**Fig. 1** Effect of iAs exposure in PND 90 mice on the GSH system. Concentration of GSH, GSSG, and GT in PND 90 mice in the cortex (a) and hippocampus (c) and GSH/GSSG ratio (b, d). Data were

analyzed using Student's *t* test. \*Significantly different from controls, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ ,  $n = 6$

### AMPA receptor subunit expression

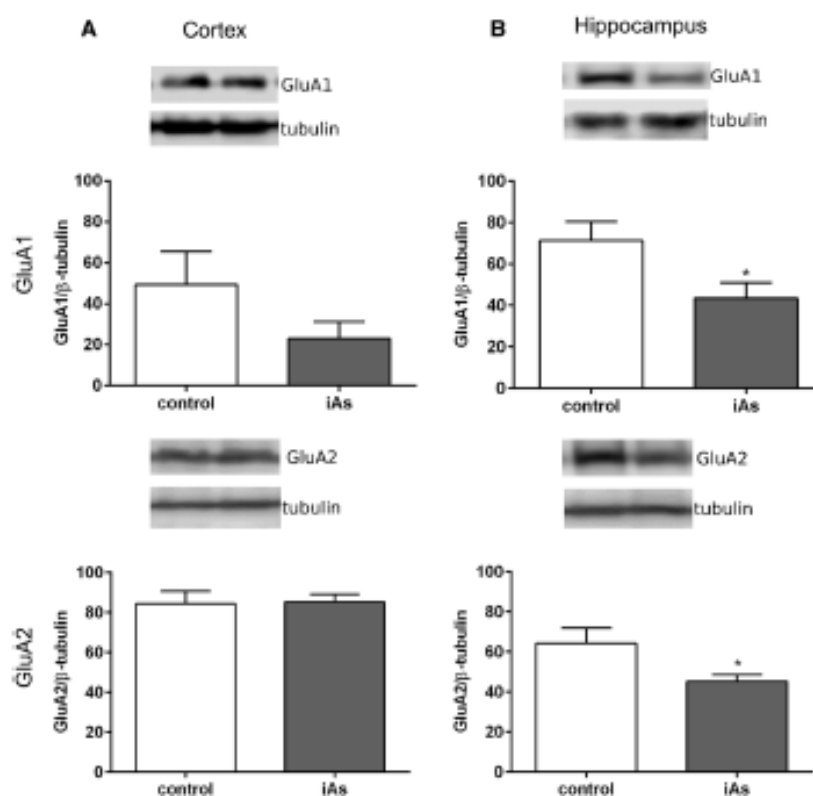
The expression of glutamate receptors at post-synaptic sites can be influenced by variations in extracellular glutamate levels; therefore, we next examined whether changes in GluA1 and GluA2 AMPA receptor subunits, could be observed in the cortex and hippocampus at PND90. Western blot analysis from the cortex of treated and non-treated mice showed no significant changes in AMPA GluA1 and GluA2 subunit expression (Fig. 2a). In contrast, a 57 and 53% down-regulation in GluA1 and GluA2, respectively, was observed in the hippocampus, suggesting a lower

expression of AMPA receptors in the hippocampus of iAs-treated animals ( $P < 0.05$ ; Fig. 2b).

### LTP induction

Due to the significant down-regulation of AMPA receptor subunits in the hippocampus of exposed animals, we investigated whether these changes could affect LTP induction. The induction conditions for LTP were studied in vivo in control and iAs-treated mice at PND90. After high-frequency stimulation, both groups displayed LTP in the PP-DG pathway; however, while the slope of the EPSPs showed a 75%

**Fig. 2** AMPA subunit GluA1 and GluA2 expression in the cortex and hippocampus of PND 90 mice. **a** GluA1-2 subunit expression in the cortex. **b** GluA1-2 subunit expression in the hippocampus. Significant changes were only observed in the hippocampus. Data were analyzed using Student's *t* test. \*Significantly different from controls,  $P < 0.05$ ; GluA1 control  $n = 5$ , iAs  $n = 6$ ; GluA2 control  $n = 6$ , iAs  $n = 6$



