



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Neurotoxicidad de la exposición combinada a Arsénico y Flúor a través del agua de beber

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Wendy Leslie González Alfonso

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rocío Salceda Sacanelles  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México. Octubre, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**GONZÁLEZ ALFONSO WENDY LESLIE**  
**Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas**  
**Presente**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **8 de agosto de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctora en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Neurotoxicidad de la exposición combinada a Arsénico y Flúor a través de agua de beber**", dirigida por el/la Dr(a). **GONSEBATT BONAPARTE MARÍA EUGENIA**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

OSTROSKY-WEGMAN SHEJET PATRICIA	PMDCBQ	PRESIDENTE
PEREZ DE LA CRUZ VERONICA	PMDCBQ	SECRETARIO
ADALID PERALTA LAURA VIRGINIA	PMDCBQ	VOCAL
CASTRO OBREGÓN SUSANA	PMDCBQ	VOCAL
DÍAZ VILLASEÑOR ANDREA SACHI	PMDCBQ	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
**Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 8 de agosto de 2023**



**Coordinadora**  
**Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**

## AGRADECIMIENTOS

A las instituciones:

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México; por la administración, orientación y apoyo durante el Doctorado. Al Consejo Nacional de ciencia y Tecnología (CONACyT); por la beca de manutención con número 754245 (No. CVU: 858601), que me fue otorgada para la realización de los estudios de doctorado.

Este proyecto contó con financiamiento del Programa Salud y Ambiente

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrados, PAEP, de la UNAM, por el apoyo recibido para presentar resultados de este trabajo en congreso.

A mi tutor principal:

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios en su laboratorio; y por todo el apoyo, la dedicación y las enseñanzas durante la realización de esta tesis, así como su ayuda y asesoría a nivel personal.

A los cotutores de tesis:

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez y Dra. Rocío Salceda Sacanelles; por las sugerencias y el seguimiento durante el transcurso del posgrado.

A mis compañeros de trabajo y técnicos académicos:

Quisiera agradecer a Lucio y Daniela, colegas que en momentos anteriores pertenecieron al laboratorio, pero siguieron apoyando mi investigación. Agradecimientos especiales al Dr. Pavel Petrosyan, por su apoyo técnico durante estos años y por todo lo que me ha enseñado experimentalmente que me ha hecho crecerme como profesional, pero también por su apoyo incondicional desde el punto de vista personal. También agradezco el apoyo técnico y las sugerencias experimentales proporcionadas por la técnica académica: Sandra Luz Hernández Ojeda. Agradezco al Dr Miguel Tapia Rodríguez, de la Unidad de Microscopía, y al técnico Pedro Medina Granados por su apoyo técnico y asesoramiento durante los estudios histológicos en hígado y cerebro, realizadas durante el programa de doctorado. No quisiera dejar de agradecer a otros técnicos académicos del instituto que fueron de gran ayuda en este trabajo y que estuvieron dispuestos a asesorarme sobre dudas en algunos métodos e incluso préstamo de algunos reactivos como Alejandra Abigail González Valdez, Luis Serrano García y María Alexandra Rodríguez Sastre

A todo el personal de la Unidad de Modelos Biológicos, en especial a Rubí Elizabeth Zavala Gaytán y Filipo Paczka, por toda la disposición y facilidades brindadas, además de su ayuda técnica durante la extracción de muestra sanguínea en los animales.

A mi familia:

Y no por último menos importante, quisiera agradecer a mi mamá, hermana y madrina. A todos ellos que incidieron de alguna manera y me apoyaron a pesar de las circunstancias, a convertirme en la persona que soy. Y que, a pesar de estar lejos ahora mismo de mí, me garantizan la tranquilidad necesaria para poder cursar una etapa importante en mi profesión.

También quiero agradecer a la familia que uno escoge, a mi esposo que me ha apoyado y acompañado desde mi entrada al mundo de la Bioquímica, y sin el cual, no sé si hubiese dado este brinco tan alto de estudiar en el extranjero. Y a mis suegros, los cuales se han portado incondicional conmigo, y me han apoyado durante este largo viaje.



## CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	5
2.1 El Arsénico y el Flúor, una problemática de salud a nivel nacional y mundial.....	5
2.2 Transporte celular y biotransformación del As y F.....	7
2.3 Mecanismos moleculares de toxicidad del As y F .....	10
2.3.1 As .....	10
2.3.2 F .....	12
2.4 Sistema de glutatión, su síntesis y función biológica.....	13
2.5 Homeostasis de la cisteína y su metabolismo.....	15
2.5.1 Alteraciones en la ruta metabólica de conversión de L-Met a L-Cys por exposición a As y F.....	18
2.6 Efectos neurotóxicos del As y F.....	20
2.6.1 As .....	20
2.6.2 F .....	28
2.7 La sinapsis glutamatérgica.....	35
2.7.1 Efectos de As sobre la sinapsis glutamatérgica.....	40
2.7.2 Efectos de F sobre la sinapsis glutamatérgica.....	41
3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	43
3.1 Importancia del modelo experimental para el estudio de exposiciones a As-F .....	43
4. HIPOTESIS .....	44
5. OBJETIVO GENERAL .....	44
5.1 Objetivos específicos:.....	44
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
6.1 Animales y protocolo experimental.....	45
6.2 Determinación de As y F .....	46
6.3 Determinación de los niveles de GSH .....	47
6.4 Actividad de las enzimas de la vía de transulfuración .....	47
6.5 Análisis de expresión de ARNm por RT-qPCR.....	48
6.5.1 Extracción de ARN.....	48
6.5.2 Síntesis de cDNA (Retrotranscripción).....	48
6.5.3 PCR Tiempo Real (qPCR).....	48
6.6 Obtención de la fracción proteica y Western Blots .....	50
6.7 Determinación de la actividad enzimática de transaminasas .....	52
6.8 Pruebas conductuales .....	53

6.8.1	Habitación a la arena y prueba de campo abierto .....	54
6.8.2	Tarea de reconocimiento de objetos novedosos (NOR).....	54
6.8.3	Tarea de reconocimiento de la ubicación de objetos (LOR).....	55
6.9	Análisis estadístico .....	56
7.	RESULTADOS.....	57
7.1	La exposición a As y/o F no modificó el consumo de agua, características de la camada, ni el crecimiento en peso de la progenie.....	57
7.2	La acumulación de As y sus especies metiladas disminuye a los P90, independientemente de la combinación con F, especialmente en hipocampo.....	58
7.3	La exposición combinada disminuye los niveles de GSH a los P30 en la corteza y el hipocampo, pero solo en el hipocampo a los P90. ....	60
7.4	La actividad de la vía de la transulfuración aumenta en la corteza a los P90 en respuesta a la exposición combinada de As y F, pero disminuye en el hipocampo.....	61
7.5	La exposición combinada a As y F aumenta los niveles de ARNm de transportadores de cisteína y metionina en la corteza, mientras disminuye los niveles proteicos de GLT1 en corteza y de xCT en hipocampo a los P90. ....	64
7.6	La exposición combinada a As y F altera la proporción de subunidades de receptores de glutamato y disminuye la actividad de la ALT en la corteza y el hipocampo a los P90. ....	66
7.7	La memoria de objeto dependiente de corteza e hipocampo está afectada tras la co- exposición a As y F.....	69
8.	DISCUSIÓN .....	71
8.1	La exposición a As y F como problema de salud en México.....	71
8.2	La exposición a As y F genera un desbalance redox en la corteza y el hipocampo en diferentes tiempos, asociado a la inhibición de la vía de transulfuración y transporte de cistina. ....	72
8.3	La co-exposición a As y F induce un desbalance en la disponibilidad de Glu, a través de la disminución de los niveles de GLT1, xCT y la actividad de ALT.....	73
8.4	La proporción de subunidades de receptores ionotrópicos de glutamato tipo AMPA y NDMA se modifica por la co-exposición a As y F, lo que resulta en una menor capacidad de memoria en pruebas de reconocimiento de objeto. ....	74
8.5	Predisposición a enfermedades neurológica por toxicidad a As+F, contribución de este trabajo .....	77
9.	RESUMEN GRÁFICO.....	81
10.	CONCLUSIONES.....	83
11.	PERSPECTIVAS .....	84
12.	BIBLIOGRAFIA.....	85
13.	ANEXOS.....	102



## 1. RESUMEN

**Introducción:** La exposición a elementos tóxicos en el agua potable, como el arsénico (As) y el fluoruro (F), comienza en la gestación y se ha asociado con déficits de memoria y aprendizaje en los niños. Los estudios mecanísticos en los que los roedores se han sometido a una exposición a As o F muestran que los efectos neurotóxicos están asociados con su capacidad para alterar el equilibrio redox, principalmente al disminuir los niveles de glutatión (GSH), alterar la biodisponibilidad de glutamato y alterar la expresión del receptor de glutamato, lo que interrumpe la transmisión sináptica. Niveles elevados de As y F son comunes en las aguas subterráneas de todo el mundo. **Objetivo:** Evaluar el efecto neurotóxico de la exposición crónica y combinada a As y F en el balance redox y la transmisión glutamatérgica. **Métodos:** Para explorar la neurotoxicidad de la exposición crónica a As y F en el agua potable, ratones hembras CD-1 gestantes fueron expuestos a 2 mg/L de As (arsenito de sodio) y 25 mg/L de F (fluoruro de sodio). La camada de machos continuó la exposición hasta 30 o 90 días después del nacimiento. En ellos, se evaluaron los efectos de la exposición crónica de As y F sobre los niveles de GSH, la expresión y actividad enzimática de la vía de transulfuración, la expresión de transportadores de cisteína/cistina, transportadores de glutamato y subunidades del receptor de glutamato ionotrópico en la corteza y el hipocampo, así como el desempeño conductual en la tarea de memoria de reconocimiento de objetos. **Resultados:** La exposición a As+F resultó en una reducción significativa en los niveles de GSH en la corteza a los P30; y en el hipocampo a los P30 y P90, una disminución de la actividad enzimática de la vía de transulfuración en ambas regiones, así como una disminución de la expresión de la proteína xCT en el hipocampo. Adicionalmente, se observaron alteraciones en la expresión de subunidades de los receptores de glutamato, y una disminución de la actividad de la enzima ALT en la corteza y el hipocampo. Estas alteraciones moleculares se asociaron con deterioro de la memoria en las tareas de reconocimiento de objetos, que involucra a estas regiones del cerebro. **Conclusión:** La exposición combinación

de As+F, a estas dosis, resultó en el deterioro cognitivo, asociado a alteraciones redox y a nivel de sinapsis glutamatérgica en la corteza y el hipocampo.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Exposure to toxic elements in drinking water, such as arsenic (As) and fluoride (F), starts at gestation and has been associated with memory and learning deficits in children. Studies in which rodents underwent mechanistic single exposure to As or F showed that the neurotoxic effects are associated with their capacity to disrupt redox balance, mainly by diminishing glutathione (GSH) levels, altering glutamate availability, and altering glutamate receptor expression, which disrupts synaptic transmission. Elevated levels of As and F are common in groundwater worldwide. **Objective:** To evaluate the neurotoxic effect of the combined chronic exposure to As and F, on redox balance and glutamatergic transmission. **Methods:** Pregnant CD-1 mice were exposed to 2 mg/L As (sodium arsenite) and 25 mg/L F (sodium fluoride). The male litter continued to receive exposure up to 30 or 90 days after birth. The effects of chronic exposure to As and F on GSH levels, transsulfuration pathway enzymatic activities, expression of cysteine/cystine transporters, glutamate transporters, and ionotropic glutamate receptor subunits as well as behavioral performance in the object recognition memory task were assessed. **Results:** As+F exposure resulted in a significant reduction in GSH levels in the cortex at P30; and in the hippocampus at both times, P30 and P90, decreased transsulfuration pathway enzyme activity in both regions, as well as diminished xCT protein expression in the hippocampus. In addition, altered glutamate receptor expression and decreased ALT enzyme activity were observed in the cortex and hippocampus. These molecular alterations were associated with memory impairment in the object recognition tasks, which relies on these brain regions. **Conclusion:** Combined exposure to low doses of As+F impaired memory, associated with redox disturbance and alteration in glutamatergic synapsis in the cortex and hippocampus.

## Abreviaturas Frecuentes:

As: arsénico

MMA: monometilarsénico

DMA: dimetilarsénico

AS3MT: arsénico-3-metiltransferasa

F: flúor

GSH: glutatión

H<sub>2</sub>S: sulfuro de hidrógeno

SAM: S-adenosil-metionina

CBS: cistationina β sintasa

CSE: cistationinasa o cistationina y liasa

SLC1A1, EAAC1, EAAT3: del inglés, solute carrier family 1 member 1 o excitatory amino acid carrier 1, excitatory amino acid transporter 1 (transportador de cisteína y glutamato en neuronas)

SLC1A2, EAAT2, GLT1: del inglés, solute carrier family 1 member 2 o excitatory amino acid transporter 2, Glutamate transporter 1 (recapturador de glutamato)

SLC1A3, EAAT1, GLAST: del inglés, solute carrier family 1 member 3 o excitatory amino acid transporter 1 or glutamate – aspartate transporter (recapturador de glutamato)

SLC1A4 o ASCT1: del inglés, solute carrier family 1 member 4 o alanine-serine-cysteine transporter 1 (transportador de cisteína, serina, alanina)

SLC1A5 o ASCT2: del inglés, solute carrier family 1 member 5 o alanine-serine-cysteine transporter 2 (transportador de cisteína, serina, alanina, también transporta glutamina)

SCL7A5 o LAT1: del inglés, solute carrier family 7 member 5 o L type aminoacid transporter 1 (transportador antiporte de aminoácidos grandes neutros, incluyendo metionina)

SCL7A8 o LAT2: del inglés, solute carrier family 7 member 8 o L type amino acid transporter 2 (transportador antiporte de aminoácidos grandes neutros, incluyendo metionina)

SLC7A11 (xCT): del inglés, solute carrier family 7 member 11 (transportador antiporte de cistina y glutamato)

NMDAR: del inglés, N -methyl-D-aspartate (NMDA)- type glutamate receptor (receptor ionotrópico de glutamato tipo NMDA)

NR2A: del inglés, NMDA-receptor subunit 2A

NR2B: del inglés, NMDA-receptor subunit 2B

AMPA: del inglés, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionic acid (AMPA)- type glutamate receptor (receptor ionotrópico de glutamato tipo AMPA)

GluA1: del inglés, glutamate receptor AMPA type subunit 1

GluA2: del inglés, glutamate receptor AMPA type subunit 2

NOR: del inglés, novel object recognition

LOR: del inglés, location of object recognition



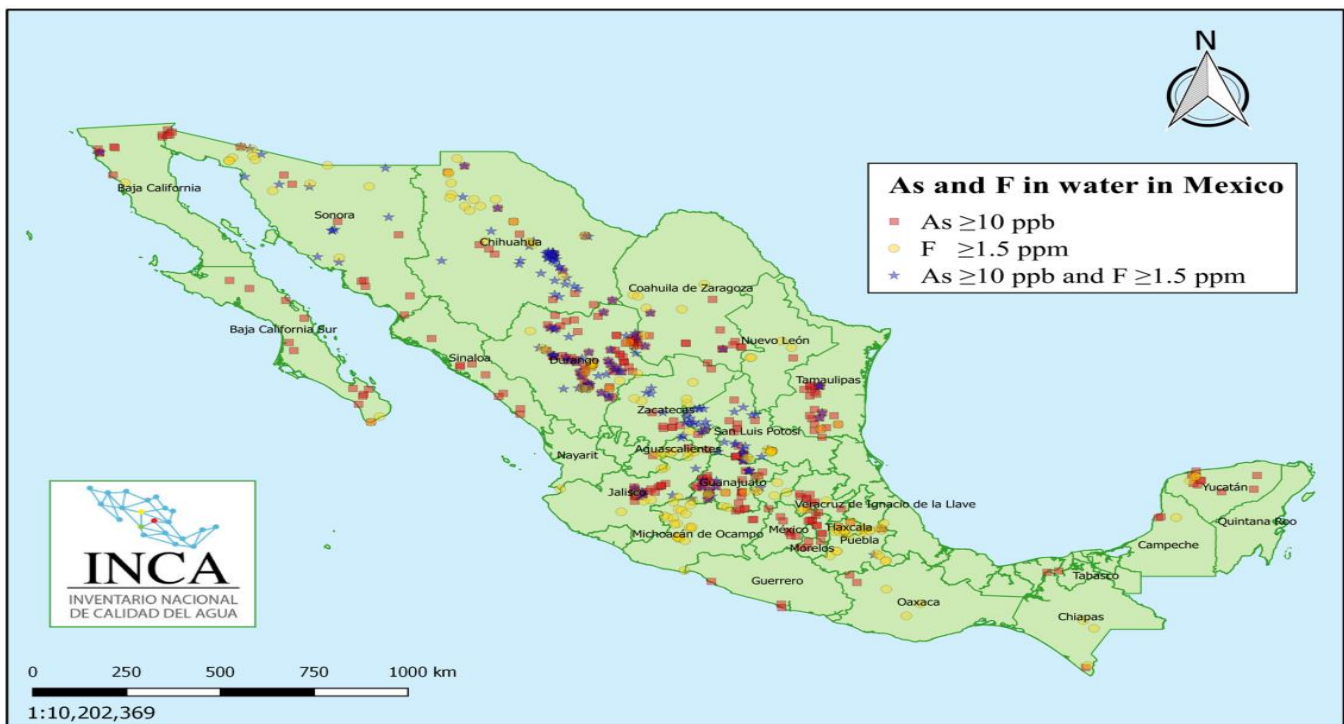
## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 El Arsénico y el Flúor, una problemática de salud a nivel nacional y mundial

El arsénico (As) y el flúor (F) son elementos ubicuos en la superficie terrestre que se consideran contaminantes naturales importantes en numerosos países como Argentina, Chile, China, India, México, Taiwán y Estados Unidos. Se encuentran presente en el suelo, aire y agua, producto de procesos naturales como erupciones volcánicas y la lixiviación del suelo. La co-exposición a ambos elementos ocurre porque poseen una geogenia similar (Howard y cols., 2006). En adición, procesos antropogénicos como la actividad minera, actividad industrial y el uso de pesticidas que contienen As o F conllevan al aumento de estos elementos en la superficie terrestre (McClintock y cols., 2012; Ranjan y Ranjan, 2015). La exposición a As y F puede ocurrir a través de inhalación, sobre todo en regiones con alta actividad volcánica; y a través de la ingesta de alimentos y aguas contaminadas. La exposición a través de agua de beber contaminada es considerada como la principal vía de exposición a ambos elementos (McClintock y cols., 2012). Debido a que inicialmente al F se le asociaron efectos benéficos, sobre todo en el cuidado bucal, por sus propiedades anticariogénicas y en la formación de los dientes, los programas de salud comenzaron a incorporar F en productos como la sal, bebidas fluoradas y productos dentales; constituyendo esta, una vía importante de exposición crónica a F (Limón-Pacheco y cols., 2018; Jimenez Cordova y cols., 2018a).

El As puede encontrarse principalmente como arsenito ( $\text{As}^{3+}$ ) o arsenato ( $\text{As}^{5+}$ ). El  $\text{As}^{3+}$  es la forma más tóxica y abundante en condiciones poco oxigenadas, por lo cual la distribución de As en las pozas de agua varía con la profundidad y oxigenación de estas. Para el caso del F, éste se encuentra principalmente en el agua, en forma iónica en condiciones de pH relativamente bajo, dureza de agua y presencia de minerales intercambiadores de iones. Adicionalmente, las concentraciones de F disuelto en las aguas subterráneas pueden variar naturalmente según las características geológicas, químicas y físicas de los suelos, además de la complejidad de otros elementos presentes en las aguas; por ejemplo,

altas concentraciones de calcio en el agua disminuyen la concentración efectiva de F (Barbier y cols., 2010; Ranjan y Ranjan, 2015). En México, se han reportado niveles altos de As y F, especialmente en estados rodeados por la Sierra Madre Occidental y Oriental, como Chihuahua, Durango, Zacatecas y Guanajuato, resaltando la similar geogenia de ambos elementos y la alta participación de fuentes naturales en la deposición de estos elementos en aguas subterráneas. En algunas regiones se pueden alcanzar niveles tan altos como: 0.65 mg/L de As y 13.3 mg/L de F en Durango; 0.45 mg/L de As y 11.8 mg/L de F en Chihuahua; 0.4 mg/L de As y 21.45 mg/L de F en Zacatecas; y 0.17 mg/L de As y 23.4 mg/L de F en Guanajuato (Alfaro de la Torre y cols., 2018). Generalmente, la proporción en la que se encuentran estos elementos varía entre 1:20 – 1:50. En la Figura 1 se muestra la distribución de pozos de aguas en México con niveles superiores a los recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS).



**Figura 1.** Distribución de sitios en México con concentración de As disuelto mayor a 10  $\mu\text{g/L}$  o ppb y F disuelto mayor a 1.5 mg/L o ppm. Tomado de Limón-Pacheco y cols, 2018.

La OMS recomienda que el agua de bebida no contenga más 10  $\mu\text{g/L}$  (10 ppb) de As y 1.5 mg/L (1.5 ppm) de F. Sin embargo, la normativa mexicana, en el caso del

As, aún mantiene el límite de 25 µg/L para el agua de bebida y de 10 µg/L para el agua embotellada (SSA, 2021).

Un estudio realizado en México reveló que aproximadamente entre 500,000 y 6,000,000 niños de hasta 14 años, están expuestos a niveles superiores a los 10 µg/L de As y/o 1.5 mg/L de F respectivamente en agua de beber; y aproximadamente el 40% de las localidades presentaban niveles superiores a los recomendados tanto para As como para F (Limón-Pacheco y cols., 2018).

Numerosos efectos tóxicos han sido asociados a la exposición tanto aguda como crónica a As y F. Siendo mucho más preocupantes las exposiciones crónicas, ya que muchos de los síntomas que presentan los individuos expuestos se manifiestan (dependiendo de la dosis) después de muchos años de exposición y se relacionan con sintomatologías de enfermedades comunes, lo cual retrasa o dificulta el diagnóstico de exposición. La exposición crónica a As se ha relacionado con diversos desórdenes en diferentes sistemas de órganos como afectaciones endócrinas, cardiovasculares, respiratorias, renales, de la piel y nerviosas. Adicionalmente, el As es considerado un carcinógeno en humanos. La exposición crónica a As se vincula a una mayor incidencia de numerosos tipos de cáncer, entre ellos, vejiga, pulmón, riñón y piel (Hughes, 2002; Flora, 2011; Hong y cols., 2014).

Entre los efectos adversos de la exposición crónica a F destacan la fluorosis dental y esquelética, alteraciones endocrinas, disfunción cognitiva, daño renal, alteraciones cardiovasculares y afectaciones del sistema inmune. Estas afectaciones han sido descritas tanto en adultos como en niños, siendo estos últimos quienes presentan una mayor susceptibilidad (Barbier y cols., 2010; Ranjan y Ranjan, 2015; Jimenez-Cordova y cols., 2018; Jimenez Cordova y cols., 2018a).

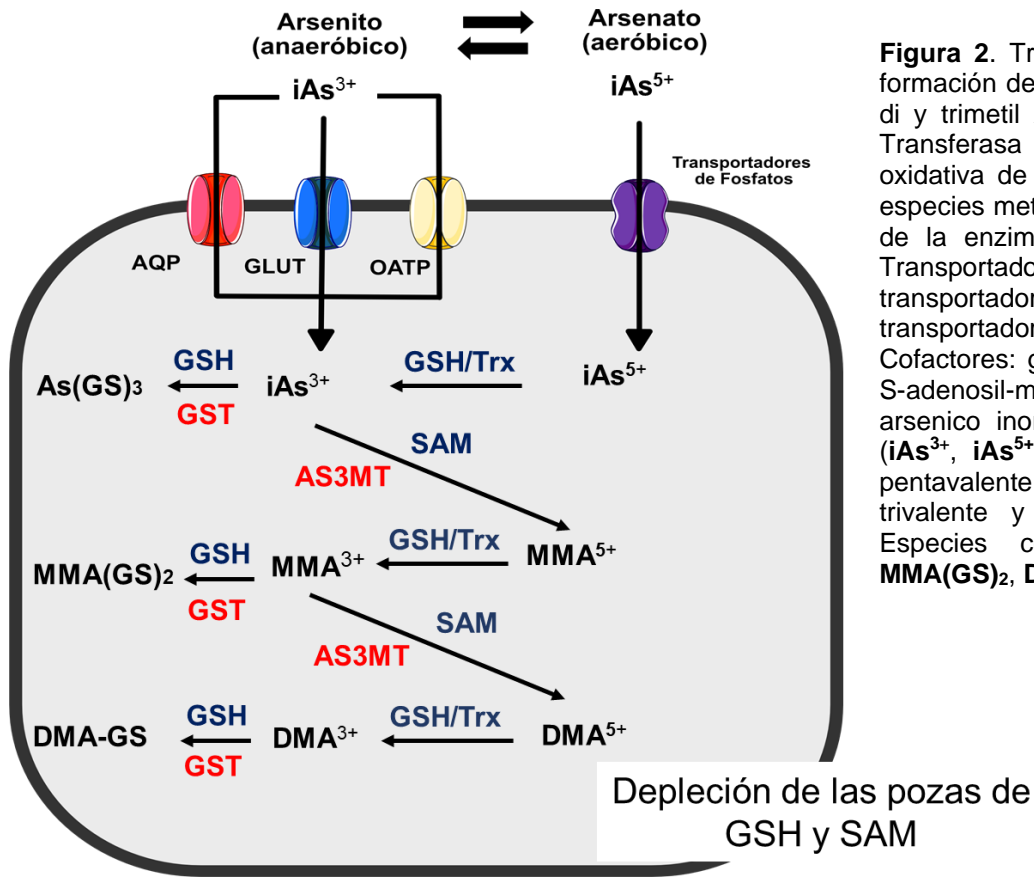
## **2.2 Transporte celular y biotransformación del As y F**

El As se absorbe principalmente en el intestino. El As trivalente ( $As^{3+}$ ) entra a las células mediante difusión facilitada a través de las acuagliceroporinas, transportadores de glucosa y transportadores de aniones orgánicos, mientras que en estado pentavalente ( $As^{5+}$ ) a través del transporte de fosfatos dependiente de

sodio. El  $\text{As}^{5+}$  es rápidamente reducido dentro de la célula a  $\text{As}^{3+}$ , proceso que consume glutatión (GSH) y/o tiorredoxina (Trx) (Jomova y cols., 2011). El hígado es el principal órgano encargado de la biotransformación de As para su posterior eliminación. Sin embargo, en mamíferos la mayoría de los tejidos poseen dicha capacidad de metilar el As, incluyendo el cerebro, dada la posibilidad del As de cruzar barrera hematoencefálica y acumularse en el cerebro. El As sufre un proceso de metilación oxidativa (Figura 2), mediado por la enzima Arsénico-3-metiltransferasa (AS3MT). Este proceso utiliza como cofactor donador de metilos a la S-adenosilmetionina (SAM). Este ciclo de metilación se repite formándose especies metiladas de As, con distintos niveles de metilación, como las especies mono, dimetiladas y hasta trimetiladas (esta última principalmente en el hígado) (MMA, DMA y TMA, respectivamente). La AS3MT tiene como sustrato las especies trivalentes del As, y da como producto una especie metilada pentavalente del As, lo que implica un paso intermedio de reducción que consume GSH. Además, el As y sus especies pueden encontrarse conjugadas con GSH, para su exportación de la célula a través de transportadores de resistencia a fármacos, y otros transportadores relacionados con la desintoxicación de xenobióticos. La principal vía de eliminación de As y sus especies biotransformadas del cuerpo es la orina (Thomas, 2007; McClintock y cols., 2012). A pesar de que el proceso de biotransformación acelera su eliminación, es importante resaltar que las especies metiladas trivalentes generadas, presentan mayor toxicidad que las especies inorgánicas (Jomova y cols., 2011).

El F ingerido se absorbe principalmente en el estómago, a través de difusión simple en forma de HF, el cual es dependiente de las altas concentraciones de  $\text{H}^+$  presentes en el estómago. Algunos factores como la naturaleza química y la solubilidad de los compuestos de fluoruros regulan la magnitud y velocidad de la absorción de F dependiente de pH; por ejemplo, las formas inorgánicas del F son más solubles y son absorbidas rápidamente y las sales de F con cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  presentan pobre biodisponibilidad. De igual manera, la presencia





**Figura 2.** Transporte y metabolismo de As y formación de las especies orgánicas de mono, di y trimetil As. La enzima Arsénico 3 Metil-Transferasa (**AS3MT**) cataliza la metilación oxidativa de As. La conjugación de As y sus especies metiladas con GSH ocurre por acción de la enzima glutatión S-transferasa (**GST**). Transportadores: acuagliceroporina (**AQP**), transportador de Glucosa (**GLUT**), transportador de aniones orgánicos (**OATP**). Cofactores: glutatión (**GSH**), tioredoxina (**Trx**), S-adenosil-metionina (**SAM**). Metabolitos: arsénico inorgánico trivalente y pentavalente (**iAs<sup>3+</sup>**, **iAs<sup>5+</sup>**), monometilarsénico trivalente y pentavalente (**MMA<sup>3+</sup>**, **MMA<sup>5+</sup>**), dimetilarsénico trivalente y pentavalente (**DMA<sup>3+</sup>**, **DMA<sup>5+</sup>**). Especies conjugadas a GSH (**As(GS)<sub>3</sub>**, **MMA(GS)<sub>2</sub>**, **DMA-GS**)

de grasa, proteínas o fibras en el tracto gastro-intestinal pueden regular el dicho proceso de absorción (Barbier y cols., 2010; Ranjan y Ranjan, 2015).

El F también puede ser absorbido en el intestino por transporte independiente de pH, posiblemente a través de transportadores de aniones como  $I^-$ ,  $Cl^-$  (He y cols, 1998) debido a las similares características químicas de estos elementos. Adicionalmente, He y cols., (1998) sugieren la posibilidad de un cotransporte dependiente de  $H^+$  o intercambiador dependiente de  $OH^-$ . A pesar de estas evidencias, algunos estudios termodinámicos sugieren la no participación de transportadores de aniones ubicuos de  $Cl^-$  o  $I^-$ , en el transporte de F. Esto se debe a que el F requiere mayor energía de de-solvatación que estos otros halógenos, y es una base más fuerte, especialmente en bajos ambientes dieléctricos como el interior de proteínas, lo que podría reducir la probabilidad compartir el mismo tipo de transporte (McIlwain y cols, 2021). En bacterias, plantas, levaduras y algunos animales poco complejos como las esponjas de mar, se han descrito la inducción

de transportadores encargados de la exportación de F, como mecanismo de defensa a sus efectos tóxicos. Estos transportadores presentan características específicas que le permiten romper a estas barreras bioenergéticas y permitir el transporte preferencial de F sobre otros halógenos (Berbasova y cols, 2017). No obstante, hasta el momento no se ha identificado ningún gen que tenga cierto grado de similitud estructural en mamíferos, al cual se le pudiese adjudicar dicha funcionalidad.

Una vez absorbido, el F llega rápidamente a varios órganos como hígado, riñón, corazón, tiroides y cerebro donde puede ejercer sus efectos tóxicos. Hasta un 80% del fluoruro ingerido se acumula preferentemente en los dientes y huesos ocasionando fluorosis dental y fluorosis esquelética. Finalmente, el fluoruro es removido de la sangre por el riñón y eliminado a través de la orina (Barbier y cols., 2010; Ranjan y Ranjan, 2015). Hasta el momento, no se ha descrito algún proceso de biotransformación del F dentro de la célula. El F es capaz de cruzar la placenta y afectar al feto en desarrollo.

## **2.3 Mecanismos moleculares de toxicidad del As y F**

### **2.3.1 As**

Uno de los principales efectos celulares del As es la generación de estrés oxidante, El As afecta la actividad y expresión de los complejos mitocondriales de la cadena de transporte de electrones, lo que favorece la generación de ROS. Además, las especies metiladas también pueden favorecer la generación de ROS, dado que pueden desplazar al hierro (Fe) de las proteínas con que se asocia y el Fe libre favorecer la generación de radical hidroxilo a través de la reacción de Haber-Weiss. Adicionalmente, DMA<sup>3+</sup> en presencia de oxígeno, favorece la generación de superóxido y radicales de As (Thomas, 2007; Flora, 2011). Por otro lado, durante la biotransformación de As, el GSH es utilizado para reducir y conjugar el As y sus especies metiladas, lo cual disminuye las pozas de GSH. También, las especies metiladas de As son capaces de inhibir enzimas relacionadas con las defensas antioxidantes como glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR),

superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Shila y cols., 2005; Rodríguez y cols., 2005; Thomas, 2007; Flora, 2011; Prakash y cols., 2015).

El  $\text{As}^{3+}$  es capaz de afectar la funcionalidad de diversas proteínas a través de la unión a los grupos tioles de los aminoácidos. Por esta razón, afecta numerosos procesos celulares, entre los que se encuentra la reparación del DNA, señalización celular, el metabolismo celular, entre otros (Hughes, 2002; Muenyi y cols., 2015). En contraste, el  $\text{As}^{5+}$  puede interferir en reacciones dependiente de fosfato, debido a su similitud con este, afectando así la generación de ATP, la fosforilación de proteínas y síntesis de neurotransmisores (Hughes, 2002; Jomova y cols., 2011).

Los efectos genotóxicos de As, pueden estar asociados a su capacidad de generar estrés oxidante, inhibir enzimas de reparación y generar entrecruzamientos de DNA con proteínas (Ramírez y cols., 2000), así como a su actividad aneugénica (Vega y cols., 1995). El As también puede alterar la expresión génica a través de modificaciones epigenéticas, principalmente cambios en la metilación de DNA, lo cual podría estar asociado a la depleción de las pozas de SAM durante el metabolismo del As (Reichard y Puga, 2010).

Un aspecto importante por señalar es la capacidad del As y sus metabolitos de cruzar la placenta, y afectar el desarrollo fetal. Diversos estudios en humanos han demostrado que el As puede ser detectado en sangre de cordón umbilical, así como en las uñas de los recién nacidos cuyas madres estuvieron expuestas durante la gestación (Parajuli y cols., 2013; Punshon y cols., 2015; Davis y cols., 2017). Estudios de exposición gestacional en modelos animales han demostrado la presencia de As en cerebro de las crías (Jin y cols., 2006). Evidencias epidemiológicas vinculan la exposición gestacional y/o temprana en la vida, con el desarrollo de enfermedades que podrían comenzar en la infancia, y expresarse en la vida adulta como enfermedades pulmonares, neurológicas y cardiovasculares, pérdida fetal, defectos de nacimiento y desarrollo de cáncer. Varios autores asocian estas consecuencias de la exposición gestacional, a cambios en el proceso de reprogramación epigenética que ocurre durante estas etapas de desarrollo (Waalkes y cols., 2004; Carvalho y cols., 2008; Reichard y Puga, 2010).

### 2.3.2 F

El principal mecanismo molecular de toxicidad del F está asociado también a la generación de un desbalance redox celular. El F potencia la generación de ROS y la inhibición de sistemas antioxidantes celulares, principalmente depleción de GSH e inhibición de enzimas antioxidantes, entre ellas SOD, GPx, CAT, etc. (Shanthakumari y cols., 2004; Chouhan y Flora, 2008; Gao y cols., 2008; Bharti y Srivastava, 2009; Flora y cols., 2009; Basha y Madhusudhan, 2010; Chouhan y cols., 2010; Basha y cols., 2011). El F puede actuar como desacoplante de la cadena de transporte de electrones, afectando el proceso de respiración celular y favoreciendo la generación de ROS. Debido a su alta electronegatividad, este elemento es capaz de interferir con la formación de puentes de hidrógenos y uniones electrostáticas dentro y entre proteínas, por lo que interfiere en diferentes procesos celulares. Entre ellos, puede alterar los procesos de síntesis proteica y de tráfico vesicular, lo cual está asociado con una menor secreción de neurotransmisores y defectos en la formación de la dentina y enamel (Barbier y cols., 2010; Everett, 2011). Adicionalmente, la exposición a F está relacionada con un desbalance iónico, alterando la disposición de iones esenciales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{I}^-$ , lo que está relacionado con alteraciones tiroideas, cardiacas y renales. El F también puede llevar a un déficit energético, vinculado a la inhibición de enzimas de la vía glicolítica y ciclo de Krebs, la inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y pérdida del potencial de membrana (Barbier y cols., 2010).

En cuanto a la genotoxicidad, algunos autores sugieren que la exposición a F puede inducir daños a nivel de ADN, principalmente a través de la generación de estrés oxidante, la alta afinidad del F por los grupos aminos de las bases nitrogenadas, y la inhibición de las ADN polimerasas, afectando la replicación y reparación del ADN. No obstante, las evidencias son muy contradictorias y se necesita más investigación (Barbier y cols., 2010; Chouhan y Flora, 2010).

## **2.4 Sistema de glutatión, su síntesis y función biológica.**

El GSH es un péptido formado por L-glutamato (Glu), L-cisteína (Cys) y L-glicina (Gly). La síntesis de GSH ocurre en el citosol, y de allí se distribuye al resto de los compartimentos celulares como el núcleo y las mitocondrias (Ribas y cols., 2014). Las mitocondrias expresan varios transportadores de GSH, sin embargo, los niveles de GSH intramitocondrial parece depender principalmente del transportador del transportador SLC25A39/40 (del inglés, solute carrier family 25 member 39/40), cuya traducción está regulada directamente por niveles de GSH (Wang y cols., 2021), a diferencia de los otros transportadores de GSH presentes en las mitocondrias.

La síntesis de GSH involucra dos pasos enzimáticos dependientes de ATP. El primer paso es llevado a cabo por la  $\gamma$ -glutamilcisteína ligasa e involucra la formación de un enlace  $\gamma$ -peptídico entre la Cys y el Glu. Este es considerado el paso limitante de la síntesis de GSH. La segunda reacción enzimática se encarga de la unión de Gly al dipéptido  $\gamma$ -glutamilcisteína a través de la GSH sintetasa (Lu, 2013). El enlace  $\gamma$ -péptido presente entre la Cys y el Glu, le provee de resistencia a degradación por la mayoría de las peptidasas celulares, mientras que el grupo tiol de la Cys participa en la mayoría de las reacciones asociadas a sus funciones celulares. En el sistema nervioso central (SNC), la síntesis de GSH, involucra la estrecha cooperación entre astrocitos y neuronas. La síntesis de GSH está favorecida en astrocitos debido a la presencia exclusiva del transportador xCT que captura cistina (Cys<sub>2</sub>), la forma oxidada de cisteína y más abundante en el espacio extracelular. Posterior a su síntesis, los astrocitos exportan el GSH, el cual es degradado por peptidasa específicas expresadas en la cara extracelular de la membrana plasmática, y favorecen la captura de su producto (aminoácidos como cisteína) por neuronas, y la posterior síntesis de GSH dentro de las neuronas (Lu, 2013; Aoyama, 2021). La síntesis de GSH está regulada por los niveles energéticos, debido a su dependencia por el ATP para llevar a cabo la reacción, así como las condiciones redox celulares. En situaciones oxidantes, se induce la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de GSH y la expresión de los

transportadores de aminoácidos que lo componen, a través de la acción de los factores de transcripción: NRF2 (del inglés, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) y NF- $\kappa$ B (del inglés, Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Lu, 2009).

El GSH está involucrado en diferentes procesos celulares como son la regulación metabólica, expresión génica, transducción de señales, respuesta antioxidante, desintoxicación metabólica y de xenobióticos, entre otros. Entre las funciones celulares más reconocidas del GSH, está su participación en la defensa antioxidante. El GSH constituye la principal molécula de bajo peso molecular con propiedades antioxidantes. Es la molécula antioxidante más abundante en diferentes tejidos y tipos celulares. Dicha función está asociada con la capacidad del GSH de oxidarse formando un enlace disulfuro entre dos moléculas de GSH, tras reducir moléculas oxidantes y radicales libres, como son el radical hidroxilo, superóxido y el peróxido de hidrógeno. Este proceso puede ocurrir directamente o ser catalizado enzimáticamente por las GSH peroxidasas. El GSH oxidado es reducido nuevamente a través de la GSH reductasa. Este ciclo redox del GSH, es conocido como sistema del GSH (Ribas y cols., 2014; Aoyama, 2021).

El GSH también participa en los procesos de desintoxicación de xenobióticos y/o eliminación de metabolitos de desecho. El GSH es utilizado como cofactor de enzimas de metabolismo de fase II, como las GSH-S-transferasas, los cuales conjugan moléculas de GSH a dichos metabolitos para aumentar su polaridad y solubilidad y favorecer su eliminación (Li, 2009). Además, el GSH participa en reacciones redox, como agente reductor, como ocurre durante el metabolismo de As, mencionado anteriormente, tras la acción de la As3MT (Jomova y cols., 2011).

En las mitocondrias, además de actuar como agente reductor participa también en la formación de los complejos de hierro y azufre (Fe-S) mitocondriales. La pérdida de los transportadores de GSH mitocondrial SLC25A39/40, resulta en una disminución en los niveles de GSH mitocondrial, sin alterar los niveles de GSH citosólico; y a su vez, en defectos en la expresión y estabilidad de proteínas que contiene complejos Fe-S (Wang y cols., 2021). Algunas de estas proteínas incluyen

enzimas del ciclo Krebs como la aconitasa, y de la cadena de transporte electrónico. Además, defectos en la formación de Fe-S, altera la homeostasis celular de Fe, conllevando a una sobrecarga de Fe libre en la mitocondria y favoreciendo la formación de ROS a través de reacción de Fenton (Ye y Rouault, 2010).

Debido a su composición aminoacídica, el GSH es considerado un reservorio tanto de Glu como de Cys, siendo un blanco importante y regulador de las pozas de estos aminoácidos, sobre todo en cerebro. En el cerebro los niveles de GSH tienen un papel importante en la regulación de las pozas de Glu, el aminoácido excitatorio más abundante en el SNC (Sedlak y cols., 2019; Aoyama, 2021).

