



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DE LA MODULACIÓN DEL CATABOLISMO DEL TRIPTÓFANO EN EL
DETERIORO COGNITIVO INDUCIDO POR LA INTOXICACIÓN CON PLOMO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias**

**PRESENTA:
BIÓL. PAULINA OVALLE RODRÍGUEZ**

**DRA. VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía**

**DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Instituto de Ciencias Biomédicas**

**DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Facultad de Química**

Ciudad de México. Octubre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM por la oportunidad que me otorgó de continuar desarrollándome profesionalmente; así como por la asesoría brindada durante mi estancia en la maestría.

Asimismo, un agradecimiento a CONACyT por el apoyo económico para poder llevar a cabo este proyecto de investigación.

Agradezco profundamente la asesoría, apoyo y retroalimentación de la Dra. Verónica Pérez quien dirigió este proyecto y confió en mí desde hace varios años atrás. Gracias por fomentar un ambiente de trabajo donde me sentí segura, querida y apoyada en todo momento, donde crecí no solo académica si no personalmente. Estoy segura que no pude haber encontrado otro laboratorio mejor. Ha sido un gran ejemplo para mí porque me ha impulsado a luchar por mis convicciones y sueños, a no desistir en el camino para lograr convertirme en la mujer profesional que he imaginado desde que soy niña; con mucho cariño siempre la llevaré en el corazón.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. María Eugenia Gonsebatt y el Dr. José Pedraza por el apoyo, tiempo y conocimiento brindados en los tutorales, por sus comentarios, correcciones y asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

Gracias a la Dra. Dinora y al Dr. Benjamín por sus comentarios, conocimiento y retroalimentación a este proyecto, así como por su amistad, confianza y amabilidad a través de los años.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

El mayor agradecimiento es a mi mamá, por ser quien ha estado para mí y confiado en mis capacidades para llegar hasta este punto, por todos los desvelos que aguantó conmigo, por motivarme a continuar cuando tenía crisis existenciales durante esta etapa, por todas las veces que se levantó temprano para prepararme el desayuno y despedirse de mí. Eres una mujer excepcional, gracias mami por ser la mejor del mundo, eres la persona a la que más amo. Sin ti no lo hubiéramos logrado porque sí, este logro es de ambas.

Gracias papá por ser parte de este proceso tan importante, por estar presente en mi vida y apoyarme más que nunca. Me siento muy feliz por compartir el tiempo que nos debíamos y crear momentos divertidos que recordaré toda mi vida.

Agradezco a mi hermana Dany por apoyarme, creer en mí, motivarme y acompañarme durante el camino. Sabes que eres una de mis mujeres favoritas y nunca tendré palabras para decirte lo mucho que te amo y que estaremos juntas hasta el final. Gracias por ser mi gran ejemplo y motivación para lograr todo lo que me propongo, por recordarme lo valiosa y capaz que soy.

A mi sobrina por ser la hermana pequeña que no tuve, a la que amo con el alma y de la que cuidaré por siempre, gracias por estar para mí, por tu cariño y confianza plena. Soy la tía más orgullosa por tenerte en mi vida, verte crecer, y poder compartir mutuamente nuestros logros no solo personales, sino también académicos. Recuerda que puedes ser lo que tú quieras y estoy para ayudarte a llegar a la meta.

A mi cuñado por ser una parte esencial de mi vida y familia, gracias porque eres un gran ejemplo de trabajo, resiliencia, así como un excelente papá, esposo y el mejor cuñado. No me imagino mi vida sin alguno de ustedes. Te adoro, mugroso.

A Dany, la mejor amiga que pude encontrar en el laboratorio y en la vida, quien me apoya en todo momento, trabajamos juntas siendo un gran equipo y obtenemos resultados increíbles. Gracias por tu hermosa amistad, confianza y cartas cursis; por enseñarme todo lo que sé en este punto, por las aventuras vividas y las que faltan. Te amo y siempre te recuerdo lo exitosa, trabajadora y hermosa que eres, te mereces todo lo bonito de la vida y mucho más.

Gracias Tona por tu amistad, aventuras, consejos, comentarios y apoyo tanto académico como personal. Eres una gran amiga y admiro tu inteligencia, siempre tienes ideas nuevas o propuestas, te admiro demasiado.

A Jorge, mi mejor amigo desde hace más de 15 años por estar al pendiente y que a la par cursábamos la maestría, siempre en sintonía y apoyándonos, alegrándonos por los logros del otro y festejando a lo grande. Gracias por escucharme y prestarme tu hombro cada que lo necesito. Te amo mucho.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	4
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	11
1. Generalidades del plomo.....	11
2. Intoxicación por plomo en la población mexicana.....	12
2.1 Alteraciones bioquímicas relacionadas con la intoxicación por plomo	13
2.2 Alteraciones conductuales en humanos por intoxicación de plomo.....	15
3. Modelos experimentales.....	15
4. Aprendizaje y memoria.....	16
4.1 Hipocampo y receptores NMDA involucrados en el aprendizaje y memoria.....	17
5. Catabolismo del triptófano a través de la vía de las kinureninas	19
5.1 Ácido kinurénico (KYNA)	20
5.2 N-Acetilcisteína.....	23
5.2.1 Efecto de NAC en los niveles de GSH.....	24
ANTECEDENTES	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25

METODOLOGÍA.....	26
1. Animales.....	26
1.1 Formación de grupos.....	26
Evaluación conductual.....	27
2.1 Prueba de reconocimiento de objeto novedoso (RON)	27
2.2 Prueba de ubicación de alimento enterrado.....	28
3. Cuantificación de niveles de GSH y GSSG.....	29
4. Actividad de KAT II y niveles de KYNA.....	29
5. Determinación de peroxidación de lípidos (PL).....	30
6. Cuantificación de proteína por Lowry.....	30
Estadística.....	30
RESULTADOS.....	31
1.1 Efecto de la N-Acetilcisteína en las alteraciones cognitivas inducidas por la exposición a plomo durante el periodo de lactancia en ratones.....	31
1.2 Efecto de la administración de NAC en los niveles de KYNA y actividad enzimática de KAT II de ratones expuestos a Pb ²⁺ durante el periodo de lactancia.....	33
1.3 Efecto de NAC en las alteraciones redox cerebrales inducidas por la exposición a Pb ²⁺ durante el periodo de lactancia.....	34
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIÓN.....	42
REFERENCIAS.....	43

ABREVIATURAS

▪ α7nAChR	Receptor alfa-7 nicotínico de acetilcolina
▪ δ-ALA	δ-aminolevulínico deshidratasa
▪ μg	Microgramos
▪ μL	Microlitros
▪ μM	Micromolar
▪ •OH	Radical hidroxilo
▪ 3-HANA	Ácido 3-hidroxiantranílico
▪ 3-HK	3-hidroxikinurena
▪ AcPb	Acetato de plomo
▪ AMPA	Receptor ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
▪ AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
▪ ANA	Ácido antranílico
▪ ATP	Adenosín trifosfato
▪ Ca²⁺	Ion calcio
▪ CaCl₂	Cloruro de calcio
▪ CaMKII	Calcio/calmodulina cinasa II
▪ CAT	Catalasa
▪ CREB	Elementos de respuesta a AMPC
▪ Cys	Cisteína
▪ dL	Decilitros
▪ DLP	Depresión a largo plazo
▪ DMT1	Transportador de metales divalentes catiónicas 1
▪ DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
▪ DPN	Día postnatal
▪ DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
▪ EPSP	Potencial postsináptico excitador deficiente
▪ ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
▪ EROs	Especies reactivas del oxígeno
▪ FeSO₄	Sulfato ferroso
▪ FONART	Fondo Nacional para el Fomento de las Artesanías
▪ g	Gramos
▪ GABA	Ácido γ-aminobutírico