increase in control animals, treated animals showed a more discrete increase of only 38% (Fig. 3a). The difference in the slope between the groups was statistically significant (repeated-measures ANOVA differences  $F = 2406.48$ ,  $P < 0.001$  and post hoc LSD  $P < 0.001$ ). We also analyzed the population spike slope change and similar results were found (Fig. 3b). Although both groups presented an increase in the population spike slope, the iAs-treated animals showed a significantly lower capacity to induce LTP than control animals, with a 179 vs. 84% slope increase, respectively (Fig. 3b, repeated-measures ANOVA differences  $F = 5926.73$ ,  $P < 0.001$  and post hoc LSD  $P < 0.001$ ). In the two groups, the changes in the EPSP slope and the population spike slope during LTP were maintained without significant changes for at least 140 min (Fig. 3a, b). These results could be explained by the down-regulation of AMPA receptors and of NR2B NMDA subunit previously observed (Ramos-Chávez et al. 2015) in iAs exposed mice.

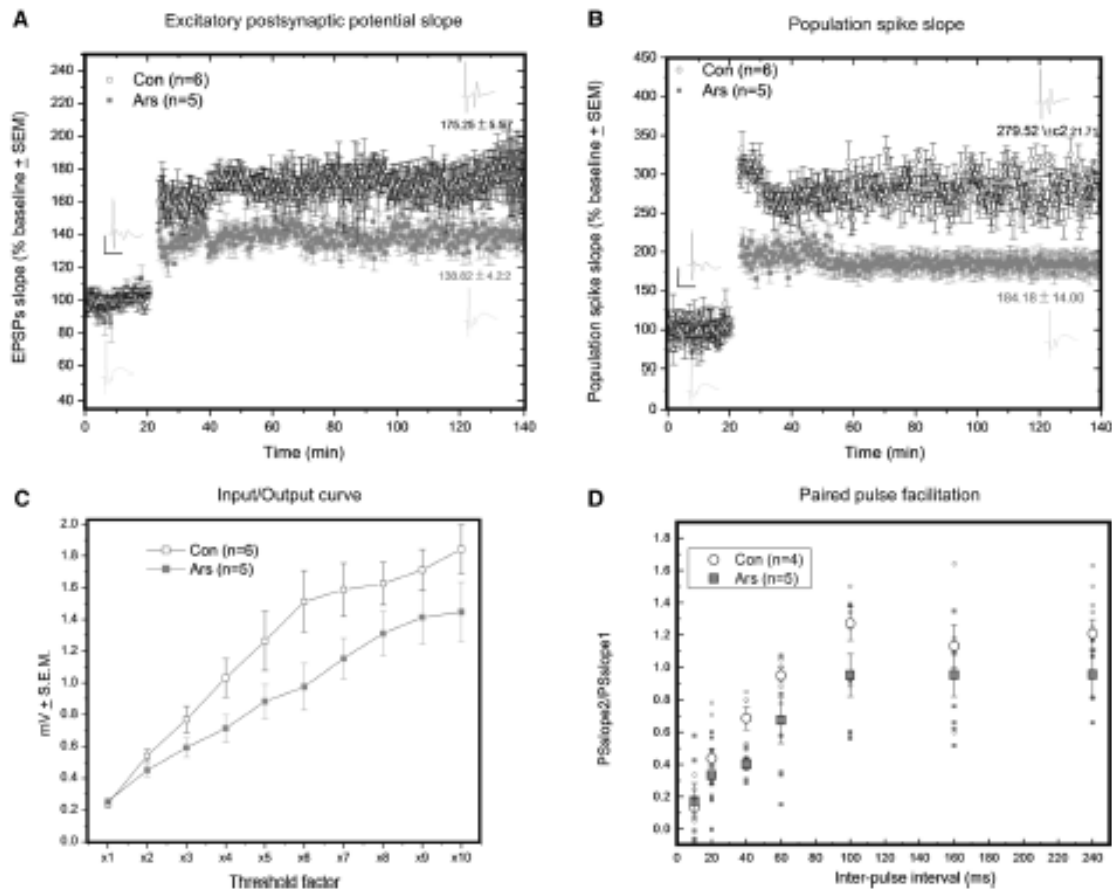
### I/O functions

Considering the results obtained in the LTP experiment, we evaluated the changes in the basal excitatory synaptic

strength by analyzing the input/output curves. The non-linear regression analysis of the baseline I/O curves revealed significant differences between the control group and the iAs-exposed animals in which a reduction in the basal excitability was observed, suggesting that exposure can affect the synaptic strength (Fig. 3c).