## **2.5 Homeostasis de la cisteína y su metabolismo.**

La L-Cys es un aminoácido semi-esencial y constituye el sustrato limitante en la síntesis de GSH. La L-Cys se puede encontrar en dos formas en el espacio extracelular: reducida u oxidada. Existen diferentes sistemas de transportes involucrados en la captura de L-Cys y estos presentan diferentes afinidades para la forma reducida y oxidada de la L-Cys. Estos sistemas de transporte se dividen en dos grandes familias: SLC1 (del inglés, solute carrier family 1), transportadores dependientes de sodio; y SLC7 (del inglés, solute carrier family 7), transportadores heterodímeros independiente de sodio (Valdovinos-Flores y Gonsebatt, 2012; Kandasamy y cols., 2018). Dentro de la familia SLC1 se encuentran los sistemas X<sub>AG</sub> y ASC, y dentro de la familia de los SLC7, el sistema X<sub>c</sub><sup>-</sup>, L y b<sup>0,+</sup>. Los sistemas X<sub>AG</sub> y ASC transportan principalmente L-Cys, mientras que X<sub>c</sub><sup>-</sup> y b<sup>0,+</sup> son antiporters Cys<sup>2-</sup>: L-Glu. Dentro de estos últimos, los miembros más relevantes son SLC7A5/SLC7A8 (L system), SLC7A11(X<sub>c</sub><sup>-</sup> system), SLC7A9 (b<sub>0,+</sub> system), SLC1A1 (X-AG system) y SLC1A4/SLC1A5 (ASC system) (Kandasamy y cols., 2018). La expresión de los miembros de cada sistema es diferente entre tejidos. Los miembros SLC7A8 y SLC1A5, se expresan principalmente en órganos periféricos como hígado, mientras SLC7A5 y SLC1A4 en cerebro (Fotiadis y cols., 2013; Kanai y cols., 2013; Nakagawa y Kaneko, 2013). La expresión de SLC1A1 y SLC7A11 es muy importante en cerebro, debido a su distribución diferencial entre neuronas y astrocitos y su relación con la homeostasis de Glu (Paul y cols., 2018). SLC1A1 se

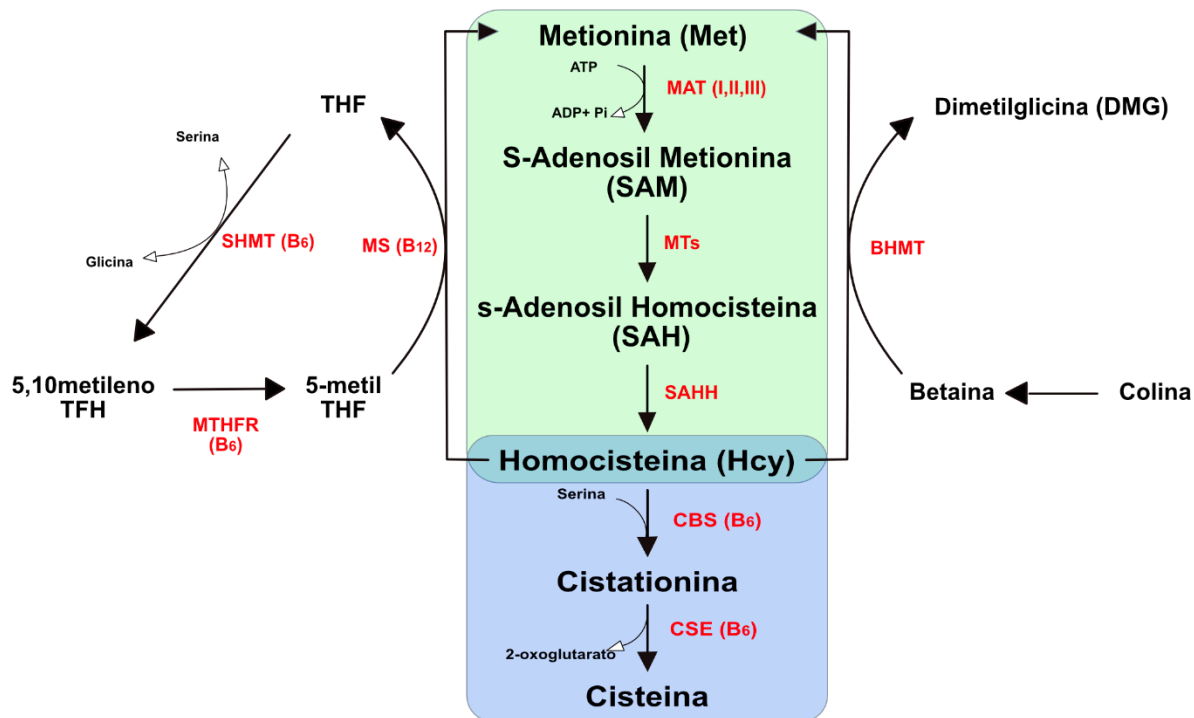
expresa también en riñón, y SLC7A11 en células inmunes de origen mieloide (Kandasamy y cols., 2018). SCL7A11 puede expresarse en hígado por la activación de respuesta antioxidante (Kurahashi y cols., 2016; Kandasamy y cols., 2018). SLC7A9 está expresado principalmente en riñón y tiene un papel similar a SLC7A11.

Otra fuente importante de L-Cys proviene de la biosíntesis a partir de la metionina (L-Met) (Figura 3). La L-Cys que proviene de esta ruta contribuye aproximadamente en un 50% a la cisteína incorporada al GSH en el hígado y un tercio en astrocitos (McBean, 2017; Sbodio y cols., 2019). En este proceso, existen 3 etapas importantes, la captura de L-Met, su conversión a homocisteína (Hcy) y su posterior conversión a L-Cys. En la captura de L-Met los transportadores del sistema L juegan un papel primordial. El proceso de conversión de L-Met a Hcy se denomina transmetilación; L-Hcys puede volver a convertirse a L-Met, a través de un proceso llamado re-metilación. La etapa final es la conversión de Hcy a L-Cys a través de la transulfuración. La Hcy constituye un metabolito de encrucijada y uno de los principales mecanismos de control de la vía de la transulfuración es la regulación del particionamiento de la Hcy entre la re-metilación y la transulfuración (Stipanuk, 2020). El proceso de conversión L-Met a Hcy involucra 3 reacciones, la conversión de L-Met a S-adenosilmetionina (SAM), por la metionina adenosil-transferasa (MAT); la conversión de SAM a S-adenosil-homocisteína (SAH), a través de diferentes metiltransferasas (MTs); y por último la hidrólisis del grupo adenosil de SAH, por SAH hidrolasa, obteniéndose Hcy. El proceso inverso (Hcy a L-Met), puede ocurrir a través de dos enzimas: metionina sintasa (MS), utiliza como donador de grupos metilos a tetrahidrofolato y la betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT), que utiliza a la betaína (Stipanuk, 2020) (Figura 3).

La vía de la transulfuración consta de dos reacciones: la condensación de Hcy con serina para formar cistationina, por la cistationina beta sintasa (CBS); y la posterior hidrólisis de cistationina para dar L-Cys y  $\alpha$ -cetobutirato, por la cistationina gamma liasa (CSE). Adicionalmente, estas enzimas también juegan un papel importante en la síntesis de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) a partir de Hcy y/o L-Cys. El  $H_2S$ , es un



gasotransmisor que juega un papel importante en la regulación de los niveles de GSH (Kimura, 2020).



**Figura 3.** Interconexión metabólica del ciclo del folato, ciclo de metionina y ruta de transulfuración involucrado en la biosíntesis de cisteína. La pérdida del grupo metilo desde la metionina hasta la homocisteína ocurre a través de la formación del metabolito intermediario S-adenosil-metionina, que constituye el cofactor de grupos metilos de diversas enzimas metiltransferasas. La homocisteína producida puede ser remetilada a Metionina, utilizando como cofactor tetrahidrofolato o betaína; o puede ser usado como sustrato para la síntesis de cisteína a través de la transulfuración. En Verde: ruta transmetilación, Azul: ruta transulfuración. Metabolitos: THF: tetrahidrofolato, ATP: trifosfato de adenosina; B6: piridoxal 5'-phosphate; B12: cobalamina. Enzimas (en rojo): MTHFR: metil-tetrahidrofolato reductasa, MS: metionina sintasa, BHMT: betaina-homocisteína metiltransferasa, MAT: metionina adenosiltransferasa, SAHH; S-adenosil-homocisteína hidrolasa, CBS: cistationina  $\beta$  sintasa, CSE: cistationina  $\gamma$  liasa.

La actividad y expresión de las enzimas de la transulfuración varía entre tejidos y células. El hígado presenta los mayores niveles de actividad de la vía, y es mayor la abundancia de CSE respecto a la CBS. Mientras que, en el cerebro la actividad de la vía es mucho menor que en el hígado y la abundancia de CBS, respecto a CSE, es mayor (Stipanuk, 2004). De igual manera, los niveles de expresión de las enzimas varían entre regiones del cerebro, observándose la mayor expresión de CBS en hipocampo y cerebelo (Robert y cols., 2003). Debido a la diferencia en cantidad proteica de las enzimas, la acumulación de cistationina en el cerebro es mayor respecto a otros órganos y se considera que la CSE es la enzima limitante y

por tanto el principal regulador de la ruta en el cerebro. Mientras que, la CBS cumple principalmente el rol regulatorio de la vía en tejidos y órganos periféricos (McBean, 2017).

El metabolismo de los aminoácidos azufrados es regulado a nivel de expresión génica, así como por mecanismos postraduccionales. El estado redox celular constituye uno de los principales reguladores de la vía, ya sea a nivel transcripcional, mediante la acción de NRF2, o a nivel postraduccional. SAM constituye un modulador alostérico endógeno de la ruta, y controla el particionamiento de Hcy entre la re-metilación y la transulfuración. El aumento en los niveles de SAM activa la CBS y a su vez inhibe la MS (Sbodio y cols., 2019). Además, SAM también estabiliza a CBS, disminuyendo su degradación proteosomal (Prudova y cols., 2006).

#### *2.5.1 Alteraciones en la ruta metabólica de conversión de L-Met a L-Cys por exposición a As y F.*

Las alteraciones en el metabolismo de L-Met y L-Cys pueden causar importantes efectos adversos en el organismo. Las principales alteraciones descritas involucran: la alteración de los niveles de Hcy, los niveles de H<sub>2</sub>S y los niveles de GSH. La disminución de la actividad de esta ruta metabólica está asociada con el incremento de Hcy, que es un metabolito altamente tóxico y su acumulación está asociada con generación de un estado proinflamatorio y neurotoxicidad (Ansari y cols., 2014; Škovierová y cols., 2016). La disminución en los niveles de H<sub>2</sub>S también tiene efectos deletéreos debido a la amplia gama de funciones a las que ha sido asociado. De igual manera, la disminución de la producción de L-Cys y GSH, tiene alta importancia en el balance redox celular (Moore y Whiteman, 2015; Xiao y cols., 2018).

Alteraciones en esta ruta metabólica han sido principalmente descritas en enfermedades neurodegenerativas, en daño hepático inducido por acetaminofén, y en daño renal y hepático en modelos de isquemia-reperfusión (Kurahashi y cols., 2016; Shang y cols., 2016; Sbodio y cols., 2019). Sin embargo, ha sido poco

explorada en exposición a xenobióticos. Para la exposición a As y F, existen pocos estudios que evalúen el efecto en el metabolismo de la L-Met/L-Cys.

Estudios en poblaciones humanas han asociado la exposición a As con un incremento en los niveles plasmáticos de Hcy (Brucker y cols., 2015; Laine y cols., 2018). La enzima AS3MT utiliza SAM como donador de grupos metilos en la biotransformación de As, generando SAH, que es rápidamente convertido a Hcy. Por lo cual, las reacciones de detoxificación de As pueden contribuir al incremento en los niveles de Hcy en el organismo (Howe y cols., 2014). Adicionalmente, el As disminuye los niveles plasmáticos de vitamina B9/B12 (Sun y cols., 2017; Perveen y cols., 2019), las cuales juegan un papel importante en el metabolismo de un carbono y remetilación de Hcy (Hall y cols., 2009; Mukherjee y cols., 2016). También, el As disminuye la expresión de MAT2A e inhibe de la actividad enzimática de MS en cultivos celulares (Waly y cols., 2004; Waly y cols., 2016). La exposición a As en modelos animales disminuye la expresión de enzimas del metabolismo de Met, como MAT1A, BHMT y MS, mientras aumenta la expresión de MAT2B y SAHH (Liu y cols., 2007; Xie y cols., 2007; García-Sevillano y cols., 2014; Li y cols., 2016). En contraste, la exposición a As induce un incremento en la vía de transulfuración, como mecanismo de respuesta a estrés oxidante, a través de un incremento en la expresión de CBS (Coppin y cols., 2008) y un aumento en la actividad de las enzimas tanto en hígado como cerebro (Silva-Adaya y cols., 2020).

De manera similar, la exposición F ha sido asociada con niveles elevados de Hcy (Li y cols., 2016) y bajos niveles séricos de vitamina B9/B12 (Jana y cols., 2018). El NaF actúa como inhibidor de MAT, por lo que puede alterar el metabolismo de L-Met (al-Khafaji y cols., 1998). No obstante, los estudios del efecto del F en la biosíntesis de cisteína son escasos.

## 2.6 Efectos neurotóxicos del As y F

### 2.6.1 As

Estudios en poblaciones humanas han mostrado que la exposición crónica a As se asocia a déficits en las funciones cognitivas, tales como disminución de la inteligencia, los coeficientes verbales, impedimentos en el aprendizaje y la memoria (Tolins y cols., 2014; Tyler y Allan, 2014). En poblaciones expuestas de manera crónica a As se ha reportado también una disminución de la conductividad nerviosa, neuropatía periférica desmielinizante en extremidades inferiores y depresión (Mukherjee y cols., 2003; Aposhian y cols., 2004; Chang y cols., 2015) (Tabla 1). La severidad de estos efectos depende de la dosis, la duración de la exposición y la etapa de vida en que la exposición inicia. Los modelos experimentales han demostrado que los efectos de la exposición parecen ser más marcados cuando ocurren durante la gestación y en etapas tempranas de la vida, dado que durante este periodo se forman las estructuras cerebrales, además no está presente aún la barrera hematoencefálica lo que favorece la llegada de As a este sitio (Basha y Reddy, 2015; Luo y Shu, 2015). La neurotoxicidad del As esta principalmente asociada a la generación de estrés oxidante. Las células nerviosas son particularmente sensibles al desbalance redox, dado que posee mecanismos antioxidantes menos eficientes comparado con otros órganos como el hígado. El cerebro posee baja expresión de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx, por lo cual el GSH, constituye la defensa antioxidante más importante (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009). Dado que este metaloide es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (BBB; del inglés blood brain barrier) y ser metilado en cerebro (Sánchez-Peña y cols., 2010), numerosos estudios han investigado los mecanismos neurotóxicos del As (Rodríguez y cols., 2005; Flora, 2011; Tolins y cols., 2014). Los niveles de ROS en el cerebro de animales tratados con As aumentan proporcional a la acumulación de As en cada una de las regiones. El incremento en los niveles de ROS, en cerebro de animales tratados crónicamente con As, induce un aumento en marcadores de daño oxidante como lipoperoxidación y con un aumento en la muerte celular (Shila y cols., 2005; Mishra y Flora, 2008). Como se mencionó anteriormente, las distintas regiones del cerebro acumulan cantidades diferentes de

As y por ello, las regiones podrían presentar diferentes susceptibilidades. Entre las regiones que acumulan mayor cantidad de As se encuentra la hipófisis, el hipocampo, el cerebelo y la corteza (Shila y cols., 2005; Mishra y Flora, 2008; Sánchez-Peña y cols., 2010; Li y cols., 2017). La alta acumulación de As en el hipocampo y corteza, regiones del cerebro asociada a los procesos de aprendizaje y memoria, y a patologías como el Alzheimer, podría explicar cómo la exposición gestacional y crónica a As promueve las manifestaciones tempranas de déficit cognitivo y demencia observadas en humanos (Tyler y Allan, 2014).

Los estudios en modelos de roedores han podido reproducir defectos cognitivos similares a los observados en humanos expuestos crónicamente a As. A nivel molecular se han demostrado afectaciones en múltiples procesos neurobiológicos, como neurogénesis y vías de señalización glutamatérgicas, colinérgicas y monoaminérgicas (Tyler y Allan, 2014); y cambios ultraestructurales en las fibras de musgosas, caracterizados por una disminución en el número de terminales nerviosas y en la mielinización (Jing y cols., 2012), así como como hinchamiento de las mitocondrias y expansión del retículo endoplasmático rugoso (Luo y cols., 2009). El As induce defectos en la homeostasis y actividad mitocondrial (Liu y cols., 2012), y disminuye los niveles de neurotrofinas como BDNF y de proteínas de su cascada de señalización (Qu y cols., 2016; Pandey y cols., 2017). Esta neurotrofina, además de participar en el desarrollo cerebral juega un papel importante en la plasticidad sináptica, por lo cual afectaciones en esta vía también permiten explicar déficit en el aprendizaje y la memoria (Carvalho y cols., 2008).

En la siguiente tabla (Tabla 1) se recogen varios estudios que demuestran las afectaciones neurológicas inducidas por la exposición a As tanto en estudios epidemiológicos como en modelos experimentales.

**Tabla 1. Efecto neurotóxico del arsénico**

<b>Epidemiológicos</b>			
<b>Modelo de exposición</b>	<b>Principales hallazgos</b>	<b>Patologías del Sistema Nervioso</b>	<b>Referencias</b>
Niños 6-11 años (Bangladesh)	↓ total IQ, memoria de trabajo, comprensión verbal	Deficiencias cognitivas	Wasserman y cols., 2004, 2007, 2011
Niños 6-8 años (México) Niños 5-15 años (India)	↓ desempeño en razonamiento visual-espacial, lenguaje y vocabulario, memoria, IQ y habilidades matemáticas, atención	Deficiencias cognitivas	Rosado y cols., 2007 von Ehrenstein y cols., 2007
Niños 6-10 años (México)	↓ total IQ, verbal IQ	Deficiencias cognitivas	Rocha-Amador y cols., 2007
Niños 6-7 años (México)	↓ desempeño en pruebas de lenguaje y vocabulario, y asociación positiva entre niveles de As y comportamientos hiperactivos	ADHD	Roy y cols., 2011
Niños 6 años (EE.UU.)	↑ proporción con diagnóstico de discapacidad intelectuales	Discapacidades intelectuales	McDermott y cols., 2012
Recién nacidos (Nepal)	Asociación negativa entre niveles de As en cordón umbilical y desempeño en indicadores de neurodesarrollo	Retraso en neurodesarrollo	Parajuli y cols., 2013
Niños con autismo (China)	↑ niveles de As comparados con niños controles	Desorden del espectro autista	Li y cols., 2018
Adultos (EE.UU., China, India)	↑ incidencia de conductas depresivas y desordenes psiquiátricos	Depresión y Ansiedad	Zierold y cols., 2004 Dang y cols., 2008 Sen y Sarathi Biswas, 2012
Adultos (Mongolia y China)	↑ insomnio, pérdida auditiva, visual y del gusto, Entumecimiento extremidades	Perdida de sentidos Neuropatía periférica	Guo y cols., 2007
Adultos expuestos durante infancia (Japón)	↑ mortalidad de individuos asociadas a enfermedades neurodegenerativas	Enfermedades neurodegenerativas	Takana y cols., 2010
Adultos (Países Europeos)	↑ incidencia de Alzheimer y otras demencias en países con niveles de As elevado	Demencia	Dani 2010
Pacientes con Alzheimer (China)	Asociación negativa entre As en sangre y habilidades cognitivas en pacientes con Alzheimer	Alzheimer	Baum y cols., 2010

Adultos (EE.UU.)

↓ desempeño en pruebas de lenguaje, habilidades espaciales y visuales, funciones ejecutivas, velocidad de procesamiento y memoria Alzheimer

O Bryant y cols. 2011  
Gong y O Bryant, 2010  
Gong y cols., 2011

***In vitro / Animales***

<b>Mecanismo de toxicidad</b>	<b>Modelo experimental</b>	<b>Principales evidencias</b>	<b>Alteraciones neuroconductuales y/o patologías</b>	<b>Referencias</b>
Estrés y daño oxidante	Ratas expuestas a 100 mg/L de As por 2 meses	↑ niveles de ROS y lipoperoxidación ↓ actividad de SOD, CAT, GPx en corteza, hipocampo, cerebelo, estriado e hipotálamo		Shila y cols., 2005
	Ratas expuestas a 50 mg/L de As por 10 meses	↑ niveles de ROS ↓ niveles de GSH/GSSG, principalmente en corteza e hipocampo		Mishra y Flora; 2008
	Ratas expuestas 10-100 mg/L a As desde la gestación	↑ niveles de ROS y lipoperoxidación en corteza ↓ niveles de GSH y actividad de GPx en corteza e hipocampo	Deficiencia aprendizaje y memoria	Xi y cols., 2010
	Ratas expuestas a 2 mg/kg de As por 2.5 mes	↑ lipoperoxidación ↓ actividad de SOD, CAT, GPx, GST y GR en mitocondrias de corteza, cerebelo e hipocampo	Deficiencia aprendizaje y memoria	Ram Kumar y cols., 2013
	Ratas expuestas a 57.3 mg/L por 2 meses	↓ niveles de GSH, ↑ lipoperoxidación, anión superóxido	Deficiencia aprendizaje y memoria	Sharma y Sharma, 2013
	Ratas expuestas a 20 mg/kg de As por 1 mes	↑ ROS en mitocondria del hipocampo y corteza frontal		Srivastava y cols., 2014
Daño y disfunción mitocondrial	<i>In vitro</i> Neuronas corticales	Induce mitofagia, ↓ niveles de citocromo C oxidasa, y PGC1-α		Teng y cols., 2015
	Ratas jóvenes expuestas a 2 y 4 mg/kg de As por 1.5 meses	↓ potencial de membrana mitocondrial, actividad de complejos mitocondriales en estriado		Chandravanshi y cols., 2014
	Ratas expuestas a 20 mg/kg por 1 mes	↓ potencial de membrana, actividad complejos mitocondriales I, II, IV,		Srivastava y cols., 2014

Ratas expuestas a 25 mg/L por 3 meses	↓ actividad complejos mitocondriales I, II, IV, expresión de UCP-2 ↑ niveles de ROS ↓ expresión de proteínas asociadas a biogénesis: PGC1- $\alpha$ , NRF1, NRF2 y TFAM Liberación de citocromo C y activación de apoptosis Alteraciones morfológicas en mitocondrias	Deficiencia aprendizaje y memoria	Prakash y cols., 2015 Prakash y Kumar, 2016
Ratas expuestas a 20 mg/kg de As por 1 mes	↓ actividad de complejos mitocondriales, expresión de blc2 ↑ niveles de ROS y muerte apoptótica en estriado	Deficiencias motoras Parkinson	Srivastava y cols., 2018
Ratones expuestos a 10-40 mg/L de As por 3 mese	↑ alteraciones morfológicas en mitocondrial, expresión de PGAM5, p-DRP1 ↓ expresión de OPA1, MFN1, niveles de ATP, potencial de membrana mitocondrial en hipocampo Induce fisión mitocondrial y autofagia	Deficiencia aprendizaje y memoria	Chen y cols., 2023
Ratas expuestas a 2-50 mg/L de As por 3 meses	↓ niveles de Bcl2, PGC1 $\alpha$ , ATP ↑ liberación citocromo C e induce apoptosis en cerebro		Ding y cols., 2023
Alteraciones ultraestructurales y morfológicas	<i>In Vitro</i> Neuronas primarias hipocampales expuestas a 1 o 5 $\mu$ M		Pandey y cols., 2017
Ratones expuestos a 2.72-68 mg/L As por 3 meses	↓ en tamaño y condensación de núcleos en neuronas hipocampales, irregularidades morfológicas del endotelio vascular		Luo y cols., 2009
Ratas expuestas a 15 mg/kg As por 3 meses	Mielinización anormal de fibras nerviosas en hipocampo y estriado ↓ en número de terminales nerviosas de fibras musgosas	Deficiencia aprendizaje y memoria	Jing y cols., 2012
Ratones expuestos a 100 $\mu$ g/L de As por 2 semanas	↓ marcaje con GFAP, indicativo de menos progenitores en hipocampo		Cronican y cols., 2013
Ratas expuestas a 57.3 mg/L por 2 meses	Disfunción del endotelial vascular	Demencia	Sharma y cols., 2013
Ratas expuestas a 20 mg/kg por 1 mes	↓ vaina de mielina y distorsión de las crestas mitocondriales en hipocampo y corteza frontal		Srivastava y cols., 2014



	Ratas expuestas a 15-45 µg/L de As por 6 días durante la lactancia (sonda)	Cambios morfológicos en las capas de la corteza frontal en etapas iniciales, retraso en la maduración y migración de células DCX+ en la corteza	Autismo (habilidades sociales), Deficiencia cognitiva y Ansiedad	Zhou y cols., 2018
	Ratas expuestas a 3 mg/L de As desde la gestación	↑ densidad de espinas y arborización dendríticas anormal en corteza ↓ mielinización en corteza e hipocampo y numero de neuronas en CA1		Niño y cols., 2020,2021,2022
Disfunción en la transmisión y plasticidad sináptica	<i>In vitro</i> Rebanadas de hipocampo de ratas adultas expuestas a 100 µM	↓ EPSP en CA1, inhibición de LTP		Kruger y cols. 2009
	Ratas expuestas a 5 mg/kg desde el nacimiento hasta 2 meses	↓ niveles de GABA y actividad de GAD en cerebelo, hipotálamo, hipocampo, estriado ↓ actividad de AChE en cerebelo, hipotálamo		Nagaraja y Desiraju 1993, 1994
	Ratones expuestos a 50 µg/L de As durante la gestación	↓ niveles de CRFR1, 5HT1A en hipocampo dorsal ↓ niveles de receptor de glucocorticoide en el núcleo, y expresión de proteínas de cascada de señalización de MAPK	Depresión; Deficiencia aprendizaje y memoria	Martínez y cols., 2008, Martínez-Finley y cols., 2011
	Ratas expuestas a 50 mg/L de As por 4 meses	↑ niveles de DA en el estriado, niveles alterados de receptores de NE y DA en dependencia la región del cerebro		Rodríguez y cols., 2010
	Ratas expuestas a 20 mg/kg As por 1 mes	↓ niveles de AChR muscarínico, ChAT, actividad de AchE en hipocampo y corteza frontal	Deficiencia aprendizaje y memoria Deficiencias motoras Alzheimer	Yadav y cols., 2011
	Ratas expuestas a 2.72-68mg/L de As por 3 meses	↓ niveles de expresión de NR2A, PSD95, p-CAMKII, p-ERK1/2	Deficiencia aprendizaje y memoria	Luo y cols. 2009, 2012
	Ratones adultos expuestos a 100 µg/L por 3 semanas	↑niveles de NR1, syntaxina 6, sinapsina 2	Deficiencia aprendizaje y memoria	Cronican y cols., 2013
	Ratones expuestos a 1-4 mg/L As por 2 meses	↓ niveles de monoaminas (NE, DA y 5HT) en cerebro y cerebelo, ARNm de enzimas de metabolismo de monoaminas (dopamina hidroxilasa, tirosina hidroxilasa y triptófano hidroxilasa)		Liu y cols., 2013

	Ratones expuestos a 20 mg/L de As desde la gestación	<p>↑ niveles de glutamato extracelular</p> <p>↓ niveles de NR2B, GluA1, GluA2, GLT1</p> <p>↓ LTP y estimulación por pulsos pareados</p>	Deficiencia aprendizaje y memoria	Ramos-Chávez y cols., 2015; Nelson-Mora y cols., 2018
	Ratas expuestas a 20 mg/kg de As por 1 mes	↓ niveles de receptor DA-D2, tirosina hidroxilasa y VMAT2 y BDNF en estriado	Deficiencias motoras	Srivastava y cols., 2018
	Ratones expuestos a 15 mg/L de As por 3 meses	↓ niveles de GAD1, receptor B2 de GABA en corteza prefrontal	Ansiedad	Hu y cols., 2023
Neuroinflamación	<i>In vitro</i> Astrocitos corticales expuestos a 0.05-1 μM de MMA	↑ niveles de IL-1β, IL-6 TNF-α, COX2, MIF1 induce reprogramación metabólica y proliferación de astrocitos		Escudero-Lourdes y cols., 2016
	<i>In vitro</i> Linea celular HAPI + SH-SY5Y	↑ secreción de IL-1β por la microglía a través de la señalización p38/JNK e induce la apoptosis en neuronas, a través de la señalización STAT3.		Mao y cols., 2016
	<i>In vitro</i> Linea celular BV-2 expuesta a 0.6 μM	Activación de microglía ↑ fenotipo proinflamatorio por MMA	Deficiencia aprendizaje y memoria	Zhang y cols. 2021
	Ratones expuestos a 50 mg/L de As por 6 meses	Activación de microglía en corteza cerebral y giro dentado		
	Ratas expuestas a 20 mg/kg de As por 21 días	↑ niveles de células NF-kB+ Mac3+ (microglía activada) en CA1 y CA3		Keshavarz-Bahaghighat 2018
	Ratas expuestas a 10 mg/kg de As por 8 días	↑ niveles de citocinas inflamatorias (IL-1β, TNF-α, IFN-γ) en hipocampo	Ansiedad	Firdaus y cols., 2018
	Ratones expuestos a 0.38 mg/kg de As desde la gestación	↑ niveles de marcadores de microglía: CD68 y TREM2 en cerebro ↑ producción de citocinas y capacidad fagocítica de la microglía	Deficiencia aprendizaje y memoria	Ansari y cols., 2022
	Ratas expuestas a 3 mg/L de As desde la gestación	Alteraciones en morfológicas de astrocitos (activados) en hipocampo		Niño y cols., 2022
Alteraciones en la neurogénesis	<i>In vitro</i> línea celular P19 expuesta a 7.5-75 μg/L de As	Inhibición de la diferenciación hacia neuronas ↓ niveles de neurogenina 1 y 2, NeuroD		Hong y cols., 2012

Ratones expuestos a 4 mg/L de As por 4 meses	↓ proliferación y diferenciación de progenitores neurales	Liu y cols. 2012
Ratones expuestos a 50 µg/L de As durante periodo gestación	↓ diferenciación de precursores en el hipocampo. Expresión alterada de genes relacionados con neurogénesis, axogénesis y señalización Notch	Tyler y Allan 2013
Ratas expuestas a 3.8 mg/L de As desde la gestación	↓ niveles de BDNF	Pandey y cols.2017

β-amiloide	<i>In vitro</i>	↑ niveles de APP, formación de β amiloide, p-tau, actividad alterada de AchE y ChAT	Alzheimer	Giasson y cols., 2002 Zarazua y cols., 2011
	Ratones expuestos a 50 µg/L de As durante periodo gestación	Expresión alterada de mRNA de <i>Appb1</i> , <i>ApoE</i> y <i>Ache</i> en giro dentado	Alzheimer	Tyler y Allan, 2013
	Ratas expuestas a 3 mg/L de As desde la gestación por 4 meses	↑ niveles de β amiloide, y expresión RAGE y actividad de BACE1	Alzheimer	Niño 2018

Abreviaturas. IQ: coeficiente de inteligencia, ADHD: desorden de déficit de atención e hiperactividad, ROS: especies reactivas del oxígeno, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, GPx: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa, SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, GST: Glutatión S transferasa, CcO: citocromo C oxidasa, PGC1a: coactivador 1α del receptor activado por proliferador de peroxisomas, UCP-2: proteína desacopadora 2, NRF1: factor nuclear respiratorio 1, NRF2: factor nuclear respiratorio 2, TFAM: Factor de transcripción mitocondria A, Bcl2: proteína mitocondrial anti apoptótica, PGAM5: fosfoglicerato mutasa 5, p-DRP1: proteína relacionada a dinamina (fosforilada), OPA1: proteína fusión mitocondrial, MFN1: mitofusina, ATP: trifosfato de adenosina, GFAP: proteína ácida fibrilar glial, DCX: doblecortina, CA1 o CA3: cornu ammonis 1 o 3 (región del hipocampo), EPSP: Potencial postsináptico excitatorio, LTP: potenciación a largo plazo, NR1: receptor tipo NMDA subunidad 1, NR2A o 2B: receptor de glutamato tipo NMDA subunidad 2A o 2B, GluA1 o 2: receptor tipo AMPA subunidad 1 o 2, GLT1: Transportador glutamato 1, PSD95: proteína de densidad postsináptica 95, p-CAMKII: cinasa activada por calmodulina II (fosforilada), CRFR1: Receptor de factor liberador de corticotrofina, GABA: acido gamma aminobutírico, GAD: glutamato descarboxilasa, GABA-B2: receptor de GABA B2, DA: dopamina, NE: norepinefrina, 5HT: serotonina, 5HT1A: receptor de serotonina tipo 1A, DA-D2: receptor de dopamina D2, VMAT2: trasportador vesicular de monoaminas 2, mAChR: receptor de Acetilcolina muscarínico, nAChR: receptor de Acetilcolina nicotinamidico, AchE: acetilcolinesterasa, ChAT: Colina acetiltransferasa, MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos, MMA: monometil arsénico, IL-1β: interleucina 1β, IL-6: interleucina 6, TNFα: factor de necrosis tumoral α, IFNγ: interferón γ, COX2: ciclooxigenasa 2, MIF1: factor inhibitorio de macrófagos 1, MAC3 (LAMP2, proteína membrana asociada a lisosomal): antígeno de diferenciación de macrófagos, NF-kB : factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, TREM2: receptor desencadenante expresado en las células mieloides 2; BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro, APP: péptido precursor amiloide, ApoE: apolipoproteína E, Appb1: Proteína de unión a APP familia B miembro 1, RAGE: receptor de productos finales de glicosilación avanzada, BACE1: β secretasa.

### 2.6.2 F

De manera similar al As, estudios en poblaciones humanas han mostrado que la exposición crónica a F conlleva a disfunciones cognitivas, tales como disminución del coeficiente de inteligencia, impedimentos en el aprendizaje y la memoria (Xiang Q, 2003; Wang y cols., 2007; Pain, 2017; Razdan y cols., 2017; Valdez Jiménez y cols., 2017; Green y cols., 2019), observándose principal vulnerabilidad en las etapas de desarrollo del cerebro (Tabla 2).

Los principales efectos neurotóxicos del F están altamente relacionados con el desbalance redox. Se ha observado aumento en los niveles de ROS, y de marcadores de estrés oxidante como peroxidación lipídica en el cerebro de animales tratados con F, un incremento en la muerte celular y neurodegeneración (Zhang y cols., 2007). Al igual que para el As, ocurre una acumulación diferencial entre regiones del cerebro, encontrándose el hipocampo, la corteza y el cerebelo entre las regiones con mayores niveles de F reportadas (Whitford y cols., 2009). La alta acumulación de F en el hipocampo y la corteza puede explicar las afectaciones cognitivas asociadas a la exposición a F.

Los estudios de exposición a F en modelos experimentales han demostrado un aumento en la permeabilidad de la BBB, cambios ultraestructurales a nivel celular y sináptico, desbalance en homeostasis redox y mitocondrial y alteraciones en la transmisión sináptica. En la siguiente tabla (Tabla 2) se recogen varios estudios que demuestran las afectaciones neurológicas inducidas por la exposición a F tanto en estudios epidemiológicos como en modelos experimentales.

**Tabla 2. Efecto neurotóxico del flúor**

<b>Epidemiológicos</b>			
<b>Modelo de exposición</b>	<b>Principales hallazgos</b>	<b>Patologías del Sistema Nervioso</b>	<b>Referencias</b>
Niños 8-12 años (China)	↓ IQ, estatura y peso	Deficiencia Cognitiva y retraso en desarrollo	Xiang y cols., 2003; Wang y cols., 2007; Ding y cols., 2011
Niños (Asia) Metaanálisis	↓ IQ	Deficiencia Cognitiva	Choi y cols., 2012
Niños 6-11 años (Irán)	↓ IQ	Deficiencia Cognitiva	Seraj y cols., 2012
Niños 8-14 años (India)	↓ IQ	Deficiencia Cognitiva	Saxena y cols., 2012; Nagarajappa y cols., 2013; Razdan y cols., 2017
Niños 4-17 años (EE.UU., Canadá)	↑ prevalencia de niños con ADHD	ADHD	Malin y Till 2015 Riddell y cols., 2019
Niños 3 meses - 5 años (México)	↓ MDI y PDI	Retraso en neurodesarrollo	Valdez Jiménez y cols., 2017
Niños 4 años y 6-12 años (México)	↓ IQ	Deficiencia Cognitiva	Bashah y cols., 2017
Adolescente 16-19 años (EE.UU., Canadá)	Alteraciones en parámetros del sueño, insomnio	Desordenes de sueño	Malin y cols., 2019 Cunningham y cols., 2021
Niños 3 - 5 años (Canadá)	↓ IQ, y flexibilidad cognitiva.	Deficiencia Cognitiva	Dewey y cols., 2023
Adultos 30-50 años con fluorosis dental (China)	↓ fluidez del lenguaje, reconocimiento, similitud, aprendizaje asociativo y memoria de trabajo	Deficiencia Cognitiva	Shao y cols., 2003
Adultos mayores > 60 años (China)	↓ funciones cognitivas, actividad de SOD en plasma	Deficiencia Cognitiva	Ren y cols., 2021

***In vitro* / Animales**

Mecanismo de toxicidad	Modelo experimental	Principales evidencias	Alteraciones neuroconductuales y/o patologías	Referencias
Estrés y daño oxidante	<i>In vitro</i> Neuronas hipocampales expuestas a 1- 4.2 mM de F	↑ niveles de ROS, lipoperoxidación ↓niveles de GSH, actividad de GPx, y SOD		Zhang y cols., 2007
	Ratas expuestas a 50 mg/L de F por 2.5 meses	↑ niveles de ROS, lipoperoxidación, actividad de GST, GPx, ↓ actividad de SOD, CAT, cociente GSH/GSSG en el cerebro		Flora y cols., 2009
	Ratas expuestas 10-100 mg/L de F por 2.5-3 meses	↑ niveles de ROS en cerebro ↓cociente GSH/GSSG en cerebro		Chouhan y Flora 2008 Chouhan y cols., 2010
	Ratones expuestos a 270 mg/L de F por 1 mes	↓ niveles de GSH ↑ niveles malonaldehído, actividad de SOD y CAT en hipocampo, corteza y cerebelo		Mahaboob Basha y Saumya 2013
	Ratas expuestas a 50 mg/L de F por 10 meses	↑ niveles de anión superóxido y malonaldehído en hipocampo y corteza frontal	Deficiencia aprendizaje y memoria	Dong y cols., 2017
	Ratas expuestas a 20 mg/L de F desde la gestación hasta P30	↑ lipoperoxidación ↓ actividad de SOD, CAT, GSH en corteza		Mesram y cols., 2017
	Ratas expuestas a 15 mg/L de F por 1 mes	↓ actividad de SOD, CAT, GPx ↑ lipoperoxidación en estriado y cerebelo	Deficiencias motoras y hipoactividad	Nkpaa y cols., 2018
	Ratas expuestas a 5 y 10 mg/L de F desde la gestación hasta P45	↑ lipoperoxidación ↓ actividad de CAT en hipocampo	Deficiencia aprendizaje y memoria	Bartos y cols., 2018, 2019
Daño y disfunción mitocondrial	<i>In vitro</i> Línea celular SH-SY5Y expuesta a 40 y 60 mg/L de F por 24h	↑liberación de citocromo C ↓ potencial de membrana, expresión de Bcl-2, actividad de SIRT1 Induce apoptosis dependiente de p53		Tu y cols., 2018

	<i>In vitro</i> Línea celular SH-SY5Y expuesta a 50 mg/L de F por 24h	↑ apoptosis mediada por mitocondria, niveles de DRP1		Tang y cols., 2021
	<i>In vitro:</i> Línea celular SH-SY5Y.  Ratas expuestas a 4.52, 22.6 and 45.2 mg/L de F desde la gestación - 2 meses	↑niveles de ROS en mitocondria, expresión de MFN1, MFN2 ↓ potencial de membrana, DRP1, FIS1, ADNmt/ADNn, expresión de subunidades mitocondriales de citocromo C oxidasa y ATP sintasa, niveles de PGC-1α, NRF1 and TFAM, actividad de SIRT1, <i>in vitro</i> y en hipocampo	Deficiencia aprendizaje y memoria	Zhao y cols., 2019, 2020
	Ratones expuestos a 270 mg/L de F por 1 mes	↓ actividad de complejos mitocondriales y enzimas del ciclo de Krebs en hipocampo, corteza y cerebelo		Mahaboob Basha y Saumya 2013
	Ratas expuestas a 10 y 50 mg/L de F por 6 meses	↓ expresión de MFN1, ↑ expresión de FIS1 y DRP1, y fragmentación de neuronas en hipocampo y corteza		Luo y cols., 2013
	Ratones expuestos a 25-100 mg/L de F por 3 meses	↓ actividad de enzimas antioxidante mitocondriales, expresión de SIRT3, transcripción de ADNmt ↑ acetilación de FOXO3A	Deficiencia aprendizaje y memoria	Wang y cols., 2021
	Ratones expuestos a 25 y 50 mg/L de F por 3 mes	↓ potencial de membrana, contenido de ATP, ADNmt, expresión de mtCO1 y mtND6, actividad de complejos mitocondriales, expresión de via señalización PGC1a/ TFAM em hipocampo	Deficiencia aprendizaje y memoria	Xin y cols., 2023
Alteraciones ultraestructurales y morfológicas	<i>In vitro</i> Línea celular Neuro-2A expuestas a 1-6mM de F por 4h	Cambios en la morfología de neuronas, perdida de prolongaciones y sinapsis, aglutinación de mitocondrias ↓ expresión de MAP2 y SYP		Chen y cols., 2017a