▪ GPx	Glutación peroxidasa
▪ GR	Glutación reductasa
▪ Grx	Glutaredoxina
▪ GSH	Glutación reducido
▪ GSSG	Glutación oxidado
▪ H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
▪ HCl	Ácido clorhídrico
▪ HFE	Hemocromatosis hereditaria
▪ IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
▪ IEG	Transcripción para genes tempranos inmediatos
▪ IR	Índices de reconocimiento
▪ KAT	Kinurenina aminotransferasa
▪ KCl	Cloruro de potasio
▪ kg	Kilogramos
▪ KMO	Kinurenina monooxigenasa
▪ KYNA	Ácido kinurénico
▪ LCR	Líquido cefalorraquídeo humano
▪ L-KYN	L-kinurenina
▪ LTP	Long-term potentiation (Potenciación a largo plazo)
▪ MAPEG	Proteínas asociadas a la membrana en el metabolismo de eicosanoides y glutación
▪ MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
▪ MCP	Memoria a corto plazo
▪ MDA	Malondialdehído
▪ mg	Miligramos
▪ MG	Medias geométricas
▪ MgSO₄	Sulfato de magnesio
▪ Min	Minutos
▪ mL	Mililitros
▪ MLP	Memoria a largo plazo
▪ mM	Milimolar
▪ MT	Memoria de trabajo
▪ Na₂CO₃	Carbonato de sodio
▪ NaH₂PO₄	Fosfato monosódico
▪ NAC	N-acetilcisteína
▪ NaCl	Cloruro de sodio

▪ NAD+	Nicotinamida adenin dinucleótido
▪ NaOH	Hidróxido de sodio
▪ NF-kB	Factor nuclear <i>kappa B</i>
▪ nm	Nanómetros
▪ nmoles	Nanomoles
▪ NMDAr	Receptor N-metil-D-aspartato
▪ NPS	Niveles de plomo en sangre
▪ ONOO-	Peroxinitrito
▪ P5N	Pirimidina 5' nucleotidasa
▪ Pb²⁺	Plomo
▪ PIC	Ácido picolínico
▪ PK	Piruvato cinasa
▪ PKA	Piruvato cinasa A
▪ PKC	Piruvato cinasa C
▪ PL	Peroxidación de lípidos
▪ PP	Proteínas fosfatasas
▪ ppm	Partes por millón
▪ Prx	Peroxirredoxina
▪ QPRTasa	Quinolinato fosforribosiltransferasa
▪ QUIN	Ácido quinolínico
▪ RON	Reconocimiento de objeto novedoso
▪ -SH	Grupo tiol
▪ S.E.M.	Error estándar de la media
▪ Seg	Segundos
▪ SNC	Sistema Nervioso Central
▪ SOD	Superóxido dismutasa
▪ TBA	Ácido tiobarbitúrico
▪ TBA-RS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
▪ TCA	Ácido tricloroacético
▪ TDAH	Trastorno por déficit de atención e hiperactividad
▪ TDO	Triptófano 2,3- dioxigenasa
▪ Trp	Triptófano
▪ VK	Vía de las kinureninas

RESUMEN

El plomo (Pb^{2+}) es un metal ampliamente utilizado en la industria y en productos de consumo. La intoxicación por este metal es considerada un problema de salud pública debido a los efectos neurotóxicos y teratogénicos que induce. Se ha reportado que la exposición a plomo durante el neurodesarrollo conlleva alteraciones en el aprendizaje y memoria. Dentro de los mecanismos por los cuales este metal pesado induce neurotoxicidad resalta su interacción con sitios estereoespecíficos para cationes divalentes como Ca^{2+} y su habilidad de inducir un desequilibrio en la generación y remoción de especies reactivas de oxígeno. Recientemente, se describió que el catabolismo del triptófano a través de la vía de las kinureninas (VK) está relacionado con las alteraciones cognitivas inducidas por la exposición a plomo. Específicamente, el ácido kinurénico (KYNA), un metabolito de la VK, fue asociado directamente con las alteraciones en memoria producidas por la exposición a plomo durante la lactancia en roedores; este metabolito es un antagonista de NMDA α 7-nicotínicos. Se ha demostrado que la N-acetilcisteína (NAC) modula la producción de KYNA a través de la inhibición de la enzima kinurenina aminotransferasa II. El objetivo de este trabajo es determinar si la modulación de los niveles de KYNA a través de la administración de N-acetilcisteína atenúa las alteraciones cognitivas inducidas por la exposición a plomo durante la lactancia en ratones. Se formaron 4 grupos experimentales: Control, NAC, Pb^{2+} y Pb^{2+} +NAC. El grupo control recibió agua de la llave y pellets de dieta normal. Los ratones del grupo Pb^{2+} y Pb^{2+} +NAC fueron expuestos a 500 ppm de acetato de plomo en el agua de bebida; los grupos NAC y Pb^{2+} +NAC recibieron NAC 350 mg/día en pellets. Todos los tratamientos se administraron durante la lactancia (día 0-23 postnatal). Transcurrido el periodo de lactancia todos los grupos recibieron agua de la llave y pellets normales. A los dos meses de edad se evaluaron los parámetros cognitivos a través de las pruebas de reconocimiento de objeto novedoso y ubicación de alimento enterrado. Adicionalmente, se determinaron los niveles cerebrales del KYNA, la actividad de KAT II y el estado redox celular en todos los grupos experimentales. En la prueba de reconocimiento de objeto novedoso no se encontró diferencia significativa en la evaluación de memoria a corto plazo; en cambio, para la memoria a largo plazo el índice de reconocimiento del grupo de Pb^{2+} fue significativamente menor respecto a los grupos control y Pb^{2+} +NAC, donde los individuos no fueron capaces de discriminar entre un objeto novedoso y uno familiar. En la prueba de ubicación de alimento enterrado, el grupo de Pb^{2+} presentó déficit en la consolidación de la memoria, mientras que el grupo tratado paralelamente con NAC atenuó el daño cognitivo inducido por Pb^{2+} . Los niveles cerebrales de KYNA aumentaron en el grupo de Pb^{2+} y estos regresaron a niveles basales tras la coadministración con NAC. La actividad de la KAT II disminuyó significativamente solo en el grupo Pb^{2+} +NAC. Las alteraciones en el ambiente redox cerebral inducidas por Pb^{2+} fueron revertidas tras la coadministración con NAC. Este trabajo robustece la evidencia de que KYNA está implicado en el deterioro cognitivo inducido por plomo y que la modulación de su formación representa un blanco terapéutico para mejorar tanto el ambiente redox como el impacto en el deterioro cognitivo.