### Paired-pulse facilitation (PPF)

Exposure to iAs could also affect LTP presynaptically. To address this problem, we evaluated the PPF process which reflects the increment in the probability in the presynaptic glutamate release. Systematic variation of the interpulse interval between (10–240 ms) was employed to evaluate the PPF. The changes in the relative refractory periods (RRPs) were accentuated as the interpulse period grew larger. Control animals exhibited facilitation when the interval pulse was between 100 and 240 ms. In contrast, iAs-exposed animals did not show facilitation with either of the pulse intervals probed in this report. These results suggest that iAs changes the presynaptic properties in the PP-DG pathway (Fig. 3d).



**Fig. 3** Effect of iAs exposure in PND 90 mice on electrophysiological parameters of the PP-DG. **a** Excitatory post-synaptic potential slope. Conditioning stimulus trains began at 20 min and were maintained for 120 min. Insets show excitatory post-synaptic potentials (EPSPs) of individual fields at basal and post-stimulus conditions; inner

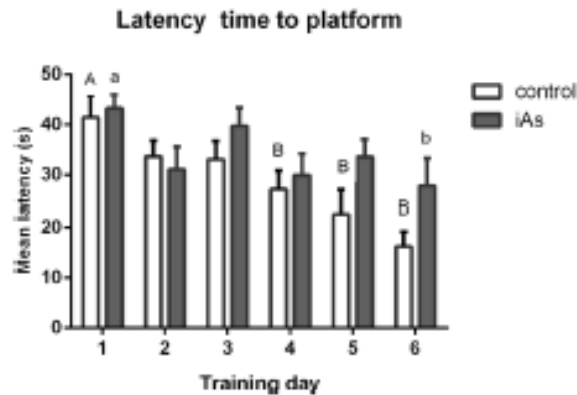
numbers show the average EPSP slope (percent of baseline) from the last 20 min of recording. **b** Population spike slope. Experimental conditions as in **a**. **c** Plot of IO curves for control and iAs groups. **d** Paired-pulse facilitation of the PS amplitude (mean  $\pm$  SEM) of control and iAs animals;  $n=6$

### Behavioral test

The above-described results suggest altered synaptic changes in the PP-DG pathway due to iAs exposure that could impact in learning a memory. We used the Morris Water Maze test a hippocampal learning and memory assay to investigate the impact of exposure in our mouse model. During the training trials, animals from both groups showed a significant reduction in the time needed to locate the platform. Control animals showed a significant difference in the time needed to locate the platform after 4 days of training, while iAs-exposed animals showed significant differences on the last training day (Fig. 4).

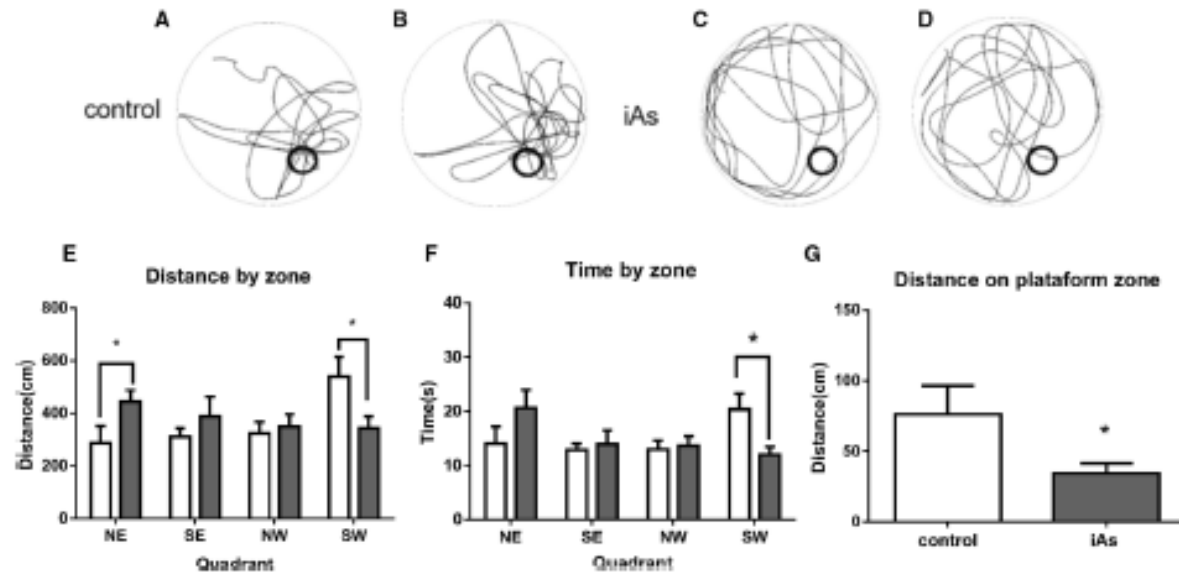
On the memory trial day, no significant differences were observed in the swimming speed between