	Ratones expuestos a 25-100 mg/L de F por 2 meses	↓ expresión de subunidades de tubulina desarreglo y despolimerización de microtúbulos en axones de neuronas, ancho de la hendidura sináptica, expresión de la proteína proteolipídica de mielina ↑ niveles de glicoproteína asociada a mielina (daño en la mielina) en el hipocampo		Niu y cols., 2015, 2018
	Ratas expuestas a 22.6-45.2 mg/L de F desde la gestación hasta 6 meses	↓ densidad de espinas dendríticas, expresión de SYP, PSD95, TrKB en hipocampo, asociado afectación de la señalización de BDNF -TrKB	Deficiencia aprendizaje y memoria	Chen y cols., 2018
	Ratones expuestos a 50 y 100 mg/L de F desde la gestación	alteraciones morfológicas en células piramidales de la corteza cerebral ↓ expresión de MAP2, SYP	Deficiencia aprendizaje y memoria	Ge y cols., 2018
	Ratas expuestas a 20-100 mg/L de F por 3 meses	Deterioro axonal, degeneración de vaina de mielina en medula espinal y nervio ciático. Hinchamiento de mitocondrias en corteza, hipocampo y cerebelo		Reddy y cols., 2021
	Ratones expuestos a 10 y 50 mg/L de F desde el destete por 2 meses	Análisis proteómico muestra cambios en la expresión de proteínas involucradas en axogénesis y regulación, en morfología de espinas dendríticas, arreglo del citoesqueleto en hipocampo	Deficiencia aprendizaje y memoria	Bittencourt y cols., 2023
Transmisión sináptica y plasticidad	<i>In vitro</i> Linea celular Neuro-2A expuestas a 1-6mM de F	↓ liberación de glutamato, expresión de NMDAR		Chen y cols., 2017a
	Ratas expuestas a 100 m/L de F por 7 meses	↓ expresión de α4 AChRs, α7 AChRs		Long y cols., 2002
	Ratas expuestas a 150 mg/L de F desde la gestación	↑ actividad de GAD ↓ actividad de ALT y AST en hipocampo	Deficiencia aprendizaje y memoria	Niu y cols., 2009
	Ratas expuestas a 20 - 100 m/L de F por 3 meses	↑ niveles de histamina, 5-HT y glutamato ↓ niveles de NE y DA dependiente de la dosis		Reddy y cols., 2013
	Ratas expuestas a 50 mg/L F por 10 meses	↓ expresión de AChR -M1 y AchR-M3 en hipocampo y corteza frontal	Deficiencia aprendizaje y memoria	Dong y cols., 2017



Ratas expuestas a 20 mg/L de F desde la gestación - P30	↓ niveles de Ach y NE en corteza	Deficiencia aprendizaje y memoria Hipoactividad	Mesram y cols., 2017
Ratas expuestas a 5 y 10 mg/L de F desde la gestación - P45	↓ α7 nAChR, actividad de transaminasas de glutamato en hipocampo	Deficiencia aprendizaje y memoria	Bartos y cols., 2018, 2019
Ratones expuestos a 25-100 mg/L de F desde la gestación	↓ niveles de ARNm de NR2A, NR2B y mGluR2 en hipocampo dependiente de la dosis	Deficiencia aprendizaje y memoria	Sun y cols., 2018
Ratas expuestas a 60 y 120 mg/L de F por 1 mes	↓ LTP, expresión de PSD95, GluA3, NR2B en hipocampo	Deficiencia aprendizaje y memoria	Yang y cols., 2018
Ratones expuestos a 68 mg/L de F por 3 -5 meses	↑ niveles de ARNm de 5-HT1A ↓ niveles de ARNm de BDNF 4, GAD67 y VGAT en hipocampo	Ansiedad y depresión	Li y cols., 2019
Ratas expuestas a 5, 20, 50 mg/L de F por 12 meses	↑ actividad de calpaína 1 y vía de señalización en hipocampo ↓ niveles de BDNF y CREB Sobreestimulación de la señalización durante la LTP temprana y disrupción de la LTP tardía	Deficiencia aprendizaje y memoria	Nadei y cols., 2020
Ratas expuestas a 5 y 10 mg/L de F desde la gestación - P90	↓ actividad de transaminasas de glutamato en estriado, corteza prefrontal e hipocampo Alteración en la actividad de AChE en dependencia de región y dosis	Deficiencia aprendizaje y memoria Depresión	Bartos y cols., 2022
Ratones expuestos a 24 mg/kg de F por 2 meses	↓ niveles de GABA, 5-HT, expresión de GAD65, GAD67 y VGAT ↑ 5-HT1A en corteza	Ansiedad y depresión	Cao y cols., 2022
Ratones expuestos a 25 y 50 mg/L de F por 56 semanas	Alteraciones electrofisiológicas en el hipocampo, ↓ frecuencia de disparo de neuronas hipocámpales, densidad del poder del espectro de potenciales de campo, especialmente oscilaciones gamma y theta, plasticidad sináptica	Deficiencia aprendizaje y memoria	Xin y cols., 2023

Neuroinflamación	In vitro Línea celular BV2 expuesta a 0.250 - 2 mM de F x 24h	↑ producción de IL-6 y TNF $\alpha$ , activación de NF- $\kappa$ B Inhibición de la señalización por WNT/ $\beta$		Chen y cols., 2017b
	Ratas expuestas a 60 y 120 mg/L de F por 2.5 mes	↑ número de células OX-42+ (microglía activada), expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ en hipocampo y corteza		Yan y cols., 2016
	Ratas expuestas a 15 mg/L de F por 1 mes	↑ niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ en estriado y cerebelo	Deficiencias motoras e hipoactividad	Nkpaa y cols., 2018
	Ratas expuestas a 60 y 120 mg/L de F por 1 mes	activación de microglía, ↑ expresión de DAP12 y TREM2, secreción de citocinas proinflamatorias, a través de la vía de señalización MAPK en hipocampo	Deficiencia aprendizaje y memoria	Yang y cols., 2018
	Ratas expuestas a 20-100 mg/L de F por 3 meses	↑ expresión iNOS, TNF $\alpha$ , VEGF, COX2		Reddy y cols., 2021
Neurogénesis	Ratones expuestos a 22.6 y 45.2 mg/L de F por 2.5 meses	↓ neurogénesis y supervivencia de neuronas en giro dentado Alteraciones en la vía de señalización GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenina		Jiang y cols., 2019
$\beta$ amiloide	Ratones expuestos a 10 mg/L de F por 3meses	↑ expresión de Iba1, C3, BACE1 ↓ expresión de SNAP-25, SYP en hipocampo	Deficiencia aprendizaje y memoria	Cao y cols., 2019

Abreviaturas. IQ: coeficiente de inteligencia, MDI: índice de desarrollo mental, PDI: índice de desarrollo psicomotor. ADHD: desorden de déficit de atención e hiperactividad, SOD: superóxido dismutasa, ROS: especies reactivas del oxígeno, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, GPx: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa, MDA: malondialdehído, CAT: catalasa, GST: Glutatión S transferasa, SIRT1 o 3: sirtuina 1 o 3, PGC1 $\alpha$ : coactivador 1 $\alpha$  del receptor activado por proliferador de peroxisomas, CcO: citocromo C oxidasa, NRF1: factor nuclear respiratorio 1, TFAM: Factor de transcripción mitocondria A, ATP: trifosfato de adenosina, Bcl2: proteína mitocondrial anti apoptótica, DRP1: proteína relacionada a dinamina, MFN1 o 2: mitofusina 1 o 2, FIS1: proteína de fisión mitocondrial 1, ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial, ADNn: ácido desoxirribonucleico nuclear, ARNm: ácido ribonucleico mensajero, FOXO3A: Forkhead box O-3A, mtCO1: citocromo C oxidasa subunidad 1 (mitocondrial), mtND6: NADH deshidrogenasa subunidad 6 (mitocondria), MAP2: proteína asociada a microtúbulo 2, SYP: sinaptofisina, PSD95: proteína de densidad postsináptica 95, BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro, TrkB: receptor de BDNF tipo B, DA: dopamina, NE: norepinefrina, 5HT: serotonina, ACh: acetilcolina, nAChR: receptor de Acetilcolina nicotinamídico, AChE: acetilcolinesterasa, GABA: ácido gamma aminobutírico, GAD: glutamato decarboxilasa (subunidad 67 o subunidad 65), ALT: alanina aminotransferasa, AST: aspartato aminotransferasa, AChR-M1 o M3: receptor de Acetilcolina muscarínico subunidad 1 o 3, NR2A o 2B: receptor de glutamato tipo NMDA subunidad 2A o 2B, GluA1 o 2 o 3: receptor de glutamato tipo AMPA subunidad 1 o 2 o 3, mGluR2: receptor de glutamato metabotrópico subunidad 2, 5-HT1A: receptor de serotonina tipo 1A, VGAT: transportador vesicular de GABA, CREB: proteína de unión a DNA a elementos de respuesta a AMP cíclico, LTP: potenciación a largo plazo, IL-1 $\beta$ : interleucina 1 $\beta$ , IL-6: interleucina 6, TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , IFN $\gamma$ : interferón  $\gamma$ , COX2: ciclooxigenasa 2, TREM2: receptor desencadenante expresado en las células mieloides 2, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible, NF- $\kappa$ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, VEGF: factor de crecimiento endotelio vascular, CD11b: integrina  $\alpha$ M, DAP12: proteína adaptadora 12; Iba1: proteína de unión a calcio específica de macrófago/microglía, C3: proteína 3 del complemento, BACE1:  $\beta$  secretasa, GSK3 $\beta$ : glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$ . SNAP-25: proteína asociada a sinaptosoma 25.

## 2.7 La sinapsis glutamatérgica.

La sinapsis glutamatérgica es una sinapsis química excitatoria y constituye entre el 80-90% de las sinapsis en el cerebro. El Glu constituye el principal neurotransmisor en este tipo de sinapsis. Entre las características que lo ubican como neurotransmisor se encuentran su almacenamiento en vesículas en la terminal presináptica, su liberación en cuantos, inducidos por la despolarización en la membrana presináptica, la activación de receptores en la terminal postsináptica y su eliminación de la hendidura sináptica. El Glu tiene también otras funciones en el cerebro: forma parte de proteínas, y de péptidos como el GSH; es precursor del neurotransmisor inhibitorio GABA y está involucrado en el reciclaje de los grupos aminos de los aminoácidos. Por estas razones, los niveles de Glu están altamente regulados y cualquier desbalance puede reflejarse en afectaciones neurológicas. La homeostasis del Glu depende de la coordinada regulación del metabolismo del Glu y su reciclaje entre neuronas y astrogliia. El Glu no puede cruzar la BBB, por lo cual su síntesis ocurre en el cerebro (Hassel y Dingle, 2012).

La síntesis *de novo* de Glu en el cerebro involucra una estrecha relación entre el metabolismo de la glucosa y del metabolismo del nitrógeno. El esqueleto de carbono del Glu proviene de la degradación de la glucosa en neuronas y astrocitos, especialmente en los últimos. De hecho, la captura de glucosa y su metabolismo es regulado por la actividad sináptica. La degradación de la glucosa resulta en la producción de piruvato, el cual puede ser incorporado al Ciclo de Krebs para la producción de  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG, el cetoácido del Glu), a través de la formación de acetil-CoA y su posterior condensación con oxalacetato (OAA) para formar citrato, o a través de la síntesis de OAA directamente (carboxilación del piruvato) por la enzima piruvato carboxilasa. Esta última reacción, es una reacción anaplerótica, ocurren predominantemente en astrocitos y contribuyen a mantener las pozas de intermediarios del ciclo de Krebs (Figura 4A).

El grupo amino proviene de la transaminación del  $\alpha$ -KG con otros aminoácidos. En este sentido juegan un papel importante las transaminasas de aminoácidos ramificados como la leucina, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato

aminotransferasa (AST). Las transaminasas catalizan reacciones enzimáticas dependientes de PLP en ambos sentidos, y están expresadas ubicuamente en el cerebro. La dirección del sentido de reacción que se favorece parece depender del tipo celular y ubicación subcelular, como resultado de los diferentes niveles de concentración de sustratos que participan en la reacción. Adicionalmente, se considera que la actividad de la AST es más importante que la ALT para la síntesis de Glu en neuronas (Figura 4A)

Por otro lado, los niveles de Glu también son mantenidos por su reciclaje, una vez liberado a la hendidura sináptica es rápidamente capturado por los recapturadores de Glu en astrocitos. Dentro de los astrocitos, es convertido a glutamina (Gln), por la glutamina sintetasa, y esta es exportada al medio extracelular para su captura por las terminales nerviosas. La posterior desaminación de la Gln por la glutaminasa activada por fosfato rinde Glu y ocurre en neuronas. Este ciclo es conocido como el ciclo de Glu-Gln (Figura 4A). Dentro de los astrocitos, el Glu también puede ser utilizado como sustrato energético y para la síntesis de GSH. Se considera que el ciclo Glu-Gln contribuye principalmente a la síntesis de Glu vesicular, sin embargo, la síntesis *de novo* también juega un papel importante para compensar la pérdida de Glu por su utilización dentro de los astrocitos (Andersen y cols., 2021)

En el proceso de empaquetamiento del Glu, los transportadores antiporte Glu/H<sup>+</sup> ubicados en las membranas vesiculares denominados vGLUTs (del inglés, vesicular glutamate transporter) se encargan del empaquetamiento del Glu en vesículas y usan como fuerza impulsora el gradiente electroquímico del H<sup>+</sup>.

Una vez liberado el Glu vesicular en la hendidura sináptica, este es capaz de activar a los receptores de Glu inotrópicos y metabotrópicos, sin embargo, la difusión fuera de la hendidura y su recaptura por los astrocitos y neuronas limitan la activación sostenida de los receptores y aseguran la correcta transmisión del impulso nervioso. Los recapturadores pertenecen a una familia de transportadores dependientes de sodio, SLC1, expresados principalmente en astrocitos. Entre ellos destacan los transportadores SCL1A2 (también conocidos como GLT1 o EAAT2, del inglés Glutamate Transporter 1 or excitatory amino acid transporter 1, respectivamente) y

SLC1A3 (también conocidos como GLAST o EAAT1, del inglés Glutamate Aspartate Transporter or excitatory amino acid transporter 1, respectivamente) (Hassel y Dingledine, 2012) (Figura 4B).

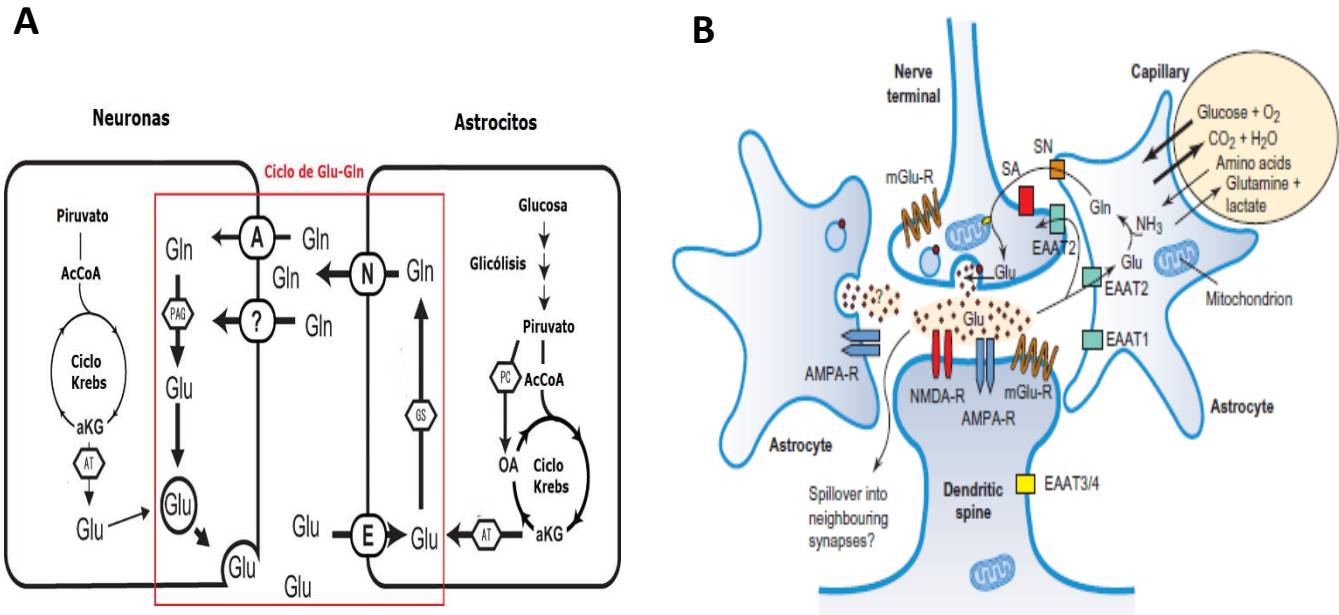
Los receptores ionotrópicos (tipo canal) de Glu se subdividen en tres tipos según el agonista al que responden preferencialmente: ácido  $\alpha$ -mino-3-hidroxi-5metil-4-izozazolpropiónico (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA), y kainato (KA) (Figura 4B). Los receptores AMPA están conformados por tetrámeros de las 4 subunidades (GluA1-GluA4, antes denominadas GluR1–GluR4) y las propiedades fisiológicas de los receptores dependen de la combinación de subunidades (Martinez-Lozada y Ortega, 2015). Por ejemplo, los receptores que tienen la subunidad GluA2 son impermeables a  $Ca^{2+}$ . En el hipocampo, los receptores AMPA son principalmente tetrámeros de las subunidades GluA1/ GluA2. Durante la inducción de LTP se ha observado un aumento en la expresión de receptores AMPA permeables a  $Ca^{2+}$  (Hassel y Dingledine, 2012).

Los receptores NMDA son canales iónicos permeables a  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  compuestos por tetrámeros de diferentes subunidades que están codificadas por 7 genes: NR1, NR2A-NR2D y NR3A-NR3B. Se ensamblan funcionalmente con dos subunidades obligatorias NR1 (también denominada GluN1; la subunidad con sitio de unión a glicina) y dos subunidades que pueden ser del tipo NR2 (o GluN2; la subunidad donde se une el Glu) o NR3 (Hassel y Dingledine, 2012; Martinez-Lozada y Ortega, 2015). La expresión de las subunidades de los receptores tipo NMDA varía dependiendo de la etapa de desarrollo y de la región del cerebro. Las subunidades NR2A y NR2B son las subunidades predominantes en el hipocampo. En etapas tempranas predominan las subunidades NR2B, mientras que las subunidades NR2A aumenta al progresar el desarrollo. Los complejos NMDA extrasinápticos están compuestos predominantemente por la subunidad NR2B mientras que en los sinápticos predominan las subunidades NR2A (Hardingham y Bading, 2010; Hassel y Dingledine, 2012). Los NMDAR que expresan NR2A tienen una cinética de activación y desactivación más rápida que los que expresan NR2B, por lo que el nivel de  $Ca^{2+}$  que pasan a través de estos últimos es hasta cuatro veces mayor que

los que expresan la subunidad NR2A (Hardingham y Bading, 2010; Hassel y Dingledine, 2012). Por ello, la activación de NR2B ocurre predominantemente por altos niveles Glu extrasinápticos y se asocia a procesos de muerte por excitotoxicidad. Los receptores tipo NMDA se encuentran más representados en la terminal sináptica con respecto a los receptores tipo AMPA y presentan mayor afinidad por el Glu, pero presentan bloqueo por  $Mg^{2+}$  que impide su activación hasta que haya ocurrido una previa despolarización de la membrana, mediada por activación de otros receptores como los de tipo AMPA (Featherstone y Shippy, 2008).

Los receptores KA son los menos estudiados. Existen 5 posibles subunidades (GluK1-5) divididas en dos familias, subunidades de la familia GluK1-GluK3 se unen con subunidades GluK4 o GluK5 para formar receptores KA funcionales (Hassel y Dingledine, 2012).

Los receptores metabotrópicos constituyen receptores acoplados a proteínas G y están formados por 8 miembros (mGluR1-8, del inglés metabotropic glutamate receptor subunit 1-8). Se encuentran divididos en 3 grupos de acuerdo con la homología de secuencias, agonistas y proteína G con la que interactúan. El grupo I está conformado por mGluR1 y mGluR5 y sus variantes de corte y empalme del ARNm que están acoplados a la vía de señalización dependiente de inositol fosfato/ $Ca^{2+}$  intracelular. En su mayoría se encuentran en la membrana postsináptica y están involucrados en la modulación de la permeabilidad de los canales de  $Na^+$  y  $K^+$ . En el grupo II están los receptores mGluR2 y mGluR3, y en el grupo III los receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Los grupos II y III inhiben la formación de cAMP (del inglés, cyclic adenine monophosphate) al activar una proteína G que inhibe a la enzima adenilato ciclasa. Están presentes en la membrana presináptica y post sináptica. Aunque su efecto parece ser mayor sobre la membrana presináptica que en la postsináptica (Vaidya y cols., 2013) (Figura 4B).



**Figura 4.** Transmisión glutamatérgica: metabolismo del Glu y componentes estructurales de la sinapsis. A) Metabolismo del Glutamato (Glu) en el cerebro. La síntesis de Glu depende de la síntesis *de novo* y del ciclo de glutamato-glutamina (recuadro rojo). Interconexión metabólica entre glicólisis, ciclo de Krebs y metabolismo de Glu. Las flechas negras indican el sentido del flujo de los aminoácidos Glu y Gln entre neuronas y astrocytos. *Editado de Tani y cols., 2010.* B) Elementos involucrados en la transmisión sináptica glutamatérgica. Elementos celulares: astrocytos, capilar, terminal presináptica y terminal postsináptica; y los elementos moleculares: transportadores de glutamato (miembros de familia "EAAT", transportadores de aminoácidos excitatorios) y receptores de glutamato ionotrópicos: NMDA-R (receptor tipo N-metil-D-aspartato) y AMPA-R (receptor tipo ácido- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y metabotrópicos: mGlu-R. Las flechas negras indican el sentido del flujo de los aminoácidos entre neuronas y astrocytos. *Tomado de Hassel y Dingledine, 2012.* Glu: glutamato, Gln: glutamina, aKG:  $\alpha$ -cetoglutarato, AcCoA: acetil-CoA, PAG: glutaminasa activada por fosfato, AT: aminotransferasas, GS: Glutamina sintetasa, PC: piruvato carboxilasa, OA: oxalacetato. N o SN: familia de transportadores de aminoácidos neutros, A o SA: transportadores de aminoácidos ácidos, E o EAAT: transportadores de aminoácidos excitatorios (E).

Un aspecto importante en la regulación de la expresión de los receptores es la asociación con proteínas accesorias, principalmente las de la familia de las proteínas de la densidad postsináptica (PSD) y estargazinas (TARP). La asociación con determinadas proteínas contribuye a la regulación del tráfico vesicular, la actividad de estos y su anclaje en la membrana plasmática. (Hoeffler, 2008; Waites y cols., 2009; Jackson y Nicoll, 2011; Greger y cols., 2017; Watson y cols., 2017). Las modificaciones por fosforilación/desfosforilación también contribuyen a la regulación del tráfico intracelular, y la cinética del canal. Tanto las subunidades de los receptores tipo NMDA como AMPA, presentan sitios de fosforilación por cinasas

como proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC) y calcio-calmodulina cinasa II (CAMKII).

### *2.7.1 Efectos de As sobre la sinapsis glutamatérgica*

Se han descrito diversos efectos de este metaloide en la sinapsis glutamatérgica tanto a nivel presináptico como postsináptico. Entre los cambios más importantes a nivel de presinapsis se encuentra la disminución de vesículas sinápticas. A nivel postsinápticos se han reportado cambios en la composición de los receptores de Glu inotrópicos y metabotrópicos, disminución en las proteínas de la densidad sináptica y de diversas rutas de señalización celular (Luo y cols., 2009; Luo y cols., 2012; Zhao y cols., 2017).

En cuanto a los receptores metabotrópicos, Jiang y cols., (2014) reportaron que la exposición a As en ratas disminuye la expresión de mGluR1 y mGluR5 en el hipocampo (Jiang y cols., 2014). Huo et al, 2015 observó un aumento en los niveles de NR2A en ratas tratadas con Realgar (mineral que contiene As, usado en la medicina tradicional china), pero no encontraron cambios en NR2B. Adicionalmente, Kruger y cols., (2009), observaron que el tratamiento rebanadas de hipocampo con MMA<sup>3+</sup>, a altas dosis inhibía la actividad de los receptores tipo NMDA, pero a dosis inferiores observaban un aumento en la actividad de los receptores (Krüger y cols., 2009). Por el contrario, Luo y cols., (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 mg/L) durante 3 meses. De manera similar, Srivastava y cols., (2018), encontraron una disminución en los niveles de NR2A, sin observar cambios en los niveles de NR2B en ratas tratadas con As (Srivastava y cols., 2018). Ramos-Chávez y cols., (2015) observaron una disminución en la expresión de NR2A y NR2B en un modelo de exposición gestacional a 20 mg/L de As. Como se comenta arriba, los cambios observados en los niveles de las subunidades de los receptores NMDA difieren entre los reportes, lo cual puede estar asociado a distintas dosis y composición de As utilizado, distintos tiempos de exposición, y el modelo animal utilizado (Luo y cols., 2009; Huo y cols., 2015; Ramos-Chavez y cols., 2015). Por otro lado, Luo y cols., (2012) proponen que las modificaciones observadas a



nivel de los receptores NMDA está asociada con la disminución en las proteínas de anclaje. La exposición crónica a As puede conllevar a la disminución en la expresión de proteínas en la membrana postsináptica, lo que se puede ver reflejado en la disminución del grosor de la sinapsis en estudios de microscopía electrónica y en la expresión de PSD95 (Luo y cols., 2012; Zhao y cols., 2017).

El efecto del As sobre los receptores AMPA ha sido muy poco estudiado. Maewaka y cols., (2013), encontraron que al incrementar la concentración de As de 0.5 hasta 2  $\mu$ M, la intensidad relativa de GluA1 se reducía significativamente en cultivo de neuronas corticales (Maekawa y cols., 2013). Nelson-Mora y cols, (2018), también observaron una disminución en la expresión de GluA1 y GluA2 en hipocampo de ratones expuestos gestacional y crónicamente a As (Nelson-Mora y cols., 2018). Por otro lado, Huo y cols., (2015), observaron un aumento en los niveles Glu extracelular, una disminución en la expresión del recapturador GLT1, afectaciones en la homeostasis de  $Ca^{2+}$  intracelular, así como cambios ultraestructurales en las neuronas hipocampales (Huo y cols., 2015). Otros estudios han demostrado también el efecto del As en la modulación negativa de transportadores GLAST y GLT1 (Castro-Coronel y cols., 2011; Zhao y cols., 2012).

### *2.7.2 Efectos de F sobre la sinapsis glutamatérgica*

Muy similar a lo descrito para el As, la exposición crónica a F ha sido asociada con alteraciones moleculares en la sinapsis glutamatérgica, principalmente en el hipocampo. La exposición gestacional a NaF disminuyó los niveles de Glu en el hipocampo de ratas expuestas, asociado a la inhibición de las enzimas AST y ALT, involucradas en la síntesis *de novo* de Glu, incluso en modelos de exposición gestacional a dosis tan bajas como 5 y 10 mg/L de F (Niu y cols., 2009; Bartos y cols., 2019).

La disminución en la expresión de receptores de Glu ionotrópicos y metabotrópicos constituye otro aspecto en común en la toxicidad de ambos elementos. El tratamiento de ratas adultas por 12 semanas a concentraciones de 60 y 120 mg/L de F, disminuyó la expresión de las subunidades GluA2 y NR2B de los receptores

de Glu en el hipocampo de los animales expuestos, lo que se asoció con un decremento en los niveles de PSD95 y una LTP disminuida (Yang y cols., 2018). La exposición gestacional en ratón a concentraciones entre 25 y 100 mg/L de F, resultó en la disminución de los niveles de ARNm de GluA2, NR2A, NR2B y mGluR2, sin cambios en mGluR1 y mGluR5 (Sun y cols., 2018).

Con respecto a la expresión y actividad de los transportadores de Glu, se considera que la exposición a F podría inhibir la actividad de los transportadores de Glu por dos vías principales. La primera, asociada a la capacidad de generar estrés oxidante, pues su conjugación con 4-hidroxinonenal (producto peroxidación lipídica), lo que disminuye la actividad del transportador. La segunda, observada en exposición a  $Al_3F$ , involucra la formación de un complejo Al-F, muy estable y bioactivo que mimetiza un grupo  $PO_4$ , y que inhibe distintas proteínas, entre ellas transportadores de Glu (Blaylock, 2004). No obstante, el efecto a niveles de transportadores de Glu requiere estudios adicionales.

### **3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

La co-exposición a arsénico y flúor ocurre en la mayoría de los casos, de manera simultánea en México. Los residentes de localidades como Guanajuato, Durango, Zacatecas, entre otros se exponen por generaciones a elevadas concentraciones (por encima de la normatividad) a estos elementos en el agua de bebida. Aunado a esto, en México, el F está presente en las pastas dentales y la sal de cocina. Esta exposición se asocia con efectos tóxicos a nivel sistémico y nervioso. El cerebro constituye un órgano que resulta seriamente afectado por exposiciones a As y F, especialmente durante la exposición gestacional, dado que durante este periodo se forman las estructuras cerebrales; además, no está presente aun la barrera hematoencefálica lo que favorece la llegada de As y F a este órgano en desarrollo. Sin embargo, existen pocos estudios que investiguen los efectos de la exposición a estos elementos de manera simultánea. Por lo cual, nos interesa estudiar cuales son los efectos neurotóxicos de la exposición conjunta a As y F, y las alteraciones moleculares que subyacen la neurotoxicidad. Para ello, utilizaremos un modelo animal que simula las condiciones de la exposición humana, es decir, que inicia durante la gestación.

#### **3.1 Importancia del modelo experimental para el estudio de exposiciones a As-F**

Aunque existen diversos estudios epidemiológicos que asocian la exposición a As y F con diversas afectaciones, el uso de modelos animales es necesario para entender mecanísticamente el efecto de la exposición y poder evaluar los efectos en el tejido en estudio. Sin embargo, es necesario que nuestro modelo experimental simule en mayor medida posible lo que ocurre en la población humana. Dentro de los modelos de roedores, el ratón constituye el modelo más apropiado para el estudio de la exposición a As, dado que el metabolismo del As es más parecido al humano, así como la vida media en sangre del As (Vahter, 1999). Además, es importante tener en cuenta el rango de concentraciones de los elementos en la naturaleza, la proporción en la que se encuentran y la resistencia de los modelos

animales respecto a los humanos en el diseño experimental. Por ello, en este trabajo se empleó un modelo de exposición combinada en ratones CD1 (cepa no endocriada), expuestos desde inicios de la gestación a dosis con relevancia para exposiciones humanas.

#### **4. HIPOTESIS**

La co-exposición crónica (iniciando en la gestación) a As y F produce una mayor neurotoxicidad que las exposiciones a los elementos individuales, en cuanto a la generación de desbalance redox, homeostasis del glutamato y expresión de receptores glutamatérgicos en el hipocampo y la corteza, afectando procesos de aprendizaje y memoria.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la exposición combinada a As y F en el estado redox celular y en la transmisión glutamatérgica en el hipocampo y la corteza de los ratones, y en el desempeño en pruebas de memoria dependiente de estas regiones cerebrales.

##### **5.1 Objetivos específicos:**

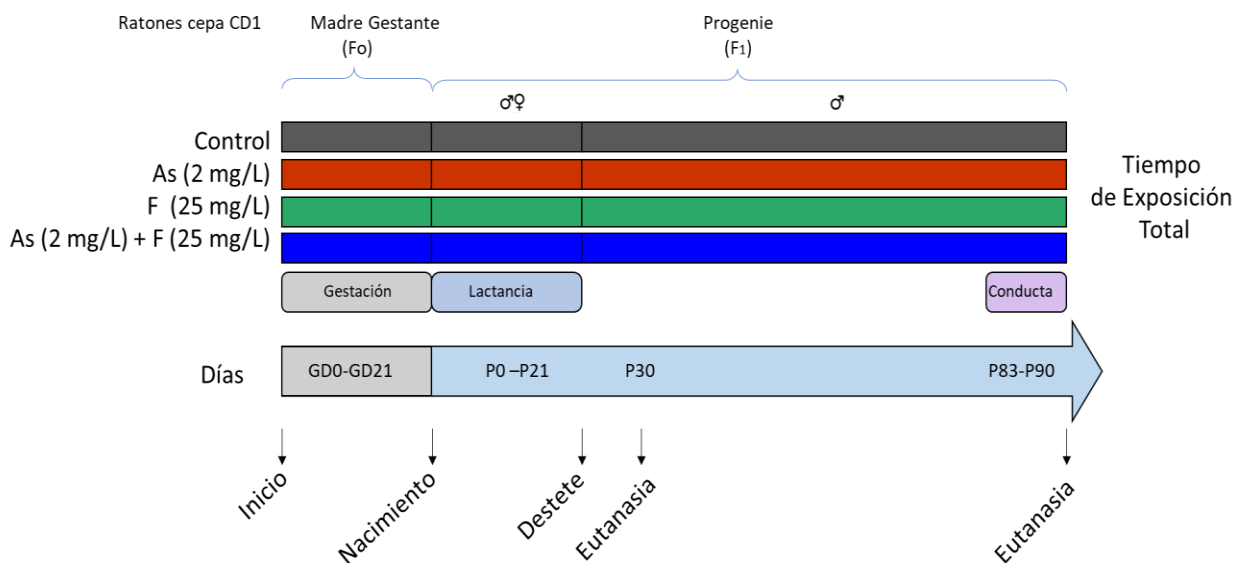
Evaluar en la corteza y el hipocampo de ratones macho expuestos desde la gestación hasta a los 30 (P30) y/o 90 (P90) días posterior al nacimiento:

1. Los niveles de As y F a los P30 y P90.
2. Los niveles de GSH a los P30 y P90.
3. Los niveles proteicos y actividad de enzimas de la vía de la transulfuración a los P30 y P90.
4. Los niveles de ARNm y de proteína de transportadores de Cys y Glu a los P90.
5. Los niveles proteicos de receptores de Glu, y la actividad de enzimas ALT y AST involucradas en la síntesis *de novo* de Glu a los P90.
6. Evaluar el desempeño conductual en pruebas de memoria de objeto dependiente de la corteza y el hipocampo en los ratones a los P90.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Animales y protocolo experimental.**

Se emplearon ratones de la cepa CD1 de 8 u 9 semanas de edad, que fueron obtenidos y mantenidos en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Después de la cruce las hembras se mantuvieron bajo condiciones controladas de 12 h de luz-oscuridad, 23-25 °C y humedad relativa del 50-60%. Los animales tuvieron acceso ilimitado a comida y agua (con sus respectivos tratamientos). Los animales fueron separados arbitrariamente en 4 grupos experimentales para su exposición a 2 mg/L (2 ppm) de As (arsenito de sodio) y/o 25 mg/L (25 ppm) de F (fluoruro de sodio) y grupo control. La exposición fue desde la gestación y hasta 1 mes o 3 meses posnatales. El agua de bebida se cambiaba diariamente para determinar su consumo y fueron pesados periódicamente. Se determinó el tamaño de las camadas y después de su nacimiento a los 21 días posnatales, se realizó el destete y separación de las crías por sexo. Evidencias previas han demostrado que las hembras presentan mayor resistencia a la toxicidad de As y F que los ratones macho (Ramos-Chávez y cols, 2015, Bera y cols, 2007), por lo que solo las crías macho continuaron el protocolo de exposición. Los experimentos y tratamientos de los animales fueron realizados con base en las guías establecidas en los “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication #85- 23, revised 1985) y las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Clave NOM-062- ZOO-1999)” de la “Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)” (publicada en agosto, 2001). El protocolo experimental No. 6305 fue aprobado por el CICUAL del Instituto de Investigaciones Biomédicas.



**Figura 5.** Esquema del diseño experimental de exposición crónica a As y F. Ratones de la cepa CD1 fueron empleados como modelo experimental, dividido en 4 grupos experimentales (N= 10 madres gestantes / grupo). Protocolo de exposición inicia el día 0 de la gestación (GD0) y continua hasta los 30 o 90 días posnatales (P30 o P90). A los 21 días posnatales (P21) ocurre el destete y separación de la progenie por sexo. ♀: sexo femenino, ♂: sexo masculino, solo los machos continuaron la exposición. F<sub>0</sub>: progenitores, F<sub>1</sub>: primera generación filial de la descendencia.

## 6.2 Determinación de As y F

Las determinaciones de As y F se realizaron en el Laboratorio de la Dra del Razo en el Departamento de Toxicología de Cinvestav (Unidad Zacatenco). Los niveles de especies As se determinaron en la corteza y el hipocampo mediante espectrometría de absorción atómica de generación de hidruro mediante criotrampa (HG-CT-AAS) descrito previamente por Hernández-Zavala y cols., 2008. Primero, se prepararon homogeneizados de muestras de tejido en hielo con agua desionizada (Currier y cols., 2011). Para la cuantificación se utilizaron gráficos de calibración independientes de las especies de arsénico inorgánico y metilado. La sal disódica de ácido arsénico (99% pura) y el ácido dimetilarsínico (DMAV; 100% puro) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. La sal disódica de ácido metilarsónico (MMAV) (99% de pureza) se obtuvo de Chem Service (West Chester, PA, EUA). El borohidruro de sodio se obtuvo de EM Science (Gibbstown, NJ, EUA).

Los niveles de F se determinaron en muestras agrupadas de 4 cortezas de ratón por grupo, combinando la técnica de destilación isotérmica (Rigalli y Puche, 2007) con un método potenciométrico utilizando un electrodo selectivo de iones (Orion 9609BNWP, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se realizó una mezcla 1:1 de la muestra y un tampón de ajuste de fuerza iónica total (TISAB). La concentración de F se determinó interpolando los resultados en una gráfica de calibración. Se utilizaron materiales de referencia de fluoruro en orina PC-U-F2102 (0,413 µg/mL), PC-U-F2103 (7,31 µg/ml) y PC-U-F2104 (4,25 µg/ml) del Centre de Toxicologie du Québec (Institut national de Santé Publique du Québec [INSPQ]).

### **6.3 Determinación de los niveles de GSH**

Para la determinación de los niveles de GSH, se homogenizó una porción de corteza o hipocampo (tejido fresco) en 10 volúmenes de solución A (KCl 154 mM, DTPA 5 mM y K<sub>2</sub>PO 0.1 M) con respecto al peso del tejido, y posteriormente se agregó el mismo volumen de solución B (HCl 40 mM, DTPA 10 mM, Ácido ascórbico 20 mM y TCA 10%). Las muestras se centrifugaron a 14000 x g por 30 minutos y posteriormente se filtraron usando filtros de 40 µm. Las muestras fueron congeladas a -70°C. Dentro de las 4 semanas posteriores a la extracción, se realizó la cuantificación por el método fluorométrico del o-ftalaldehído (OPA), siguiendo la metodología descrita por Senft y cols, 2000. El GSH reacciona con el OPA, formando un derivado fluorescente, isoindol, que se excita a 365nm y emite a 410nm. Los niveles de GSH se interpolaron de una curva estándar de GSH (Sigma- Aldrich) y se expresaron en nmol/g tejido (Senft y cols., 2000).

### **6.4 Actividad de las enzimas de la vía de transulfuración**

Las enzimas involucradas en la vía de la transulfuración (CBS y CSE) según los sustratos que se utilicen pueden producir los intermediarios de la ruta o H<sub>2</sub>S. Basada en esta capacidad, la metodología de determinación de la actividad de las enzimas se basa en la detección de la formación de H<sub>2</sub>S (Hine y Mitchell, 2017). Brevemente, aproximadamente 50 mg de hipocampo o corteza fueron homogenizadas en solución de lisis: Tris-HCl 25 mM pH 7.8, glicerol 10%, DTT 2mM, Triton X100 1%,

PMSF 1 mM y 10 mg/mL de aprotinina y leupeptina. Inmediatamente fueron congeladas en N<sub>2</sub> líquido y se sometieron a 3 ciclos de congelación/descongelación (N<sub>2</sub> líquido por 2 min/ 37°C por 5 min). El homogenado se centrifugó a 5000 g por 15 min a 4°C. La determinación de la concentración de proteínas empleó la técnica de micro-placa de Bradford (Bio-Rad, CA, USA). Aproximadamente 300 µg de proteínas fueron incubados en solución de reacción con concentración final: L-Cys 10 mM, piridoxal fosfato 1 mM en PBS1X a 37°C por 16 h para muestras de cerebro. La producción de H<sub>2</sub>S es medida a través de la formación de manchas de sulfuro de plomo en un papel de filtro previamente embebido acetato de plomo 100 mM colocado en la superficie de la placa.

## **6.5 Análisis de expresión de ARNm por RT-qPCR.**

### *6.5.1 Extracción de ARN.*

La extracción de ARN se llevó a cabo siguiendo el protocolo general de TRIzol® Reagent de Invitrogen (CA, USA; No Cat. 15596026). Las muestras fueron almacenadas a -80°C, hasta su posterior utilización. La pureza del ARN se determinó por espectrometría (cociente A260/A280: 1,8-2) en espectrofotómetro ND-1000 de Nanodrop y la integridad del ARN a través de un gel de agarosa al 1,5% en TAE1X (Tris 2 M pH 8.0, acetato 1 M, EDTA 100 nM) para confirmar la presencia de las bandas correspondiente a ARN ribosomal 18S y 28S (Wieczorek, et al., 2012).

### *6.5.2 Síntesis de cDNA (Retrotranscripción)*

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó utilizando el kit de M-MLV RT de Promega® (WI, USA; No Cat. 9PIM170) siguiendo las instrucciones de fabricante.

### *6.5.3 PCR Tiempo Real (qPCR)*

Para determinar los niveles de ARNm de los transportadores se utilizó la técnica de PCR tiempo real. Los experimentos se llevaron a cabo en un termociclador Rotor-Gene Q de QIAGEN® (Hilden, Alemania) y se usó la mezcla de reacción SYBR®



FAST Universal 2X qPCR Master Mix (KAPA Biosystems, MA, USA; No Cat. KK4600). Los cebadores utilizados y las temperaturas de alineamiento se muestran en la Tabla 3. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1. Hold. 94°C por 3 min, 2. Cycling (40 ciclos): 94°C por 3 seg; temperatura de alineamiento específico para cada primer por 10 seg, 72°C por 12 seg; 3. Melt. 55-95°C. Los cambios en la expresión se determinaron por el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Tasa de expresión normalizada =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta\Delta Ct = (CT(\text{gen problema, tratado}) - CT(\text{gen constitutivo, tratado})) - (CT(\text{gen problema, control}) - CT(\text{gen constitutivo, control}))$ . Los datos del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  fueron representados en una gráfica de mapas de calor, utilizando el programa Graphpad Prism 8.