ABSTRACT

Lead (Pb^{2+}) is a widely used metal in industry and in consumer products. Poisoning by this is considered a public health problem due to the neurotoxic and teratogenic effects that it induces, especially during neurodevelopment, causing alterations in learning and memory. The molecular basis of its toxicity involve its interaction with stereospecific sites for divalent cations such as Ca^{2+} and has the ability to induce an imbalance in the generation and removal of reactive oxygen species. Recently, kynurenic acid (KYNA), a metabolite of tryptophan catabolism, was related to the cognitive impairment induced by the exposure of lead during early life. KYNA is an antagonist of NMDA and $\alpha 7$ -nicotinic receptors, and an imbalance in its production is associated with cognitive deficits. It has been shown that N-acetylcysteine (NAC) can modulate KYNA production and induced procognitive effect in behavioral tests in rodents. The aim of this study is to determine whether the modulation of KYNA levels by the administration of N-acetylcysteine prevents cognitive alterations induced by exposure to lead during lactation in mice. Four experimental groups were formed: Control, NAC, Pb^{2+} and Pb^{2+} +NAC. The control group received tap water and normal diet pellets. The groups Pb^{2+} and Pb^{2+} +NAC were exposed to 500 ppm of lead acetate in the drinking water; the NAC and Pb^{2+} +NAC groups received NAC 350 mg/day in pellets. All treatments were given during lactation (0-23 postnatal day). After the lactation period, all groups received tap water and normal pellets. At two months of age, cognitive parameters were assessed through novel object recognition and buried food location tests. In addition, the cerebral levels of KYNA, the KAT II (enzyme for the production of kynurenic acid) activity and the cellular redox state were determined in all experimental groups. In the novel object recognition test, no significant differences between groups were found in the evaluation of short-term memory. However, for long-term memory, the recognition index of the Pb^{2+} group was significantly lower compared to the control and Pb^{2+} +NAC groups, where the mice were unable to discriminate between a new object and a familiar one. In the buried food location test, Pb^{2+} group presented deficit in memory consolidation, while the group treated in parallel with NAC attenuated the cognitive damage induced by Pb^{2+} . KYNA levels increased significantly in the Pb^{2+} group and returned to baseline levels when NAC was given as a cotreatment. KAT II activity decreased significantly only in the Pb^{2+} +NAC group. Alterations in the redox environment of the brain induced by Pb^{2+} were attenuated after coadministration with NAC. This work reinforces the evidence that KYNA is involved in Pb^{2+} -induced cognitive impairment and that modulation of its formation represents a therapeutic target to improve both the redox environment and the impact on cognitive impairment.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del plomo

El plomo (Pb^{2+}) es un metal ampliamente utilizado en la industria y en productos de consumo, gracias a sus propiedades físicas y químicas como maleabilidad, ductilidad, baja conductividad y resistencia a la corrosión (García-Lestón et al., 2010). Es empleado como aditivo en combustibles y pinturas; producción de revestimiento de cables, vidrio, cristales, fertilizantes, etc.; puede encontrarse en juguetes, baterías, cañerías de agua, entre otros (Fontana et al., 2013; Dhimal et al., 2017). Aunque es un elemento que no tiene una función biológica en el cuerpo humano, se encuentra en este debido a la contaminación ambiental por actividades antropogénicas como la minería y fundición, reciclaje y eliminación de materiales de desecho y quema de combustibles fósiles, lo cual conduce a su acumulación y distribución en diferentes ecosistemas, incluso en el agua y alimentos para consumo humano (Pájaro et al., 2013; Hanna-Attisha et al., 2016; Swaringen et al., 2022).

La intoxicación por Pb^{2+} es considerada un problema de salud pública debido a los efectos neurotóxicos, teratogénicos, endocrinos, reproductivos y cardiovasculares que induce, independientemente de las concentraciones de exposición a este metal (Fontana et al., 2013; Skerfving et al., 2015; Holstege, 2019). Las mujeres embarazadas o en periodo de lactancia, el feto en desarrollo, así como los niños de seis años o menos, son los más susceptibles a los efectos del Pb^{2+} (Braun et al., 2006; Hanna-Attisha et al., 2016; Swaringen et al., 2022). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la exposición a este metal ha sido la causa de casi un millón de muertes al año (OMS, 2022). Los efectos tóxicos del Pb^{2+} y sus compuestos han sido investigados por varios años en diferentes sistemas animales y vegetales (García-Lestón et al., 2010).

Los niveles de plomo en sangre (NPS) se mide en microgramos (μg) por decilitro (dL) de sangre. En México, la Norma Oficial Mexicana "*NOM-199-SSA1-2000 Salud ambiental. Niveles de plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente*" establece que incluso debajo de 5 $\mu g/dL$ de NPS se considera tóxico para el neurodesarrollo de niños, mujeres embarazadas o en periodo de lactancia (Téllez et al., 2017), por lo tanto, no existe un nivel seguro de exposición a este metal (CDC, 2018). La gravedad de los daños está directamente relacionada con la concentración de Pb^{2+} en sangre (Ahamed et al., 2008); a altas concentraciones de exposición a Pb^{2+} se presentan daños en la mayoría de los órganos y sistemas, siendo de mayor importancia el sistema nervioso central (SNC), hígado y torrente sanguíneo, que podrían culminar en la muerte si los niveles son excesivos (Tong et al., 2000).

La absorción de este metal depende del tránsito gastrointestinal, estado nutricional y edad (Azcona et al., 2015; Wani et al., 2015). El Pb^{2+} ingresa principalmente al organismo por vías respiratorias y gastrointestinales. Aproximadamente el 99% se retiene en el torrente sanguíneo y se acumula en las membranas de los eritrocitos interfiriendo en la síntesis del grupo hemo ocasionando anemia; esto ocurre ya que los eritrocitos tienen mayor afinidad por el Pb^{2+} , por lo que son más susceptibles al daño que este ocasiona (Mani et al., 2018). Después se distribuye en diversos órganos y tejidos generando daños a nivel sistémico, donde permanece alrededor de 40 días (Feksa et al., 2012; Wani et al., 2015). Finalmente se deposita en tejidos duros como huesos, uñas y dientes donde puede permanecer incluso toda

la vida del individuo (Fontana et al., 2013). La vida media del Pb^{2+} en el tejido cerebral es de aproximadamente 2 años y en los huesos permanece durante décadas (Sirivarasai et al., 2015; Wani et al., 2015). El 90% del Pb^{2+} se excreta por orina y en menor cantidad en bilis, sudor y leche materna (Azcona et al., 2015).

Desde 1993, Namihira y col. encontraron que los NPS en la leche materna y en la sangre en mujeres de la Ciudad de México eran $45.88 \pm 19.88 \mu\text{g/dL}$ y $2.47 \mu\text{g/dL}$, respectivamente. Las concentraciones de NPS materna $>5 \mu\text{g/dL}$ se han asociado con el aborto espontáneo, parto prematuro, preeclampsia, muerte fetal, bebés con bajo peso al nacer o anomalías en estos (Cunningham, 2012). Ya que la placenta no filtra el Pb^{2+} , en consecuencia, los NPS del cordón umbilical se correlacionan altamente con los NPS maternos (Kordas, 2010). La leche materna de una madre que sufre de envenenamiento crónico y que es consumida después del nacimiento es otra vía por la cual el Pb^{2+} se acumula en el neonato. Afecta el sistema hematopoyético, nervioso central y periférico, sistema vascular y el tracto gastrointestinal; causando anemia, insuficiencia renal, nefropatía y síntomas gastrointestinales, incluida la insuficiencia de la función hepática (Mazumdar & Goswami, 2014).