control and exposed mice, showing that motor skills were not affected (controls  $23.46 \pm 1.04$  cm/s vs. exposed  $25.42 \pm 0.16$  cm/s; Student's *t* test,  $P > 0.05$ ). Control animals showed a significantly longer swim time and distance in the SW quadrant where the platform was located on the training days. Figure 5a, b shows representative track maps of two control and iAs-exposed (Fig. 5c, d) animals. Control animals spent more time swimming in the SW quadrant than the iAs-exposed ones (two-way ANOVA,  $P < 0.01$ , Fisher LSD post hoc test  $P < 0.05$ ). In addition, the time spent by controls in the SW quadrant was greater than the time spent in the rest of the quadrants and was significantly different from where the exposed animals swam (two-way ANOVA,  $P < 0.01$ ; post hoc Fisher LSD test  $P < 0.05$ ; Fig. 5e, f). Finally, the distance



**Fig. 4** Mean latency time to platform for both groups during the training sessions. Significant differences are shown as different letters. Upper case letters are used for the control group and lower case letters for the iAs group. Data were analyzed using a two-way repeated-measures ANOVA,  $F=1.196$ , and post hoc test Sidak,  $P<0.05$ ;  $n=8$

swam in the platform area was higher in control animals than in the iAs-treated mice (Student's  $t$  test,  $P<0.03$ , Fig. 5g).



**Fig. 5** Effects of iAs exposure on the behavioral parameters assessed in the Morris Water Maze experiments. **a–d** Tracks of the mice in the memory test trial. **a, b** Control mice; **c, d** iAs exposed mice. **e** Graphic representation of the distance swam by the animals in each zone. Data were analyzed using a two-way ANOVA and a post hoc Fisher LSD test. \*Significantly different from controls  $P<0.05$ ,  $n=8$ . **f** Time swam by the animals in each zone. Data were analyzed using

## Discussion

In Latin America, several regions have historical records of high concentrations of iAs in the soil and ground water (McClintock et al. 2012), mostly due to the geological origin of bedrock, which has high quantities of volcanic rock and from which iAs can be easily dissolved (Vahter 2008). In this area, approximately 4.5 million people are exposed to iAs through drinking water at levels that exceed 10 ppb (Tyler and Allan 2014).

People exposed to iAs by natural means are in contact with this element for long periods and occasionally through generations (Arriaza et al. 2010; Schlebusch et al. 2015). Thus, contact with iAs can occur at very early stages of life, while its neurotoxic effects may only be observable later in life, as learning and memory impairments.

Developmental exposure to iAs has been associated with an increased risk for critical diseases including neurological defects in children (Tolins et al. 2014; Osorio-Yañez et al. 2015; Ahmed et al. 2017), severely affecting their quality of life and public health resources.

In the case of iAs exposure by drinking water, the levels of As in cord blood are inversely associated with neurodevelopmental indicators (Parajuli et al. 2013). Moreover, neurotoxic effects leading to diminished learning skills in children

a two-way ANOVA and a post hoc Fisher LSD test. \*Significantly different from controls  $P<0.05$ ,  $n=8$ . **g** Mean distance swam by the animals on the platform area. Data were analyzed using Student's  $t$  test. \*Significantly different from controls  $P<0.01$ ,  $n=8$ . Bars represent mean  $\pm$  SEM values. NE northeastern quadrant in the water maze, SE southeastern quadrant, NW northwestern quadrant, SW southwestern quadrant



have been reported in different countries (Calderón et al. 2001; Tsai et al. 2003; Rosado et al. 2007; Von Ehrenstein et al. 2007; Asadullah and Chaudhury 2008; Wasserman et al. 2014).