**Tabla 3.** Cebadores empleados para la cuantificación de ARNm de transportadores de cisteína y glutamato

	<b>Nombre de Gen (Proteína)</b>	<b>Secuencia Cebadores</b>	<b>Código GeneBank Sitio Unión (# nucleótido)</b>	<b>Amplicón (pb)</b>	<b>Temperatura alineamiento (°C)</b>
Transportador	<i>Slc1a1</i> (EACC1 o EAAT3)	F CCAGTTACATTCCGCTGTGC R GCTGTAATGCTGATGGTGACG	NM_009199.3 1116-1306	191	66
	<i>Slc1a2</i> (GLAST o EAAT2)	F ATATGCCCAAGCAGGTAGAAGT R GCTCCCAGGATGACACCA	NM_011393.2 55-202	143	63
	<i>Slc1a3</i> (GLAST o EAAT1)	F CAGTCTCGTCACAGGAATGGC R CCAATCACACAGCAATGATGG	NM_148938.3 873 - 979	108	66
	<i>Slc1a4</i> (ASCT1)	F GAACGTGACCAAAGAGAAGATCC R CATAACACATGATCCATGACACC	NM_018861.3 856-1046	191	66
	<i>Slc1a5</i> (ASCT2)	F CTGCCTTCCGCTCTTTTGC R GCCACACCAAAGACGATAGC	NM_009201.2 1160-1328	169	66
	<i>Slc7a5</i> (LAT1)	F AGCTTCTTCAACTGGCTGTGT R AGAGGCAGGCCAGGATAAA	NM_011404.3 1296-1428	133	66
	<i>Slc7a8</i> (LAT2)	F CAGGGCTCCTTTGCCTATGG R AGTTTCTCTCCAAAAGTCACAGC	NM_016972.2 1274-1485	212	66
	<i>Slc7a11</i> (xCT)	F ATACTCCAGAACACGGGCAGCG R CCAGGGCGTATTACGAGCAG	NM_011990.2 557-762	206	68
		<i>Sdha</i>	F CAAATGCTGGAGAAGAATCGGT R CATCGACTTCTGCATGTTTAGGC	NM_02328.1 1489-1589	102

## 6.6 Obtención de la fracción proteica y Western Blots

Para la determinación de los niveles totales de proteína de interés, CBS, CSE, xCT, LAT1, SLC1A4, EAAT1, EAAT2, EAAT3, GluA1, GluA2, NR2A, NR2B, PSD95 y sinaptofisina se extrajeron proteínas totales de corteza e hipocampo. Brevemente, se homogenizó el tejido en Buffer Ripa (Tris-HCl 50 mM, pH 7.55, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 1 mM, DTT 1mM, pirofosfato de sodio 5 mM, Tritón X-100 1%, deoxicolato de sodio 0.1%, Glicerol 2-fosfato 1mM, Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, PMSF 1 mM y 10 mg/mL de aprotinina y leupeptina). El homogenado se incubó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 14000 x g por 15 min a 4°C. Se colectó el sobrenadante y las muestras fueron almacenadas a -80°C. Para la determinación de la concentración de proteínas en las muestras obtenidas, se empleó la técnica de micro-placa de Bradford (Bio-Rad, CA, USA) usando una curva patrón de albúmina de suero bovino con R<sup>2</sup> >0.98.

Para determinar los cambios en los niveles de las proteínas de interés, se empleó la técnica de Western Blot. Las muestras se corrieron en una electroforesis vertical en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se cargaron 30 µg de proteína totales en geles de acrilamida a una concentración de 10 % para CSE, CBS, xCT, LAT1, SLC1A4, EAAT1, EAAT2, EAAT3 y Sinaptofisina; y 50 µg de proteínas totales en geles de 8% para la determinación de la expresión de GluA1, GluA2, NR2A, NR2B y PSD95. Para la determinación de xCT, el buffer de corrida incluyó bisulfito de sodio para mantener las condiciones de corrida altamente reductoras. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad®, CA, USA; No Cat. 162-0115). Posteriormente, las membranas se bloquearon con BSA (Sigma, No Cat. A9647) o leche descremada (Santa Cruz Biotechnology, No Cat. sc-2324) a una concentración al 5% preparada en TBS-T 1X (Tris pH 7.6, NaCl y Tween 20 [0.1 %]). Después se llevó a cabo la incubación con los anticuerpos primarios por una noche a 4°C (Tabla 4). Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario

correspondiente por 2 horas a temperatura ambiente. Al terminar la incubación, las membranas se sometieron a 3 lavados de 15 min con TBS-T y 1 lavado de 15 min con TBS (Tris pH 7.6, NaCl). Las proteínas fueron detectadas a través de una reacción quimioluminiscente en la que se empleó el kit Amersham TM ECL TM Advance Western Blotting Detection Kit (GE Life Sciences, RPN2232), usando el scanner C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR). Como control de carga se utilizó la tinción de Ponceau para visualizar el total de bandas proteicas en cada ensayo.

El análisis de densitometría de las placas se realizó con el software Image J 1.49 (W. Rasband, NIH, USA). La señal de la proteína problema se corrigió respecto al control de carga (80% bandeado del Ponceau) para cada membrana, y los niveles de proteína se representaron respecto al valor promedio del grupo control.

**Tabla 4.** Anticuerpos empleados para cuantificación de proteína por Western Blot

Anticuerpo	Marca	MW	Dilución
Rabbit polyclonal anti-CBS	Abcam Cat No: ab135626	61kDa	1:500
Rabbit polyclonal anti-CTH	Abcam Cat No: ab151769	45kDa	1:2000
Rabbit Polyclonal Anti NMDAR2B	Abcam Cat No: ab 65783	180kDa	1:2000
Rabbit Anti NMDAR2A Antibody	Millipore Cat No: ab1555p	180kDa	1:2000*
Rabbit Anti-GluA1 Antibody	Millipore Cat No: ab1504	100kDa	1:1000*
Rabbit monoclonal Anti GluA 2 [EPR5032]	Abcam Cat No: ab ab133477	100kDa	1:2000
Rabbit polyclonal Anti xCT	Abcam Cat No: ab 37185	40kDa	1:1000
Rabbit Monoclonal Anti LAT1 (H-75)	Santa Cruz B. Cat No: sc-134994	40kDa	1:1000
Rabbit Anti SLC1A4	Cell Signaling Cat No: 8442s	75kDa	1:1000*
Rabbit Anti EAAT3 (EPR6774B)	Abcam Cat No: ab124802	60kDa	1:1000
Mouse anti Synaptophysin (SY38)	Abcam Cat No: ab8049	40kDa	1:3000
Mouse anti PSD95 (7E3)	Santa Cruz B. Cat No: sc-32290	100kDa	1:1000
Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Invitrogen Cat No: 31450		1:4000
Anti Mouse IgM HRP	Abcam Cat No: ab97230		1:1000
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Cat No: 7074S		1:2000

---

Marcador de Peso Molecular

Marca

Biotinylated Protein Ladder Detection Pack

Cell Signaling Cat No: 7727S

Precision Plus Protein Dual Color Standards

Bio-Rad Cat No: 1610374

---

Las membranas se bloquearon en leche descremada 5%, e incubaron con anticuerpos primario y secundarios disueltos en leche descremada 5%, con excepción de las marcadas con \*, en las cuales el bloqueo e incubación con anticuerpos se realizó en solución de BSA 5%.

## 6.7 Determinación de la actividad enzimática de transaminasas

La actividad de las transaminasas en la corteza y el hipocampo se determinó por medio de una modificación del protocolo descrito por Reitman y Frankel, 1957, basado en la capacidad de los cetoácidos de reaccionar con la dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando un compuesto con absorción en el espectro visible. Brevemente, 100 µg de homogenado (ver protocolo de actividad de enzimas de la vía transulfuración) de proteínas fueron incubados con 100 µL de Sustrato AST (α cetoglutarato 2 mM + Aspartato 0.2 M en tampón de fosfatos pH 7.4) o ALT sustrato (α cetoglutarato 2 mM + Alanina 0.2 M en tampón de fosfatos pH 7.4) e incubados a 37°C por 60 o 30 min respectivamente. Posteriormente, se les añadió 100 µL de DNPH 1 mM en HCL 1 N e incubó por 20 min a temperatura ambiente (TA). Finalmente, se les añadió 1 mL de NaOH 1 M e incubó 10 min a TA. Se determinó la absorbancia a 505 nm. La curva estándar se preparó a partir de una solución de piruvato de sodio 2 mM. La actividad enzimática (AE) fue calculada a partir de la siguiente ecuación y expresada como (U/L)

$$AE (AST) = \frac{umol(60min) - umol(0min)}{60min * 0.00001L};$$

$$AE (ALT) = \frac{umol(30min) - umol(0min)}{30min * 0.00001L}$$

## 6.8 Pruebas conductuales

Los estudios de comportamiento se realizaron en P83-P90 siguiendo protocolos previamente descritos por Moreno-Castilla y cols., 2017. Para la prueba de campo abierto, así como para las pruebas de reconocimiento de objetos y lugar, utilizamos una arena cuadrada cerrada de acrílico blanco (40 x 40 x 25 cm) en la que el piso estaba cubierto con aserrín. La arena se colocó en una sala iluminada con poca luz y tenía una pista visual interna que consistía en un cartón plastificado rectangular con rayas blancas y negras (38 x 5 cm) pegado a una de las paredes (Figura 6A). Los objetos utilizados en las tareas de reconocimiento fueron dos pirámides idénticas de bloques de Lego llamadas "A1" y "A2" (4,8 cm de largo x 3,0 cm de ancho x 4,0 cm de alto, construidas en rojo, azul, gris y amarillo) y un objeto diferente, una torre de bloques de Lego denominada "objeto novedoso" (NO, 3,2 cm de largo x 1,6 cm de ancho x 4,5 cm de alto, construido en verde, rojo, amarillo y blanco) (Figura 6D). Los objetos se limpiaron cuidadosamente con etanol al 70%, y el aserrín se cambió después de cada prueba para evitar señales olfativas. Los animales fueron transportados a la sala experimental 30 minutos antes del comienzo de cada sesión. Todas las sesiones de comportamiento fueron grabadas en video para su posterior análisis. Uno de los dos investigadores permaneció ciego al tratamiento de cada animal durante el experimento. Para las pruebas de reconocimiento de objeto, el investigador a ciego realizó los cálculos de tiempo de exploración a cada objeto para determinar el índice de exploración (IE) en las fases de adquisición y prueba de las tareas de reconocimiento.

El IE que se calculó como el tiempo dedicado a explorar (en segundos) un objeto específico durante el tiempo total de exploración (ambos objetos),  $IE = [\text{objeto } 1 / (\text{objeto } 1 + \text{objeto } 2)]$ . Un IE igual a 0.5 indica que no hay preferencia por ningún objeto o ubicación, mientras que un IE superior a 0.5 se considera una preferencia por un objeto o ubicación. La exploración se consideró como apuntar la nariz a un objeto a 2 cm o menos y tocarlo con la nariz. Darse la vuelta, sentarse, trepar o roer los objetos no se consideraba un comportamiento exploratorio.

### *6.8.1 Habitación a la arena y prueba de campo abierto*

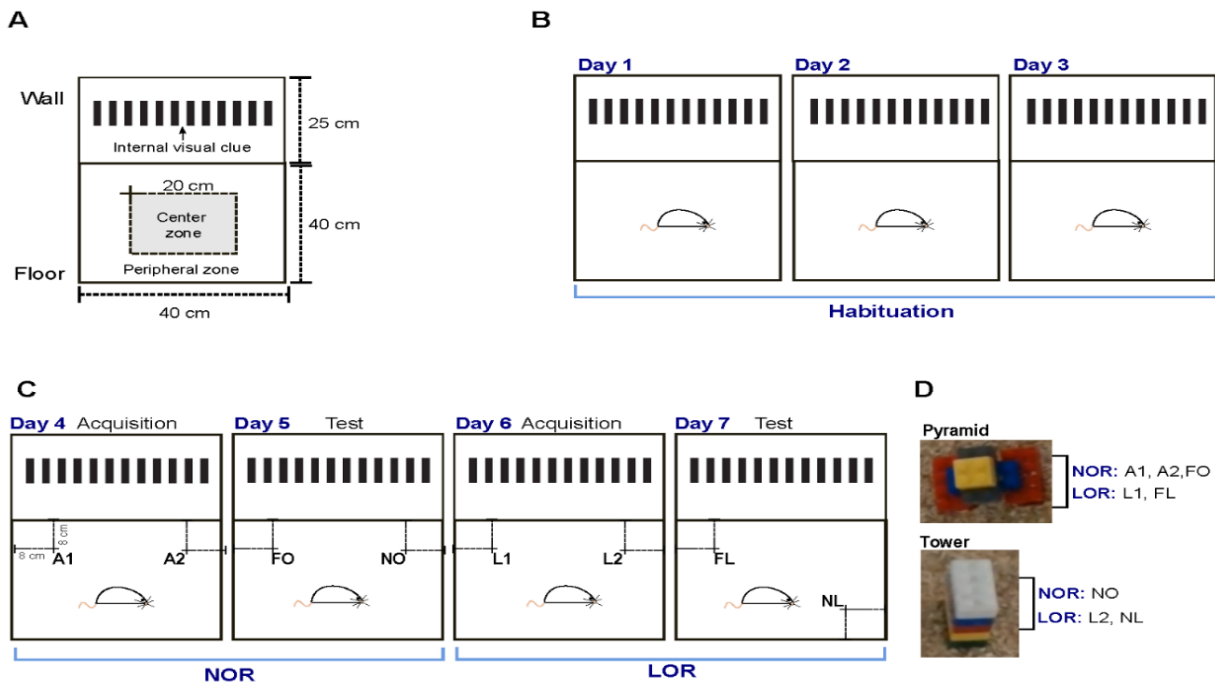
Durante 10 minutos por 3 días consecutivos, el investigador interactuó con los animales para habituarlos al experimentador. Luego, los animales se habituaron a la arena cuadrada sin ningún objeto durante 10 minutos al día durante 3 días (Figura 6B). El primer día de habitación se utilizó para evaluar el rendimiento motor general y los comportamientos relacionados con la ansiedad a través de un análisis de campo abierto. Esto consistió en la medición de la distancia total recorrida, el porcentaje de tiempo pasado en las zonas centrales o periféricas de la arena y la frecuencia de levantamiento (*rearing*, según denominación en inglés). La conducta de levantamiento hace referencia al comportamiento donde los sujetos se paran en sus patas traseras (con o sin apoyo en paredes laterales) para explorar el ambiente en el que se encuentran. El análisis del comportamiento general se realizó utilizando el software EthoVision XT (11.5.126, Wageningen, Países Bajos). Este software se basa en el reconocimiento del sujeto experimental (en este caso ratón) y realiza un seguimiento de su movimiento alrededor de la arena, lo que permite el cálculo de distancias recorridas, velocidades, tiempo en regiones específicas de la arena, entre otros análisis.

### *6.8.2 Tarea de reconocimiento de objetos novedosos (NOR)*

El día 4 (después de 3 días de habitación), cada ratón fue introducido en la arena y se le permitió explorar dos objetos idénticos (A1 y A2) durante 10 minutos para la fase de adquisición. Los objetos se fijaron en el suelo cerca de una de las esquinas de la arena (a 8 cm de distancia de cada una de las 2 paredes adyacentes, véase la Figura 6C) con cinta adhesiva de doble cara para evitar su desplazamiento, como resultado de la exploración de estos por el animal. El día 5, cada ratón fue introducido en la arena donde se colocaron un objeto familiar (FO, A1) y un objeto novedoso (NO). Los objetos se colocaron en la misma posición que en la fase de adquisición (Figura 6C), y los sujetos pudieron explorar libremente los objetos durante 10 minutos. Se determinó el índice de exploración para el objeto novedoso, que refleja la memoria del objeto.

### 6.8.3 Tarea de reconocimiento de la ubicación de objetos (LOR)

El día 6, cada ratón se colocó en la arena y pudo explorar libremente los mismos objetos utilizados en el día 5 durante 10 minutos para la fase de adquisición (Figura 6C). Los objetos se colocaron en la misma posición que el día 5 y se conocen como ubicación 1 (L1) y ubicación 2 (L2). El día 7, el objeto ubicado en L1 se colocó en la misma posición que en la fase de adquisición ("ubicación familiar", FL), y el objeto ubicado en L2 se colocó en una "ubicación novedosa" (NL). Los ratones podían explorar libremente los objetos durante 10 minutos (Figura 6C). Se determinó un



**Figura 6.** Esquema de las pruebas de comportamiento para reconocimiento de objeto novedosos (NOR) y reconocimiento de la localización de objeto (LOR). A) Representación de la arena cuadrada utilizada durante las tareas de campo abierto y reconocimiento (NOR y LOR). B) La habituación a la arena se realizó durante 10 min durante tres días consecutivos sin exposición a objetos. C) Diagrama y ubicación de objetos para NOR y LOR. Para la tarea NOR, se utilizaron dos objetos idénticos (A1 y A2, pirámides de Lego) durante la adquisición (día 4). El objeto de la izquierda era el mismo durante la fase de prueba (día 5) que en la adquisición (pirámides de Lego) y se denomina el "objeto familiar" (FO). El objeto de la derecha, el día 5, era una figura nueva (torre de Lego) llamada "objeto novedoso" (NO). Para la tarea LOR, el día 6, se empleó la configuración del objeto utilizada el día anterior como una segunda prueba de adquisición para reducir la novedad (L1, pirámide y L2, torre). Durante la fase de prueba (día 7), el objeto denominado "L2" (torre) durante la adquisición se desplazó a una nueva ubicación (NL). Por el contrario, el objeto L1 (pirámide) utilizado durante la adquisición se mantuvo en el mismo lugar en la fase de prueba, un lugar familiar (FL). D) Fotografías de los objetos empleados durante las tareas de reconocimiento.

índice de exploración para el objeto en la nueva ubicación, que refleja la memoria del lugar.

### **6.9 Análisis estadístico**

Los datos son expresados en promedios  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Prueba de ANOVA paramétrico o no paramétrico fue usada para evaluar diferencias estadísticas entre los grupos (según se indica en cada pie de figura). Se estableció el valor de  $P < 0.05$  como estadísticamente significativo en todos los casos. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 8, para el análisis.

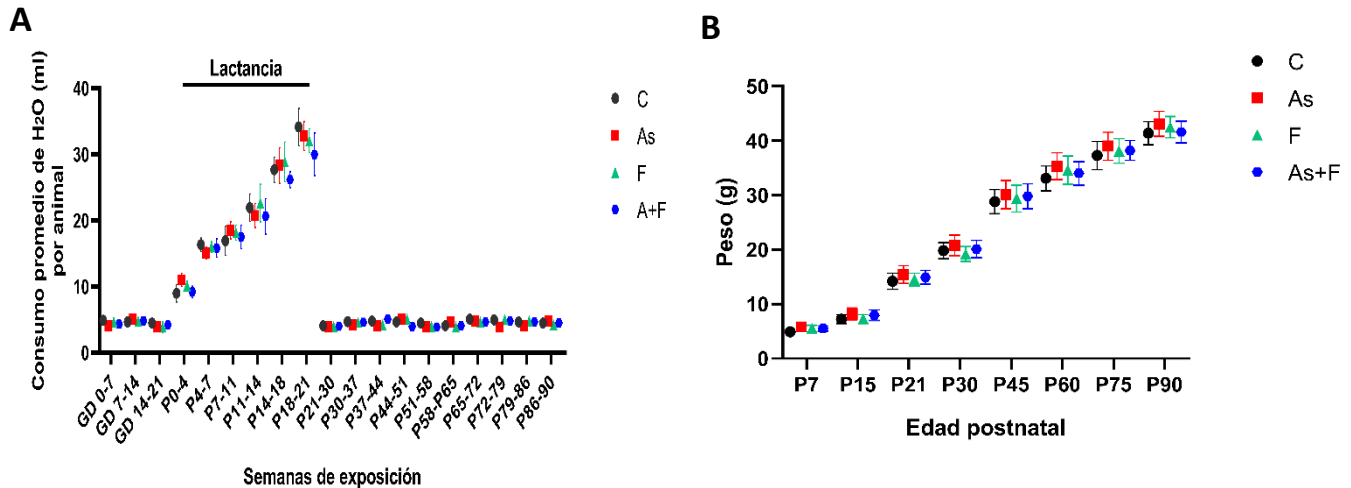


## 7. RESULTADOS

### 7.1 La exposición a As y/o F no modificó el consumo de agua, características de la camada, ni el crecimiento en peso de la progenie.

El modelo experimental intenta reproducir la exposición humana a estos elementos. Por ello, consistió en utilizar 2 mg/L de As<sup>3+</sup> y/o 25 mg/L de F iniciando en la gestación. Los animales fueron examinados un mes y tres meses después de su nacimiento. Las cruces se realizaron con hembras y machos de 8-9 semanas. Una vez que se detectó la presencia del tapón vaginal, las hembras se separaron en 4 grupos experimentales: C (control, agua libre de As y F), As (tratados con 2 mg/L de As<sup>3+</sup>), F (tratados con 25 mg/L de F) y As+F (tratados con 2 mg/L de As<sup>3+</sup> y 25 mg/L de F). Una vez alcanzados los 21 días posnatales (fin de lactancia) se realizó el destete y el sexado de las crías. Las crías machos continuaron la exposición hasta completar 1 mes o 3 meses posnatales. Las dosis de As y F utilizada en este estudio están en relación con los valores de concentración de As (0.2 mg/L) y F (2.5 mg/L) presentes frecuentemente en pozas de agua en México (Jiménez-Cordova y cols., 2018a), y una resistencia de alrededor de 10 veces a estos contaminantes en los roedores respecto a los humanos.

De manera general los tratamientos fueron bien tolerados, no mostraron signos físicos evidentes de alta toxicidad. El período de gestación en todos los grupos fue de alrededor de 21 días. Todas las crías nacieron con aproximadamente una semana de diferencia entre ellas. El consumo diario de agua y de alimentos no fue diferente entre los grupos, obteniéndose un consumo individual promedio entre 5-6 mL de agua de manera general durante la gestación y posterior al destete, y con un incremento proporcional durante el período de lactancia, por parte de las madres (Figura 7A). Tampoco se observaron alteraciones en el tamaño de la camada, las cuales variaron entre 11-15 crías independiente del grupo de exposición, ni en la relación de crías de sexo masculino/ femenino. El crecimiento de la progenie siguió un comportamiento normal, sin mostrar afectaciones por el tratamiento (Figura 7B).



**Figura 7.** Efecto de la exposición crónica a As y F en la ingesta de agua (A) y en el peso de la progenie (B). Los datos muestran media  $\pm$  SEM. Two-Way ANOVA, prueba post-hoc: Tukey. Madres gestantes: (N=10/grupo), Progenie de sexo masculino hasta P30 (N=40/grupo), Progenie de sexo masculino hasta P90 (N=25/grupo)

## 7.2 La acumulación de As y sus especies metiladas disminuye a los P90, independientemente de la combinación con F, especialmente en hipocampo

Tanto roedores como humanos pueden bio-transformar el As inorgánico a través de reacciones de metilación oxidativa, a través de la AS3MT, obteniéndose especies mono y multi-metiladas de  $As^{3+}$  o  $As^{5+}$ . Entre los roedores, los ratones constituyen el modelo animal ideal para el estudio de los efectos de As, debido a que el contenido de Cys en la albumina de ratón es similar a la humana, en contraste con el alto contenido de Cys presente en la albumina de ratas. Por lo que la cinética y distribución del As es más parecido a humanos. Además, el metabolismo del As es similar al que ocurre en humanos (Hughes y cols., 2003). Los niveles de las especies metiladas fueron determinadas en la corteza y el hipocampo de los ratones macho a los 30 y 90 días posnatales, para determinar si la exposición combinada podría tener un efecto en la capacidad de metilación y acumulación de As en los animales. Los niveles totales de As en la corteza fueron más altos que los del hipocampo. Los niveles de especies de As metiladas en la corteza de animales expuestos a As fueron significativamente más altos que los expuestos a As+F a los P30 pero no a los P90. Los niveles de especies de As metiladas en el hipocampo entre la

exposición individual y la combinación no fueron significativamente diferentes en P30 o P90 (Tabla 5). Durante la lactancia, los animales no están expuestos a As debido a la incapacidad de As para acumularse en la leche materna. Por lo que, el reinicio de la exposición después de terminar el período de lactancia puede potenciar su rápida acumulación en los tejidos en tiempos cercanos al reinicio de la exposición (Hughes y cols., 2003). Este efecto puede parcialmente explicar los mayores niveles de As observados en ambos tejidos a los P30 en comparación con los P90.

Los niveles de F fueron determinados solamente en la corteza a partir de combinar el tejido proveniente de 4 animales para cada grupo, debido a limitaciones experimentales de la técnica. Los niveles de F fueron similares entre los grupos experimentales (C: 0.019, As: 0.023, F: 0.019, As+F: 0.023 µg/g de tejido).

**Tabla 5.** Niveles de As y especies metiladas en la corteza y el hipocampo de ratones expuestos a As y F.

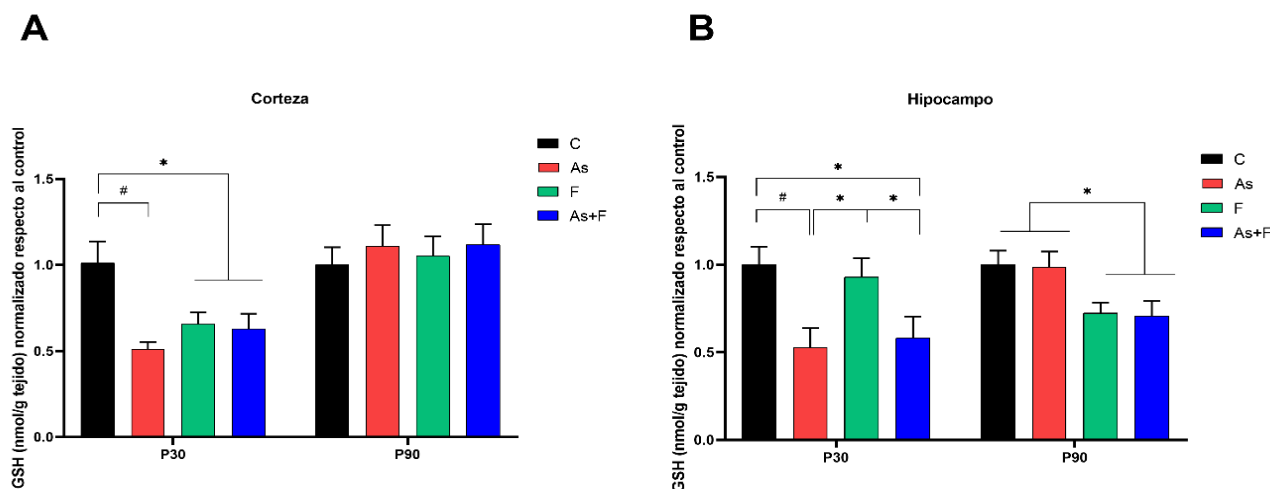
	iAs		MMA+DMA	
	P30	P90	P30	P90
<b>Corteza</b>				
C	24.06 ± 6.98	10.32 ± 4.19	< LD	< LD
As	21.32 ± 12.43	18.53 ± 8.87	8.639 ± 1.54 *	4.37 ± 0.67 *
F	22.58 ± 8.93	13.01 ± 5.47	< LD	< LD
As+F	16.25 ± 5.01	11.82 ± 4.24	3.76 ± 2.21 ‡	5.47 ± 1.69 *
<b>Hipocampo</b>				
C	16.03 ± 12.11	10.49 ± 7.21	< LD	< LD
As	19.59 ± 13.54	14.87 ± 4.91	3.81 ± 0.39 *	1.65 ± 1.27 *
F	13.79 ± 3.76	13.06 ± 3.30	< LD	< LD
As+F	21.86 ± 7.97	13.69 ± 2.53	3.35 ± 1.95 *	1.92 ± 1.05 *

Los ratones recibieron agua de beber purificada (controles, C), As (2 mg/L de As), F (25 mg/L de F) y As+F (2:25 mg/L de As y F) desde la gestación hasta los P30 (30 días posnatales) o P90 (90 días posnatales). Los datos están expresados en medias ± desviación estándar (N=5). Análisis estadístico Kruskal Wallis, prueba post hoc: Dunn. p< 0.05. \* significativo respecto a C y F; ‡ significativo respecto a C, As y F. Abreviaturas: iAs: arsénico inorgánico, MMA: monometil-arsénico, DMA: dimetil-arsénico. LD: límite de detección.

### 7.3 La exposición combinada disminuye los niveles de GSH a los P30 en la corteza y el hipocampo, pero solo en el hipocampo a los P90.

El GSH constituye la principal defensa antioxidante en el cerebro, por ello se determinó el impacto de la exposición gestacional en los niveles de GSH en la corteza y el hipocampo (regiones asociadas al aprendizaje y memoria) en los animales expuestos hasta P30 y P90.

En la corteza, se observó una disminución en los niveles de GSH en los grupos expuestos a As y F de manera individual y combinada en los animales expuestos hasta P30 (Figura 8A). Evidencias similares se han observado previamente en nuestro grupo de trabajo (Ramos-Chávez, 2015; Nelson-Mora, 2018), mostrando que la corteza parece sufrir alteraciones en tiempos más tempranos de exposición (P30), mientras que para mayores tiempos (P90) se restablecen los niveles de GSH.



**Figura 8.** Desbalance redox celular en el cerebro de ratones expuestos desde la gestación a As y F. Niveles de GSH en cerebro de los animales a los P30 y P90 en corteza (A) e hipocampo (B). Media  $\pm$ SEM. Método del OPA Análisis estadístico: One Way ANOVA, prueba post-hoc: Tukey. P30 (N=7) y P90 (N=6). \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$ , &  $p < 0.001$

En el hipocampo (Figura 8B), se observó una disminución en los niveles de GSH en los animales expuestos individualmente a As y en la combinación a los P30,

respecto al grupo control. Para etapas más tardías de exposición (P90), en el hipocampo se observó una recuperación en los niveles de GSH a niveles similares al grupo control en el grupo expuesto a As de manera individual. Los grupos expuesto a F y a As+F mostraron una disminución significativa en los niveles de GSH, en el hipocampo, respecto al grupo control y al grupo expuesto a As individualmente a los P90. Interesantemente, se observó que los efectos de la combinación en el hipocampo son dependientes del efecto del As para P30 y dependientes del efecto del F para los P90.

Los cambios temporales en los niveles de GSH muestran que la exposición a F requiere de mayores tiempos de exposición para afectar los niveles de GSH en el hipocampo; y sugieren que, a tiempos mayores el As, induce a una respuesta adaptativa para restablecer los niveles de GSH en el hipocampo y la corteza, a estas dosis y en este modelo de exposición gestacional.

#### **7.4 La actividad de la vía de la transulfuración aumenta en la corteza a los P90 en respuesta a la exposición combinada de As y F, pero disminuye en el hipocampo.**

L-Cys es considerado el aminoácido limitante en la síntesis de GSH, el cual ingresa a la célula a través de transportadores o es generado a través de la transulfuración a partir de la homocisteína. Los niveles de Cys, metabolitos derivados y H<sub>2</sub>S son extremadamente importantes debido a sus funciones neuro-protectoras y neuro-reguladoras.

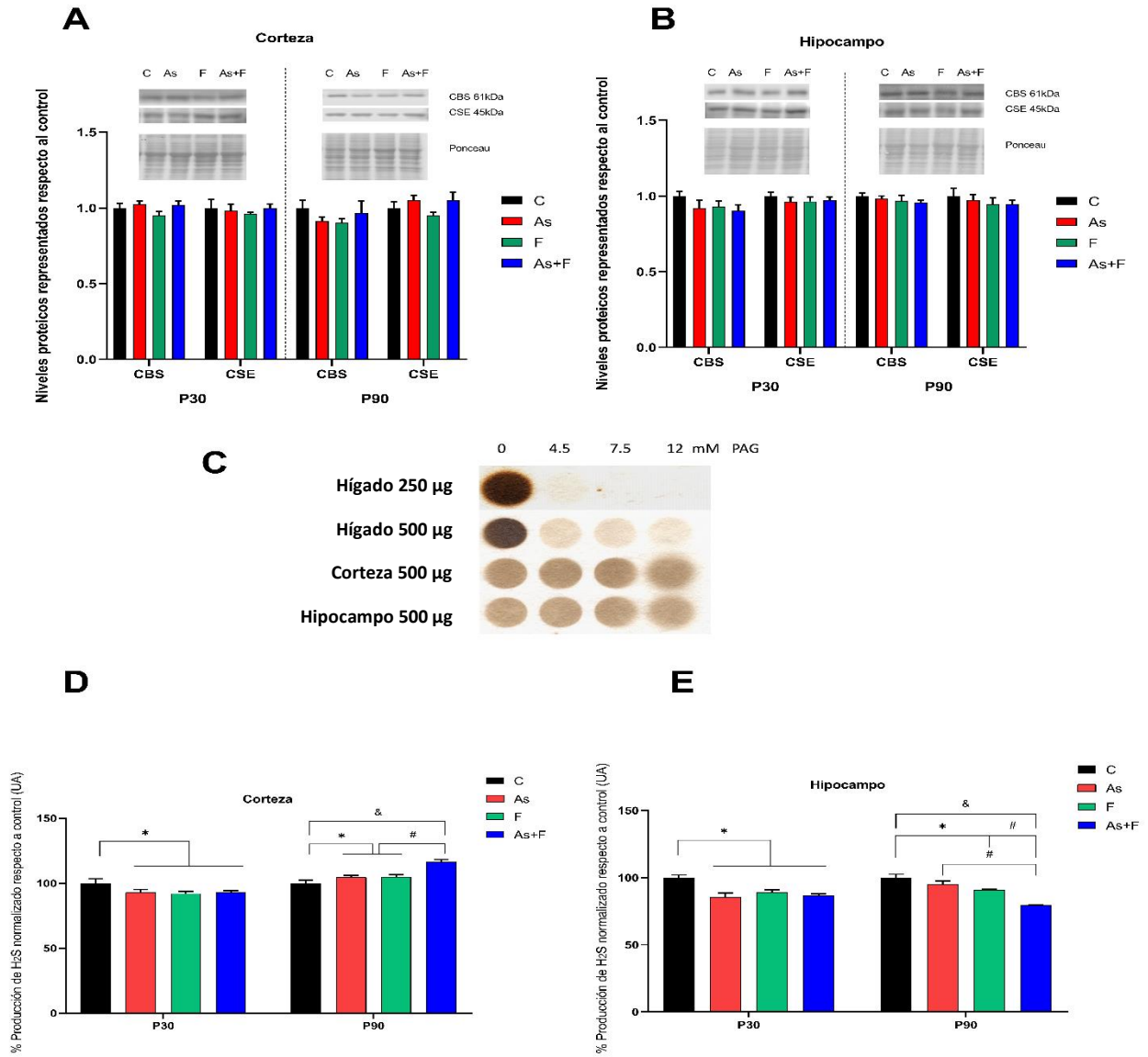
Los niveles de las enzimas involucradas en la vía de transulfuración fueron determinados por Western Blot. Tanto en hipocampo como en corteza no observamos cambios en los niveles proteicos de estas enzimas a los P30 y P90 (Figura 9A-B). La producción de H<sub>2</sub>S en cerebro estuvo determinada principalmente por la actividad de la CBS, dado que la inhibición de CSE no alteró la capacidad de producción de H<sub>2</sub>S en estas muestras (Figura 9C). En la corteza se observó una disminución de alrededor de un 8% en la actividad de la ruta en los animales

expuestos a As, F y As+F respecto al control a los P30. Mientras que, a los P90 en la corteza, la producción de H<sub>2</sub>S incrementó en un 5% en el grupo expuesto individualmente a As y F respecto a controles, y en un 15% en el grupo expuesto a la combinación respecto al control (Figura 9D).

En el hipocampo se observó una disminución de un 12-15% en la actividad de la ruta en animales expuestos a As, F y As+F a los P30 (Figura 9E). A los P90, en el grupo expuesto a As se observó una recuperación en la actividad de la vía de transulfuración en el hipocampo. En contraste, a los P90 en el hipocampo, el grupo expuesto a F mostró una reducción en un 10% respecto al control, y el grupo expuesto a As+F, una reducción de un 20% en la actividad respecto a controles (Figura 9E).

Dado que los niveles proteicos de las enzimas no se alteraron, los datos sugieren que los mecanismos regulatorios involucrados en la modulación de la actividad de la vía de transulfuración son principalmente post-traduccionales.

Una limitante de este ensayo es su baja sensibilidad, dado que la cuantificación del complejo (PbS) se realiza por densitometría, y su formación depende de la difusión del producto (H<sub>2</sub>S) de la reacción enzimática. Sin embargo, teniendo en cuenta esta limitante, cambios significativos de un 8-15% pueden representar un cambio biológicamente significativo.



**Figura 9.** Niveles proteicos y actividad de las enzimas de la vía de la transulfuración en la corteza y el hipocampo de animales expuestos a As y F desde inicios de la gestación. Niveles proteicos de CBS y CSE de los animales tratados hasta P30 y P90 en corteza (A) e hipocampo (B). Media  $\pm$ SEM. Western Blot. (N=6) C) Imagen representativa de la participación de la actividad de CSE en la producción de H<sub>2</sub>S en diferentes tejidos. Propargilglicina (PAG), inhibidor de CSE. Capacidad de producción de H<sub>2</sub>S de los animales a los P30 y P90 en corteza (D) e hipocampo (E). Media  $\pm$ SEM. Análisis estadístico: One Way ANOVA, prueba post-hoc: Tukey. P30 (N=6) y P90 (N=5). \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$ , &  $p < 0.001$ .

## **7.5 La exposición combinada a As y F aumenta los niveles de ARNm de transportadores de cisteína y metionina en la corteza, mientras disminuye los niveles proteicos de GLT1 en corteza y de xCT en hipocampo a los P90.**

Un adecuado balance en el transporte de aminoácidos es esencial para diferentes funciones del cerebro. El transporte de Cys y de aminoácidos con actividad neurotransmisora como Ser, Gln y Glu comparten los algunos transportadores, por lo cual la modulación de algunos de ellos en respuestas a afectaciones redox puede tener efectos adversos en el funcionamiento sináptico.

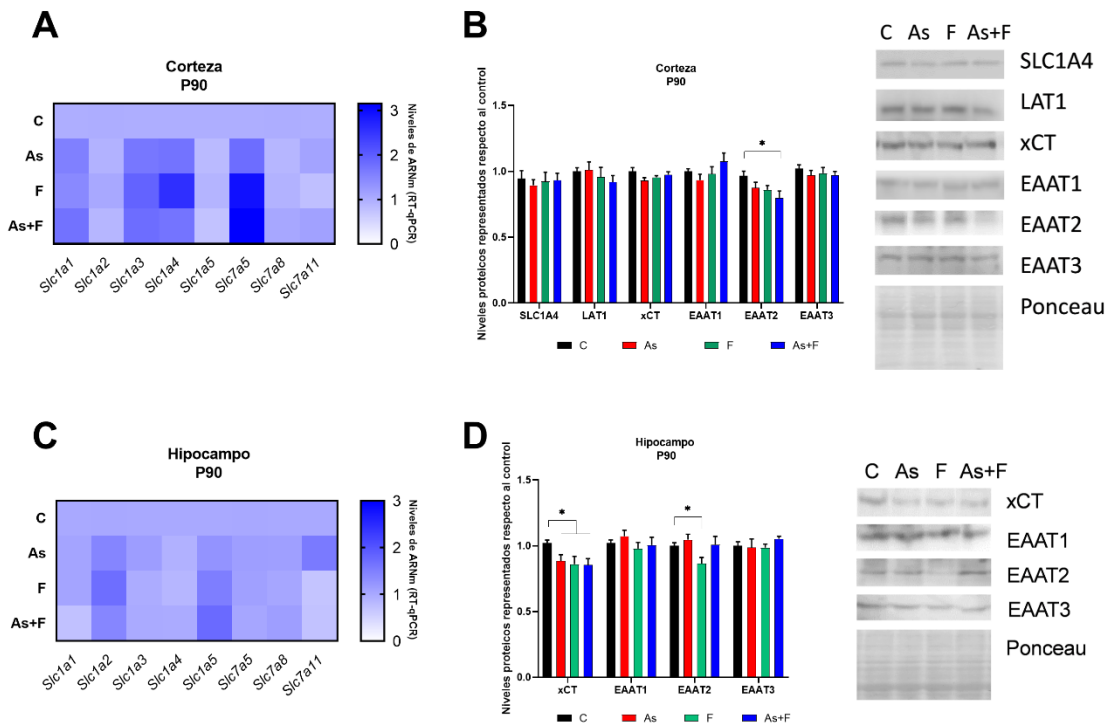
Respecto a los transportadores de Cys, en la corteza, se observó un aumento de 50-70% en la transcripción de del transportador *Slc1a1* en los grupos expuestos a As, F, As+F respecto al grupo control a los P90. Además, en la corteza, incrementaron los niveles de *Slc1a4*, en un 72-74% en grupos expuesto a As y As+F, y de un 150% en el grupo expuesto a F, respecto a los niveles observados en el grupo control (Figura 10A). Por el contrario, la expresión de *Slc1a5* en la corteza, disminuyó en el grupo expuesto a la combinación de As+F en un 25% respecto a los controles. A los P90 en la corteza, los niveles de ARNm del transportador de Met *Slc7a5* incrementaron en un 83% en el grupo expuesto a As, y en un 200% en el grupo expuesto a F y As+F respecto a los controles. Los niveles del ARNm de *Slc7a8* no se modularon por la exposición (Figura 10A). Respecto a los transportadores de Glu, en la corteza a los P90, los niveles de ARNm de *Slc1a2* disminuyeron en el grupo expuesto a As+F en un 12%, mientras que los niveles de ARNm de *Slc1a3* aumentaron en un 70-90% en los grupos expuestos a As, F y As+F respecto al control. Los niveles de ARNm de *Slc7a11* se encontraron disminuidos en un 22% en los animales expuesto a F en la corteza a los P90 (Figura 10A). La magnitud de los cambios en los niveles del ARNm de los transportadores en la combinación de As y F parecen depender principalmente del efecto de uno u otro tóxico y varía para cada transportador.