Algunas de las afectaciones de la exposición crónica al Pb^{2+} en el caso de los hombres en etapa adulta incluyen ansiedad, depresión, reducción de la libido, alteración en la espermatogénesis (reducción en cantidad y motilidad, e incremento de formas anormales de los espermatozoides), daño cromosómico, función prostática anormal y cambios en los niveles de testosterona (Pájaro et al., 2013; Azcona et al., 2015). Se ha relacionado de manera concluyente en la etapa adulta con la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares (Lanphear et al., 2018), ya que afecta a marcadores inflamatorios que pueden llevar a un cambio adverso en la presión arterial (Sirivarasai et al., 2013).

2. Intoxicación por plomo en la población mexicana

Existen y se han implementado leyes que regulan y prohíben el uso de Pb^{2+} en México, tal es el caso del Programa Nacional para la Adopción de Esmalte Libre de Plomo, apoyado por FONART desde el año 1994, el cual plantea la coordinación de diversas acciones encaminadas a mitigar y, progresivamente, erradicar los trastornos en la salud de los artesanos, causados por el contacto directo con el esmalte con Pb^{2+} (Covarrubias & Estrada, 2010). Sin embargo, no se ha erradicado su presencia en el ambiente puesto que es un metal que no sufre degradación natural y también a su amplio uso en la industria (Fontana et al., 2013; Xie et al., 2020).

Las fuentes de exposición varían por región, país y contexto local. En el caso de México, este tiene una historia larga y única de exposición al Pb^{2+} . En 1990 se comenzó a eliminar el Pb^{2+} en la gasolina e introdujo los combustibles libres de este, pero fue hasta el año de 1997 cuando la gasolina con Pb^{2+} se eliminó por completo del país, trayendo consigo mejoras a la salud. Sin embargo, hay otros tipos de exposición que continúan afectando a la población, tales como el hecho de que México tiene grandes depósitos de Pb^{2+} ; y desarrolla la alfarería vidriada tradicional donde se emplea la tretoóxido de plomo, ideal debido a su punto bajo de fusión ($<800 \text{ }^\circ\text{C}$) en hornos de leña. Estos generan riesgos tanto ocupacionales como de salud ambiental (Caravanos et al., 2014; Pantic et al., 2018).

Actualmente la fuente secundaria más común de exposición al Pb^{2+} en la población no expuesta laboralmente es el uso de alfarería vidriada. A través de la elaboración,

almacenamiento y consumo de alimentos y bebidas en loza de barro vidriado, el riesgo de contraer enfermedades por envenenamiento con este metal aumenta (Caravanos et al., 2014; Téllez et al., 2017). Es posible que los alimentos ácidos lixivien el Pb^{2+} de los recipientes de arcilla, haciendo que el metal esté disponible para la absorción (Díaz-Ruiz et al., 2016). Cabe destacar que México es el quinto mayor productor de Pb^{2+} y uno de los cinco principales exportadores de plata a nivel mundial, a menudo extraída junto con Pb^{2+} ; así como un productor grande, exportador y reciclador de baterías de plomo-ácido para automóviles y otros vehículos (Caravanos et al., 2014).

A lo largo de varios años y diversos estudios se ha intentado estimar los NPS en México, en los cuales se ha demostrado una tendencia a que sean elevados. Caravanos y col. en el 2014 realizaron un metaanálisis a partir de 83 estudios entre 1978 y 2010 en distintas ciudades del país y reportaron medias geométricas (MG) de 6.5 $\mu\text{g/dL}$ en el subgrupo de menores de un año de edad; mientras que para un subgrupo con el mismo rango de edad para la Ciudad de México fue de 4.9 $\mu\text{g/dL}$. En áreas urbanas y rurales fueron de 8.9 $\mu\text{g/dL}$ y 22.2 $\mu\text{g/dL}$, respectivamente. A partir de la introducción de la gasolina libre de Pb^{2+} , la media en áreas urbanas fue de 5.36 $\mu\text{g/dL}$ y se espera que el promedio en áreas rurales sea mayor y a su vez, siga en aumento (Caravanos et al., 2014).

Estos antecedentes aportan información relevante sobre el tema en México. Sin embargo, únicamente son representativos de pequeños sectores de la población, ya que en el país no existe un sistema de monitoreo poblacional que mida los NPS, por lo tanto, no se pueden hacer inferencias a nivel nacional.

2.1 Alteraciones bioquímicas relacionadas con la intoxicación por plomo

Como ya se había mencionado, el Pb^{2+} no tiene una función biológica en el organismo, por lo tanto, es poco probable que exista un transportador específico para su absorción. El transportador de metales divalentes-1 (DMT1) le permite ingresar al cuerpo humano, participando en la absorción de Pb^{2+} en el intestino delgado. También es el principal transportador de hierro, y su expresión aumenta cuando hay deficiencia de este, por lo que un aumento en la expresión de DMT1 contribuye a una mayor absorción de Pb^{2+} (Kordas, 2010).

La base molecular de la toxicidad del Pb^{2+} involucra su unión covalente a proteínas debido a que interactúa con sitios estereoespecíficos para cationes divalentes como Ca^{2+} , lo que conlleva a la alteración de diversas vías metabólicas reguladas por este catión (Aguilar et al., 2014; Azcona et al., 2015). El hecho de que este metal pesado pueda competir por el lugar del calcio afecta una variedad de procesos diferentes, biológicamente significativos y dependientes de este catión, tales como: señalización intercelular e intracelular, transporte de metales divalentes, metabolismo energético, procesos enzimáticos, apoptosis, conducción iónica, adhesión celular, maduración de proteínas y regulación genética (Cunningham, 2012; Feksa et al., 2012).

Este metal también posee habilidad de inducir un desequilibrio en la generación y remoción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en tejidos y componentes celulares, conocido como estrés oxidante. La concentración de EROs depende de las concentraciones y la duración de la exposición a xenobióticos. El Pb^{2+} genera estrés oxidante a través de: 1) incrementar la generación de EROs; y 2) agotar las defensas antioxidantes por su alto grado de afinidad por

grupos tiol (-SH) como el glutatión (GSH) y modifica la actividad y expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y catalasa (CAT). Las consecuencias son daño oxidante en lípidos, DNA y proteínas (Ahamed et al., 2005; Feksa et al., 2012; Pawlas et al., 2016).

Se han propuesto diferentes tipos de mecanismos para las EROs mediadas por Pb^{2+} : (1) alteran las membranas celulares estimulando su peroxidación lipídica iniciada por iones ferrosos, incrementando significativamente los niveles de malondialdehído (MDA) que es el producto final (Ahamed et al., 2008); (2) interacciones plomo-hemoglobina; (3) daña la reacción en cadena que conduce a la formación del grupo hemo que da como resultado la acumulación de ácido δ -aminolevulínico deshidratasa (δ -ALA) mediada por la generación de EROs; y (4) efecto del Pb^{2+} en el sistema de defensa antioxidante de las células. Incluye la capacidad de conducir a inhibir/imitar las acciones de Ca^{2+} e interactuar con algunas proteínas (como aquellas con grupos amino, carboxilo, fosfato y sulfhidrilo) (Ahamed et al., 2008; Feksa et al., 2012; Mani et al., 2018; Singh et al., 2018).

De igual manera el Pb^{2+} interfiere con el crecimiento y la diferenciación o el desarrollo estructural cerebral. Los ejemplos respaldados por la evidencia experimental incluyen el efecto sobre las moléculas de adhesión neural y la alteración de la función sináptica (por ejemplo, la expresión del receptor N-metil-D-aspartato) (NMDAr) (Ahamed, 2005).