Mechanistic studies in adult rodents exposed semi chronically or chronically to iAs show glutamatergic hippocampal synaptic disruption involving increased extracellular glutamate levels (Huo et al. 2014), altered NMDA and AMPA receptors expression (Luo et al. 2009; Maekawa et al. 2013; Huo et al. 2015), as well as diminish performance in hippocampal learning paradigms such as the Morris Water Maze (Luo et al. 2009; Tyler and Allan 2014).

In a previous work, we explored iAs gestational exposure in mice brain observing higher levels of xCT in the hippocampus and disrupted cystine–cysteine and L-glu transport associated with an altered expression of the NMDA receptor and diminished spatial memory (Ramos-Chávez et al. 2015). In the present report, using the same model, we observed increased levels of GSH in the hippocampus (Fig. 1) in PND90 animals that are consistent with the increased expression of cystine/L-glu antiporter transporter xCT, previously reported (Ramos-Chávez et al. 2015) and with higher levels of extracellular L-glu.

At the same time, a reduction of AMPA receptor subunits was observed in the hippocampus of exposed animals, suggesting that the excess of extracellular L-glu could be responsible for the negative modulation of this receptor. A paracrine modulation by L-glu released from xCT that suppresses glutamatergic synapse strength by the down-regulation of AMPA was proposed by Williams and Fetherstone (2014), due to the fact that the glial cells of xCT knock-out mice show increased expression of AMPA receptors and enhanced glutamatergic synaptic strength. In addition, the chronic administration of lithium (Li) to rats diminished synaptic AMPA expression in hippocampal neurons by reducing Protein Kinase A (PKA) phosphorylation of the subunit GluA1 at serine S845. These observations were confirmed by whole-cell patch-clamp recordings in CA1 neurons (Du et al. 2009); however extracellular L-glu levels were not determined here. Moreover, synaptic plasticity studies that have explored AMPA receptors trafficking suggest that PKA might play a modulating role (Groc and Choquet 2006). In the rat striatum, sodium arsenite (20 mg/kg of body weight during 28 days) diminished the expression of dopamine receptors and of PKA (Srivastava et al. 2016). These results suggest that arsenite could down-regulate PKA, impairing the phosphorylation of hippocampal AMPA GluA1 subunit and its traffic to the membrane. Lower levels of PKA due to gestational exposure to iAs might explain the impaired synaptic plasticity such as the lower capacity to induce LTP and the reduction in the basal excitability (Fig. 4a–c). It is also possible that the reduction in GluA1-2 AMPA

receptor subunits might be linked to decreasing levels of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) as seen in rat hippocampus of animals exposed chronically to iAs (Luo et al. 2012) as well as lower levels of GluA1, GluA2, and CaMKII mRNA together with a decreased post-synaptic density (PSD) as shown in rat cerebellum after iAs exposure (Zhang et al. 2014). CaMKII is considered a key component of LTP induction; PSD and synaptic strength (Herring and Nicoll 2016).

In addition, the lack of facilitation observed in the PPF test (Fig. 4d) suggests presynaptic alterations that could also be related to the altered L-glu disposition, events that need further investigation.

The presence of arsenic species in rat hippocampus slices has been related to a diminished capacity for LTP induction (Krüger et al. 2009). Then, iAs early in life might impair the synaptic plasticity critical for cognitive functions. These observations are also consistent with the results obtained in the water maze test where gestationally exposed animals showed impaired learning and memory (Fig. 5). Several processes such as oxidative stress disrupted mitochondrial function and energy production could be involved (Prakash et al. 2015) in the impaired extracellular L-glu removal (Ramos-Chávez et al. 2015). Increased L-glu could exert synaptic excitation that might result in a reduction of synaptic strength due to the down-regulation in the number and function of AMPA receptors (Béique et al. 2011; Orlandi et al. 2011; Williams and Fetherstone 2014). In addition, perinatal iAs exposure diminished neurogenesis and cell differentiation in mouse hippocampus (Tyler and Allan 2013), conditions that could impair synaptic formation leading to the lower levels of GluA1 and GluA2 observed in this region (Fig. 2). It is important to mention that increases in L-glu affect nerve cell structure and survival (Lewerenz and Maher 2015), which could lead to aging or neurodegeneration. Nonetheless, we need to understand the mechanism behind the negative modulation of ionotropic L-glu receptors and increased extracellular L-glu in iAs exposed mice hippocampus.