A nivel proteico, los transportadores mencionados anteriormente no se modularon por la exposición a los P90 en la corteza, excepto los niveles proteicos de EAAT2



que se encontraron disminuida en un 21% en la corteza a los P90 en los animales expuestos a As+F respecto a los controles (Figura 10B).

La diferencia entre los cambios a niveles de ARNm y proteína podrían resultar de la diferencia en sensibilidad en las técnicas experimentales entre qPCR y Western Blot. A su vez, el incremento en los niveles de ARN y no en los de proteína, podrían estar relacionados con una mayor degradación proteica de estos transportadores, y un incremento en la expresión génica en respuesta para mantener los niveles basales de estos. No obstante, el hecho de encontrar un aumento en los transcritos de algunos de estos genes nos sugiere la inducción de un mecanismo de respuesta molecular para hacer frente al desbalance redox resultantes de la exposición a estos elementos.



**Figura 10.** Niveles de ARNm y proteína de transportadores de aminoácidos en cerebro de los animales a los P90. Niveles de ARNm en corteza (A) e hipocampo (C). Niveles proteicos en corteza (B) e hipocampo (D). Media  $\pm$ SEM. Análisis estadístico: One Way ANOVA, prueba post-hoc: Tukey. N=6. \* $p < 0.05$ .

En el hipocampo a los P90, se modularon pocos transportadores a nivel ARNm comparados con las alteraciones observadas en corteza. Respecto a los transportadores de Cys, los niveles de ARNm de *Slc1a1* disminuyeron en un 28%

en el grupo expuesto a la combinación (As+F) respecto a controles en el hipocampo. Los niveles de *Slc1a5* se encontraron aumentados significativamente en los grupos expuestos a As (27%), F (51%) y As+F (75%) respecto a los controles, en el hipocampo a los P90 (Figura 10C). Los transportadores de Met no se modularon por la exposición en el hipocampo a los P90.

Respecto a los transportadores de Glu, observamos un aumento en el hipocampo a los P90, en los niveles de ARNm de *Slc1a2* en los grupos expuestos a As (43%), F (69%) y As+F (42%) respecto a los controles (Figura 10C). Sin embargo, a nivel proteico observamos una disminución en los niveles de EAAT2 en el grupo expuesto a F en un 16% respecto al control (Figura 10D). Los niveles de ARNm de *Slc7a11*, aumentaron en un 50% en el grupo expuesto a As respecto a controles en el hipocampo a los P90; mientras que, los niveles de ARNm de *Slc7a11* disminuyeron en un 29-31% en los grupos expuesto a F y As+F respecto a los controles (Figura 10C). Los niveles proteicos de xCT mostraron un decremento de un 12-15% en los niveles de xCT en los grupos expuestos a As, F y As+F en el hipocampo a los P90, respecto al grupo control.

#### **7.6 La exposición combinada a As y F altera la proporción de subunidades de receptores de glutamato y disminuye la actividad de la ALT en la corteza y el hipocampo a los P90.**

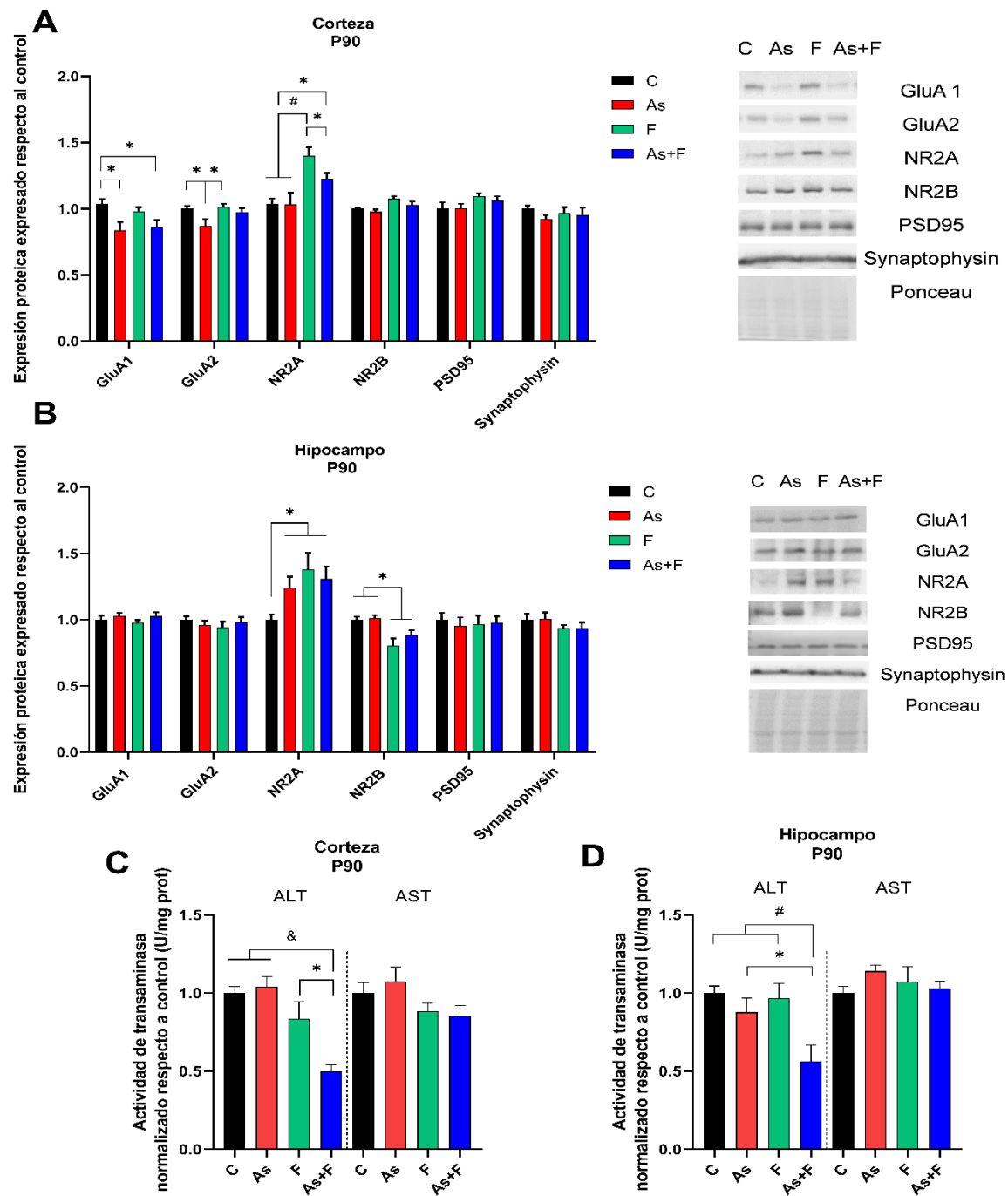
La sinapsis glutamatérgica constituye el tipo de sinapsis química más abundante en la corteza y el hipocampo, que son las regiones más sensibles a los efectos de As y F, y están asociadas a las afectaciones neurológicas observadas en las poblaciones humanas expuestas a estos xenobióticos. La medición de los niveles de los receptores de Glu constituye un acercamiento para evaluar afectaciones en la transmisión glutamatérgica. Por ello, evaluamos los niveles de diferentes subunidades de los receptores ionotrópicos de glutamato tipo NMDA y AMPA en los animales adultos expuestos desde la gestacional.

Como se puede observar en la Figura 11A, en la corteza a los P90, los niveles de las subunidades de los receptores tipo AMPA, GluA1 y GluA2 se encontraron

disminuidos en el grupo expuesto a As en un 17% y 15% respectivamente respecto al control. En contraste, la exposición combinada (As+F) resultó en una disminución en un 14% de la subunidad GluA1 respecto al grupo control. Con respecto a las subunidades de los receptores tipo NMDA, en la corteza a los P90, los niveles de la subunidad NR2A aumentaron en un 40% en el grupo expuesto a F y en un 22% en la combinación, mientras los niveles de NR2B no se modularon. Tampoco observamos cambios en los niveles de sinaptofisina y PSD95, dos proteínas importantes en la funcionalidad y ensamblaje proteico en las terminales sinápticas.

En el hipocampo (Figura 11B) no se encontraron alteraciones en los niveles de las subunidades de los receptores tipo AMPA. En cambio, a los P90 en el hipocampo los niveles de NR2A incrementaron en el grupo expuesto a As (24%), F (37%) y As+F (30%) respecto a los controles, mientras que los niveles de NR2B disminuyeron entre un 15-20% el grupo expuesto a F y As+F. Similar a corteza, en el hipocampo no observamos cambios en los niveles de sinaptofisina y PSD95.

Adicionalmente evaluamos la actividad de las aminotransferasas involucradas en la síntesis *de novo* de Glu en el cerebro. Observamos una disminución significativa en el grupo expuesto a la combinación (As+F) en la actividad enzimática de la ALT en la corteza y el hipocampo a los P90 (Figura 11C-D).



**Figura 11.** Niveles proteicos de receptores de glutamato y proteínas sinápticas en corteza (A) e hipocampo (B) de los animales tratados hasta P90. WB. C: Actividad de enzimas involucradas en la síntesis de novo de Glutamato. Media  $\pm$ SEM. Análisis estadístico: One Way ANOVA, prueba post-hoc: Tukey N=6. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.01$ , & $p < 0.001$ .

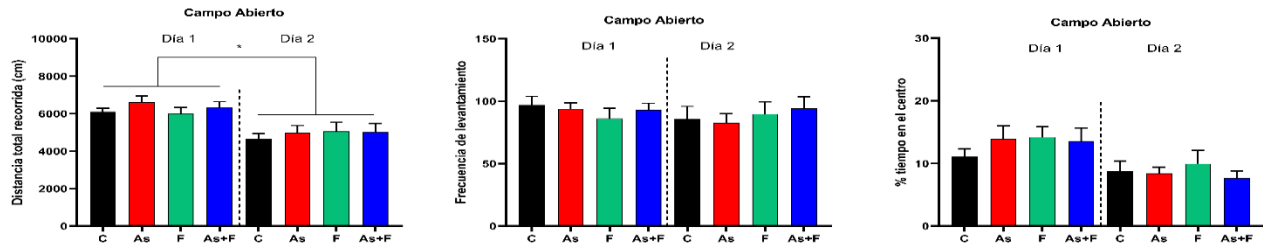
## **7.7 La memoria de objeto dependiente de corteza e hipocampo está afectada tras la co-exposición a As y F.**

Con el objetivo de evaluar el impacto que tienen las alteraciones moleculares antes observadas en el funcionamiento del cerebro se evaluó la capacidad de memoria de los animales a través de las pruebas conductuales de reconocimiento de objeto novedoso (por sus siglas en inglés, NOR) y reconocimiento de la localización del objeto (por sus siglas en inglés, LOR). Estas pruebas dependen de la actividad sináptica de la corteza y el hipocampo, respectivamente (Vogel-Ciernia y Wood, 2014), lo que nos permiten evaluar la funcionalidad de estas dos regiones previamente afectadas por As y F. Como parte del protocolo de análisis de comportamiento se realizó una prueba de campo abierto para evaluar capacidad motora, exploración y ansiedad de los animales experimentales para descartar su impacto en el desempeño en las pruebas de memoria. En la Figura 12A se muestra los resultados del análisis de diferentes parámetros en la prueba de campo abierto. Los datos muestran que no existen diferencias en la capacidad exploratoria de los animales según el tratamiento (frecuencia de levantamiento, distancia recorrida), ni ansiedad evidente (% tiempo en centro de la arena); lo que sugiere que estas variables no influyen en los resultados posteriores. Además, observamos una disminución en la distancia recorrida en todos los grupos en el día 2 con respecto al día 1, lo que muestra que todos los grupos de animales se habituaron de manera similar a la arena.

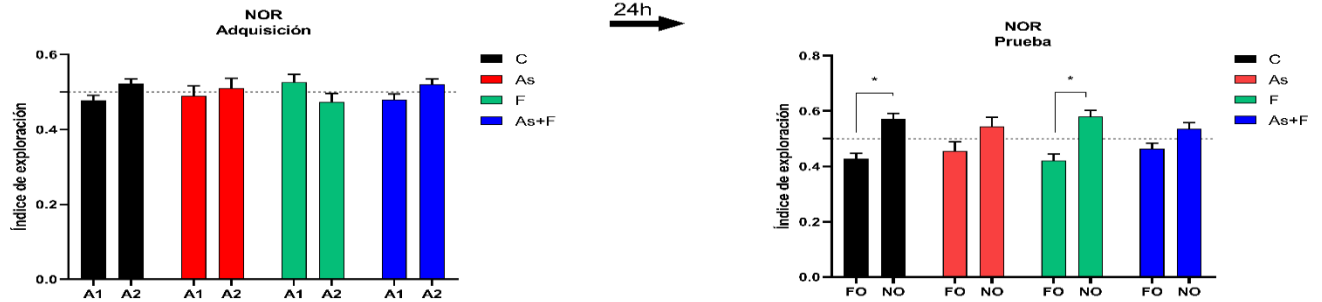
Los análisis de las pruebas NOR y LOR se realizaron de forma doble ciega en los que se determinaron los tiempos de exploración a cada objeto durante la prueba conductual y se calculó el índice de exploración. Como se puede observar (Figura 12B - izquierda), durante la fase de adquisición de la prueba NOR, los animales exploraron los dos objetos idénticos (A1 y A2) durante un periodo de tiempo similar. Durante la fase de prueba (Figura 12B - derecha), los animales controles y expuestos a F son capaces de discriminar entre el objeto novedoso (NO) vs familiar (FO) dado que el índice de exploración (IE) es significativamente mayor para el objeto novedosos (NO). Mientras que, los animales expuestos a As y As+F, no mostraron un IE significativo para objeto novedoso (NO).

Durante la fase de adquisición de la prueba LOR (Figura 12C - izquierda), los animales exploraron los dos objetos conocidos en ambos lugares denominadas L1 y L2 por períodos similares. En la fase de prueba (Figura 12C - derecha), solo los animales expuestos As+F no mostraron un IE significativo por la localización novedosa (NL).

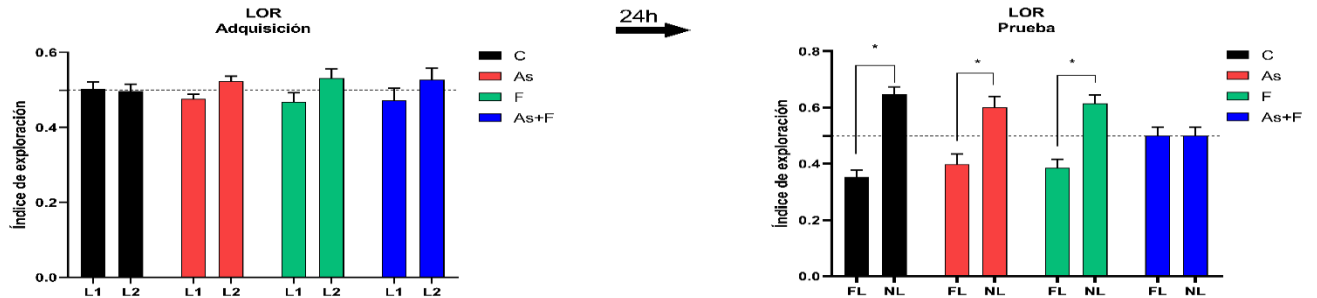
**A**



**B**



**C**



**Figura 12.** Estudios de comportamiento en ratones durante los P83-P90. A) Análisis conductual en la prueba de campo abierto (distancia total recorrida, frecuencia de levantamiento (rearing, denominación en inglés) y % tiempo en el centro B) Índice de exploración en la prueba conductual NOR, durante la adquisición de la memoria de los objetos (gráfico izquierdo) y durante la fase de prueba (gráfico derecho). C) Índice de exploración en las pruebas conductuales LOR durante la fase de adquisición (gráfico izquierdo) y la fase de prueba (gráfico derecho). El igual a 0.5 indica no preferencia por objeto/localización, mientras que valor superior a 0.5 indica preferencia por un objeto/localización. A1 y A2 son objetos idénticos; NO es un objeto novedoso; L1 y L2, refiere a la localización de los objetos conocidos, FL indica ubicación familiar; NL indica la ubicación novedosa. Media  $\pm$  SEM. n=6 (control, As+F), n=8 (As), n= 7(F). Two -way ANOVA, prueba post hoc: prueba de Tukey. \*p <0.05, #p <0.01, &p <0.01

## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1 La exposición a As y F como problema de salud en México.**

Diferentes elementos presentes en la superficie terrestre se encuentran acumulados en aguas subterráneas resultado del lixiviado de los suelos. El As y F constituyen los elementos con más presencia en el agua subterránea a nivel mundial. Dado que aproximadamente un tercio de la población mundial depende del suministro de agua proveniente de pozas subterráneas (Howard y cols., 2006), el número de personas que beben agua con elevados niveles de As y F sobrepasa los 200 millones. Debido a sus orígenes geológicos, México presenta a lo largo de su territorio numerosas pozas de agua con niveles superiores a los recomendados por la OMS, para As y F, con alrededor de un 40% de las pozas con contaminación combinada por ambos elementos (Limón-Pacheco y cols., 2018). Como resultado, la población mexicana se ha encontrado expuesta a estos elementos por generaciones. La exposición crónica a As y F ha sido asociada con afectaciones severas a diferentes órganos. En especial, la exposición durante etapas tempranas de la vida como la gestación y etapas tempranas posnatales tiene alta relevancia en el desarrollo de cáncer y alteraciones neurológicas, en especial retraso cognitivo. Se ha estimado que aproximadamente 0.5 millones y 6 millones de niños mexicanos se encuentran expuestos a As y F, respectivamente (Limón-Pacheco y cols., 2018), resaltando el alto riesgo que presenta la población mexicana a desarrollar enfermedades asociadas a la exposición a As y/o F. Debido a las repercusiones sociales y de salud en general que conlleva la exposición a estos elementos, es necesario estudiar los efectos moleculares que generan. Sin embargo, la mayoría de los estudios han abordado exposiciones individuales, sin tener en cuenta la posible interacción entre ambos elementos, como ocurre en la naturaleza. El estudio de estos efectos contribuye a la generación de evidencias necesarias que soportan las normativas de control de niveles de calidad del agua de beber y en el desarrollo de tecnologías para la eliminación de estos elementos del agua de bebida, en zonas de menor desarrollo social y económico.

## **8.2 La exposición a As y F genera un desbalance redox en la corteza y el hipocampo en diferentes tiempos, asociado a la inhibición de la vía de transulfuración y transporte de cistina.**

Los efectos nocivos de estos elementos han sido principalmente asociados con alteraciones en el balance redox. La exposición a As y F disminuye los niveles de GSH e interfieren en metabolismo de este (Chouhan y cols., 2010).

En este trabajo, la exposición a As y F induce desde tiempos tempranos afectaciones en el estado redox en el cerebro en los animales expuestos desde la gestación. Los bajos niveles de GSH observados en la corteza a los P30 parecen estar asociados con la disminución en la vía de la transulfuración a ese tiempo. Mientras que, a los P90, observamos un incremento en los niveles de ARNm de transportadores de Cys y Met, un incremento en la actividad de la vía de la transulfuración, y una recuperación en los niveles de GSH, lo que sugiere la activación de mecanismos de respuesta antioxidante en este tejido. Interesantemente la magnitud del efecto y mecanismos involucrados en la recuperación de los niveles de GSH a los P90 en la corteza, difirió entre las exposiciones individuales y combinadas a estos elementos (Figura 8).

En el hipocampo, la disminución sostenida en los niveles de GSH a los P30 y P90 en el grupo As+F podría estar asociada a la inhibición sostenida de la vía de transulfuración y a la disminución de la expresión de xCT a los P90. En el grupo expuesto a As observamos una recuperación en los niveles de GSH que podría asociarse con la recuperación en la actividad de la vía de la transulfuración a los P90 en el hipocampo. En estudios previos de exposición a As a 20 mg/L, en un modelo de exposición similar, el incremento en los niveles de GSH se asoció con un incremento en xCT (Ramos-Chávez y cols, 2015). Sin embargo, a la dosis de exposición empleada en este trabajo, 2 mg/L de As, se observó una disminución en los niveles de xCT a los P90, y un incremento transcripcional de *Slc1a5*, sugiriendo la inducción de diferentes mecanismos de respuesta dependientes de dosis, tejido y tiempo estudiado.



Los bajos niveles de GSH, la reducción en la expresión de xCT y la reducción en la actividad de la vía de la transulfuración observados en el hipocampo en el grupo expuesto a la combinación, podrían llevar a ferroptosis, un tipo de muerte celular dependiente de hierro y caracterizada por daño oxidante (Chen y cols., 2021). En algunos modelos de estrés oxidante en el cerebro, como los de hipoxia–reperfusión, se ha observado que la inducción de ferroptosis está mediado por disminución en los niveles de GPX4 y xCT, y un incremento en los niveles de p53. P53 modula negativamente la expresión de xCT, y puede inducir o reprimir la ferroptosis dependiente de la magnitud del daño celular (Jiang y cols., 2015; Chen y cols., 2021). Sin embargo, a pesar de encontrar disminuidos significativamente los niveles de GSH y xCT en el grupo expuesto a As+F en el hipocampo a los P90 (Figura 8A y 10D), no observamos cambios en los niveles de p53 ni GPX4 (dato no mostrado), lo que parece sugerir que estas dosis no inducen muerte por ferroptosis dependiente de p53 y, que la disminución de xCT es a través de un mecanismo independiente de p53.

Por otro lado, la disminución en la actividad de la ruta de transulfuración podría estar asociada a mecanismos de regulación alostérica. SAM es un activador alostérico de la CBS (Prudova y cols., 2006). La disminución en los niveles de SAM podría ocurrir por su consumo durante el metabolismo de As (Hughes, 2002) y por la inhibición de la MAT por F (al-Khafaji y cols., 1998). Adicionalmente, la reducción en la metilación de As a los P90 en ambos tejidos podría estar asociado con menores niveles de dicho cofactor. Sin embargo, la determinación de los niveles de SAM sería necesaria para confirmar esta relación.

### **8.3 La co-exposición a As y F induce un desbalance en la disponibilidad de Glu, a través de la disminución de los niveles de GLT1, xCT y la actividad de ALT.**

Como ha sido mencionado previamente, cambios en los niveles de GSH, podrían alterar la homeostasis del Glu. La exposición a As y F resultó en la alteración de la expresión de transportadores de Glu y en la actividad de enzimas que regulan el metabolismo del Glu. La reducción en los niveles de xCT observada en hipocampo, puede modificar los niveles extracelulares de Glu y subsecuentemente la

transmisión sináptica (De Bundel y cols., 2011). EAAT2 es el recapturador más abundante de Glu presente en corteza e hipocampo, por lo que la reducción de este en la corteza en el grupo expuesto a As+F tiene un importante impacto en la recaptura y reciclamiento del Glu. Alteraciones en los niveles de EAAT2, han sido reportadas previamente en exposiciones a As, como las revisadas en este trabajo (véase Tabla 1 y sección 2.7.1). Sin embargo, evidencias directas de la modulación de los recapturadores de Glu por exposición a F no habían sido descritas previamente, por lo que la disminución significativa en los niveles de EAAT2 en el hipocampo a los P90 en el grupo expuesto a F, es un hallazgo novedoso. Adicionalmente, observamos una disminución en la actividad de ALT (síntesis *de novo* de Glu) en el grupo As+F en corteza e hipocampo. La reducción de la actividad de las transaminasas por exposiciones a F ha sido previamente asociada con reducción en el contenido total de Glu en el cerebro (Niu y cols., 2009; Bartos y cols., 2022). Sin embargo, la contribución de las transaminasas, en especial ALT, al mantenimiento de los niveles de Glu es menor que la del ciclo de Glu-Gln (Andersen y cols., 2021). A pesar de esto, varios estudios sugieren una importante participación de ALT en la metabolización de Glu dentro de los astrocitos luego de su recaptura durante la transmisión sináptica y en el reciclamiento del nitrógeno durante el ciclo de Glu-Gln (Westergaard y cols., 1993; Erecińska y cols., 1994; Schousboe y cols., 2003). Por lo cual, menor actividad de esta enzima es más probable que resulte en una pobre metabolización de Glu en astrocitos y menor capacidad de tamponamiento de los niveles Glu extracelular.

Estas modificaciones antes discutidas, sugieren que la combinación induce alteraciones en los niveles del Glu en la corteza y el hipocampo que puede tener un impacto negativo en la transmisión sináptica y en la conducta de los animales.

#### **8.4 La proporción de subunidades de receptores ionotrópicos de glutamato tipo AMPA y NDMA se modifica por la co-exposición a As y F, lo que resulta en una menor capacidad de memoria en pruebas de reconocimiento de objeto.**

Las pruebas de comportamiento muestran un pobre desempeño en el grupo expuesto a la combinación (As+F) en las pruebas dependiente de corteza e hipocampo comparado con las exposiciones individuales. La exposición a As o F, a

dosis mayores a las empleadas en este trabajo, induce alteraciones conductuales principalmente dependiente de hipocampo, como son menor capacidad de aprendizaje y memoria espacial, y mayor ansiedad (Han y cols, 2014, Liu y cols., 2014; Tyler y Allan 2014; Ramos-Chávez y cols., 2015; Gopnar y cols., 2023). Similar a nuestras observaciones, otros estudios han mostrado que el F, a dosis similares a las de este trabajo, por sí solo no tiene efecto en la memoria y aprendizaje en las pruebas de NOR y laberinto acuático de Morris (Han y cols, 2014; McPherson y cols, 2018). Mientras que, exposiciones a As durante gestación incluso a dosis más bajas como 0.05 y 0.1 mg/L de As interfieren en la memoria en la prueba de NOR (Martinez-Finley y cols, 2009; Fitz y cols., 2022). Los defectos en la memoria observados en este trabajo pueden estar asociadas con las modificaciones en los niveles de los receptores glutamatérgicos en la corteza y el hipocampo.

La exposición combinada alteró la proporción de las subunidades de receptores ionotrópicos tipo NMDA y AMPA en la corteza e hipocampo a los P90. Respecto a las alteraciones encontradas en los niveles de receptores de Glu, los reportes previos no son consistentes respecto al tipo de modulación (alza o baja) y tipo de subunidades, lo cual parece estar relacionado principalmente con las dosis y modelos de exposición empleados. A pesar de que la mayoría de los trabajos describen una disminución en la expresión de estos receptores a dosis mucho mayores que la nuestra, algunos trabajos concuerdan con nuestros hallazgos (Krüger y cols., 2009, Huo y cols., 2015, Sun y cols, 2018). En varios estudios previos, la modulación de estas subunidades ha sido asociada con la disminución de los niveles de PSD95. Sin embargo, en este trabajo no observamos cambios en PSD95, ni sinaptofisina, lo que sugiere que a estas dosis ocurre una modulación más discreta de la transmisión sináptica glutamatérgica, que no implica importantes modificaciones ultraestructurales como ocurre a altas dosis (Luo y cols., 2009; Huo y cols., 2015).

Un aspecto importante que podría repercutir en la diferencia de subunidades moduladas entre las regiones es la distribución diferencial de As metilado entre regiones en los grupos expuestos a As y As+F. En este trabajo observamos una

mayor acumulación de As metilado en la corteza respecto al hipocampo, lo cual puede estar asociado con una mayor irrigación sanguínea de la región. Esta diferencia podría contribuir a que los animales del grupo As mostraran afectaciones conductuales en las pruebas dependientes de corteza, pero no del hipocampo.

Para comprender mejor como los cambios en los niveles de los receptores de Glu impactan en el comportamiento tenemos que partir por las diferentes características fisicoquímicas, la distribución de los receptores tipo AMPA y tipo NMDA en el cerebro, y sus roles durante la transmisión sináptica.

Los receptores tipo NMDA son más abundantes en la post-sinapsis que los receptores tipo AMPA y son permeables a  $Ca^{2+}$ , por lo que su activación es esencial para la transmisión de la señal eléctrica y para la activación de cascadas de señalización que regulan la plasticidad sináptica (Hassel y Dingledine, 2012). No obstante, para la activación de los receptores tipo NMDA es importante la previa activación de receptores tipo AMPA para la liberación del bloqueo por  $Mg^{2+}$  de los receptores NMDA. Además, la subunidad GluA1 es menos abundante en la corteza respecto a la subunidad GluA2, y los receptores tipo AMPA, conformados con subunidades GluA2 son impermeables a  $Ca^{2+}$  (Schwenk y cols., 2014). Por ello, el reclutamiento de receptores AMPA, especialmente los homotetrámeros de GluA1, a la sinapsis resulta en la maduración y activación funcional de esta, así como en la potenciación sináptica (Kessels y Malinow, 2009). Teniendo en cuenta lo anterior, cambios en la proporción de subunidades, y disminución en los niveles de las subunidades en especial la unidad GluA1, como se observa en corteza por exposición a As y As+F (Figura 11A), podría resultar en una deficiente activación y maduración sináptica, y en defectos cognitivos.

Para los receptores tipo NMDA, los receptores formados por las subunidades NR2A o NR2B presentan diferentes cinéticas de activación y desactivación, por lo que la relación entre los niveles de NR2A/NR2B es importante en la adecuada transmisión sináptica y en los procesos de plasticidad sináptica (Hassel y Dingledine, 2012). Un incremento en este cociente, por sobreexpresión de NR2A resulta en peor desempeño conductuales (Cui y cols., 2013). La disminución en los niveles de

NR2B, también resulta en una LTP disminuida y peor desempeño en diversas pruebas conductuales asociadas al hipocampo y corteza (Clayton y cols., 2002; Gardoni y cols., 2009). Los cambios en el cociente NR2A/NR2B, modifican la excitabilidad de la sinapsis, disminuyendo el umbral para la plasticidad sináptica bidireccional (LTP o LTD) e influencia el aprendizaje espacial (Bach y cols., 1995; Zeng y cols., 2001).

Por ello, las alteraciones en la proporción de subunidades tipo AMPAR y NMDAR en la corteza y en el hipocampo sugieren afectaciones en la correcta transmisión sináptica y resultan en un peor desempeño en pruebas de memoria (NOR y LOR).

### **8.5 Predisposición a enfermedades neurológica por toxicidad a As+F, contribución de este trabajo**

La exposición a As o F en poblaciones humanas han mostrado principalmente afectaciones neurológicas en niños, caracterizadas por una disminución en las capacidades intelectuales y predisposición a enfermedades del neurodesarrollo como desorden del espectro autista. En contraste, en adultos ha sido asociado con demencia y afectaciones emocionales (Tabla 1 y 2). Estas evidencias están en relación con las regiones del cerebro que acumulan mayores niveles de As o F según han mostrado los estudios en roedores (Sánchez-Peña y cols., 2010; Whitford y cols., 2009).

A pesar de la discrepancia entre etapa de vida y dosis de exposición entre los estudios epidemiológicos y modelos experimentales, varios estudios en animales han demostrado diferentes mecanismos moleculares de neurotoxicidad de estos elementos y como contribuyen en las alteraciones conductuales. En adición, varios de estas afectaciones descritas constituyen características distintivas de enfermedades neurodegenerativa, como son estrés oxidante, disfunción mitocondrial y disfunción en transmisión sináptica (Tabla 1,2 Anexos). En concordancia con estas evidencias, algunos investigadores han sugerido que la exposición crónica y desde etapas tempranas de la vida, constituye un factor

importante en el desarrollo de enfermedades degenerativas en la etapa adulta (Rice y Barone, 2000; Grandjean y Landrigan, 2014).

En este trabajo, pudimos observar diferentes alteraciones en animales adultos que fueron expuestos desde la gestación a As+F que podrían contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas dentro de la clasificación demencia a más largo plazo. La disminución mantenida en los niveles de GSH en el hipocampo, es un marcador importante en el desbalance redox y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Paul y cols., 2018). Además, la actividad de la vía de la transulfuración disminuyó por la exposición combinada en el hipocampo a los P90. Varios metabolitos de esta vía y subproductos tienen un papel importante en el funcionamiento y protección del cerebro (Hensley y Denton, 2015). La cetimina de lantoina, un derivado de un subproducto de estas enzimas tiene funciones neuroprotectoras. El H<sub>2</sub>S producido por las enzimas CBS y CSE, como resultado de la promiscuidad de sustrato, ejerce diferentes funciones celulares a través de sulfhidratación de residuos de Cys de proteínas. Entre ellas, el H<sub>2</sub>S contribuye a regular el balance redox, la proteostasis celular, y la transmisión sináptica (Paul y cols., 2018). Alteraciones en la expresión y actividad de la enzima CBS y en los niveles de H<sub>2</sub>S han sido observada en enfermedades neurodegenerativas incluyendo el Alzheimer (Paul y Snyder, 2018). El H<sub>2</sub>S también contribuye a regular la contracción/relajación vascular, y otras funciones del endotelio vascular, por lo que alteración en el H<sub>2</sub>S resultan en la disfunción endotelial (Citi y cols., 2021). Adicionalmente, la ruta de la transulfuración esta interconectada con la ruta del ciclo de la metionina y es regulada por los niveles de SAM. Dado que la actividad de la vía se encontraba disminuida, así como la cantidad de As metilado, es posible que hubiera alteraciones en los niveles de SAM. SAM es un metabolito que participa en la donación de grupos metilos en diferentes rutas metabólicas, incluyendo la síntesis de fosfolípidos de membrana (Benjamins y cols., 2012) y la síntesis de colina, a pesar de no ser suficiente para los requerimientos de esta última. Sin embargo, en condiciones de altos niveles de homocisteína, bajos niveles de SAM y estrés oxidante, se favorece la conversión de colina en betaína, para alimentar el ciclo de la Met (Jadavji y cols., 2017) (Figura 3). Este proceso, aunque es más común en

hígado en determinadas condiciones puede ocurrir en el cerebro, debido a la presencia de la BHMT (Prieur y cols, 2017), conllevando a una disminución en las pozas de colina, que pueden ser destinadas para la síntesis de acetilcolina. Disminución en los niveles de SAM y alteraciones en los niveles de acetilcolina y transmisión colinérgica, se ha observado en paciente y modelos experimentales de Alzheimer (Schaeffer y Gattaz, 2008; Linnebank y cols, 2010) y por exposición a As y F (Tabla 1 y 2). Por lo cual, afectación de la actividad de la vía de transulfuración en el grupo expuesto a As+F podría contribuir al desarrollo de enfermedades relacionadas a la demencia.

Por otro lado, observamos deficiencias de memoria en pruebas conductuales asociadas a la corteza y al hipocampo, y alteraciones en la expresión de receptores ionotrópicos de glutamato. Entre ellas, la disminución de las subunidades GluA1 y NR2B ha sido observada en pacientes con Alzheimer (Schaeffer y Gattaz, 2008). En contraste, el aumento de NR2A ha sido asociado con alteraciones emocionales (Ganguly y cols., 2015; Lee y cols., 2021), conducta que es frecuente en enfermedades asociadas a la demencia (Zhao y cols., 2016; Asmer y cols., 2018). Además, el incremento de NR2A ha sido asociada con pérdida de interneuronas parvalbumin+ en corteza en modelos animales de ansiedad (Ganguly y cols., 2015). Estas interneuronas presentes tanto en corteza como hipocampo tienen funciones regulatorias en el balance excitatorio/inhibitorio y su disfunción ha sido asociada con diferentes enfermedades neurológicas (Nahar y cols., 2021)

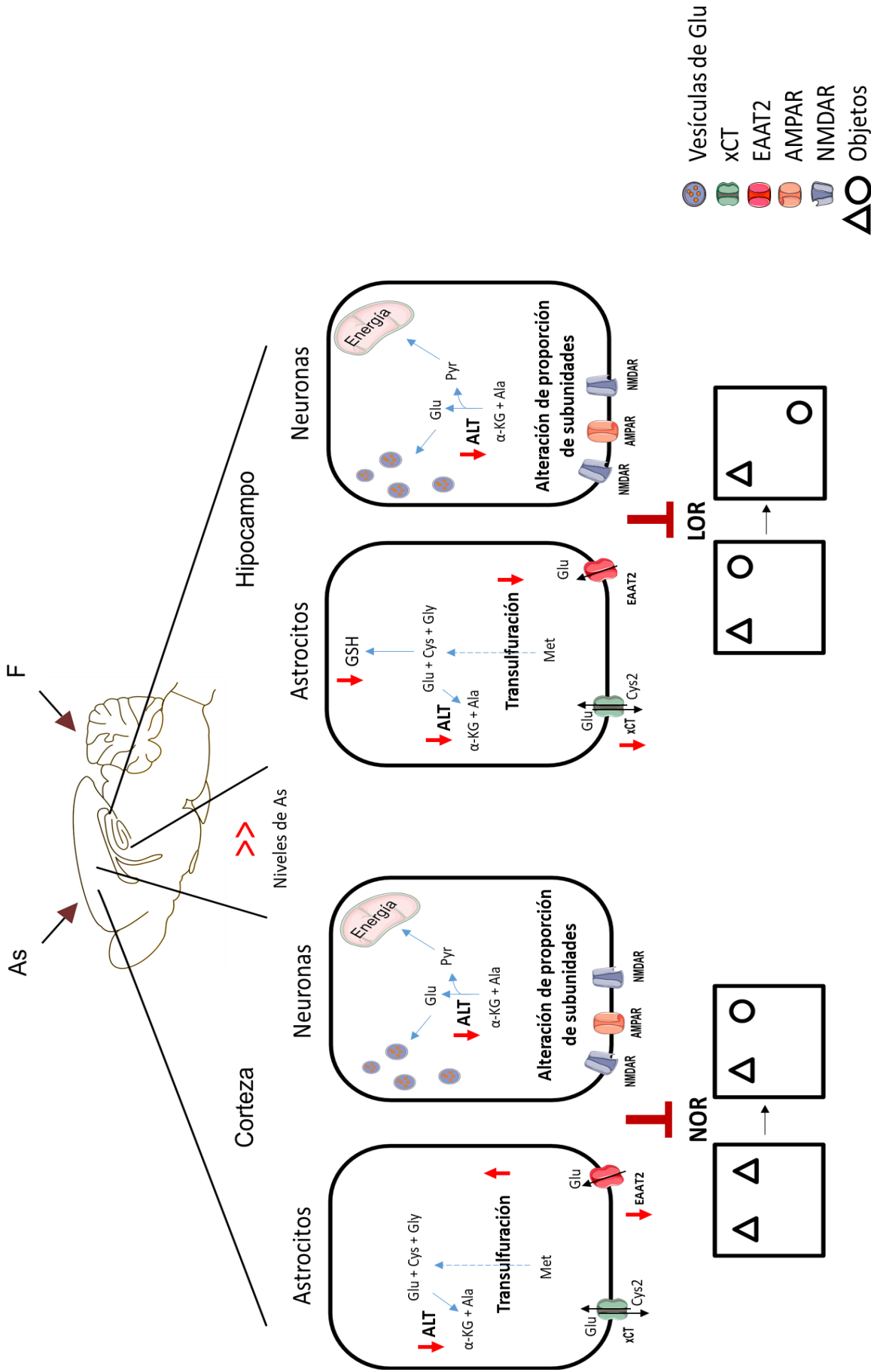
Por último, observamos una disminución en los niveles de EAAT2 en la corteza, y de la actividad de ALT en corteza e hipocampo a los P90. Ambos elementos, tienen un rol importante en el control de los niveles extracelulares de Glu a través de la recaptura y metabolismo de este en astrocitos, como ha sido mencionado previamente. Estas alteraciones a largo plazo podrían resultar en la acumulación extracelular de Glu y muerte neuronal por excitotoxicidad, característico de las enfermedades neurodegenerativas (Schaeffer y Gattaz, 2008).

A pesar, que los datos obtenidos hasta el momento de exposición evaluado sugieren que las afectaciones en la memoria están relacionadas con un desbalance redox y

alteraciones en la proporción de receptores glutamatérgicos y disposición de glutamato. Dichas afectaciones a largo plazo podrían resultar en los cambios previamente expuestos, y en neurodegeneración. Por lo cual sería importante explorar el impacto de estos elementos previamente discutido en un mayor tiempo de exposición.



## 9. RESUMEN GRÁFICO



**Figura 13.** Esquema resumen de los efectos neurotóxicos de la co-exposición crónica a As y F desde inicios de la gestación en la corteza y el hipocampo. La coexposición disminuye de forma mantenida de los niveles de GSH, los niveles de xCT e inhibe en la ruta de la transulfuración en el hipocampo. La coexposición disminuye la actividad de la ALT y de los niveles de transportadores de Glu en la corteza y el hipocampo, lo que puede influir en la disposición de Glu. La coexposición modifica la proporción de subunidades de los receptores glutamatérgicos impactando en el desempeño en las pruebas de reconocimiento de objeto novedoso (NOR) y localización de objeto (LOR). As: arsenico, F: fluor, Glu: glutamato, Cys: cisteina, EAAT2: alanina aminotransferasa, EAAT2: alanina aminotransferasa, EAAT2: transportador de glutamato 2, xCT: transportador antiporte de cistina y glutamato, AMPAR: receptor tipo AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxy-5-metil-4-isoxazolopropiónico), NMDAR: receptor tipo NMDA (n-metil-D-aspartato).



## 10. CONCLUSIONES

- La co-exposición gestacional a As y F no altera la acumulación de As y F en la corteza y el hipocampo; sin embargo, la corteza acumula mayores niveles de As que el hipocampo.
- La co-exposición gestacional a As y F, resulta en una disminución sostenida en los niveles de GSH en el hipocampo a diferencia de las exposiciones individuales, pero no en la corteza.
- La exposición combinada a As y F induce un aumento mayor de la actividad de la vía de la transulfuración en la corteza comparado con las exposiciones individuales, mientras que la presencia de As incrementa el efecto inhibitorio del F en la actividad de la vía de la transulfuración en el hipocampo.
- La exposición combinada a As y F disminuye de los niveles proteicos de EAAT2 en la corteza y en la actividad de ALT en la corteza y el hipocampo a diferencia de las exposiciones individuales. Sin embargo, la disminución en niveles de xCT en el hipocampo es independiente de la combinación.
- La exposición combinada a As y F altera la proporción de los receptores glutamatérgicos en la corteza y el hipocampo, que resulta en un efecto negativo en la memoria de objeto tanto en ambas pruebas reconocimiento de objeto (novedoso y localización) a diferencia de exposiciones individuales.