También afecta el desarrollo de oligodendrocitos a partir de células precursoras; altera la morfología de la mielina, la cual en los grupos control está formada por capas ordenadas, mientras que en muestras intoxicadas con Pb^{2+} este orden se destruye en grandes áreas, reflejándose en un aumento en la fluidez de la membrana, dando como resultados vainas irregulares y sueltas (Kordas, 2010). Asimismo, se asocia con deterioro en la neurotransmisión (Wani et al., 2015), por ejemplo, en el sistema dopaminérgico: los cambios en los niveles de dopamina son relevantes en la función de las neuronas para la cognición y el comportamiento, ya que este neurotransmisor se encuentra involucrado en la regulación de varios procesos del SNC, incluidos la actividad motora, el estado de ánimo, la motivación, la recompensa y la atención. Estos cambios también se han relacionado con la hiperactividad (Kordas, 2010).

La mayor parte del trabajo sobre la neurotoxicidad inducida por Pb^{2+} se ha centrado en las células neuronales, ya que provoca una disminución en el número de neuronas que se desarrollan, así como en su crecimiento (Meng et al., 2005; Wani et al., 2015). Otras células de soporte, que son varias veces más numerosas que las neuronas y modulan la función de estas y que también pueden verse afectadas por Pb^{2+} , son los astrocitos. Estos son capaces de captar 14 veces más Pb^{2+} que las neuronas a través de canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje (Simons & Pocock, 1987) y puede implicar un aumento dependiente del glutamato en el calcio intracelular (Cornell-Bell et al., 1990). La acumulación y almacenamiento de Pb^{2+} en los astrocitos puede ser un mecanismo de protección para las neuronas que son más sensibles a los efectos tóxicos de este metal (Holtzman et al., 1987; Tiffany-Castiglioni et al., 1986; Tiffany-Castiglioni, 1993), o bien, puede proporcionar un reservorio para su liberación continua y contribuir a la toxicidad de las neuronas adyacentes o de los propios astrocitos (Struzynska, 2009).

2.2 Alteraciones conductuales en humanos por intoxicación de plomo

Dentro de las consecuencias a la exposición a Pb^{2+} durante etapas tempranas del desarrollo e incluso en la etapa joven-adulto se encuentran alteraciones en la memoria. Estas alteraciones son más prominentes cuando la exposición es durante el neurodesarrollo (Earl et al., 2015; Ramírez et al., 2020). Es por esto que los niños constituyen el segmento de la población más vulnerable por exposición al Pb^{2+} , ya que lo absorben en mayor proporción que los adultos (Dhimal et al., 2017) debido a la inmadurez de la BHE, al aumento de la absorción gastrointestinal y en el caso de mujeres embarazadas cruza la barrera placentaria (Cunningham, 2012; Azcona et al., 2015). Los adultos absorben del 35-50% del Pb^{2+} que ingieren en comparación con más del 50% que absorben los niños (Ahamed et al., 2005). Incluso en niños con niveles inferiores a 5 $\mu\text{g}/\text{dL}$ han sido asociadas consecuencias de impacto social como disminución del coeficiente intelectual (Earl et al., 2015), deficiente desarrollo neurológico, comportamiento agresivo, trastornos de atención e hiperactividad (Baghurst et al., 1992; Nkomo et al., 2018). Estos efectos son mayores en niños que presentan deficiencia de hierro o anemia y se sabe que son en gran medida irreversibles (Tong et al., 2000; Fontana et al., 2013). A lo largo de los estudios que se han llevado a cabo es evidente el efecto nocivo del Pb^{2+} en diversos parámetros cognitivos, y esto es más evidente cuando la exposición a este metal ocurre en etapas tempranas del desarrollo.

3. Modelos experimentales

Se ha demostrado que la exposición a Pb^{2+} de manera prenatal y postnatal temprana en modelos de roedores, causa la acumulación de este metal en el SNC, aumenta los niveles de peroxidación de lípidos y la capacidad antioxidante cerebral se ve considerablemente disminuida, propiciando así un ambiente celular oxidante que contribuye a cambios morfológicos cerebrales que conllevan a alteraciones conductuales en la etapa adulta (Nehru & Kanwar, 2004; Prasanthi et al., 2010). Müller y colaboradores (2008) mostraron que los sacos vitelinos expuestos a Pb^{2+} generaban inactividad y movimientos anormales en polluelos durante la primera semana postnatal y lo correlacionaron con los altos niveles de este metal en el cerebro. En concordancia, diversos estudios en roedores han mostrado que tanto la intoxicación con Pb^{2+} durante la gestación o la etapa postnatal temprana, genera alteraciones motoras y cognitivas mayores que las observadas cuando la intoxicación ocurre en la etapa adulta, lo cual está relacionado a un mayor paso de Pb^{2+} al cerebro debido a la BHE inmadura, lo que conlleva alteraciones en la sinaptogénesis, diferenciación y proliferación celular que ocurre durante las etapas pre y postnatales tempranas (Goyer, 1990; Zhang et al., 2004; Bazrgar et al., 2015). Cabe mencionar que, en estos procesos fisiológicos, los NMDAr juegan un rol central y su actividad se ve comprometida por la presencia de Pb^{2+} , el cual al mimetizar la acción del calcio interviene con la señalización de estos receptores (Goyer, 1997). También se ha comprobado que la exposición a este metal a través del agua potable durante el embarazo en ratones ocasiona pérdida neuronal en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo de la descendencia; y se ha relacionado directamente con la muerte celular programada a bajas concentraciones en células cerebrales *in vitro* e *in vivo*, así como con la activación de caspasas del hipocampo después de la exposición neonatal al metal en ratas (Díaz et al., 2016).

4. Aprendizaje y memoria

El sistema de cognición en general se compone de procesos de aprendizaje y memoria (Morgado, 2005). Memoria es el proceso por el cual la información adquirida se convierte en conocimiento dependiente de una experiencia que guardamos para utilizarlo posteriormente cuando sea necesario (Solís & López, 2009); cabe resaltar que no es una función cerebral estática, única o aislada, sino que se comporta como un conjunto de funciones cerebrales distintas pero estrechamente interrelacionadas que están orientadas hacia un mismo fin, por lo que es más acertado denominar en términos de sistemas de memoria (Carrillo-Mora, 2010^a).

La memoria se puede dividir en dos grandes bloques: memoria a corto plazo (MCP) y memoria a largo plazo (MLP) (Navarrete et al., 2008). La MCP abarca a la denominada memoria de trabajo (MT) (Solís & López, 2009), un modelo propuesto por Baddeley y Hitch en 1974 que aún es aceptado en la actualidad (Baddeley, 2003). Se trata de un sistema para almacenar y administrar una cantidad limitada de información durante un corto periodo de tiempo; es una memoria inmediata para los estímulos que acaban de ser percibidos (Navarrete et al., 2008). La memoria de trabajo se refiere a la capacidad para mantener las cosas en la mente el tiempo suficiente para realizar una tarea específica (Carrillo-Mora, 2010b); la capacidad para este tipo de registro es muy grande, involucra a todas las modalidades (visual, verbal, táctil, etc.) y nos brinda el sentido continuo del presente (Solís & López, 2009). A su vez, los sistemas de MLP en los mamíferos se conforman por dos grandes categorías de información, la declarativa y la no declarativa (Squire & Dede, 2015). La memoria explícita (declarativa), la cual se emplea para hechos, eventos, personas, lugares y objetos y puede traerse a la mente como material verbal o no verbal recordado, como una idea, un sonido, una imagen, una sensación, un olor o una palabra (Cohen & Squire, 1980), responde a las preguntas del “¿qué?”, “¿dónde?” y “¿cuándo?” ocurrieron. Y la memoria implícita (no declarativa) es la resultante de procesos de aprendizaje no consciente realizados a través de habilidades perceptivas y motoras, y hábitos (Tulving, 1985; Carrillo-Mora, 2010b).