## Conclusions

Male mice gestationally and chronically exposed to iAs showed impaired learning and memory consistent with a diminish synaptic plasticity demonstrated by a decreased capacity for LTP induction and altered presynaptic response. Altered L-glu disposition and ionotropic glutamate receptor expression probably due to iAs metabolism in brain cells could explain mechanistically the learning and memory impairments described in epidemiological studies in iAs impacted populations.

**Acknowledgements** We thank Pavel Petrosyan for his technical support and Unidad de Modelos Biológicos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM for supplying the animals. Janikua Nelson-Mora received a scholar fellowship from CONACYT No 384958, and she thanks the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM for its support. This work received grants from PAPIIT (UNAM) IN 207611, PAPIIT (UNAM) IN 215816 and CONACYT102287 and Red Temática de Salud Ambiental Infantil Conacyt 280296 to María E. Gonshebb. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in the Posgrado en Ciencias Biológicas at the Universidad Nacional Autónoma de México.

## References

- Ahmed S, Akhtar E, Roy A et al (2017) Arsenic exposure alters lung function and airway inflammation in children: a cohort study in rural Bangladesh. *Environ Int* 101:108–116. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.01.014>
- Arriaza B, Amarasiriwardena D, Cornejo L et al (2010) Exploring chronic arsenic poisoning in pre-Columbian Chilean mummies. *J Archaeol Sci* 37:1274–1278. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2009.12.030>
- Asadullah MN, Chaudhury N (2008) Poisoning the mind: arsenic contamination and cognitive achievement of children. *World Bank Policy Research Working Paper*
- Bear Mark F., Barry W, Connors, Paradiso Michael A. (2007) *Neuroscience: Exploring the brain*, 3rd edn. Lippincott, Philadelphia
- Béïque JC, Na Y, Kuhl D et al (2011) Arc-dependent synapse-specific homeostatic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(2):816–821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017914108>
- Bennett D, Bellinger DC, Birnbaum LS et al (2016) Project TENDR: targeting environmental neuro-developmental risks. The TENDR Consensus Statement. *Environ Health Perspect* 124:A118–A122. <https://doi.org/10.1289/EHP358>
- Brady ST, Siegel GJ, Albers RW et al (2012) Basic neurochemistry, principles of molecular, cellular, and medical neurobiology, 8th edn. Elsevier, Boston
- Bridges R, Lutgen V, Lobner D et al (2012) Thinking outside the cleft to understand synaptic activity: contribution of the cystine–glutamate antiporter (System xc<sup>-</sup>) to normal and pathological glutamatergic signaling. *Pharmacol Rev* 64(3):780–802. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003889>
- Calderón J, Navarro ME, Jimenez-Capdeville ME (2001) Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ Res* 85(2):69–76. <https://doi.org/10.1006/enrs.2000.4106>
- Concha G, Vogler G, Lezciano D et al (1998) Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. *Toxicol Sci* 44:185–190
- De Bundel D, Schallier A, Loyens E et al (2011) Loss of system xc<sup>-</sup> does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *J Neurosci* 31:5792–5803. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5465-10.2011>
- Del Razo L, García-Vargas G, Vargas H et al (1997) Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism. A pilot study. *Arch Toxicol* 71(4):211–217
- Devesa V, Adair B, Liu J et al (2006) Arsenicals in maternal and fetal mouse tissues after gestational exposure to arsenite. *Toxicology* 224:147–155. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.04.041>
- Du J, Cresson T, Wu L et al (2009) The role of hippocampal GluR1 and GluR2 receptors in manic-like behavior. *J Neurosci* 28(1):68–79. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3080-07.2008>
- Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA (2008) *Neurochemical aspects of excitotoxicity*. Springer Science, Business Media, New York, pp 1–32
- García-Vargas G, García-Rangel A, Aguilar-Romo M et al (1991) A pilot study on the urinary excretion of porphyrins in human populations chronically exposed to arsenic in Mexico. *Hum Exp Toxicol* 10(3):189–193
- Groc L, Choquet D (2006) AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse. *Cell Tissue Res* 326:423–438. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0254-9>
- Herring B, Nicoll R (2016) Long-term potentiation: from CaMKII to AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Physiol* 78:351–365. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071753>
- Huang Y, Yang S, Hu Z et al (2012) A new approach to location of the dentate gyrus and perforant path in rats/mice by landmarks on the skull. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 72(4):468–472
- Huo T, Zhang Y, Li W et al (2014) Effect of reargal on extracellular amino acid neurotransmitters in hippocampal CA1 region determined by online microdialysis—dansyl chloride derivatization—high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 28(9):1254–1262. <https://doi.org/10.1002/bmc.3154>
- Huo T, Li W, Zhang Y et al (2015) Excitotoxicity induced by reargal in the rat hippocampus: the involvement of learning memory injury, dysfunction of glutamate metabolism and NMDA receptors. *Mol Neurobiol* 51(3):980–994. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8753-2>
- Jin Y, Wang G, Zhao F et al (2010) Distribution of speciated arsenicals in mice exposed to arsenite at the early life. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1323–1326. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.02.012>
- Kapaj S, Peterson H, Liber K et al (2006) Human health effects from chronic arsenic poisoning—a review. *J Environ Sci Health* 41(10):2399–2428. <https://doi.org/10.1080/10934520600873571>
- Kröger K, Straub H, Hirner AV et al (2009) Effects of monomethylarsonic and monomethylarsonous acid on evoked synaptic potentials in hippocampal slices of adult and young rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 236(1):115–123. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.12.025>
- Lanphear B (2015) The impact of toxins on the developing brain. *Annu Rev Public Health* 36:211–230. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031912-114413>
- Lewerenz J, Maher P (2015) Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases—what is the evidence? *Front Neurosci* 9:469. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00469>
- Luo J, Qiu Z, Shu W et al (2009) Effects of arsenic exposure from drinking water on spatial memory, ultra-structures and NMDAR gene expression of hippocampus in rats. *Toxicol Lett* 184(2):121–125. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.10.029>
- Luo J, Qiu Z, Zhang L et al (2012) Arsenite exposure altered the expression of NMDA receptor and postsynaptic signaling proteins in rat hippocampus. *Toxicol Lett* 211:39–44. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.02.021>
- Maekawa F, Tsuboi T, Oya M et al (2013) Effects of sodium arsenite on neurite outgrowth and glutamate AMPA receptor expression in mouse cortical neurons. *Neurotoxicology* 37:197–206. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.05.006>
- Massie A, Schallier A, Kim SW et al (2011) Dopaminergic neurons of system xc<sup>-</sup> deficient mice are highly protected against 6-hydroxydopamine-induced toxicity. *FASEB J* 25:1359–1369. <https://doi.org/10.1096/fj.10.177212>
- Mayer ML, Westbrook GL (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28(3):197–276
- McClintock T, Chen Y, Bundschuh J et al (2012) Arsenic exposure in Latin America: biomarkers, risk assessments and related health