## 11. PERSPECTIVAS

En este trabajo pudimos observar que la combinación de As y F resulta en una disminución sostenida en los niveles de GSH en el hipocampo. Consideramos que sería interesante evaluar el efecto a nivel mitocondrial en los niveles de GSH, y su impacto en diferentes procesos celulares, teniendo en cuenta la importancia del GSH en la mitocondria y el importante papel de esta en el cerebro.

Adicionalmente, observamos alteraciones en el metabolismo de la cisteína, y en el metabolismo de As, por lo que sería interesante evaluar los niveles de SAM/SAH, un metabolito en común entre ambos procesos y que podría contribuir a explicar las alteraciones observadas con la exposición combinada a As y F.

A nivel de sinapsis glutamatérgica, observamos una disminución en la actividad de una enzima de síntesis *de novo* de Glu y en el transporte de Glu en los animales expuestos a As y F, sin embargo, consideramos que sería necesario evaluar el efecto a nivel del ciclo de Glu - Gln, la capacidad de liberación de Glu vesicular y los niveles extracelulares de Glu, para un mejor entendimiento del impacto en la homeostasis del neurotransmisor.

Adicionalmente, observamos que la exposición combinada moduló diferencialmente la expresión de subunidades de receptores tipo NMDA y AMPA en el cerebro. Las subunidades de los receptores de Glu presentan diferentes conductividades y cinéticas de apertura, por lo que consideramos que sería importante realizar estudios electrofisiológicos para evaluar impacto de estos cambios moleculares en la excitabilidad de las neuronas y respuesta a estimulación eléctrica. También sería interesante evaluar si estos cambios en la expresión del receptor de glutamato también podrían resultar en una maduración deficiente de las espinas dendrítica y una interconexión cerebral alterada.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- al-Khafaji, F., Bowron, A., Day, A. P., Scott, J. y Stansbie, D. (1998). Stabilization of blood homocysteine by 3-deazaadenosine. *Ann Clin Biochem*, 35 ( Pt 6), 780-782.
- Alfaro de la Torre, M. C., Ortiz Pérez, M. D., Alarcón, M. T., Martínez Cruz, D. A. y Ledón, J. M. (2018). Chapter 2. Inventario Nacional de Calidad del Agua. Arsénico y fluoruro en agua: riesgos y perspectivas desde la sociedad civil y la academia en México (pp. 31-56).
- Andersen, J. V., Markussen, K. H., Jakobsen, E., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., Rosenberg, P. A. y Aldana, B. I. (2021). Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology*, 196, 108719.
- Ansari, R., Mahta, A., Mallack, E. y Luo, J. J. (2014). Hyperhomocysteinemia and neurologic disorders: a review. *J Clin Neurol*, 10(4), 281-288.
- Ansari, J.A.; Dey, R.K.; Mishra, S.K.; Roy, O.; Kushwaha, S.; Singh, V.; Patnaik, S.; Ghosh, D. (2022) Perinatal arsenic exposure-induced sustained microglial activation leads to impaired cognitive response in BALB/c mice. *Neurotoxicology*. 92:1-14.
- Aoyama, K. (2021). Glutathione in the Brain. *International journal of molecular sciences*, 22(9)
- Aposhian, H. V., Zakharyan, R. A., Avram, M. D., Sampayo-Reyes, A. y Wollenberg, M. L. (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*, 198(3), 327-335.
- Asmer MS, Kirkham J, Newton H, Ismail Z, Elbayoumi H, Leung RH, Seitz DP. Meta-Analysis of the Prevalence of Major Depressive Disorder Among Older Adults With Dementia. *J Clin Psychiatry*. 2018 Jul 31;79(5):17r11772.
- Bach, M. E., Hawkins, R. D., Osman, M., Kandel, E. R. y Mayford, M. (1995). Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell*, 81(6), 905-915.
- Barbier, O., Arreola-Mendoza, L. y Del Razo, L. M. (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact*, 188(2), 319-333.
- Bartos M, Gumilar F, Gallegos CE, Bras C, Dominguez S, Mónaco N, Esandi MDC, Bouzat C, Cancela LM, Minetti A. (2018) Alterations in the memory of rat offspring exposed to low levels of fluoride during gestation and lactation: Involvement of the  $\alpha 7$  nicotinic receptor and oxidative stress. *Reprod Toxicol*. 81:108-114.
- Bartos, M., Gumilar, F., Gallegos, C. E., Bras, C., Dominguez, S., Cancela, L. M. y Minetti, A. (2019). Effects of Perinatal Fluoride Exposure on Short- and Long-Term Memory, Brain Antioxidant Status, and Glutamate Metabolism of Young Rat Pups. 38(5), 405-414.
- Bartos, M., Gumilar, F., Baier, C. J., Dominguez, S., Bras, C., Cancela, L. M., Minetti, A. y Gallegos, C. E. (2022). Rat developmental fluoride exposure affects retention memory, leads to a depressive-like behavior, and induces biochemical changes in offspring rat brains. *Neurotoxicology*, 93, 222-232.
- Basha, P. M. y Madhusudhan, N. (2010). Pre and post natal exposure of fluoride induced oxidative macromolecular alterations in developing central nervous system of rat and amelioration by antioxidants. *Neurochem Res*, 35(7), 1017-1028.
- Basha, P. M., Rai, P. y Begum, S. (2011). Evaluation of fluoride-induced oxidative stress in rat brain: a multigeneration study. *Biol Trace Elem Res*, 142(3), 623-637.
- Basha, C. D. y Reddy, R. G. (2015). Long-term changes in brain cholinergic system and behavior in rats following gestational exposure to lead: protective effect of calcium supplement. *Interdisciplinary Toxicology*, 8(4), 159-168.

- Bashash M, Thomas D, Hu H, Martinez-Mier EA, Sanchez BN, Basu N, Peterson KE, Ettinger AS, Wright R, Zhang Z, Liu Y, Schnaas L, Mercado-García A, Téllez-Rojo MM, Hernández-Avila M. (2017) Prenatal Fluoride Exposure and Cognitive Outcomes in Children at 4 and 6-12 Years of Age in Mexico. *Environ Health Perspect.* 125(9):097017.
- Baum L, Chan IH, Cheung SK, Goggins WB, Mok V, Lam L, Leung V, Hui E, Ng C, Woo J, Chiu HF, Zee BC, Cheng W, Chan MH, Szeto S, Lui V, Tsoh J, Bush AI, Lam CW, Kwok T. (2010) Serum zinc is decreased in Alzheimer's disease and serum arsenic correlates positively with cognitive ability. *Biometals.* 23(1):173-9.
- Benjamins J.A, Murphy E.J, Syefried T.N Chapter 5 Lipids In S. T. Brady, G. J. Siegel, R. W. Albers y D. L. Price (Eds.), *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)* (pp. 81-100). New York: Academic Press.
- Bera, I., Sabatini, R., Auteri, P., Flace, P., Sisto, G., Montagnani, M. O. N. I. C. A., y cols. (2007). Neurofunctional effects of developmental sodium fluoride exposure in rats. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 11(4).
- Bharti, V. K. y Srivastava, R. S. (2009). Fluoride-induced oxidative stress in rat's brain and its amelioration by buffalo (*Bubalus bubalis*) pineal proteins and melatonin. *Biol Trace Elem Res*, 130(2), 131-140.
- Bittencourt LO, Dionizio A, Ferreira MKM, Aragão WAB, de Carvalho Cartágenes S, Puty B, do Socorro Ferraz Maia C, Zohoori FV, Buzalaf MAR, Lima RR. (2023) Prolonged exposure to high fluoride levels during adolescence to adulthood elicits molecular, morphological, and functional impairments in the hippocampus. *Sci Rep.* 13(1):11083.
- Blaylock, R. L. (2004). Excitotoxicity: A possible central mechanism in fluoride neurotoxicity. *Fluoride*, 37, 301-314.
- Brucker, N., Moro, A., Charão, M., Bubols, G., Nascimento, S., Goethel, G., Barth, A., Prohmann, A. C., Rocha, R., Moresco, R. y cols. (2015). Relationship between blood metals and inflammation in taxi drivers. *Clin Chim Acta*, 444, 176-181.
- Carvalho, A. L., Caldeira, M. V., Santos, S. D. y Duarte, C. B. (2008). Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *Br J Pharmacol*, 153 Suppl 1, S310-324.
- Cao K, Xiang J, Dong YT, Xu Y, Li Y, Song H, Zeng XX, Ran LY, Hong W, Guan ZZ. (2019) Exposure to fluoride aggravates the impairment in learning and memory and neuropathological lesions in mice carrying the APP/PS1 double-transgenic mutation. *Alzheimers Res Ther.* 11(1):35.
- Cao Q, Wang J, Hao Y, Zhao F, Fu R, Yu Y, Wang J, Niu R, Bian S, Sun Z. (2022) Exercise Ameliorates Fluoride-induced Anxiety- and Depression-like Behavior in Mice: Role of GABA. *Biol Trace Elem Res.* 200(2):678-688.
- Castro-Coronel, Y., Del Razo, L. M., Huerta, M., Hernandez-Lopez, A., Ortega, A. y Lopez-Bayghen, E. (2011). Arsenite exposure downregulates EAAT1/GLAST transporter expression in glial cells. *Toxicol Sci*, 122(2), 539-550.
- Chandravanshi LP, Yadav RS, Shukla RK, Singh A, Sultana S, Pant AB, Parmar D, Khanna VK. (2014) Reversibility of changes in brain cholinergic receptors and acetylcholinesterase activity in rats following early life arsenic exposure. *Int J Dev Neurosci.* 34:60-75.
- Chang, C. Y., Guo, H. R., Tsai, W. C., Yang, K. L., Lin, L. C., Cheng, T. J. y Chuu, J. J. (2015). Subchronic Arsenic Exposure Induces Anxiety-Like Behaviors in Normal Mice and Enhances Depression-Like Behaviors in the Chemically Induced Mouse Model of Depression. *Biomed Res Int*, 2015, 159015.
- Chen L, Ning H, Yin Z, Song X, Feng Y, Qin H, Li Y, Wang J, Ge Y, Wang W. (2017) The effects of fluoride on neuronal function occurs via cytoskeleton damage and decreased signal transmission. *Chemosphere.* 185:589-594.

- Chen R, Zhao LD, Liu H, Li HH, Ren C, Zhang P, Guo KT, Zhang HX, Geng DQ, Zhang CY. (2017) Fluoride Induces Neuroinflammation and Alters Wnt Signaling Pathway in BV2 Microglial Cells. *Inflammation*. 40(4):1123-1130.
- Chen J, Niu Q, Xia T, Zhou G, Li P, Zhao Q, Xu C, Dong L, Zhang S, Wang A. (2018) ERK1/2-mediated disruption of BDNF-TrkB signaling causes synaptic impairment contributing to fluoride-induced developmental neurotoxicity. *Toxicology*. 410:222-230.
- Chen, X., Comish, P. B., Tang, D. y Kang, R. (2021). Characteristics and Biomarkers of Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*, 9, 637162.
- Chen Y, Liu X, Zhang Q, Wang H, Zhang R, Ge Y, Liang H, Li W, Fan J, Liu H, Lv Z, Dou W, Wang Y, Li X. (2023) Arsenic induced autophagy-dependent apoptosis in hippocampal neurons via AMPK/mTOR signaling pathway. *Food Chem Toxicol*. 179:113954.
- Choi AL, Sun G, Zhang Y, Grandjean P. (2012) Developmental fluoride neurotoxicity: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*. 120(10):1362-8.
- Chouhan, S. y Flora, S. J. (2008). Effects of fluoride on the tissue oxidative stress and apoptosis in rats: biochemical assays supported by IR spectroscopy data. *Toxicology*, 254(1-2), 61-67.
- Chouhan, S. y Flora, S. J. (2010). Arsenic and fluoride: two major ground water pollutants. *Indian J Exp Biol*, 48(7), 666-678.
- Chouhan, S., Lomash, V. y Flora, S. J. (2010). Fluoride-induced changes in haem biosynthesis pathway, neurological variables and tissue histopathology of rats. *J Appl Toxicol*, 30(1), 63-73.
- Citi V, Martelli A, Gorica E, Brogi S, Testai L, Calderone V. (2021) Role of hydrogen sulfide in endothelial dysfunction: Pathophysiology and therapeutic approaches. *J Adv Res*. 27:99-113
- Clayton, D. A., Mesches, M. H., Alvarez, E., Bickford, P. C. y Browning, M. D. (2002). A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J Neurosci*, 22(9), 3628-3637.
- Coppin, J. F., Qu, W. y Waalkes, M. P. (2008). Interplay between cellular methyl metabolism and adaptive efflux during oncogenic transformation from chronic arsenic exposure in human cells. *J Biol Chem*, 283(28), 19342-19350.
- Cronican AA, 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*. 8(2):e53478.
- Cui, Z., Feng, R., Jacobs, S., Duan, Y., Wang, H., Cao, X. y Tsien, J. Z. (2013). Increased NR2A:NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory. *Sci Rep*, 3(1), 1036.
- Cunningham JEA, McCague H, Malin AJ, Flora D, Till C. (2021) Fluoride exposure and duration and quality of sleep in a Canadian population-based sample. *Environ Health*. 20(1):16
- Currier, J. M., Svoboda, M., Matoušek, T., Dědina, J. y Stýblo, M. (2011). Direct analysis and stability of methylated trivalent arsenic metabolites in cells and tissues. *Metallomics*, 3(12), 1347-1354.
- Dang WM, Ma WJ, Wang S, Shi C, Su LP, Guan HY, Zhang Q, Wang Y, Zhao Q, Yang T, Xiang LJ. (2008) [Investigation on mental health of residents living in a mineral area in Hubei province]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 26(8):457-60
- Dani SU. (2010) Arsenic for the fool: an exponential connection. *Sci Total Environ*. 408(8):1842-6.
- Davis, M. A., Signes-Pastor, A. J., Argos, M., Slaughter, F., Pendergrast, C., Punshon, T., Gossai, A., Ahsan, H. y Karagas, M. R. (2017). Assessment of human dietary exposure to arsenic through rice. *Sci Total Environ*, 586, 1237-1244.
- De Bundel, D., Schallier, A., Loyens, E., Fernando, R., Miyashita, H., Van Liefferinge, J., Vermoesen, K., Bannai, S., Sato, H., Michotte, Y. y cols. (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(15), 5792-5803.
- Dewey D, England-Mason G, Ntanda H, Deane AJ, Jain M, Barnieh N, Giesbrecht GF, Letourneau N; APron Study Team. (2023) Fluoride exposure during pregnancy from a community water supply is associated with executive function in preschool children: A prospective ecological cohort study. *Sci Total Environ*. 891:164322.
- Ding Y, YanhuiGao, Sun H, Han H, Wang W, Ji X, Liu X, Sun D. (2011) The relationships between low levels of urine fluoride on children's intelligence, dental fluorosis in endemic fluorosis areas in Hulunbuir, Inner Mongolia, China. *J Hazard Mater*. 186(2-3):1942-6.
- Ding B, Ma X, Liu Y, Ni B, Lu S, Chen Y, Liu X, Zhang W. (2023) Arsenic-Induced, Mitochondria-Mediated Apoptosis Is Associated with Decreased Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Coactivator  $\alpha$  in Rat Brains. *Toxics*. 11(7):576.
- Dong, Y. T., Wei, N., Qi, X. L., Liu, X. H., Chen, D., Zeng, X. X., & Guan, Z. Z. (2017). Attenuating effect of vitamin E on the deficit of learning and memory of rats with chronic fluorosis: The mechanism may involve muscarinic acetylcholine receptors. *Fluoride*, 50(3), 354-364.
- Erecińska, M., Nelson, D., Nissim, I., Daikhin, Y. y Yudkoff, M. (1994). Cerebral alanine transport and alanine aminotransferase reaction: alanine as a source of neuronal glutamate. *J Neurochem*, 62(5), 1953-1964.
- Escudero-Lourdes C, Uresti-Rivera EE, Oliva-González C, Torres-Ramos MA, Aguirre-Bañuelos P, Gandolfi AJ. (2016) Cortical Astrocytes Acutely Exposed to the Monomethylarsonous Acid (MMAIII) Show Increased Pro-inflammatory Cytokines Gene Expression that is Consistent with APP and BACE-1: Over-expression. *Neurochem Res*. 41(10):2559-2572.
- Everett, E. T. (2011). Fluoride's effects on the formation of teeth and bones, and the influence of genetics. *J Dent Res*, 90(5), 552-560.
- Featherstone, D. E. y Shippy, S. A. (2008). Regulation of synaptic transmission by ambient extracellular glutamate. *Neuroscientist*, 14(2), 171-181.
- Firdaus F, Zafeer MF, Ahmad M, Afzal M. (2018) Anxiolytic and anti-inflammatory role of thymoquinone in arsenic-induced hippocampal toxicity in Wistar rats. *Heliyon*. 4(6):e00650
- Fitz NF, Barchowsky A, Koldamova R, Lefterov I. (2022) Genome-wide alteration of histone methylation profiles associated with cognitive changes in response to developmental arsenic exposure in mice. *Toxicol Rep*. 9:393-403.
- Flora, S. J., Mittal, M. y Mishra, D. (2009). Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines and DNA damage in mouse brain. *J Neurol Sci*, 285(1-2), 198-205.
- Flora, S. J. (2011). Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med*, 51(2), 257-281.
- Fotiadis, D., Kanai, Y. y Palacín, M. (2013). The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med*, 34(2-3), 139-158.
- Gao, Q., Liu, Y. J. y Guan, Z. Z. (2008). Oxidative stress might be a mechanism connected with the decreased alpha 7 nicotinic receptor influenced by high-concentration of fluoride in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicol In Vitro*, 22(4), 837-843.
- Ganguly P, Holland FH, Brenhouse HC. (2015) Functional Uncoupling NMDAR NR2A Subunit from PSD-95 in the Prefrontal Cortex: Effects on Behavioral Dysfunction and Parvalbumin Loss after Early-Life Stress. *Neuropsychopharmacology*. 40(12):2666-75.
- García-Sevillano, M. A., Contreras-Acuña, M., García-Barrera, T., Navarro, F. y Gómez-Ariza, J. L. (2014). Metabolomic study in plasma, liver and kidney of mice exposed to inorganic arsenic based on mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 406(5), 1455-1469.



- Gardoni, F., Mauceri, D., Malinverno, M., Polli, F., Costa, C., Tozzi, A., Siliquini, S., Picconi, B., Cattabeni, F., Calabresi, P. y cols. (2009). Decreased NR2B subunit synaptic levels cause impaired long-term potentiation but not long-term depression. *J Neurosci*, 29(3), 669-677.
- Ge Y, Chen L, Yin Z, Song X, Ruan T, Hua L, Liu J, Wang J, Ning H. (2018) Fluoride-induced alterations of synapse-related proteins in the cerebral cortex of ICR offspring mouse brain. *Chemosphere*. 201:874-883.
- Giasson BI, Sampathu DM, Wilson CA, Vogelsberg-Ragaglia V, Mushynski WE, Lee VM. (2002) The environmental toxin arsenite induces tau hyperphosphorylation. *Biochemistry*. 41(51):15376-87.
- Gopnar VV, Rakshit D, Bandakinda M, Kulhari U, Sahu BD, Mishra A. (2023) Fisetin attenuates arsenic and fluoride subacute co-exposure induced neurotoxicity via regulating TNF- $\alpha$  mediated activation of NLRP3 inflammasome. *Neurotoxicology*. 97:133-149.
- Gong G, O'Bryant SE. (2010) The arsenic exposure hypothesis for Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 24(4):311-6.
- Gong G, Hargrave KA, Hobson V, Spallholz J, Boylan M, Lefforge D, O'Bryant SE. (2011) Low-level groundwater arsenic exposure impacts cognition: a project FRONTIER study. *J Environ Health*. 74(2):16-22
- Grandjean P, Landrigan PJ. (2014) Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol*. 13(3):330-8.
- Green, R., Lanphear, B., Hornung, R., Flora, D., Martinez-Mier, E. A., Neufeld, R., Ayotte, P., Muckle, G. y Till, C. (2019). Association Between Maternal Fluoride Exposure During Pregnancy and IQ Scores in Offspring in Canada. *JAMA Pediatrics*, 173(10), 940-948.
- Greger, I. H., Watson, J. F. y Cull-Candy, S. G. (2017). Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron*, 94(4), 713-730.
- Guo JX, Hu L, Yand PZ, Tanabe K, Miyatalre M, Chen Y. (2007) Chronic arsenic poisoning in drinking water in Inner Mongolia and its associated health effects. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 42(12):1853-8.
- Hall, M. N., Liu, X., Slavkovich, V., Ilievski, V., Pilsner, J. R., Alam, S., Factor-Litvak, P., Graziano, J. H. y Gamble, M. V. (2009). Folate, Cobalamin, Cysteine, Homocysteine, and Arsenic Metabolism among Children in Bangladesh. *Environ Health Perspect*, 117(5), 825-831.
- Han, H., Du, W., Zhou, B. y cols (2014) Effects of Chronic Fluoride Exposure on Object Recognition Memory and mRNA Expression of SNARE Complex in Hippocampus of Male Mice. *Biol Trace Elem Res* 158, 58–64.
- Hardingham, G. E. y Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, 11(10), 682-696.
- Hassel, B. y Dingledine, R. (2012). Chapter 17 - Glutamate and Glutamate Receptors. In S. T. Brady, G. J. Siegel, R. W. Albers y D. L. Price (Eds.), *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)* (pp. 342-366). New York: Academic Press.
- Hensley, K. y Denton, T. T. (2015). Alternative functions of the brain transsulfuration pathway represent an underappreciated aspect of brain redox biochemistry with significant potential for therapeutic engagement. *Free Radical Biology and Medicine*, 78, 123-134.
- Hernández-Zavala, A., Matoušek, T., Drobná, Z., Paul, D. S., Walton, F., Adair, B. M., Dědina, J., Thomas, D. J. y Stýblo, M. (2008). Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23(3), 342-351.
- Hine, C. y Mitchell, J. R. (2017). Endpoint or Kinetic Measurement of Hydrogen Sulfide Production Capacity in Tissue Extracts. *Bio Protoc*, 7(13)

- Hoeffler, C. A., & Klann, E. . (2008). NMDA receptors and translational control. In AM. VanDongen (Ed.), *Biology of the NMDA receptor*. CRC Press, 103-121.
- Hong, Y. S., Song, K. H. y Chung, J. Y. (2014). Health effects of chronic arsenic exposure. *J Prev Med Public Health*, 47(5), 245-252.
- Howard, G., Bartram, J., Pedley, S., Schmoll, O., Chorus, I. y Berger, P. (2006). Groundwater and public health. In O. Schmoll, G. Howard, J. Chilton, I. Chorus, S. World Health Organization. *Water y T. Health (Eds.), Protecting Groundwater for Health: Managing the quality of drinking-water sources* (pp. 3-19). UK: World Health Organization, IWA Publishing.
- Howe, C. G., Niedzwiecki, M. M., Hall, M. N., Liu, X., Ilievski, V., Slavkovich, V., Alam, S., Siddique, A. B., Graziano, J. H. y Gamble, M. V. (2014). Folate and cobalamin modify associations between S-adenosylmethionine and methylated arsenic metabolites in arsenic-exposed Bangladeshi adults. *J Nutr*, 144(5), 690-697.
- Hu X, Yuan X, Yang M, Han M, Ommati MM, Ma Y. (2023) Arsenic exposure induced anxiety-like behaviors in male mice via influencing the GABAergic Signaling in the prefrontal cortex. *Environ Sci Pollut Res Int*. 30(36):86352-86364.
- Hughes, M. F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett*, 133(1), 1-16.
- Hughes, M. F., Kenyon, E. M., Edwards, B. C., Mitchell, C. T., Razo, L. M. y Thomas, D. J. (2003). Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicol Appl Pharmacol*, 191(3), 202-210.
- Huo, T. G., Li, W. K., Zhang, Y. H., Yuan, J., Gao, L. Y., Yuan, Y., Yang, H. L., Jiang, H. y Sun, G. F. (2015). Excitotoxicity Induced by Realgar in the Rat Hippocampus: the Involvement of Learning Memory Injury, Dysfunction of Glutamate Metabolism and NMDA Receptors. *Mol Neurobiol*, 51(3), 980-994.
- Jackson, A. C. y Nicoll, R. A. (2011). Stargazing from a new vantage--TARP modulation of AMPA receptor pharmacology. *J Physiol*, 589(Pt 24), 5909-5910.
- Jadavji NM, Bahous RH, Deng L, Malysheva O, Grand'maison M, Bedell BJ, Caudill MA, Rozen R. (2014) Mouse model for deficiency of methionine synthase reductase exhibits short-term memory impairment and disturbances in brain choline metabolism. *Biochem J*. 461(2):205-12.
- Jana, L., Maity, P. P., Perveen, H., Dash, M., Jana, S., Dey, A., De, S. K. y Chattopadhyay, S. (2018). Attenuation of utero-toxicity, metabolic dysfunction and inflammation by soy protein concentrate in rats exposed to fluoridated water: consequence of hyperlipidemia in parallel with hypohomocysteinemia. *Environ Sci Pollut Res Int*, 25(36), 36462-36473.
- Jiang, S., Su, J., Yao, S., Zhang, Y., Cao, F., Wang, F., Wang, H., Li, J. y Xi, S. (2014). Fluoride and arsenic exposure impairs learning and memory and decreases mGluR5 expression in the hippocampus and cortex in rats. *PLoS One*, 9(4), e96041.
- Jiang, L., Kon, N., Li, T., Wang, S.-J., Su, T., Hibshoosh, H., Baer, R. y Gu, W. (2015). Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*, 520(7545), 57-62.
- Jiang P, Li G, Zhou X, Wang C, Qiao Y, Liao D, Shi D. (2019) Chronic fluoride exposure induces neuronal apoptosis and impairs neurogenesis and synaptic plasticity: Role of GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway. *Chemosphere*. 214:430-435.
- Jimenez-Cordova, M. I., Cardenas-Gonzalez, M., Aguilar-Madrid, G., Sanchez-Pena, L. C., Barrera-Hernandez, A., Dominguez-Guerrero, I. A., Gonzalez-Horta, C., Barbier, O. C. y Del Razo, L. M. (2018). Evaluation of kidney injury biomarkers in an adult Mexican population environmentally exposed to fluoride and low arsenic levels. *Toxicol Appl Pharmacol*, 352, 97-106.

- Jimenez Cordova, M., Cardenas Gonzalez, M. y Barbier, O. (2018a). Capítulo 3. Efectos a la salud por la exposición a fluoruro. En: *Hacia el Cumplimiento del Derecho del Agua: Arsénico y Fluoruro en agua: riesgos y perspectivas desde la sociedad civil y la academia en México* (1ra edición ed., pp. 63 - 67).
- Jin, Y., Xi, S., Li, X., Lu, C., Li, G., Xu, Y., Qu, C., Niu, Y. y Sun, G. (2006). Arsenic speciation transported through the placenta from mother mice to their newborn pups. *Environ Res*, 101(3), 349-355.
- Jing, J., Zheng, G., Liu, M., Shen, X., Zhao, F., Wang, J., Zhang, J., Huang, G., Dai, P., Chen, Y. y cols. (2012). Changes in the synaptic structure of hippocampal neurons and impairment of spatial memory in a rat model caused by chronic arsenite exposure. *Neurotoxicology*, 33(5), 1230-1238.
- Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., Rhodes, C. J. y Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol*, 31(2), 95-107.
- Kanai, Y., Cléménçon, B., Simonin, A., Leuenberger, M., Lochner, M., Weisstanner, M. y Hediger, M. A. (2013). The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Mol Aspects Med*, 34(2-3), 108-120.
- Kandasamy, P., Gyimesi, G., Kanai, Y. y Hediger, M. A. (2018). Amino acid transporters revisited: New views in health and disease. *Trends Biochem Sci*, 43(10), 752-789.
- Keshavarz-Bahaghighat H, Sepand MR, Ghahremani MH, Aghsami M, Sanadgol N, Omid A, Bodaghi-Namileh V, Sabzevari O. (2018) Acetyl-L-Carnitine Attenuates Arsenic-Induced Oxidative Stress and Hippocampal Mitochondrial Dysfunction. *Biol Trace Elem Res*. 184(2):422-435.
- Kessels, H. W. y Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron*, 61(3), 340-350.
- Kimura, H. (2020). Signalling by hydrogen sulfide and polysulfides via protein S-sulfuration. *Br J Pharmacol*, 177(4), 720-733.
- Krüger, K., Straub, H., Hirner, A. V., Hippler, J., Binding, N. y Musshoff, U. (2009). Effects of monomethylarsonic and monomethylarsonous acid on evoked synaptic potentials in hippocampal slices of adult and young rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 236(1), 115-123.
- Kurahashi, T., Lee, J., Nabeshima, A., Homma, T., Kang, E. S., Saito, Y., Yamada, S., Nakayama, T., Yamada, K.-i., Miyata, S. y cols. (2016). Ascorbic acid prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by ameliorating glutathione recovery and autophagy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 604, 36-46.
- Laine, J. E., Ilievski, V., Richardson, D. B., Herring, A. H., Stýblo, M., Rubio-Andrade, M., Garcia-Vargas, G., Gamble, M. V. y Fry, R. C. (2018). Maternal one carbon metabolism and arsenic methylation in a pregnancy cohort in Mexico. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 28(5), 505-514.
- Lee BR, Lee JH, Ko YH, Seo JY, Hur KH, Kim YJ, Kim SK, Kim SE, Lee SY, Jang CG. Korean Red (2021) Ginseng reduces chronic social defeat stress-induced mood disorders via N-methyl-D-aspartate receptor modulation in mice. *J Ginseng Res*. 45(2):254-263.
- Li, X. (2009). Glutathione and Glutathione-S-Transferase in Detoxification Mechanisms General, Applied and Systems Toxicology.
- Li, M., Gao, Y., Cui, J., Li, Y., Li, B., Liu, Y., Sun, J., Liu, X., Liu, H., Zhao, L. y cols. (2016). Cognitive Impairment and Risk Factors in Elderly People Living in Fluorosis Areas in China. *Biol Trace Elem Res*, 172(1), 53-60.
- Li, J., Duan, X., Dong, D., Zhang, Y., Zhao, L., Li, W., Chen, J., Sun, G. y Li, B. (2017). Tissue-specific distributions of inorganic arsenic and its methylated metabolites, especially in cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of mice after a single oral administration of arsenite. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 43, 15-22.

- Li H., Li H., Li Y, Liu Y, Zhao Z (2018) Blood Mercury, Arsenic, Cadmium, and Lead in Children with Autism Spectrum Disorder. *Biol Trace Elem Res* 181, 31–37
- Li X, Zhang J, Niu R, Manthari RK, Yang K, Wang J. (2019) Effect of fluoride exposure on anxiety- and depression-like behavior in mouse. *Chemosphere*. 215:454-460.
- Limón-Pacheco, J. y Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1), 137-147.
- Limón-Pacheco, J. H., Jiménez-Córdova, M. I., Cárdenas-González, M., Sánchez Retana, I. M., Gonsebatt, M. E. y Del Razo, L. M. (2018). Potential Co-exposure to Arsenic and Fluoride and Biomonitoring Equivalents for Mexican Children. *Ann Glob Health*, 84(2), 257-273.
- Linnebank M, Popp J, Smulders Y, Smith D, Semmler A, Farkas M, Kulic L, Cvetanovska G, Blom H, Stoffel-Wagner B and others. (2010) S-adenosylmethionine is decreased in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 7(6):373-8.
- Liu, J., Xie, Y., Cooper, R., Ducharme, D. M., Tennant, R., Diwan, B. A. y Waalkes, M. P. (2007). Transplacental exposure to inorganic arsenic at a hepatocarcinogenic dose induces fetal gene expression changes in mice indicative of aberrant estrogen signaling and disrupted steroid metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol*, 220(3), 284-291.
- Liu, S., Piao, F., Sun, X., Bai, L., Peng, Y., Zhong, Y., Ma, N. y Sun, W. (2012). Arsenic-induced inhibition of hippocampal neurogenesis and its reversibility. *Neurotoxicology*, 33(5), 1033-1039.
- Liu X, Piao F, Li Y. (2013) Protective effect of taurine on the decreased biogenic amine neurotransmitter levels in the brain of mice exposed to arsenic. *Adv Exp Med Biol*. 776:277-87.
- Liu, F., Ma, J., Zhang, H., Liu, P., Liu, Y.-P., Xing, B. y Dang, Y.-H. (2014). Fluoride exposure during development affects both cognition and emotion in mice. *Physiology & Behavior*, 124, 1-7.
- Long YG, Wang YN, Chen J, Jiang SF, Nordberg A, Guan ZZ. (2002) Chronic fluoride toxicity decreases the number of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. *Neurotoxicol Teratol*. 24(6):751-7.
- Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, 30(1-2), 42-59.
- Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1830(5), 3143-3153.
- Luo, J. H., Qiu, Z. Q., Shu, W. Q., Zhang, Y. Y., Zhang, L. y Chen, J. A. (2009). Effects of arsenic exposure from drinking water on spatial memory, ultra-structures and NMDAR gene expression of hippocampus in rats. *Toxicol Lett*, 184(2), 121-125.
- Luo, J. H., Qiu, Z. Q., Zhang, L. y Shu, W. Q. (2012). Arsenite exposure altered the expression of NMDA receptor and postsynaptic signaling proteins in rat hippocampus. *Toxicol Lett*, 211(1), 39-44.
- Lou DD, Guan ZZ, Liu YJ, Liu YF, Zhang KL, Pan JG, Pei JJ. (2013) The influence of chronic fluorosis on mitochondrial dynamics morphology and distribution in cortical neurons of the rat brain. *Arch Toxicol*. 87(3):449-57
- Luo, J. y Shu, W. (2015). 15 - Arsenic-Induced Developmental Neurotoxicity A2 - Flora, S.J.S *Handbook of Arsenic Toxicology* (pp. 363-386). Oxford: Academic Press.
- Maekawa, F., Tsuboi, T., Oya, M., Aung, K. H., Tsukahara, S., Pellerin, L. y Nohara, K. (2013). Effects of sodium arsenite on neurite outgrowth and glutamate AMPA receptor expression in mouse cortical neurons. *Neurotoxicology*, 37, 197-206.
- Mahaboob Basha P, Saumya SM. (2013) Suppression of mitochondrial oxidative phosphorylation and TCA enzymes in discrete brain regions of mice exposed to high fluoride: amelioration by Panax ginseng (Ginseng) and Lagerstroemia speciosa (Banaba) extracts. *Cell Mol Neurobiol*. 33(3):453-64

- Malin AJ, Till C. (2015) Exposure to fluoridated water and attention deficit hyperactivity disorder prevalence among children and adolescents in the United States: an ecological association. *Environ Health*. 14:17.
- Malin AJ, Bose S, Busgang SA, Gennings C, Thorpy M, Wright RO, Wright RJ, Arora M. (2019) Fluoride exposure and sleep patterns among older adolescents in the United States: a cross-sectional study of NHANES 2015-2016. *Environ Health*. 18(1):106.
- Mao J, Yang J, Zhang Y, Li T, Wang C, Xu L, Hu Q, Wang X, Jiang S, Nie X, Chen G. (2016) Arsenic trioxide mediates HAPI microglia inflammatory response and subsequent neuron apoptosis through p38/JNK MAPK/STAT3 pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 303:79-89.
- Martinez EJ, Kolb BL, Bell A, Savage DD, Allan AM. (2008) Moderate perinatal arsenic exposure alters neuroendocrine markers associated with depression and increases depressive-like behaviors in adult mouse offspring. *Neurotoxicology*. 29(4):647-55.
- Martinez-Finley EJ, Ali AM, Allan AM. (2009) Learning deficits in C57BL/6J mice following perinatal arsenic exposure: consequence of lower corticosterone receptor levels? *Pharmacol Biochem Behav*. 94(2):271-7
- Martinez-Finley EJ, Goggin SL, Labrecque MT, Allan AM. (2011) Reduced expression of MAPK/ERK genes in perinatal arsenic-exposed offspring induced by glucocorticoid receptor deficits. *Neurotoxicol Teratol.*;33(5):530-7.
- Martinez-Lozada, Z. y Ortega, A. (2015). Glutamatergic Transmission: A Matter of Three. *Neural Plast*, 2015, 787396.
- McBean, G. J. (2017). Cysteine, Glutathione, and Thiol Redox Balance in Astrocytes. *Antioxidants (Basel)*, 6(3)
- McClintock, T. R., Chen, Y., Bundschuh, J., Oliver, J. T., Navoni, J., Olmos, V., Lepori, E. V., Ahsan, H. y Parvez, F. (2012). Arsenic exposure in Latin America: biomarkers, risk assessments and related health effects. *Sci Total Environ*, 429, 76-91.
- McDermott S, Bao W, Marjorie Aelion C, Cai B, Lawson A. (2012) When are fetuses and young children most susceptible to soil metal concentrations of arsenic, lead and mercury? *Spat Spatiotemporal Epidemiol*. 3(3):265-72.
- McPherson CA, Zhang G, Gilliam R, Brar SS, Wilson R, Brix A, Picut C, Harry GJ. (2018) An Evaluation of Neurotoxicity Following Fluoride Exposure from Gestational Through Adult Ages in Long-Evans Hooded Rats. *Neurotox Res*. 34(4):781-798
- Mesram, N., Nagapuri, K., Banala, R. R., Nalagani, C. R., & Karnati, P. R. (2017) Quercetin treatment against NaF induced oxidative stress related neuronal and learning changes in developing rats. *Journal of King Saud University-Science*, 29(2), 221-229.
- Mishra, D. y Flora, S. J. (2008). Differential oxidative stress and DNA damage in rat brain regions and blood following chronic arsenic exposure. *Toxicol Ind Health*, 24(4), 247-256.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. y Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12(3), 529-540.
- Moore, P. y Whiteman, M. (2015). *Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide (Vol. 230)*.
- Moreno-Castilla, P., Pérez-Ortega, R., Violante-Soria, V., Balderas, I. y Bermúdez-Rattoni, F. (2017). Hippocampal release of dopamine and norepinephrine encodes novel contextual information. *Hippocampus*, 27(5), 547-557.
- Muenyi, C. S., Ljungman, M. y States, J. C. (2015). Arsenic Disruption of DNA Damage Responses- Potential Role in Carcinogenesis and Chemotherapy. *Biomolecules*, 5(4), 2184-2193.
- Mukherjee, A. K., Manna, S. K., Roy, S. K., Chakraborty, M., Das, S. y Naskar, J. P. (2016). Plasma-aminothiols status and inverse correlation of total homocysteine with B-vitamins in arsenic

- exposed population of West Bengal, India. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 51(11), 962-973.
- Mukherjee, S. C., Rahman, M. M., Chowdhury, U. K., Sengupta, M. K., Lodh, D., Chanda, C. R., Saha, K. C. y Chakraborti, D. (2003). Neuropathy in arsenic toxicity from groundwater arsenic contamination in West Bengal, India. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 38(1), 165-183.
- Nadei OV, Khvorova IA, Agalakova NI. (2020) Cognitive Decline of Rats with Chronic Fluorosis Is Associated with Alterations in Hippocampal Calpain Signaling. *Biol Trace Elem Res*. 197(2):495-506.
- 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 arsenic in developing and adult rats. *Bull Environ Contam Toxicol*. 50(1):100-7.
- Nagaraja TN, Desiraju T. (1994) Effects on operant learning and brain acetylcholine esterase activity in rats following chronic inorganic arsenic intake. *Hum Exp Toxicol*. 13(5):353-6.
- Nagarajappa R, Pujara P, Sharda AJ, Asawa K, Tak M, Aapaliya P, Bhanushali N. (2013) Comparative Assessment of Intelligence Quotient among Children Living in High and Low Fluoride Areas of Kutch, India-a Pilot Study. *Iran J Public Health*. 42(8):813-8.
- Nakagawa, T. y Kaneko, S. (2013). SLC1 glutamate transporters and diseases: psychiatric diseases and pathological pain. *Curr Mol Pharmacol*, 6(2), 66-73.
- Nahar L, Delacroix BM, Nam HW. (2021) The Role of Parvalbumin Interneurons in Neurotransmitter Balance and Neurological Disease. *Front Psychiatry*. 12:679960.
- Nelson-Mora, J., Escobar, M. L., Rodriguez-Duran, L., Massieu, L., Montiel, T., Rodriguez, V. M., Hernandez-Mercado, K. y Gonsebatt, M. E. (2018). 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. *Arch Toxicol*, 92(3), 1037-1048.
- Niño SA, Martel-Gallegos G, Castro-Zavala A, Ortega-Berlanga B, Delgado JM, Hernández-Mendoza H, Romero-Guzmán E, Ríos-Lugo J, Rosales-Mendoza S, Jiménez-Capdeville ME, Zarazúa S. (2018) Chronic Arsenic Exposure Increases A $\beta$ (1-42) Production and Receptor for Advanced Glycation End Products Expression in Rat Brain. *Chem Res Toxicol*. 31(1):13-21
- Niño SA, Chi-Ahumada E, Ortíz J, Zarazua S, Concha L, Jiménez-Capdeville ME. (2020) Demyelination associated with chronic arsenic exposure in Wistar rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 393:114955.
- Niño SA, Vázquez-Hernández N, Arevalo-Villalobos J, Chi-Ahumada E, Martín-Amaya-Barajas FL, Díaz-Cintra S, Martel-Gallegos G, González-Burgos I, Jiménez-Capdeville ME. (2021) Cortical Synaptic Reorganization Under Chronic Arsenic Exposure. *Neurotox Res*. 39(6):1970-1980
- Niño SA, Chi-Ahumada E, Carrizales L, Estrada-Sánchez AM, Gonzalez-Billault C, Zarazúa S, Concha L, Jiménez-Capdeville ME. (2022) Life-long arsenic exposure damages the microstructure of the rat hippocampus. *Brain Res*. 1775:147742
- Niu, R., Sun, Z., Cheng, Z., Li, Z. y Wang, J. (2009). Decreased learning ability and low hippocampus glutamate in offspring rats exposed to fluoride and lead. *Environ Toxicol Pharmacol*, 28(2), 254-258.
- Niu R, Xue X, Zhao Y, Sun Z, Yan X, Li X, Feng C, Wang J. (2015) Effects of fluoride on microtubule ultrastructure and expression of Tub $\alpha$ 1a and Tub $\beta$ 2a in mouse hippocampus. *Chemosphere*. 139:422-7.
- Niu R, Chen H, Manthari RK, Sun Z, Wang J, Zhang J, Wang J. (2018) Effects of fluoride on synapse morphology and myelin damage in mouse hippocampus. *Chemosphere*. 194:628-633. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.027.