El área cerebral relacionada en la memoria declarativa es el el hipocampo y la corteza (Squire & Zola-Morgan, 1991; Squire & Dede, 2015) y en los humanos implica la consciencia (Solís & López, 2009); la memoria no declarativa no requiere esta última e involucra al cerebelo, cuerpo estriado y amígdala (Scoville & Milner, 1957; Tulving & Schacter, 1990; Solís & López, 2009; Squire & Dede, 2015).

El almacenamiento de la memoria es más complejo que una secuencia lineal de eventos que culmina en una memoria indeleble a largo plazo, es el resultado dinámico de varios procesos: codificación o adquisición de nueva información, memoria a corto plazo, mediano plazo, consolidación y mantenimiento de memoria a largo plazo, desestabilización y reestabilización de memoria en el curso de la recuperación y actualización e integración de una memoria dada con otras memorias. Los cambios que acompañan al aprendizaje tienen paralelos biológicos en la plasticidad sináptica. La memoria a corto y mediano plazo es paralela al fortalecimiento sináptico que dura de minutos a horas, y la memoria a largo plazo al fortalecimiento sináptico que dura de días a semanas (Castellucci et al., 1978; Carew et al., 1979).

Para respaldar la MLP se habla sobre la consolidación de sistemas, que se refiere a la reorganización gradual de los sistemas cerebrales (Squire & Alvarez, 1995; Dudai & Morris, 2000; Dudai, 2012), siendo un proceso por el cual los recuerdos almacenados tanto en el hipocampo como en la corteza, son guiados por el hipocampo para su reorganización

conforme pasa el tiempo, con la finalidad de que se independicen de este y se desarrolle una memoria estable a largo plazo al aumentar la complejidad, la distribución y la conexión entre múltiples regiones corticales (Dudai & Morris, 2013). Si como consecuencia de la repetición de la experiencia los cambios neurales de la MCP persisten, pueden activar otros mecanismos de plasticidad cerebral produciendo cambios estructurales en las sinapsis. Estos cambios constituyen el soporte físico de la MLP. El proceso gradual por el que la reiteración de la MCP produce los cambios neurales que originan la MLP se denomina consolidación de la memoria (Morgado, 2005), es decir, es un proceso mediante el cual un recuerdo temporal y lábil se transforma en una forma más estable y duradera. Este término se propuso por primera vez en 1900 (Müller & Pilzecker, 1900; Lechner et al., 1999) para hacer referencia a que lo aprendido continúa siendo vulnerable a la interferencia durante un período de tiempo después del aprendizaje; y la estructura cerebral que es de fundamental importancia, es el hipocampo como ya se ha mencionado anteriormente (Ortega-Loubon y Franco, 2010).

Tanto la MCP como MLP implican cambios en la fuerza de las conexiones en diversos sitios sinápticos, incluyendo conexiones sinápticas entre neuronas sensoriales y motoras. En los dos, el aumento de la fuerza de la conexión sináptica es debido al aumento de la liberación de neurotransmisores, sobre todo uno en común, la serotonina. Finalmente, los circuitos intracelulares de segundos mensajeros, (adenosina monofosfato cíclico) AMPc y (proteína cinasa A) PKA, se activan en ambos tipos de procesos. Sin embargo, para que el aprendizaje se sostenga a largo plazo se requieren procesos adicionales; para que la información se almacene de manera permanente es necesaria la consolidación como ya se mencionó, e implica tres procesos: expresión de genes, síntesis de nuevas proteínas y aumento o poda de conexiones sinápticas. Esta es la diferencia principal entre la MCP y MLP (Ortega-Loubon y Franco, 2010).

4.1 Hipocampo y receptores NMDA involucrados en el aprendizaje y memoria

El hipocampo es la principal región del cerebro involucrada en la adquisición y consolidación de la memoria explícita; es una lámina curvada de corteza que está plegada en la superficie media y basal del lóbulo temporal (Squire & Wixted, 2011; Murphy, 2013). Se ha identificado en muchas especies incluyendo mamíferos, aves, reptiles y peces teleosteos. La evidencia neurobiológica y funcional sugiere fuertemente que el hipocampo es una estructura homóloga a través de las especies; así en los mamíferos está notablemente conservada tanto en los seres humanos, primates, cerdos y roedores. Este es crítico para la memoria espacial en ratas, primates y seres humanos (Aguirre, 2015). Se ha sugerido que se ve particularmente afectado por la intoxicación por Pb^{2+} , donde hay disminución de los niveles de óxido nítrico (Sun et al., 2005), alteración en la fosforilación de proteínas, así como deterioro en la transmisión de la sinapsis glutamatérgica; cabe resaltar que el glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante en el cerebro (Neal & Guilarte, 2010).

El principal mecanismo neurofisiológico dentro del hipocampo que es responsable de la adquisición de nuevos recuerdos es la potenciación a largo plazo (LTP) (Aguirre, 2015), el cual es un aumento duradero de la eficacia sináptica después de breves periodos de estimulación de sinapsis específicas (Malenka & Nicoll, 1999; Nihei et al., 2000, 2001; Shimizu et al., 2000). Algunas formas de LTP en el hipocampo son dependientes de la activación de NMDAr (Teyler & DiScenna, 1987; Madison et al., 1991; Malenka & Nicoll, 1993, 1999) donde

LTP requiere liberación de glutamato presináptico y activación posterior del NMDAr postsináptico (Massicotte & Baudry, 1991; McNaughton, 1993).

La activación de NMDAr juegan un papel central en el desarrollo del cerebro y la plasticidad sináptica, procesos implicados tanto en el aprendizaje y la memoria (Morris et al. 1982, 1986; Malenka et al., 1999; Hansen et al., 2018) así como en enfermedades neurodegenerativas (Ozawa et al., 1998; Scheetz y Constantine-Paton, 1994; Hansen et al., 2018). Estos receptores se encuentran en abundancia en el hipocampo y corteza cerebral (Monyer et al., 1994; Moriyoshi et al., 1991) y permiten el ingreso de calcio extracelular al interior de la neurona postsináptica. Los NMDAr median la proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB) y la activación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), la plasticidad sináptica y las vías de supervivencia. Por otro lado, los receptores extrasinápticos están asociados con una vía de cierre de CREB, inactivación de ERK e inducción de vías de muerte celular (Hardingham et al., 2002; Vanhoutte & Bading, 2003; Ivanov et al., 2006). Distintas vías de señalización dependen de la composición y/o localización de la subunidad NMDAr y estas pueden ser alteradas por la intoxicación con Pb^{2+} , afectando algunas vías de señalización río abajo, incluidas la de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Cordova et al., 2004), la actividad de calcio/calmodulina cinasa II (CaMKII) (Toscano et al., 2005), de la proteína cinasa C (PKC) (Bressler et al., 1999) y el estado de fosforilación de CREB y la afinidad de unión (Toscano et al., 2002; 2003). CREB es un factor de transcripción para genes tempranos inmediatos (IEG) dependientes de la actividad de NMDAr, que desempeñan un papel esencial en la consolidación de la memoria (Athos et al., 2002) y en la propagación de señales desde las sinapsis al núcleo al vincular la activación de NMDAr y la señalización dependiente de calcio a la expresión de genes necesarios para la plasticidad sináptica (Bredt et al., 1992). Se ha observado una expresión alterada de IEG en animales expuestos a Pb^{2+} (Kim et al., 2002), lo que indica que la actividad de CREB se altera debido a la interrupción de la señalización NMDAr mediada por Pb^{2+} , afectando la transcripción de genes asociados con los procesos de aprendizaje, memoria y plasticidad sináptica.