- effects. *Sci Total Environ* 429:76–91. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.051>
- Mejía-Toiber J, Márquez-Ramos JA, Díaz-Muñoz M et al (2010) Glutamatergic excitation and GABA release from a transplantable cell line. *Cell Transplant* 19:1307–1323. <https://doi.org/10.3727/096368910X509059>
- O'Bryant SE, Edwards M, Menon CV et al (2011) Long-term low-level arsenic exposure is associated with poorer neuropsychological functioning: a Project FRONTIER study. *Int J Environ Res Public Health* 8(3):861–874. <https://doi.org/10.3390/ijerph8030861>
- Orlandi C, La Via L, Bonini D et al (2011) AMPA receptor regulation at the mRNA and protein level in rat primary cortical cultures. *PLoS One* 6(9):e25350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025350>
- Osorio-Yáñez C, Ayllón-Vergara J, Arzola-Mendoza L et al (2015) Blood pressure, left ventricular geometry, and systolic function in children exposed to inorganic arsenic. *Environ Health Perspect* 123(6):629–635. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307327>
- Parajuli RP, Fujiwara T, Umezaki M et al (2013) Association of cord blood levels of lead, arsenic, and zinc with neurodevelopmental indicators in newborns: a birth cohort study in Chitwan Valley. *Nepal Environ Res* 121:45–51. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2012.10.010>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0284-9>
- Ramos-Chávez LA, Rendón-López CR, Zepeda A et al (2015) Neurological effects of inorganic arsenic exposure: altered cysteine/glutamate transport, NMDA expression and spatial memory impairment. *Front Cell Neurosci* 9:21. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00021>. eCollection 2015
- Rocha-Amador D, Navarro ME, Carrizales L et al (2007) Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. *Cad Saude Publica* 23(Suppl 4):S579–S587
- Rodríguez VM, Del Razo LM, Limón-Pacheco JH et al (2005) Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicol Sci* 84:157–166. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kf057>
- Rosado JL, Ronquillo D, Katarzyna K (2007) Arsenic exposure and cognitive performance in Mexican schoolchildren. *Environ Health Perspect* 115:119. <https://doi.org/10.1289/ehp.9961>
- Sánchez-Peña LC, Petrosyan P, Morales M et al (2010) Arsenic species, AS3MT amount, and AS3MT gene expression in different brain regions of mouse exposed to arsenite. *Environ Res* 110(5):428–434. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.01.007>
- Schindler J, Jung S, Niedner-Schatteburg G et al (2006) Enrichment of integral membrane proteins from small amounts of brain tissue. *J Neural Transm (Vienna)* 113(8):995–1013. <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0508-4>
- Schliebusch CM, Gattepaille LM, Engström K et al (2015) Human adaptation to arsenic-rich environments. *Mol Biol Evol* 32(6):1544–1555. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv046>
- Schulz P, Cook E, Johnston (1994) Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation. *J Neurosci* 14(9):5325–5337
- Senft AP, Dalton TP, Shertzer HG (2000) Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Anal Biochem* 280(1):80–86. <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0508-4>
- Singh V, Gera R, Kushwaha R et al (2016) Hijacking microglial glutathione by inorganic arsenic impels bystander death of immature neurons through extracellular cystine/glutamate imbalance. *Sci Rep* 6:30601. <https://doi.org/10.1038/srep30601>
- Srivastava P, Dhuriya Y, Gupta R et al (2016) Protective effect of curcumin by modulating BDNF/DARPP32/CREB in arsenic-induced alterations in dopaminergic signaling in rat corpus striatum. *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0288-2>
- Thomas DJ (2007) Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 222 (3):365–373. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.02.007>
- Tolins M, Ruchirawat M, Landrigan P (2014) The developmental neurotoxicity of arsenic: cognitive and behavioral consequences of early life exposure. *Ann Glob Health* 80(4):303–314. <https://doi.org/10.1016/j.aogh.2014.09.005>
- Tsai SY, Chou HY, The HW et al (2003) The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence. *Neurotoxicology* 24(4–5):747–753. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00029-9)
- Tyler CR, Allan AM (2013) Adult hippocampal neurogenesis and mRNA expression are altered by perinatal arsenic exposure in mice and restored by brief exposure to enrichment. *PLoS One* 8(9):e73720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073720>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0012-1>
- Vahter M (2008) Health effects of early life exposure to arsenic. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:204–211. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00168.x>
- Valdovinos-Flóres C, Gonsheiff ME (2013) The role of amino acid transporters in GSH synthesis in the blood-brain barrier and central nervous system. *Neurochem Int* 61(3):405–414. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.05.019>
- Von Ehrenstein OS, Poddar S, Yuan Y et al (2007) Children's intellectual function in relation to arsenic exposure. *Epidemiology* 18:44–51. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b0000000000065613.a9>
- Wasserman GA, Liu X, Loiacono N et al (2014) A cross-sectional study of well water arsenic and child IQ in Maine schoolchildren. *Environ Health* 13:23. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-23>
- Williams L, Featherstone D (2014) Regulation of hippocampal synaptic strength by glial xCT. *J Neurosci* 34(48):16093–16102. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1267-14.2014>
- Zhang C, Li S, Sun Y et al (2014) Arsenic downregulates gene expression at the postsynaptic density in mouse cerebellum, including genes responsible for long-term potentiation and depression. *Toxicol Lett* 228(3):260–269. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.05.007>