- Nkpaa KW, Onyeso GI. (2018) Rutin attenuates neurobehavioral deficits, oxidative stress, neuro-inflammation and apoptosis in fluoride treated rats. *Neurosci Lett.* 682:92-99.
- 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.* 8(3):861-74.
- Pain, G. (2017). *Mechanisms of Fluoride Neurotoxicity A quick guide to the literature.*
- Pandey, R., Rai, V., Mishra, J., Mandrah, K., Kumar Roy, S. y Bandyopadhyay, S. (2017). From the Cover: Arsenic Induces Hippocampal Neuronal Apoptosis and Cognitive Impairments via an Up-Regulated BMP2/Smad-Dependent Reduced BDNF/TrkB Signaling in Rats. *Toxicological Sciences,* 159(1), 137-158.
- Parajuli, R. P., Fujiwara, T., Umezaki, M. y Watanabe, C. (2013). Association of cord blood levels of lead, arsenic, and zinc with neurodevelopmental indicators in newborns: a birth cohort study in Chitwan Valley, Nepal. *Environ Res,* 121, 45-51.
- Paul BD, Snyder SH. (2018) Gasotransmitter hydrogen sulfide signaling in neuronal health and disease. *Biochemical pharmacology* 149:101-109.
- Paul, B. D., Sbodio, J. I. y Snyder, S. H. (2018). Cysteine Metabolism in Neuronal Redox Homeostasis. *Trends Pharmacol Sci,* 39(5), 513-524.
- Perveen, H., Chattopadhyay, S., Maity, M., Dash, M. y Islam, S. S. (2019). Involvement of proinflammatory cytokines and metallothionein in the repairing of arsenic-mediated uterine tissue damage by curcumin. *J Basic Clin Physiol Pharmacol,* 30(4)
- Prakash, C., Soni, M. y Kumar, V. (2015). Biochemical and Molecular Alterations Following Arsenic-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Rat Brain. *Biol Trace Elem Res,* 167(1), 121-129.
- Prakash C, Kumar V. (2016) Arsenic-induced mitochondrial oxidative damage is mediated by decreased PGC-1 $\alpha$  expression and its downstream targets in rat brain. *Chem Biol Interact.* 256:228-35.
- Prieur EAK, Pjetri E, Zeisel SH, Jadavji NM. (2017) Reduced brain volume and impaired memory in betaine homocysteine S-methyltransferase knockout mice. *Appl Physiol Nutr Metab.* 42(11):1228-1231.
- Prudova, A., Bauman, Z., Braun, A., Vitvitsky, V., Lu, S. C. y Banerjee, R. (2006). S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine beta-synthase and modulates redox capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 103(17), 6489-6494.
- Punshon, T., Davis, M. A., Marsit, C. J., Theiler, S. K., Baker, E. R., Jackson, B. P., Conway, D. C. y Karagas, M. R. (2015). Placental arsenic concentrations in relation to both maternal and infant biomarkers of exposure in a US cohort. *J Expo Sci Environ Epidemiol,* 25(6), 599-603.
- Qu, L., Gao, Y., Sun, H., Wang, H., Liu, X. y Sun, D. (2016). Role of PTEN-Akt-CREB Signaling Pathway in Nervous System impairment of Rats with Chronic Arsenite Exposure. *Biol Trace Elem Res,* 170(2), 366-372.
- Ram Kumar M, Flora SJS, Reddy GR. (2013) Monoisoamyl 2,3-dimercaptosuccinic acid attenuates arsenic induced toxicity: behavioral and neurochemical approach. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36: 231–242.
- Ramírez, P., Del Razo, L. M., Gutierrez-Ruiz, M. C. y Gonsebatt, M. E. (2000). Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis,* 21(4), 701-706.
- Ramos-Chavez, L. A., Rendon-Lopez, C. R., Zepeda, A., Silva-Adaya, D., Del Razo, L. M. y Gonsebatt, M. E. (2015). Neurological effects of inorganic arsenic exposure: altered cysteine/glutamate transport, NMDA expression and spatial memory impairment. *Front Cell Neurosci,* 9, 21.
- Ranjan, R. y Ranjan, A. (2015). *Fluoride Toxicity in Animals.*

- Razdan, P., Patthi, B., Kumar, J. K., Agnihotri, N., Chaudhari, P. y Prasad, M. (2017). Effect of Fluoride Concentration in Drinking Water on Intelligence Quotient of 12-14-Year-Old Children in Mathura District: A Cross-Sectional Study. *J Int Soc Prev Community Dent*, 7(5), 252-258.
- Reddy YP, Tiwari SK, Shaik AP, Alsaeed A, Sultana A, Reddy PK. (2014) Effect of sodium fluoride on neuroimmunological parameters, oxidative stress and antioxidative defenses. *Toxicol Mech Methods*. 24(1):31-6.
- Reddy, Y.P., Tiwari, S., Tomar, L.K. et al. (2021) Fluoride-Induced Expression of Neuroinflammatory Markers and Neurophysiological Regulation in the Brain of Wistar Rat Model. *Biol Trace Elem Res* 199, 2621–2626
- Reichard, J. F. y Puga, A. (2010). Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation. *Epigenomics*, 2(1), 87-104.
- Reitman, S. y Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*, 28(1), 56-63.
- Ren C, Zhang P, Yao XY, Li HH, Chen R, Zhang CY, Geng DQ. (2021) The cognitive impairment and risk factors of the older people living in high fluorosis areas: DKK1 need attention. *BMC Public Health*. 21(1):2237
- Ribas, V., García-Ruiz, C. y Fernández-Checa, J. C. (2014). Glutathione and mitochondria. 5(151)
- Rice D, Barone S Jr. (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*. 108 Suppl 3(Suppl 3):511-33.
- Riddell JK, Malin AJ, Flora D, McCague H, Till C. (2019) Association of water fluoride and urinary fluoride concentrations with attention deficit hyperactivity disorder in Canadian youth. *Environ Int*. 133(Pt B):105190.
- Rigalli, A. y Puche, R. (2007). Determinación de la concentración de Fluor en muestras biológicas. *Actualización en Osteología*, 3(1), 27-34.
- Robert, K., Vialard, F., Thiery, E., Toyama, K., Sinet, P. M., Janel, N. y London, J. (2003). Expression of the cystathionine beta synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain. *J Histochem Cytochem*, 51(3), 363-371.
- 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 Suppl 4:S579-87.
- Rodriguez, V. M., Del Razo, L. M., Limon-Pacheco, J. H., Giordano, M., Sanchez-Pena, L. C., Uribe-Querol, E., Gutierrez-Ospina, G. y Gonsbatt, M. E. (2005). Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicol Sci*, 84(1), 157-166.
- Rodríguez VM, Limón-Pacheco JH, Carrizales L, Mendoza-Trejo MS, Giordano M. (2010) Chronic exposure to low levels of inorganic arsenic causes alterations in locomotor activity and in the expression of dopaminergic and antioxidant systems in the albino rat. *Neurotoxicol Teratol*. 32(6):640-7.
- Rosado JL, Ronquillo D, Kordas K, Rojas O, Alatorre J, Lopez P, Garcia-Vargas G, Del Carmen Caamaño M, Cebrián ME, Stoltzfus RJ. (2007) Arsenic exposure and cognitive performance in Mexican schoolchildren. *Environ Health Perspect*. 115(9):1371-5.
- Roy A, Kordas K, Lopez P, Rosado JL, Cebrian ME, Vargas GG, Ronquillo D, Stoltzfus RJ. (2011) Association between arsenic exposure and behavior among first-graders from Torreón, Mexico. *Environ Res*. 111(5):670-6.



- Sánchez-Peña, L. C., Petrosyan, P., Morales, M., González, N. B., Gutiérrez-Ospina, G., Del Razo, L. M. y Gonsebatt, M. E. (2010). Arsenic species, AS3MT amount, and AS3MT gen expression in different brain regions of mouse exposed to arsenite. *Environ Res*, 110(5), 428-434.
- Saxena S, Sahay A, Goel P. (2012) Effect of fluoride exposure on the intelligence of school children in Madhya Pradesh, India. *J Neurosci Rural Pract*. 3(2):144-9.
- Sbodio, J. I., Snyder, S. H. y Paul, B. D. (2019). Redox Mechanisms in Neurodegeneration: From Disease Outcomes to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 30(11), 1450-1499.
- Sbodio, J. I., Snyder, S. H. y Paul, B. D. (2019). Regulators of the transsulfuration pathway. *Br J Pharmacol*, 176(4), 583-593.
- Schaeffer EL, Gattaz WF. (2008) Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A2 enzyme. *Psychopharmacology (Berl)*. 198(1):1-27.
- Schousboe, A., Sonnewald, U. y Waagepetersen, H. S. (2003). Differential roles of alanine in GABAergic and glutamatergic neurons. *Neurochem Int*, 43(4-5), 311-315.
- Schwenk, J., Baehrens, D., Haupt, A., Bildl, W., Boudkkazi, S., Roeper, J., Fakler, B. y Schulte, U. (2014). Regional Diversity and Developmental Dynamics of the AMPA-Receptor Proteome in the Mammalian Brain. *Neuron*, 84(1), 41-54.
- Sedlak, T. W., Paul, B. D., Parker, G. M., Hester, L. D., Snowman, A. M., Taniguchi, Y., Kamiya, A., Snyder, S. H. y Sawa, A. (2019). The glutathione cycle shapes synaptic glutamate activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(7), 2701-2706.
- Senft, A. P., Dalton, T. P. y Shertzer, H. G. (2000). Determining Glutathione and Glutathione Disulfide Using the Fluorescence Probe o-Phthalaldehyde. *Analytical Biochemistry*, 280(1), 80-86.
- Seraj B, Shahrabi M, Shadfar M, Ahmadi R, Fallahzadeh M, Eslamlu HF, Kharazifard MJ. (2012) Effect of high water fluoride concentration on the intellectual development of children in makoo/iran. *J Dent (Tehran)*. 9(3):221-9
- Sen D, Sarathi Biswas P. (2012) Arsenicosis: Is it a Protective or Predisposing Factor for Mental Illness? *Iran J Psychiatry*. 7(4):180-3.
- Shang, Y., Siow, Y. L., Isaak, C. K. y O, K. (2016). Downregulation of Glutathione Biosynthesis Contributes to Oxidative Stress and Liver Dysfunction in Acute Kidney Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 9707292.
- Shanthakumari, D., Srinivasalu, S. y Subramanian, S. (2004). Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology*, 204(2-3), 219-228.
- Sharma B, Sharma PM. (2013) Arsenic toxicity induced endothelial dysfunction and dementia: pharmacological interdiction by histone deacetylase and inducible nitric oxide synthase inhibitors. *Toxicol Appl Pharmacol*. 273(1):180-8.
- Shao QL, Wang Y, Li L, Li J. (2003) Initial study of cognitive function impairment as caused by chronic fluorosis. *Chinese Journal of Endemiology*. 22(4): 336-8.
- Shila S, Kokilavani V, Subathra M, Panneerselvam C. (2005) Brain regional responses in antioxidant system to alpha-lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology*. 210(1):25-36.
- Shila, S., Subathra, M., Devi, M. A. y Panneerselvam, C. (2005). Arsenic intoxication-induced reduction of glutathione level and of the activity of related enzymes in rat brain regions: reversal by DL-alpha-lipoic acid. *Arch Toxicol*, 79(3), 140-146.
- Silva-Adaya, D., Ramos-Chávez, L. A., Petrosyan, P., González-Alfonso, W. L., Pérez-Acosta, A. y Gonsebatt, M. E. (2020). Early Neurotoxic Effects of Inorganic Arsenic Modulate Cortical GSH Levels Associated With the Activation of the Nrf2 and NFκB Pathways, Expression of Amino Acid Transporters and NMDA Receptors and the Production of Hydrogen Sulfide. *Front Cell Neurosci*, 14, 17.

- Škovierová, H., Vidomanová, E., Mahmood, S., Sopková, J., Drgová, A., Červeňová, T., Halašová, E. y Lehotský, J. (2016). The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1733.
- Srivastava P, Yadav RS, Chandravanshi LP, Shukla RK, Dhuriya YK, Chauhan LKS, Dwivedi HN, Pant AB, Khanna VK. (2014) Unraveling the mechanism of neuroprotection of curcumin in arsenic induced cholinergic dysfunctions in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 279(3):428-440.
- Srivastava P, Dhuriya YK, Gupta R, Shukla RK, Yadav RS, Dwivedi HN, Pant AB, Khanna VK. (2018) Protective Effect of Curcumin by Modulating BDNF/DARPP32/CREB in Arsenic-Induced Alterations in Dopaminergic Signaling in Rat Corpus Striatum. *Mol Neurobiol*. 55(1):445-461.
- Srivastava, P., Dhuriya, Y. K., Kumar, V., Srivastava, A., Gupta, R., Shukla, R. K., Yadav, R. S., Dwivedi, H. N., Pant, A. B. y Khanna, V. K. (2018). PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  induced CREB activation ameliorates arsenic mediated alterations in NMDA receptors and associated signaling in rat hippocampus: Neuroprotective role of curcumin. *Neurotoxicology*, 67, 190-205.
- Stipanuk, M. H. (2004). Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr*, 24, 539-577.
- Stipanuk, M. H. (2020). Metabolism of Sulfur-Containing Amino Acids: How the Body Copes with Excess Methionine, Cysteine, and Sulfide. *J Nutr*, 150(Suppl 1), 2494s-2505s.
- Sun, H., Yang, Y., Shao, H., Sun, W., Gu, M., Wang, H., Jiang, L., Qu, L., Sun, D. y Gao, Y. (2017). Sodium Arsenite-Induced Learning and Memory Impairment Is Associated with Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis in Rat Hippocampus. *Front Mol Neurosci*, 10, 286.
- Sun, Z., Zhang, Y., Xue, X., Niu, R. y Wang, J. (2018). Maternal fluoride exposure during gestation and lactation decreased learning and memory ability, and glutamate receptor mRNA expressions of mouse pups. *Hum Exp Toxicol*, 37(1), 87-93.
- Tanaka H, Tsukuma H, Oshima A. (2010) Long-Term Prospective Study of 6104 Survivors of Arsenic Poisoning During Infancy Due to Contaminated Milk Powder in 1955. *J Epidemiol*. 20(6):439-45.
- Tang Z, Lai CC, Luo J, Ding YT, Chen Q, Guan ZZ. (2021) Mangiferin prevents the impairment of mitochondrial dynamics and an increase in oxidative stress caused by excessive fluoride in SH-SY5Y cells. *J Biochem Mol Toxicol*. 35(4):e22705.
- Teng YC, Tai YI, Huang HJ, Lin AM. (2015) Melatonin Ameliorates Arsenite-Induced Neurotoxicity: Involvement of Autophagy and Mitochondria. *Mol Neurobiol*. 52(2):1015-22.
- Thomas, D. J. (2007). Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol*, 222(3), 365-373.
- Tolins, M., Ruchirawat, M. y Landrigan, P. (2014). The developmental neurotoxicity of arsenic: cognitive and behavioral consequences of early life exposure. *Ann Glob Health*, 80(4), 303-314.
- Tu W, Zhang Q, Liu Y, Han L, Wang Q, Chen P, Zhang S, Wang A, Zhou X. (2018) Fluoride induces apoptosis via inhibiting SIRT1 activity to activate mitochondrial p53 pathway in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 347:60-69.
- Tyler, C. R. y Allan, A. M. (2014). The Effects of Arsenic Exposure on Neurological and Cognitive Dysfunction in Human and Rodent Studies: A Review. *Curr Environ Health Rep*, 1, 132-147.
- Vahter, M. (1999). Methylation of Inorganic Arsenic in Different Mammalian Species and Population Groups. *Science Progress*, 82(1), 69-88.
- Vaidya, A., Jain, S., Jain, A. K., Agrawal, A., Kashaw, S. K., Jain, S. K. y Agrawal, R. K. (2013). Metabotropic glutamate receptors: a review on prospectives and therapeutic aspects. *Mini Rev Med Chem*, 13(13), 1967-1981.

- Valdez Jiménez, L., López Guzmán, O. D., Cervantes Flores, M., Costilla-Salazar, R., Calderón Hernández, J., Alcaraz Contreras, Y. y Rocha-Amador, D. O. (2017). In utero exposure to fluoride and cognitive development delay in infants. *Neurotoxicology*, 59, 65-70.
- Valdovinos-Flores, C. y Gonsebatt, M. E. (2012). The role of amino acid transporters in GSH synthesis in the blood-brain barrier and central nervous system. *Neurochem Int*, 61(3), 405-414.
- Vega, L., Gonsebatt, M. E. y Ostrosky-Wegman, P. (1995). Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 334(3), 365-373.
- Vogel-Ciernia A, Wood MA (2014) Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci* 69:8.31.1-17
- von Ehrenstein OS, Poddar S, Yuan Y, Mazumder DG, Eskenazi B, Basu A, Hira-Smith M, Ghosh N, Lahiri S, Haque R, Ghosh A, Kalman D, Das S, Smith AH. (2007) Children's intellectual function in relation to arsenic exposure. *Epidemiology*. 18(1):44-51.
- Waalkes, M. P., Liu, J., Ward, J. M. y Diwan, B. A. (2004). Mechanisms underlying arsenic carcinogenesis: hypersensitivity of mice exposed to inorganic arsenic during gestation. *Toxicology*, 198(1-3), 31-38.
- Waites, C., Specht, C., Härtel, K., Leal-Ortiz, S., Genoux, D., Li, D., C Drisdell, R., Jeyifous, O., Cheyne, J., Green, W. y cols. (2009). Synaptic SAP97 Isoforms Regulate AMPA Receptor Dynamics and Access to Presynaptic Glutamate (Vol. 29).
- Waly, M., Olteanu, H., Banerjee, R., Choi, S. W., Mason, J. B., Parker, B. S., Sukumar, S., Shim, S., Sharma, A., Benzecry, J. M. y cols. (2004). Activation of methionine synthase by insulin-like growth factor-1 and dopamine: a target for neurodevelopmental toxins and thimerosal. *Mol Psychiatry*, 9(4), 358-370.
- Waly, M., Power-Charnitsky, V. A., Hodgson, N., Sharma, A., Audhya, T., Zhang, Y. y Deth, R. (2016). Alternatively Spliced Methionine Synthase in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells: Cobalamin and GSH Dependence and Inhibitory Effects of Neurotoxic Metals and Thimerosal. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 6143753.
- Wang, S. X., Wang, Z. H., Cheng, X. T., Li, J., Sang, Z. P., Zhang, X. D., Han, L. L., Qiao, X. Y., Wu, Z. M. y Wang, Z. Q. (2007). Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children's IQ and growth in Shanyin county, Shanxi province, China. *Environ Health Perspect*, 115(4), 643-647.
- Wang D, Cao L, Pan S, Wang G, Wang L, Cao N, Hao X. (2021) Sirt3-mediated mitochondrial dysfunction is involved in fluoride-induced cognitive deficits. *Food Chem Toxicol*. 158:112665.
- Wang, Y., Yen, F. S., Zhu, X. G., Timson, R. C., Weber, R., Xing, C., Liu, Y., Allwein, B., Luo, H., Yeh, H.-W. y cols. (2021). SLC25A39 is necessary for mitochondrial glutathione import in mammalian cells. *Nature*, 599(7883), 136-140.
- Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Factor-Litvak P, van Geen A, Slavkovich V, Lolocono NJ, Cheng Z, Hussain I, Momotaj H, Graziano JH. (2004) Water arsenic exposure and children's intellectual function in Araihasar, Bangladesh. *Environ Health Perspect*. 112(13):1329-33.
- Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Factor-Litvak P, Kline J, van Geen A, Slavkovich V, Lolocono NJ, Levy D, Cheng Z, Graziano JH. (2007) Water arsenic exposure and intellectual function in 6-year-old children in Araihasar, Bangladesh. *Environ Health Perspect*. 115(2):285-9.
- Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Factor-Litvak P, Ahsan H, Levy D, Kline J, van Geen A, Mey J, Slavkovich V, Siddique AB, Islam T, Graziano JH. (2011) Arsenic and manganese exposure and children's intellectual function. *Neurotoxicology*. 32(4):450-7.
- Watson, J. F., Ho, H. y Greger, I. H. (2017). Synaptic transmission and plasticity require AMPA receptor anchoring via its N-terminal domain. *Elife*, 6

- Westergaard, N., Varming, T., Peng, L., Sonnewald, U., Hertz, L. y Schousboe, A. (1993). Uptake, release, and metabolism of alanine in neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurosci Res*, 35(5), 540-545.
- Whitford, G. M., Whitford, J. L. y Hobbs, S. H. (2009). Appetitive-based learning in rats: lack of effect of chronic exposure to fluoride. *Neurotoxicol Teratol*, 31(4), 210-215.
- Xi S, Guo L, Qi R, Sun W, Jin Y, Sun G. (2010) Prenatal and early life arsenic exposure induced oxidative damage and altered activities and mRNA expressions of neurotransmitter metabolic enzymes in offspring rat brain. *J Biochem Mol Toxicol*24(6):368-78.
- Xiang Q, L. Y., Chen L, Wang C, Chen B, Chen X, Zhou M. (2003). Effect of fluoride in drinking water on children's intelligence. *Fluoride*, 36(2), 84-94.
- Xiao, Q., Ying, J., Xiang, L. y Zhang, C. (2018). The biologic effect of hydrogen sulfide and its function in various diseases. *Medicine*, 97(44), e13065-e13065.
- Xie, Y., Liu, J., Benbrahim-Tallaa, L., Ward, J. M., Logsdon, D., Diwan, B. A. y Waalkes, M. P. (2007). Aberrant DNA methylation and gene expression in livers of newborn mice transplacentally exposed to a hepatocarcinogenic dose of inorganic arsenic. *Toxicology*, 236(1-2), 7-15.
- Xin J, Zhu B, Wang H, Zhang Y, Sun N, Cao X, Zheng L, Zhou Y, Fang J, Jing B, Pan K, Zeng Y, Zeng D, Li F, Xia Y, Xu P, Ni X. (2023) Prolonged fluoride exposure induces spatial-memory deficit and hippocampal dysfunction by inhibiting small heat shock protein 22 in mice. *J Hazard Mater*. 456:131595
- Yadav RS, Chandravanshi LP, Shukla RK, Sankhwar ML, Ansari RW, Shukla PK, Pant AB, Khanna VK. (2011) Neuroprotective efficacy of curcumin in arsenic induced cholinergic dysfunctions in rats. *Neurotoxicology*. 32(6):760-8.
- Yan, N., Liu, Y., Liu, S. y cols. (2016) Fluoride-Induced Neuron Apoptosis and Expressions of Inflammatory Factors by Activating Microglia in Rat Brain. *Mol Neurobiol* 53, 4449–4460.
- Yang, L., Jin, P., Wang, X., Zhou, Q., Lin, X. y Xi, S. (2018). Fluoride activates microglia, secretes inflammatory factors and influences synaptic neuron plasticity in the hippocampus of rats. *Neurotoxicology*, 69, 108-120.
- Ye, H. y Rouault, T. A. (2010). Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry*, 49(24), 4945-4956.
- Zarazúa S, Bürger S, Delgado JM, Jiménez-Capdeville ME, Schliebs R. (2011) Arsenic affects expression and processing of amyloid precursor protein (APP) in primary neuronal cells overexpressing the Swedish mutation of human APP. *Int J Dev Neurosci*. 29(4):389-96.
- Zeng, H., Chattarji, S., Barbarosie, M., Rondi-Reig, L., Philpot, B. D., Miyakawa, T., Bear, M. F. y Tonegawa, S. (2001). Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell*, 107(5), 617-629.
- Zhang, M., Wang, A., He, W., He, P., Xu, B., Xia, T., Chen, X. y Yang, K. (2007). Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons. *Toxicology*, 236(3), 208-216.
- Zhang RY, Tu JB, Ran RT, Zhang WX, Tan Q, Tang P, Kuang T, Cheng SQ, Chen CZ, Jiang XJ, Chen C, Han TL, Zhang T, Cao XQ, Peng B, Zhang H, Xia YY. (2021) Using the Metabolome to Understand the Mechanisms Linking Chronic Arsenic Exposure to Microglia Activation, and Learning and Memory Impairment. *Neurotox Res*. 39(3):720-739
- Zhao, F., Liao, Y., Jin, Y., Li, G., Lv, X. y Sun, G. (2012). Effects of arsenite on glutamate metabolism in primary cultured astrocytes. *Toxicol In Vitro*, 26(1), 24-31.
- Zhao QF, Tan L, Wang HF, Jiang T, Tan MS, Tan L, Xu W, Li JQ, Wang J, Lai TJ, Yu JT. (2016) The prevalence of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 190:264-271.

- Zhao, F., Liao, Y., Tang, H., Piao, J., Wang, G. y Jin, Y. (2017). Effects of developmental arsenite exposure on hippocampal synapses in mouse offspring. *Metallomics*, 9(10), 1394-1412
- Zhao Q, Niu Q, Chen J, Xia T, Zhou G, Li P, Dong L, Xu C, Tian Z, Luo C, Liu L, Zhang S, Wang A. (2019) Roles of mitochondrial fission inhibition in developmental fluoride neurotoxicity: mechanisms of action in vitro and associations with cognition in rats and children. *Arch Toxicol.* 93(3):709-726.
- Zhao Q, Tian Z, Zhou G, Niu Q, Chen J, Li P, Dong L, Xia T, Zhang S, Wang A. (2020) SIRT1-dependent mitochondrial biogenesis supports therapeutic effects of resveratrol against neurodevelopment damage by fluoride. *Theranostics.* 10(11):4822-4838
- Zhou H, Zhao W, Ye L, Chen Z, Cui Y. (2018) Postnatal low-concentration arsenic exposure induces autism-like behavior and affects frontal cortex neurogenesis in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 62:188-198.
- Zierold KM, Knobeloch L, Anderson H. (2004) Prevalence of chronic diseases in adults exposed to arsenic-contaminated drinking water. *Am J Public Health.* 94(11):1936-7.

## 13. ANEXOS



# Chronic exposure to inorganic arsenic and fluoride induces redox imbalance, inhibits the transsulfuration pathway, and alters glutamate receptor expression in the brain, resulting in memory impairment in adult male mouse offspring

Wendy L. González-Alfonso<sup>1</sup> · Petrosyan Pavel<sup>1</sup> · Hernández-Mercado Karina<sup>1</sup> · Luz M. Del Razo<sup>2</sup> · Luz C. Sanchez-Peña<sup>2</sup> · Angélica Zepeda<sup>1</sup> · María E. Gonsebatt<sup>1</sup>

Received: 8 March 2023 / Accepted: 12 July 2023 / Published online: 23 July 2023  
© The Author(s) 2023

## Abstract

Exposure to toxic elements in drinking water, such as arsenic (As) and fluoride (F), starts at gestation and has been associated with memory and learning deficits in children. Studies in which rodents underwent mechanistic single exposure to As or F showed that the neurotoxic effects are associated with their capacity to disrupt redox balance, mainly by diminishing glutathione (GSH) levels, altering glutamate disposal, and altering glutamate receptor expression, which disrupts synaptic transmission. Elevated levels of As and F are common in groundwater worldwide. To explore the neurotoxicity of chronic exposure to As and F in drinking water, pregnant CD-1 mice were exposed to 2 mg/L As (sodium arsenite) and 25 mg/L F (sodium fluoride) alone or in combination. The male litter continued to receive exposure up to 30 or 90 days after birth. The effects of chronic exposure on GSH levels, transsulfuration pathway enzymatic activity, expression of cysteine/cystine transporters, glutamate transporters, and ionotropic glutamate receptor subunits as well as behavioral performance in the object recognition memory task were assessed. Combined exposure resulted in a significant reduction in GSH levels in the cortex and hippocampus at different times, decreased transsulfuration pathway enzyme activity, as well as diminished xCT protein expression. Altered glutamate receptor expression in the cortex and hippocampus and decreased transaminase enzyme activity were observed. These molecular alterations were associated with memory impairment in the object recognition task, which relies on these brain regions.

**Keywords** Arsenic · Fluoride · xCT · Transsulfuration pathway · Hydrogen sulfide · Glutamate receptor · Glutamate disposal

## Introduction

Fluoride (F) and arsenic (As) are the most serious contaminants in drinking water worldwide and are of health concern, since approximately over one-third of the world's population depends on the ground water supply (Schmoll et al. 2006).

Chronic exposure to As and F by drinking water has been linked to toxic effects in several organs and to neurodevelopmental alterations in children (Tyler and Allan 2014, Agalokova and Nadei 2020). As and F can cross the placenta and blood–brain barrier and can incorporate into the central nervous system (CNS). As is a metalloid element with high affinity for the SH- group, while F has strong electronegativity with high affinity for OH- and NH-, which results in the alteration of protein assembly and other molecular interactions. Alteration in glutathione (GSH) levels is the main redox perturbation associated with As or F exposure (Chouhan and Flora 2010). However, although As + F are frequently present in groundwater worldwide (Schmoll et al. 2006), the effects of the combination of these elements in drinking water have been poorly explored (Mondal and

✉ María E. Gonsebatt  
margen@unam.mx

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

<sup>2</sup> Departamento de Toxicología, Centro de Investigación Y Estudios Avanzados, Mexico, DF, Mexico

Chattopadhyay 2020). L- $\gamma$ -Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (GSH) constitutes the major antioxidant defense in the brain, and its synthesis is limited by cysteine availability. Brain cells take up cystine or cysteine through facilitated transport and synthesize cysteine from methionine through the transsulfuration pathway (Lu 2013). The transsulfuration pathway involves the participation of enzymatic steps carried out by cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) and cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) (Paul et al. 2018). Cysteine in the extracellular space is mostly oxidized as cystine, and its uptake by glial cells is mediated mainly by the antiporter xCT in exchange for glutamate. Neuron cysteine uptake is mediated by EAAT3 (EACC1), which is part of the excitatory amino acid transporter (EAAT) family (Valdovinos-Flores and Gonsbatt 2012). GSH homeostasis in the brain is tightly linked to glutamatergic synaptic transmission, since GSH can also serve as a reservoir of neuronal glutamate. Additionally, xCT and EAAT3 participate in the uptake of Cys and may also modulate extracellular glutamate levels.

During glutamatergic transmission, vesicular glutamate release activates ionotropic glutamate receptors in the postsynaptic terminal. The most abundant receptors include  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, which depolarize the postsynaptic terminal upon activation to propagate the nervous impulse. The signal ends when glutamate is removed from the synaptic cleft (Hassel and Dingle 2012). Glutamate homeostasis is essential for proper signal transmission and depends on coordinated glutamate recycling and metabolism between neurons and astrocytes. Vesicular glutamate originates from the glutamate–glutamine shuttle and from de novo synthesis mainly by aspartate aminotransferase (AST) and alanine amine transferase (ALT). Moreover, glutamate recapture is mediated by EAAT transporter family members that are expressed in high levels on astrocytes but also in the synaptic terminals (Andersen et al. 2021).

We have previously explored the neurotoxic impact of chronic As exposure starting at gestation and observed disrupted glutamate disposition in the cortex and hippocampus. Increased expression of the cystine/glutamate xCT transporter was linked to increased levels of extracellular glutamate in the hippocampus and altered expression of NMDA and AMPA receptors (Ramos-Chavez et al. 2015; Nelson-Mora et al. 2018). In the case of F exposure during gestation and lactation, different groups have reported reduced activity and expression of antioxidant components in the cortex and hippocampus of rat and mouse offspring. Additionally, they observed reduced activity of brain transaminase involved in glutamate synthesis and altered expression of glutamate receptors, associated with memory impairment (Sun et al. 2018; Bartos et al. 2022). In Mexico, levels as high as 0.650 mg/L and 23.4 mg/L for As and F, respectively, have

been observed in some locations. As and F are present in a ratio of approximately 1:20–1:50 (Alfaro de la Torre et al. 2018). Rodent models show a resistance to As or F toxicity of five-to-tenfold compared to that of humans (Vahter 1999; Council 2006). In this work, we explored the effects of exposure to low and relevant doses of these toxic elements considering the mouse model resistance, the As:F ratio, and average levels in nature. To explore the impact of As + F in drinking water on the cortex and hippocampus, CD1 male mice were chronically exposed at gestation to 2 mg/L sodium arsenite and 25 mg/L sodium fluoride in drinking water. Glutathione levels, transsulfuration pathway enzyme activities, and the expression of cystine/glutamate and cysteine transporters as well as NMDA and AMPA receptor proteins were explored in the cortex and hippocampus at postnatal days 30 and 90 (P30 and P90, respectively). Additionally, the expressions of PSD95 and synaptophysin were determined to investigate the general postsynaptic protein distribution and arrangement and vesicular density, respectively. Behavioral tests to evaluate learning and memory were performed at P90.

## Materials and methods

### Chemicals and antibodies

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) unless otherwise indicated. Methylarsonic acid (MMAV) disodium salt (99% pure) was obtained from Chem Service (West Chester, PA, USA). Sodium borohydride was obtained from EM Science (Gibbstown, NJ, USA). For Western blots, primary rabbit antibodies against xCT (ab37185), EAAT3 (ab124802), GLAST (ab416), GLT1 (ab41621), NR2B (ab65783), GluA2 (ab133477), Synaptophysin (SY38, ab8049), CBS (ab135626), and CSE (ab151769) were obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA). Anti-LAT1 (sc-134994) and PSD95 (7E3, sc-32290) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit anti-NR2A (AB1555P) and anti-GluA1 (AB1504) antibodies were purchased from Millipore (Bedford, MA, USA). Primary antibody against SLC1A4 (8442 s) and secondary goat anti-rabbit antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Secondary anti-mouse IgG antibody was purchased from Invitrogen (Waltham, MA, USA).

### Animals and treatment

Eight- to ten-week-old CD-1 mice were obtained from the Animal Care Facility at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM and were maintained at 23–25 °C under a 12 h light/dark cycle and a relative humidity of 50–60%.



Animals were given free access to food (Harlan 2018S Diet; Harlan, Indianapolis, IN, USA) and water. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM. Virgin female mice were paired with proven breeder males, and the next day, each female was explored for the presence of a mating plug. Pregnant mice ( $n=40$ ) were randomly divided into four groups. The first group (control group) received iAs/F-free drinking water, the second group (As group) received 2 mg/L As daily as sodium arsenite in drinking water, the third group (F group) received 25 mg/L F daily as sodium fluoride in drinking water, and the fourth group (combination As + F group) received both elements in the above-mentioned concentrations in drinking water. Solutions were prepared freshly daily in deionized water to avoid oxidation of As. Animal weight was determined weekly. At the end of the lactation period (postnatal day 21), mice were separated by sex. Male litters continued with the exposure protocols until P30 or P90. At these times, mice were euthanized, and the cortex as well as the hippocampus were dissected, immediately frozen, and stored at  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  until processed or used freshly for some experiments.

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

### Arsenic level determination

The levels of As species were determined in the cortex and hippocampus by hydride-generation atomic absorption spectrometry using cryotrapping (HG-CT-AAS) as previously described by Hernández-Zavala et al. (2008). First, tissue sample homogenates were prepared on ice with deionized water as described by Currier et al. (2011). Independent calibration graphs of the inorganic and methylated arsenic species were used for quantification.

### Fluoride level determination

The levels of F were determined in pooled samples of four mouse cortex per group, combining the isothermal distillation technique (Rigalli and Puche 2007) with a potentiometric method using an ion-selective electrode (Orion 9609BNWP, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). A 1:1 mixture of the sample and a total ionic strength adjustment buffer (TISAB) were made. The concentration of F was determined by interpolating the results on a calibration plot.

Urine fluoride reference materials PC-U-F2102 (0.413  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), PC-U-F2103 (7.31  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and PC-U-F2104 (4.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) from the Centre de Toxicologie du Québec (Institut National de Santé Publique du Québec [INSPQ]) were used as quality control.

### GSH level determination

Reduced GSH levels were measured in fresh tissue preparations of the cortex and hippocampus using a microplate-adapted fluorometric *o*-phthalaldehyde (OPA) method (Silva-Adaya et al. 2020). The method is based on the conjugation of reduced GSH with *o*-phthalaldehyde (OPA), forming a stable and fluorescent isoindole derivate (Senft et al. 2000). GSH levels were determined by fluorescence with 365 nm/430 nm (excitation/emission) filters in a DTX 800/880 Multimode Detector (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

### Transsulfuration pathway activity

CBS and CSE activity was determined by their ability to produce  $\text{H}_2\text{S}$  (Silva-Adaya et al. 2020).  $\text{H}_2\text{S}$  production was measured through the formation of PbS spots (brown dot spots), which resulted from the reaction of diffused  $\text{H}_2\text{S}$  with PbAc embedded in the filter paper placed over the plate surface. The assay was run in a 96-well plate with a final volume of 150  $\mu\text{l}$  containing 300  $\mu\text{g}$  of protein from homogenated cortex or hippocampus and reaction solution (final concentration of 10 mM L-Cys, 1 mM PLP in PBS1X) per well. Liver samples from untreated animals were used as positive controls. Dot spots were quantified using ImageJ software version 1.46r software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

### Western blotting

Total protein preparations from the cortex and the hippocampus were used as the source of protein for the Western blot studies. Briefly, 20 mg of tissue was homogenized in RIPA buffer (Tris HCl 50 mM, pH 7.55, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, NaPPi 2.5 mM, Triton X-100 1%, sodium deoxycholate 0.1%, glycerol 2-P 1 mM,  $\text{Na}_2\text{VO}_4$  1 mM, PMSF 1 mM, and 10 mg/mL aprotinin/leupeptin) and centrifuged at 14,000 $\times$ g for 15 min at 4  $^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was collected and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for further analysis. The total protein concentration was determined by the microtiter Bradford technique (Bio-Rad, CA, USA) using a standard graph of albumin.  $R^2 > 0.98$ . For transporter and enzyme expression analysis, 30  $\mu\text{g}$  of protein was loaded in a 10% SDS-acrylamide gel and transferred into nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories, Germany). For receptor expression analysis, 50  $\mu\text{g}$  of protein was loaded in 8% SDS-acrylamide

gel and transferred into PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories, Germany). The membranes were blocked with TBS containing 5% Blotto and 0.1% Tween-20 and incubated with the respective primary antibodies at 4 °C overnight. As a loading control, total protein Ponceau staining was used. Protein bands were visualized after incubation with the appropriate HRP-linked secondary antibodies using the Amersham TM ECL TM Advance Western blotting Detection Kit (GE Life Sciences, RPN2232). Images were captured using Li-Cor and analyzed using ImageJ software version 1.46r software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Protein expression levels were analyzed using ImageJ (vs. 1.49) and normalizing each band with respect to the loading control (Ponceau Staining). Protein contents were finally compared and represented with respect to the experimental control.

### Brain transaminase activities

Transaminase activity was determined as a marker of de novo synthesis of glutamate by a modified procedure (Reitman and Frankel 1957) using dinitrophenyl-hydrazine (DNPH). Briefly, 40 µg of protein was incubated with 100 µL of ALT substrate (2 mM α keto-glutarate + 0.2 M alanine in phosphate buffer pH 7.4) or AST substrate (2 mM α keto-glutarate + 0.2 M aspartate in phosphate buffer pH 7.4) at 37 °C for 30 min or 60 min, respectively. Subsequently, 100 µL of 1 mM DNPH in 1 N HCl was added to the mixture and incubated at RT for 20 min. Finally, 1 mL of NaOH1M was added and incubated for 10 min at RT. The absorbance at 505 nm was measured. Sodium pyruvate (2 mM) was used as a standard, and enzymatic activity was expressed as U/L using the following equations:  $EA (AST) = \frac{umol(60min) - umol(0min)}{60min \times 0.00001L}$ ,  $EA (ALT) = \frac{umol(60min) - umol(0min)}{30min \times 0.00001L}$ , respectively.

### Behavioral tasks

Behavioral studies were performed on P83–P90 following previously described protocols (Moreno-Castilla et al. 2017). For the open-field test, as well as for the object and place recognition tests, we used a white acrylic closed square arena (40 × 40 × 25 cm) in which the floor was covered with sawdust. The arena was placed in a dim-light illuminated room and had an internal visual clue consisting of a rectangular black and white striped plasticized cardboard (38 × 5 cm) glued to one of the walls (see Supplementary Fig. 1). The objects used in the recognition tasks were two identical pyramids of Lego blocks named “A1” and “A2” (4.8 cm length × 3.0 cm width × 4.0 cm height, built in red, blue, gray, and yellow) and a different object, a tower of Lego blocks referred to as “novel object” (NO, 3.2 cm length × 1.6 cm width × 4.5 cm height, built in green, red,

yellow, and white) (see Supplementary Fig. 1). The objects were thoroughly cleaned with 70% ethanol, and sawdust was stirred after each trial to prevent olfactory cues. The animals were transported to the experimental room 30 min before the beginning of each session. All behavioral sessions were video-recorded for further analysis. One of the two experimenters remained blinded to the treatment of each animal. The blind experimenter performed the calculations to determine the exploration index in the acquisition and test phases of the recognition tasks (see below).

### Habituation to the arena and open-field test

Each mouse was handled for 10 min on 3 consecutive days and was then habituated to the squared arena without any objects for 10 min a day for 3 days before the onset of the memory tasks. The first day of habituation was used to evaluate the general motor performance and anxiety-related behaviors through an open-field analysis. This consisted of the measurement of the total traveled distance, the percentage of time spent in the center or peripheral zones of the arena (see Supplementary Fig. 1), and the rearing frequency. General behavior recording and further observational analysis were performed using EthoVision XT software (11.5.126, Wageningen, The Netherlands).

### Novel object recognition task (NOR)

On day 4 (after 3 days of habituation), each mouse was introduced to the arena and allowed to explore two identical objects (A1 and A2) for 10 min for the acquisition phase. Objects were fixed on the floor close to one of the corners of the arena (8 cm away from each of the two adjacent walls, see Supplementary Fig. 1) with double-sided tape to prevent displacement by the animals. On day 5, each mouse was introduced to the arena where one familiar object (FO, A1) and one novel object (NO) were placed. The objects were placed in the same positions as in the acquisition phase (Supplementary Fig. 1), and subjects could freely explore the objects for 10 min. An exploration index for the novel object, reflecting object memory, was further obtained.