Por lo tanto, es importante mencionar que los NMDAr son críticos para la LTP. El bloqueo farmacológico de estos o la delección de la subunidad 1 (NR1) ocasiona un deterioro sustancial de las tareas referidas a la memoria espacial. Los ratones knockout para NR1 muestran deterioro en la LTP, encontrándose que en el envejecimiento hay un decremento en la expresión de ciertas subunidades de los NMDAr y sus funciones en el hipocampo (Aguirre, 2015).

Se ha estudiado que la sobreexpresión de diversas proteínas se induce por la exposición a Pb^{2+} y las proteínas fosfatasa (PP) Ser/Thr son una de ellas y de las más importantes. Se encuentran en el cerebro de los mamíferos y han sido implicadas en el deterioro del aprendizaje y la memoria (Lee y Silva 2009), sobre todo durante el envejecimiento (Mansuy & Shenolikar, 2006; Knobloch et al., 2007).

La MLP implica la síntesis de proteínas, el crecimiento y la formación de nuevas sinapsis (Martin et al., 1997; Bozdagi et al., 2000; De Roo et al., 2008). Por el contrario, MCP implica la modificación covalente de proteínas en las estructuras presinápticas o postsinápticas (Kandel, 2001; Malinow & Malenka, 2002).

5. Catabolismo del triptófano a través de la vía de las kinureninas

Un metabolito de suma importancia fisiológica es el ácido kinurénico (KYNA), que forma parte del catabolismo del triptófano (Trp), ya que es un antagonista competitivo del sitio de glicina de NMDAr y de forma no competitiva del receptor alfa-7 nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7nAChR$) (Kessler et al., 1989).

El Trp es uno de los diez aminoácidos esenciales, necesario para la síntesis de proteínas, sirve como precursor de diversas moléculas biológicamente activas como la serotonina y puede metabolizarse por diferentes vías (Kostrzewa, 2014). Las principales son la vía de las kinureninas (VK) (Stone & Darlington, 2002) y la vía de la serotonina, que es más conocida, produce 5-hidroxitriptófano y luego serotonina, y está presente en plaquetas y neuronas (Sas et al., 2007). El Trp también produce melatonina, la principal hormona sintetizada en la glándula pineal.

La VK es la ruta más importante en mamíferos, considerando que el 95% de Trp de la dieta se metaboliza en el hígado dando lugar a la biosíntesis de *nov*o de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), coenzima esencial durante la respiración celular, fosforilación oxidativa, producción de ATP y reparación del DNA. De hecho, la síntesis de ATP y el potencial redox son directamente proporcionales a concentraciones intracelulares de NAD⁺ (Ussher et al., 2012). Los metabolitos de esta vía son denominados colectivamente como kinureninas, los cuales desempeñan un papel importante en el SNC, inmunológico y también participan en la fisiopatología de un número creciente de enfermedades neurológicas debido a sus propiedades neuroactivas y redox (Ogawa et al., 1992; Hartai et al., 2005; Robotka et al., 2008); mientras que las enzimas de esta vía han sido ampliamente estudiadas en roedores y otros mamíferos (Wolf, 1974).

El primer paso limitante de la VK en el cerebro es la degradación enzimática del triptófano por indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) o triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) para formar N-formilkynurenina, que es convertida por la arilformamidasa en L-kinurenina (L-KYN) (Kostrzewa, 2014). La TDO se expresa principalmente en hígado, pero también en tejido nervioso, con una alta expresión en el cerebelo y el hipocampo, seguidos del mesencéfalo (Kanai et al., 2009). La TDO puede ser activada por varios inductores, incluidos L-KYN, algunos aminoácidos como histidina, tirosina y fenilalanina, niveles elevados de triptófano, glucocorticoides, corticosteroides o su expresión puede ser inducida indirectamente por inflamación. Por otro lado, la IDO presenta una estrecha relación con el sistema inmunológico; de hecho, hay dos isoformas de la IDO descritas, IDO1 e IDO2, las cuales se expresan principalmente en monocitos, macrófagos, células dendríticas y, en la microglía, que son los macrófagos residentes en el cerebro (Cuartero et al., 2016). L-KYN da lugar a los diferentes metabolitos de la vía de las kinureninas a través de tres ramas: a KYNA, al ácido antranílico (ANA) y al 3-hidroxi-kinurenina (3-HK) para producir QUIN, un metabolito neurotóxico (González-Esquivel et al., 2017). En la primera rama se sintetiza KYNA a través de la transaminación de L-KYN, un paso catalizado por las enzimas kinurenina aminotransferasas I-IV (KAT I-IV) (Rossi et al., 2008), las isoformas de KAT tienen diferentes propiedades fisicoquímicas y propiedades bioquímicas (Kessler et al., 1989). La KAT II es la principal aminotransferasa a la que se le atribuye la síntesis de KYNA y se localiza principalmente en los astrocitos (Du et al., 1992), el resto de las aminotransferasas están presentes en neuronas (Knyihar-Csillik et al., 1999). En el segundo brazo de la vía, L-KYN sirve como sustrato para la enzima kinureninasa, dando lugar al ANA; mientras que el tercer brazo comprende una

secuencia de pasos enzimáticos que culminan en la síntesis de NAD⁺ y es responsable de la formación de compuestos con capacidad redox como la 3-HK, el ácido 3-hidroxiantranílico (3-HANA) y el agonista para NMDAr, el ácido quinolínico (QUIN). Para producir 3-HK se involucra la acción de kinurenina 3-monooxigenasa (KMO) (Kostrzewa, 2014), KAT puede tomar 3-HK para producir ácido xanturénico (XA). Tanto ANA como 3-HK se convierten por kinureninasa en 3-HANA, más tarde es degradado por el 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa a un semialdehído inestable (2-amino-3-carboximuconato semialdehído) que se transforma enzimáticamente mediante 2-amino-3-carboximuconato-6-semialdehído descarboxilasa en ácido picolínico (PIC), o no enzimáticamente en QUIN, el cual finalmente es tomado por la enzima quinolinato fosforribosiltransferasa (QPRTasa) para producir NAD⁺ (González-Esquivel et al., 2017).

La L-kinurenina cerebral se deriva tanto de la producción *in situ*, como de fuentes periféricas (Fukui et al., 1991), pero la actividad metabólica difiere en condiciones fisiológicas y patológicas. En condiciones fisiológicas, esta vía tiene una capacidad mucho mayor en la periferia, mientras que, durante los procesos inflamatorios localizados en el SNC, la producción de L-KYN y QUIN resulta de la síntesis local en el cerebro (Kita et al., 2002). Estos dos últimos están presentes en concentraciones nanomolares en el líquido cefalorraquídeo humano (LCR) (Moroni, 1999; Schwarcz & Pellicciari, 2002; Erhardt et al., 2004), mientras que KYNA está en concentraciones micromolares en el tejido cerebral humano (Moroni et al., 1988; Turski et al., 1988). KYNA y QUIN cruzan la barrera hematoencefálica en un grado limitado, mientras que su precursor L-KYN es capaz de cruzarla fácilmente (Fukui et al., 1991).