### Location of object recognition task (LOR)

On day 6, each mouse was placed in the arena and could freely explore the same objects used on day 5 for 10 min for the acquisition phase (see Supplementary Fig. 1). The objects were placed in the same position as on day 5 and are referred to as location 1 (L1) and location 2 (L2) in Fig. 5B. On day 7, the object located in L1 was placed in the same position as in the acquisition phase (“familiar location”, FL), and the object located in L2 was placed in a “novel location” (NL). Mice could freely explore the objects for 10 min (see

Supplementary Fig. 1). An exploration index for the object in the novel location, reflecting place memory, was further obtained.

The results were expressed as an exploration index (EI) that was calculated as the time spent exploring (in seconds) a specific object over the total exploration time (both objects)  $IE = [\text{object 1}/(\text{object 1} + \text{object 2})]$ . An EI equal to 0.5 indicates no preference for any object or location, while an EI higher than 0.5 is considered a preference for an object or a location. Exploration was considered as pointing the nose to an object at 2 cm or less and touching it with the nose. Turning around, sitting on, climbing, or gnawing the objects was not considered exploratory behavior.

## Data analysis

The data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The number of animals tested is indicated in each case. One-way analysis of variance (ANOVA) tests were used to assess statistical significance followed by post hoc tests, as indicated in the corresponding figures. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant in all cases.

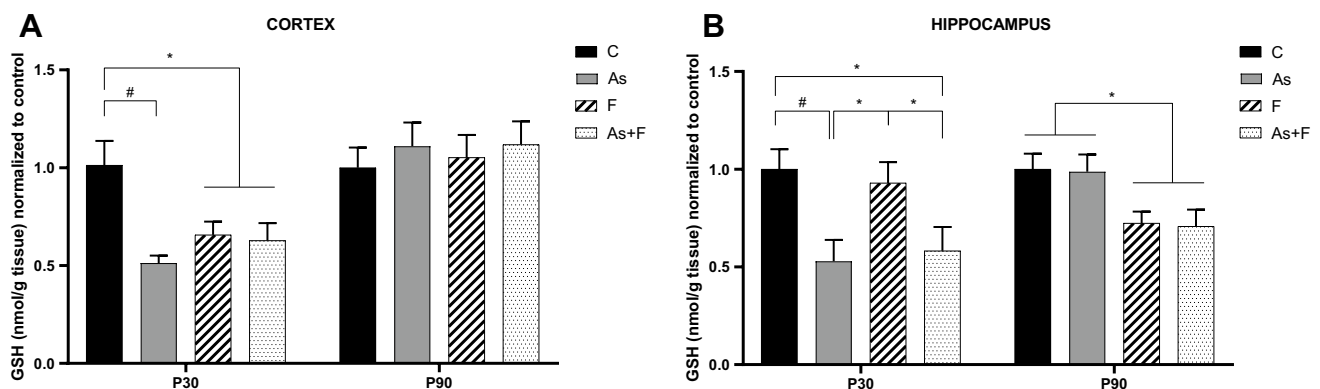
## Results

Exposed pregnant females did not show significant differences from the controls with respect to weight gain, food or water consumption, or litter size or weight at birth (data not shown). Pup weight gain was also similar during and after lactation. To investigate the effects of exposure in the offspring, we determined the content of arsenical species (inorganic and methylated forms) in the cortex and hippocampus in mice at P30 and P90. In most mammals, including humans, inorganic As is reduced and methylated into mono-methylated and di-methylated trivalent and pentavalent

forms and conjugated with GSH in most tissues, including the brain (Sánchez-Peña et al. 2010). Total As levels in the cortex were higher than those in the hippocampus. The levels of methylated As species in the mouse cortex of animals exposed to As were significantly higher than those exposed to As + F at P30 (As:  $8.64 \pm 1.54$  vs. As + F:  $3.76 \pm 2.21$  ng/g tissue), while this difference was not observed at P90 (As:  $4.37 \pm 0.67$  vs. As + F:  $5.47 \pm 1.69$  ng/g tissue). The levels of methylated As species in the hippocampus were not significantly different at P30 or P90 (As:  $3.81 \pm 0.39$  vs. As + F:  $3.35 \pm 1.95$  ng/g tissue; As:  $1.65 \pm 1.27$  vs. As + F:  $1.92 \pm 1.05$  ng/g tissue, respectively). During lactation, animals are not exposed to As due to the inability of As to accumulate in maternal milk. The higher levels observed at P30 compared with P90 could be a boost in accumulation after the restart of exposure after ending the lactation period (Hughes et al. 2003). In contrast, we observed similar levels of F in the cortex among groups. The F concentrations determined in the P90 pooled cortex samples were  $0.019 \mu\text{g/g}$  in control,  $0.023 \mu\text{g/g}$  in As exposed group,  $0.019 \mu\text{g/g}$  in F-exposed group, and  $0.023 \mu\text{g/g}$  in the combined AS + F group. F concentration in soft tissues such as the brain is usually low and also dose- and time-dependent (Inkielewicz and Krechniak, 2003). A few studies have reported its accumulation in brain using higher doses and longer periods of exposure than those used here (Inkielewicz and Krechniak, 2003; Sharma et al. 2022).

## GSH levels in the cortex and hippocampus are affected by combined exposure to As and F

At P30, the levels of reduced GSH were significantly decreased in the cortex of animals exposed to As, F, or As + F (Fig. 1A), while at P90, the level of GSH in all groups was similar to that of controls, suggesting that GSH synthesis increased in the exposed groups after P30. In contrast,



**Fig. 1** Effect of As and F exposure on GSH. GSH levels in the mouse cortex (A) and hippocampus (B) at P30 and P90. Bars show means  $\pm$  SEMs, normalized against controls. Data were analyzed by

two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc analysis. \* $P < 0.05$ , # $P < 0.01$ ,  $n = 7$

in the hippocampus, GSH levels were significantly lower at P30 in the As and As + F groups, while mice exposed to F showed levels similar to control. At P90, only mice receiving F or As + F showed significantly lower levels of GSH (Fig. 1B). These results suggest that the hippocampus shows evidence of continued oxidative stress by As + F due to the significantly lower levels of reduced GSH. Additionally, the combination As + F showed different impacts on the GSH system depending on age and brain region.

### CBS and CSE activity inhibition is associated with lower GSH levels in As- and F-exposed mice

Cysteine bioavailability is a limiting factor for GSH synthesis and the maintenance of adequate levels of GSH in cells. We investigated the expression and activity of CBS and CSE. CBS and CSE protein levels in the cortex or in the hippocampus were not altered at P30 or P90 (Supplementary Fig. 2A, B). However, inhibition of the enzymatic activity measured as H<sub>2</sub>S production was observed in groups exposed to As and F. In the cortex, activity at P30 was initially reduced, and then, the activity of the enzymes at P90 increased, especially in the As + F group; this observation could be linked to the decrease (P30) and later (P90) increase in GSH levels, respectively (Fig. 1A). In contrast, H<sub>2</sub>S production in the hippocampus was reduced in all exposed groups compared to the control at P30 and continued to be inhibited or reduced in the F- and As + F-exposed groups at P90 (Fig. 2A, B, Supplementary 2C), which coincides with the lower levels of GSH observed at P90.

### Expression of cystine/glutamate, cysteine, and glutamate transporters

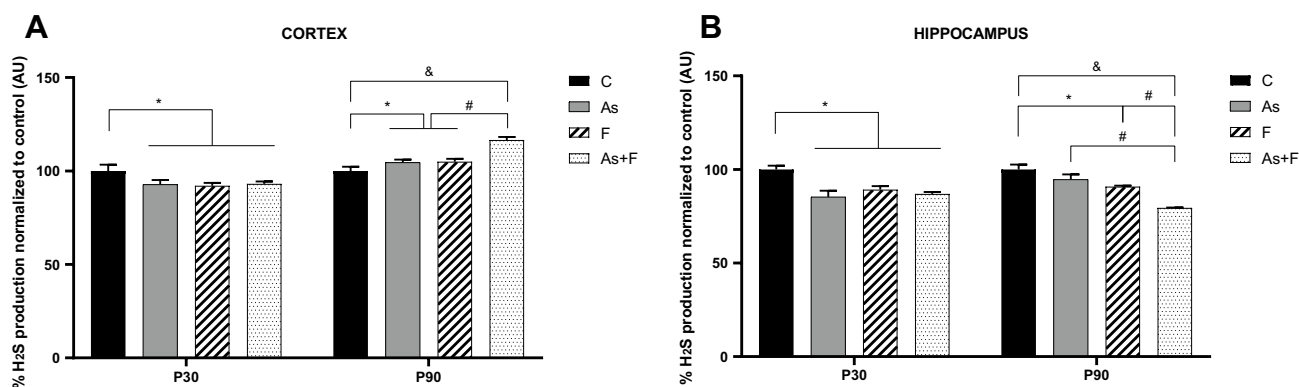
A significant reduction in EAAT2 protein levels (glutamate importer) was observed in the cortex at P90 in the

As + F-exposed group (Fig. 3A). Simultaneously, in the hippocampus, we observed an important reduction in the level of xCT at the mRNA and protein levels at P90 in the group exposed to As and/or F compared to the control group and of EAAT2 in the mice exposed to F (Fig. 3B).

### Modulation of ionotropic glutamate receptor expression and glutamate synthesis

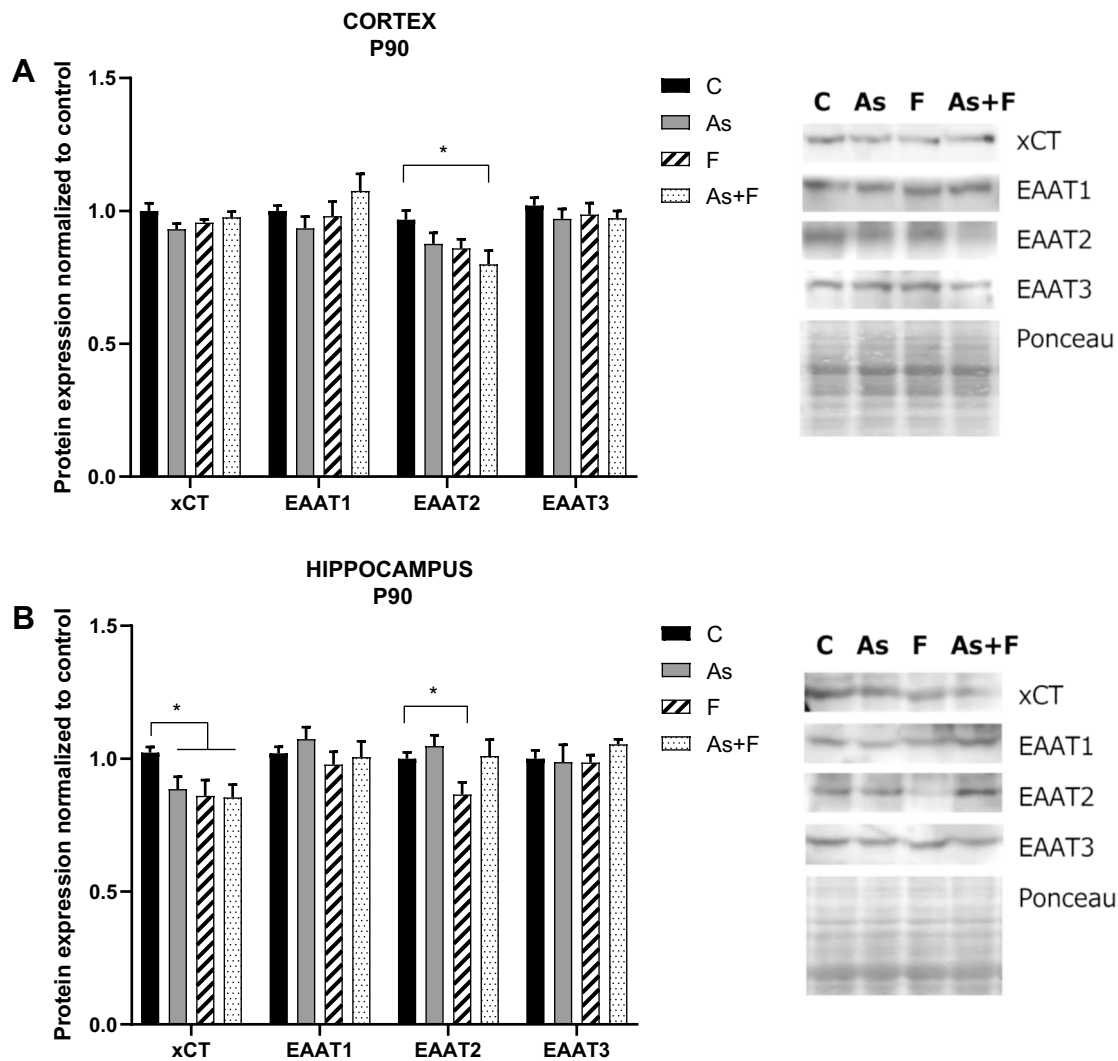
Alterations in glutamatergic transmission have been associated with neurological impairment after As or F exposure (Tyler and Allan 2014; Agalakova and Nadei 2020). Here, we observed crucial differences between glutamate receptor subunit expressions in exposed animals at P90, the time when the behavioral tasks were performed. In the cortex, As exposure reduced the expression levels of GluA1 and GluA2, but no changes were observed in NR2A or NR2B subunits. F exposure increased the protein levels of NR2A without altering AMPAR expression. In contrast, As + F exposure reduced the protein levels of GluA1 and increased the levels of NR2A (Fig. 4A).

In the hippocampus, no changes were observed in AMPAR at P90, but an increase in NR2A and a decrease in NR2B in the F and As + F groups were observed at this same time point (Fig. 4B). In addition, we tested the expression of PSD95 and synaptophysin in the cortex and hippocampus as biomarkers of general postsynaptic protein distribution and arrangement and vesicular density, respectively. We did not observe significant alterations in any of the protein contents, suggesting that glutamate synaptic transmission is more discretely modulated at the doses tested compared to the ultrastructural modification of the synapse observed in other models exposed to higher doses (Luo et al. 2009; Huo et al. 2015).



**Fig. 2** H<sub>2</sub>S production in the mouse cortex (A) and hippocampus (B) at P30 and P90. Bars show means  $\pm$  SEMs of the densitometric measurement of PbS spots formed, normalized against controls. Data were

analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc analysis. \* $P < 0.05$ , # $P < 0.01$ , &  $P < 0.0001$ ,  $n = 5$  (a)  $n = 7$  (b)



**Fig. 3** Cystine/glutamate and glutamate transporter expression in the mouse cortex (**A**) and hippocampus (**B**) at P90. Bars show means  $\pm$  SEMs of the densitometric determination of Western blot

images normalized against total protein stain as loading control and expressed respect to controls. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc analysis. \* $P < 0.05$ ,  $n = 6$

### De novo glutamate synthesis

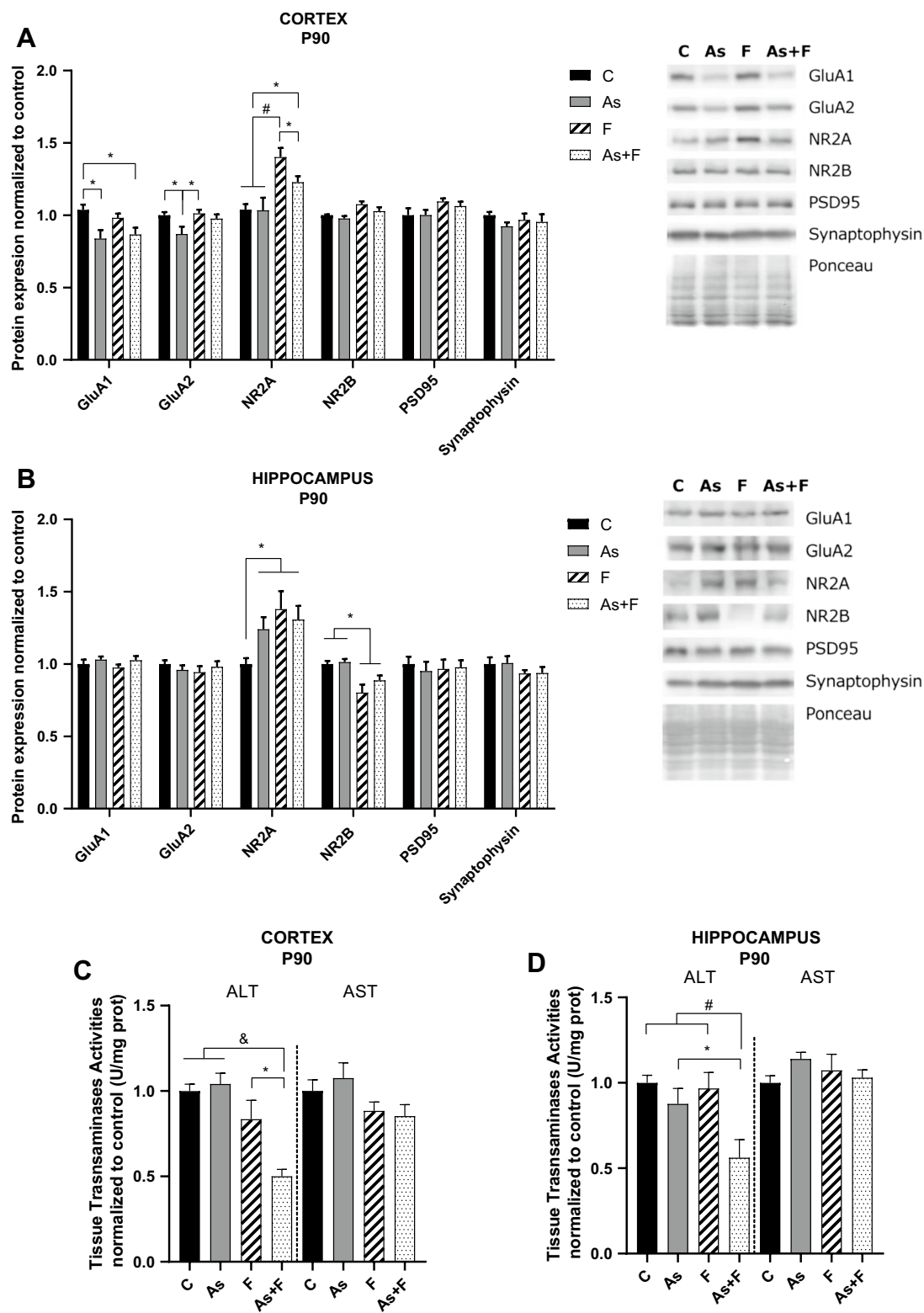
ALT and AST are responsible for de novo glutamate synthesis in the brain. A significant reduction in ALT activity was observed in the cortex and hippocampus at P90 in the As + F group. These results suggest an important alteration in glutamate availability in the brain (Fig. 4C, D).

### Memory impairment after combined exposure to As and F

Memory performance was assessed using the following recognition tasks: the novel object recognition (NOR) and the location object recognition (LOR) tests to establish a possible association between the observed molecular alterations and behavioral impairments. NOR has a meaningful

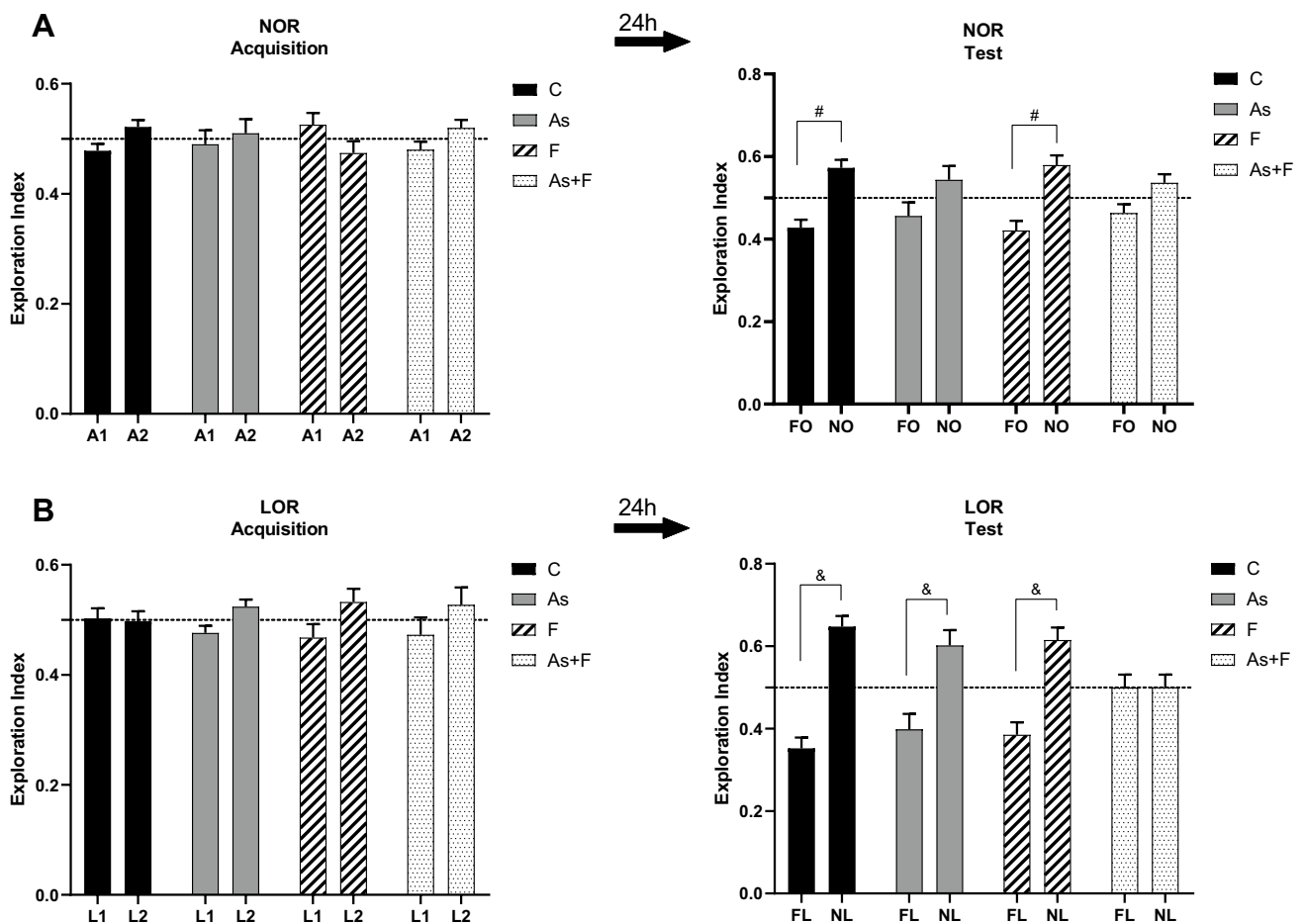
cortex participation, while the LOR has a critical spatial memory component that involves the hippocampus (Vogel-Ciernia and Wood 2014). The analysis of the open-field test performed prior to the NOR task did not show significant motility, alteration in exploration behavior, or anxiety-like behavior induced by As or F treatment (Supplementary Fig. 3), which was important for the further interpretation of memory performance (Vogel-Ciernia and Wood 2014). During the acquisition phase in both tasks, NOR and LOR, no preference was observed for the two identical objects, as expected (Fig. 5A and B). In the test phase of NOR, mice exposed to As and to As + F could not discriminate the novel object (NO) in contrast to the control group, suggesting a memory impairment related to the cortex region (Fig. 5A). In the LOR test phase, we also observed an impairment in the ability to discriminate the novel location (NL) in the





**Fig. 4** Glutamate ionotropic receptor subunit, PSD95, and synaptophysin protein expression in mouse cortex (A) and hippocampus (B) on P90. Bars represent means  $\pm$  SEMs of densitometric determination of Western blot images normalized against total protein stain as loading control and expressed respect to controls. Data were analyzed

by two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc analysis ( $n=6$ ). Brain tissue transaminase activity at P90 in the cortex and hippocampus (C-D). Bars represent means  $\pm$  SEMs. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc analysis ( $n=7$ ). \* $P < 0.05$ , # $P < 0.01$ , &  $P < 0.0001$



**Fig. 5** Memory impairment in the novel object recognition (NOR) and location of object recognition (LOR) tasks at P90 in animals exposed to As and As+F. **A**) Exploration index (EI) during object acquisition (left graph) and the test phase of NOR (right graph). During acquisition, animals explored the two identical objects for a similar amount of time, showing no difference in the EI. During the test phase (right panel), animals exposed to As and As+F did not display a significant EI for the novel object (NO). **B**) EI during the acquisition (left graph) and test phases (right graph) of LOR. During acquisition, animals explored the objects in the known locations

for a similar amount of time, showing no difference in the EI. During the test phase (right panel), all groups spent more time exploring the novel location except for the As+F group. EI equal to 0.5 indicates no preference for any particular object/location, while a value higher than 0.5 indicates a preference for an object/location. A1 and A2 are identical objects; NO is a novel object; FL indicates familiar location; NL indicates novel location. Mean  $\pm$  SEM.  $n=6$  (control, As+F),  $n=8$  (As),  $n=7$  (F) two-way ANOVA, post hoc test: Tukey's test. # $P<0.01$ , &  $P<0.0001$

group exposed to As + F (Fig. 5B,  $p < 0.05$ ), which suggests an impairment in spatial memory.

## Discussion

Groundwater contamination with As and F is common in arid and semiarid regions from Latin America, Asia, and Africa, affecting over 300 million people worldwide. Unfortunately, overexploitation of groundwater increases the concentration of toxic elements (Schmoll et al. 2006; Falkenmark 2009). In many of these regions, as in México, populations have been exposed for generations to groundwater with elevated levels of As and F (Limón-Pacheco 2018).

This condition has caused detrimental effects on their quality of life due to the higher prevalence of cardiovascular, renal, hepatic, reproductive, and neurological diseases (Mondal and Chattopadhyay 2020). Learning and memory impairments have been documented in children exposed to As or F worldwide (Tyler and Allan 2014; Agalakova and Nadei 2020). Using a mouse model, we have previously reported that exposure to inorganic As in drinking water starting at gestation alters the homeostasis of GSH and disrupts the availability of glutamate in the hippocampus, which was associated with altered ionotropic glutamate receptor expression, and to impaired memory (Ramos-Chavez et al. 2015; Nelson-Mora et al. 2018). On the other hand, F also induces an imbalance in redox homeostasis in the brain and affects

glutamatergic transmission, as reviewed by Agalakova and Nadei (2020).

In this work, we further show that As + F exposure combined in drinking water led to an important reduction in GSH levels at P30 and P90 in the cortex and hippocampus (Fig. 1). The decrease in GSH levels was shown to occur along a reduction in CBS and CSE activities and xCT protein expression in the hippocampus at P90. In the cortex at P90, GSH levels were recovered in association with an induction in CBS and CSE activity (Figs. 2 and 3). Significantly lower levels of GSH, xCT downregulation, and transsulfuration inhibition could lead to ferroptosis in the hippocampus (Stockwell et al. 2020), although additional experiments are needed to further strengthen these suggestions.

On the other hand, the modulation in the transsulfuration pathway could be due to allosteric regulation. S-adenosyl-methionine (SAM) is an allosteric activator of CBS (Prudova et al. 2006). However, SAM levels could be diminished due to As methylation (Sánchez-Peña et al. 2010) and by F-induced inhibition of methionine adenosyl-transferase (al-Khafaji et al. 1998). Determining the SAM levels in this model would clarify whether the transsulfuration pathway inhibition observed in the hippocampus and cortex (P30) is mediated by SAM bioavailability alteration.

On the contrary, the activity of the pathway could be induced under toxic conditions. The increase in transsulfuration observed in the cortex at P90 (Fig. 2A), especially in the group exposed to the combination of As + F, could be associated with a higher accumulation of both elements combined in that and, therefore, a synergistic induction of adaptive response to overcome redox imbalance.

As mentioned before, changes in GSH levels could lead to altered glutamate homeostasis. The As + F exposure group showed greater effects on transporters and enzymes that regulate glutamate levels, including the inhibition of transaminase activity and the decreased expression of EAAT2 and xCT (Fig. 4C and Fig. 3, respectively). EAAT2 is the major member of the EAAT family present in the forebrain and is found primarily in astrocytes and neurons. EAAT2 is responsible for the most glutamate uptake; therefore, downregulation in its expression could alter glutamate homeostasis. In addition, a reduction in xCT levels in the hippocampus can also contribute to altered extracellular glutamate levels (De Bundel et al. 2011).

In this work, we observed that chronic exposure to As + F resulted in lower ALT activity (Fig. 4C). Previous work has shown that inhibition of glutamate transaminases by F exposure is associated with a reduction in total glutamate contents in the brain (Niu et al. 2009; Bartos et al. 2022). However, according to Andersen et al. (2021), ALT contribution to glutamate synthesis is less important than that of the glutamine–glutamate shuttle. Nonetheless, ALT activity could be important for glutamate buffering in astrocytes

and ammonium recycling during the glutamine–glutamate shuttle. Erecinska et al. (1994) and Westergaard et al. (1993) showed that ALT activity is higher in astrocytes during glutamate degradation and alanine synthesis, favoring alanine release from astrocytes and its uptake by neurons. Moreover, the opposite cycling direction has been proposed to contribute to ammonium recycling (Schousboe et al. 2003). Although we cannot attribute the decreased ALT activity to a specific cell type or cellular location, alterations in its activity can clearly result in important alterations in glutamate metabolism and homeostasis.

The results obtained thus far suggest that As + F exposure alters glutamate homeostasis. Most likely associated with this, we observed that As or F exposure altered the proportion of AMPAR and NMDAR subunit expression in the cortex and hippocampus (Fig. 4A, B). Similar alterations in receptor expression have been observed previously for AMPAR and NMDAR expression after As or F exposure (Ramos-Chavez et al. 2015; Nelson-Mora et al. 2018; Sun et al. 2018; Yang et al. 2018); although at higher doses, both downregulated NR2A expression (Luo et al. 2009; Sun et al. 2018) (Fig. 4A).

NOR and LOR test results showed an important impairment in memory in mice exposed to As + F in tasks dependent on the cortex and hippocampus at P90 (Fig. 5). Other studies have shown that after exposure to As or F, memory impairment occurs in different hippocampal-dependent tasks, such as the water maze and location object recognition tests (Liu et al. 2014; Huo et al. 2015; Ramos-Chavez et al. 2015). However, some of these studies used higher doses of both elements. Here, we observed that As + F caused alterations in both tasks, in contrast to As or F exposure alone. Interestingly, in As-treated animals, the impairment seen in the cortex-dependent task could be associated with the higher accumulation of As in this brain region, as compared to the hippocampus. Moreover, memory impairment in this task occurred along alterations in AMPAR and NMDAR expression induced by the combination of As + F.

An increase in NR2A has been associated with memory impairment in different behavioral tasks, including object recognition (Cui et al. 2013). Additionally, reduction and ablation of the NR2B subunit in the forebrain result in impaired LTP and impaired performance in different spatial and nonspatial memory tasks (Clayton et al. 2002; von Engelhardt et al. 2008). The change in the NR2A/NR2B ratio, as a result of altered subunit expression, modifies the threshold for bidirectional synaptic plasticity (LTP or LTD) and influences spatial learning behavior (Bach et al. 1995; Zeng et al. 2001). The recruitment of AMPAR, especially GluA1-containing receptors to the synaptic area by electrophysiological-induced activity, results in the maturation and functional activation of the synapse as well as of its potentiation (Kessels and Malinow 2009).



The reduction in the expression levels of receptors in the brain could result in improper postsynaptic activation, signal transduction, and memory codification.

Alterations in brain glutamate metabolism and availability as a result of redox imbalance during chronic exposure to As + F could lead to altered expression of glutamate receptors and learning and memory impairments as those observed in exposed subjects. Nevertheless, additional investigation regarding the activity of enzymes involved in the glutamine–glutamate cycle, extracellular glutamate levels, and glutamate vesicle release activity could better clarify the impact of these alterations on glutamate neurotransmitter availability. Moreover, electrophysiological evaluations could help explain the impact of As + F on glutamatergic synapses. It will also be interesting to evaluate whether these changes in glutamate receptor expression could also result in poor dendritic spine maturation (Haas et al. 2006) and altered brain interconnections.

Finally, this study, which involved mice exposed to biologically relevant levels of As and F, provides new insights into the alteration in transsulfuration pathway as a possible mechanism of xenobiotic-induced neurotoxicity, considering its involvement in H<sub>2</sub>S and cysteine production and their function in the brain. Future studies should explore the inhibition of the transsulfuration pathway by other xenobiotics in the CNS.

## Conclusion

Male mouse offspring exposed to As + F in combination through drinking water, starting at gestation, showed memory impairments at P90. These behavioral observations were associated with a downregulation of GSH levels and transsulfuration pathway activity and with a decrease in the levels of glutamate transporters as well as with a reduction in de novo synthesis of glutamate, suggesting an altered glutamate availability. Additionally, we observed changes in the proportion of NMDA glutamate receptor subunits, which may add to an imbalance in excitatory neurotransmission.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03556-7>.

**Funding** WLG-A: received scholarship No. 858601 from CONACYT. This work was funded by the “Salud y Ambiente” program from Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Agalakova NI, Nadei OV (2020) Inorganic fluoride and functions of brain. *Crit Rev Toxicol* 50(1):28–46. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1722061>
- Alfaro de la Torre MC, Ortiz Pérez MD, Alarcón MT, Martínez Cruz DA, Ledón JM (2018) Chapter 2. Inventario Nacional de Calidad del Agua. Arsénico y fluoruro en agua: riesgos y perspectivas desde la sociedad civil y la academia en México. p 31–56
- Al-Khafaji F, Bowron A, Day AP, Scott J, Stansbie D (1998) Stabilization of blood homocysteine by 3-deazaadenosine. *Ann Clin Biochem* 35(Pt 6):780–782. <https://doi.org/10.1177/000456329803500612>
- Andersen JV, Markussen KH, Jakobsen E et al (2021) Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology* 196:108719. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108719>
- Bach ME, Hawkins RD, Osman M, Kandel ER, Mayford M (1995) Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell* 81(6):905–915. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90010-1)
- Bartos M, Gumilar F, Baier CJ et al (2022) Rat developmental fluoride exposure affects retention memory, leads to a depressive-like behavior, and induces biochemical changes in offspring rat brains. *Neurotoxicology* 93:222–232. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.10.006>
- Chouhan S, Flora SJ (2010) Arsenic and fluoride: two major ground water pollutants. *Indian J Exp Biol* 48(7):666–678
- Clayton DA, Mesches MH, Alvarez E, Bickford PC, Browning MD (2002) A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J Neurosci* 22(9):3628–3637. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-09-03628.2002>
- Council NR (2006) Fluoride in drinking water: a scientific review of EPA's standards. The National Academies Press, Washington
- Cui Z, Feng R, Jacobs S et al (2013) Increased NR2A:NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory. *Sci Rep* 3(1):1036. <https://doi.org/10.1038/srep01036>
- Currier JM, Svoboda M, Matoušek T, Dědina J, Stýblo M (2011) Direct analysis and stability of methylated trivalent arsenic metabolites in cells and tissues. *Metallomics* 3(12):1347–1354. <https://doi.org/10.1039/c1mt00095k>
- De Bundel D, Schallier A, Loyens E et al (2011) Loss of system x(c)- does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *J Neurosci* 31(15):5792–5803. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5465-10.2011>
- Erecińska M, Nelson D, Nissim I, Daikhin Y, Yudkoff M (1994) Cerebral alanine transport and alanine aminotransferase reaction: alanine as a source of neuronal glutamate. *J Neurochem*

- 62(5):1953–1964. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.62051953.x>
- Falkenmark M (2009) Water and the next generation—towards a more consistent approach. In: Biswas AK, Tortajada C, Izquierdo R (eds) *Water management in 2020 and beyond*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 65–87
- Haas K, Li J, Cline HT (2006) AMPA receptors regulate experience-dependent dendritic arbor growth in vivo. *PNAS* 103(32):12127–12131
- Hassel B, Dingledine R (2012) Chapter 17—glutamate and glutamate receptors. In: Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL (eds) *Basic neurochemistry*, 8th edn. Academic Press, New York, pp 342–366
- Hernández-Zavala A, Matoušek T, Drobná Z et al (2008) Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer). *J Anal at Spectrom* 23(3):342–351. <https://doi.org/10.1039/B706144G>
- Howard G, Bartram J, Pedley S, Smoll O, Chorus I, Berger P (2006) Section I, Chapter 1, Groundwater and public health. In: Schmoll O, et al. (eds) *Protecting groundwater for health: managing the quality of drinking-water sources* / edited by World Health Organization, Geneva pp 3–19. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43186>
- Hughes MF, Kenyon EM, Edwards BC, Mitchell CT, Razo LM, Thomas DJ (2003) Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicol Appl Pharmacol* 191(3):202–210. [https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(03\)00249-7](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(03)00249-7)
- Huo TG, Li WK, Zhang YH et al (2015) Excitotoxicity induced by realgar 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>
- Inkielewicz I, Krechniak J (2003) Fluoride content in soft tissues and urine of rats exposed to sodium fluoride in drinking water. *Fluoride* 36:263–266
- Kessels HW, Malinow R (2009) Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* 61(3):340–350. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.015>
- Limón-Pacheco JH, Jiménez-Córdova MI, Cárdenas-González M, Sánchez Retana IM, Gonsebatt ME, Del Razo LM (2018) Potential co-exposure to arsenic and fluoride and biomonitoring equivalents for mexican children. *Ann Glob Health* 84(2):257–273. <https://doi.org/10.29024/aogh.913>
- Liu F, Ma J, Zhang H et al (2014) Fluoride exposure during development affects both cognition and emotion in mice. *Physiol Behav* 124:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.10.027>
- Lu SC (2013) Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1830(5):3143–3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
- Luo JH, Qiu ZQ, Shu WQ, Zhang YY, Zhang L, Chen JA (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>
- Mondal P, Chattopadhyay A (2020) Environmental exposure of arsenic and fluoride and their combined toxicity: a recent update. *J Appl Toxicol* 40(5):552–566. <https://doi.org/10.1002/jat.3931>
- Moreno-Castilla P, Pérez-Ortega R, Violante-Soria V, Balderas I, Bermúdez-Rattoni F (2017) Hippocampal release of dopamine and norepinephrine encodes novel contextual information. *Hippocampus* 27(5):547–557. <https://doi.org/10.1002/hipo.22711>
- Nelson-Mora J, Escobar ML, Rodríguez-Duran L et al (2018) 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. *Arch Toxicol* 92(3):1037–1048. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2111-x>
- Niu R, Sun Z, Cheng Z, Li Z, Wang J (2009) Decreased learning ability and low hippocampus glutamate in offspring rats exposed to fluoride and lead. *Environ Toxicol Pharmacol* 28(2):254–258. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.04.012>
- Paul BD, Sbodio JI, Snyder SH (2018) Cysteine metabolism in neuronal redox homeostasis. *Trends Pharmacol Sci* 39(5):513–524. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.02.007>
- Prudova A, Bauman Z, Braun A, Vitvitsky V, Lu SC, Banerjee R (2006) S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine beta-synthase and modulates redox capacity. *PNAS* 103(17):6489–6494. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509531103>
- Ramos-Chavez LA, Rendon-Lopez CR, Zepeda A, Silva-Adaya D, Del Razo LM, Gonsebatt ME (2015) Neurological effects of inorganic arsenic exposure: altered cysteine/glutamate transport, NMDA expression and spatial memory impairment. *Front Cell Neurosci* 9:21. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00021>
- Reitman S, Frankel S (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 28(1):56–63. <https://doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56>
- Rigalli A, Puche RC (2007) Determinación de la concentración de Fluór en Muestras Biológicas. *Actualiz Osteol* 3(1):27–34
- Sánchez-Peña LC, Petrosyan P, Morales M et al (2010) Arsenic species, AS3MT amount, and AS3MT gen 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>
- Schousboe A, Sonnewald U, Waagepetersen HS (2003) Differential roles of alanine in GABAergic and glutamatergic neurons. *Neurochem Int* 43(4–5):311–315. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(03\)00017-2](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(03)00017-2)
- 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/10.1006/abio.2000.4498>
- Sharma P, Verma PK, Sood S et al (2022) Distribution of fluoride in plasma, brain, and bones and associated oxidative damage after induced chronic fluorosis in wistar rats. *Biol Trace Elem Res* 200:1710–1721. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02782-3>
- Silva-Adaya D, Ramos-Chavez LA, Petrosyan P, Gonzalez-Alfonso WL, Perez-Acosta A, Gonsebatt ME (2020) Early neurotoxic effects of inorganic arsenic modulate cortical GSH levels associated with the activation of the Nrf2 and NFKappaB pathways, expression of amino acid transporters and NMDA receptors and the production of hydrogen sulfide. *Front Cell Neurosci* 14:17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00017>
- Stockwell BR, Jiang X, Gu W (2020) Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis. *Trends Cell Biol* 30(6):478–490. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.02.009>
- Sun Z, Zhang Y, Xue X, Niu R, Wang J (2018) Maternal fluoride exposure during gestation and lactation decreased learning and memory ability, and glutamate receptor mRNA expressions of mouse pups. *Hum Exp Toxicol* 37(1):87–93. <https://doi.org/10.1177/0960327117693067>
- 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 (1999) Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Sci Prog* 82(1):69–88. <https://doi.org/10.1177/003685049908200104>
- Valdovinos-Flores C, Gonsebatt ME (2012) 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>
- Vogel-Ciernia A, Wood MA (2014) Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci*. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0831s69>
- von Engelhardt J, Doganci B, Jensen V et al (2008) Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks. *Neuron* 60(5):846–860. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.039>
- Westergaard N, Varming T, Peng L, Sonnewald U, Hertz L, Schousboe A (1993) Uptake, release, and metabolism of alanine in neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurosci Res* 35(5):540–545. <https://doi.org/10.1002/jnr.490350510>
- Yang L, Jin P, Wang X, Zhou Q, Lin X, Xi S (2018) Fluoride activates microglia, secretes inflammatory factors and influences synaptic neuron plasticity in the hippocampus of rats. *Neurotoxicology* 69:108–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.09.006>
- Zeng H, Chattarji S, Barbarosie M et al (2001) Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell* 107(5):617–629. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00585-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00585-2)

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.