5.1 Ácido kinurénico (KYNA)

KYNA es uno de los metabolitos más importantes de VK, su nivel en el SNC depende de la especie, la región estudiada y la etapa de desarrollo ontogenético. En el cerebro humano, KYNA se produce en un rango micromolar bajo (aproximadamente 0.1-1.5 μM), que es 20 a 50 veces mayor que en el SNC de roedores (0.001-0.05 μM); en el LCR, la concentración de KYNA es baja (0.001–0.01 μM), pero aumenta constantemente con la edad (Ostapiuk & Urbanska, 2022). KYNA fue inicialmente reconocido como un antagonista de amplio espectro de los receptores ionotrópicos de glutamato, muestra la mayor afinidad por el sitio coagonista de glicina del complejo receptor NMDA (IC₅₀ ~8–15 μM en ausencia de glicina; ~50–200 μM en presencia de 10 μM de glicina (Kessler et al., 1989; Weber et al., 2001). En un entorno competitivo también bloquea los sitios de unión de agonistas de los NMDAr, ácido kaínico y AMPA, aunque con menor afinidad (IC₅₀ de 100-500 μM) (Stone et al., 2012). A pesar de la discrepancia entre los niveles fisiológicos de KYNA y los niveles necesarios para interferir con los receptores glutamatérgicos, está bien establecido que la síntesis de este metabolito puede aumentar localmente debido a varios factores y alcanzar fácilmente la concentración suficiente para interactuar con los NMDAr (Urbańska et al., 2001).

KYNA atraviesa de forma limitada la BHE (Fukui et al., 1991); por lo tanto, los niveles de este metabolito en el cerebro se determinan en gran medida mediante la síntesis local de su bioprecursor L-KYN. En el SNC de mamíferos hay cuatro enzimas diferentes que pueden catalizar esta transaminación (Okuno et al., 1991; Han et al., 2009; Han et al., 2010), siendo KAT II la principal isoforma tanto en humanos como en roedores (Vanderbist et al., 1996;

Kondo et al., 1997; Sueishi et al., 2014). Sin embargo, KYNA también se puede generar a partir de la reacción entre el ácido indol-3-pirúvico con EROs o por la interacción de L-KYN con radical hidroxilo y peroxinitrito ($\bullet\text{OH}$ y ONOO^- , respectivamente) (Russi et al., 1989). En este contexto, estudios experimentales han demostraron que KYNA es capaz de atrapar $\bullet\text{OH}$, O^{2-} , ONOO^- en sistemas de química combinatoria para cada especie reactiva y sin tejido biológico (Goda et al., 1996; Hardeland et al., 1999; Lugo-Huitrón et al., 2011). Estos hallazgos fueron corroborados en ovocitos, los cuales no tienen NMDAR funcionales y carecen de receptores nicotínicos, por lo que el efecto observado de KYNA fue únicamente debido a su propiedad redox. Bajo estas condiciones KYNA redujo EROs y la peroxidación lipídica inducida por FeSO_4 . Adicionalmente, el efecto redox de KYNA fue evaluado *in vivo* a través de un ensayo de microdiálisis, el cual demostró que KYNA previene la formación *in vivo* de ácido 2,3-dihidroxibenzoico inducido por $\bullet\text{OH}$ (Lugo-Huitrón et al., 2011).

La importancia fisiológica del KYNA radica en que un moderado aumento de sus niveles cerebrales está asociado con dramáticos efectos en la actividad neuronal dopaminérgica, afectando la liberación de glutamato, norepinefrina y dopamina (Wu et al., 2007). Tanto NMDAR como $\alpha 7\text{nAChR}$ tienen funciones bien establecidas en la cognición, tanto en procesos de aprendizaje como de memoria (Wallace & Porter, 2011; Leiser et al., 2009; Yang et al., 2013; Collingridge et al., 2013). Es importante señalar que KYNA puede estar implicado en el rendimiento de estos, ya que se ha vinculado con el deterioro cognitivo: la elevación aguda de KYNA en ratas adultas lleva a alteraciones en la memoria, aprendizaje y flexibilidad cognitiva (Pocivavsek et al., 2016), así como en un aumento de la ansiedad (Giorgini et al., 2013). La aplicación sistémica de L-KYN en los primeros años de vida induce un aumento transitorio en el cerebro y disminuye el comportamiento social en la edad adulta (Iaccarino et al., 2013). De manera similar, la administración de este metabolito durante la adolescencia afecta el comportamiento social (Trecartin y Bucci 2011), miedo contextual y memoria de reconocimiento de objetos novedosos (Akagbosu et al., 2012). En ratas adultas, los aumentos agudos de KYNA inducidos por L-KYN interrumpen la activación sensorial (Erhardt et al. 2004; Nilsson et al. 2006; Shepard et al. 2003), deterioran la memoria de trabajo espacial en el laberinto del brazo radial (Chess et al., 2007) y el condicionamiento del miedo contextual (Chess et al., 2009). Se atribuyen deficiencias en tareas de memoria dependientes del hipocampo como la evitación pasiva y el laberinto acuático de Morris en ratas adultas cuando se alimentan a las madres con L-KYN desde el día 15 embrionario hasta el día 21 postnatal, elevando las concentraciones cerebrales de KYNA en la descendencia (Alexander et al. 2013; Pocivavsek et al., 2012). De igual forma se observan anomalías cognitivas en la descendencia adulta correlacionadas con un aumento de los niveles de KYNA cuando la alimentación con kinurenina se restringe a la última semana de gestación (días 15-22 embrionarios) (Pershing et al., 2015; Pocivavsek et al., 2014), y una intervención muy similar provoca disminución de la LTP del hipocampo en la edad adulta (Forrest et al., 2015). El área cerebral implicada principalmente en esas alteraciones es el hipocampo, y es rico en NMDAR y $\alpha 7\text{nAChR}$ (Ben-Ari et al., 1997; Timofeeva & Levin, 2011). Por lo tanto, una disminución significativa de KYNA observada en ratones knockout para KAT II constituyen una estrategia efectiva para el declive cognitivo, mejorando en varios parámetros cognitivos como exploración y reconocimiento de objetos, evitación pasiva y discriminación espacial, así como un aumento de LTP en el hipocampo (Potter et al., 2010; Pocivavsek et al., 2011).

El análisis del comportamiento posterior a la manipulación de VK en modelos animales ha permitido establecer que esta vía juega un papel clave en varios aspectos de la función cognitiva (Stone & Darlington, 2013). El aumento de los niveles cerebrales de KYNA produce

a largo plazo deterioro de diferentes dominios cognitivos que incluyen déficit de memoria espacial (Nilsson et al., 2006; Chess et al., 2007; Akagbosu et al., 2012; Pocivavsek et al., 2012), alteraciones en la respuesta de congelación después del condicionamiento de miedo contextual (Nilsson et al., 2006) o incluso déficit en la adquisición de la tarea de desplazamiento extradimensional (Pocivavsek et al., 2012). De lo contrario, después de disminuir los niveles de KYNA mediante el uso de un modelo genético en el que se elimina KAT II, se observó una mejora del rendimiento cognitivo en tareas de comportamiento, incluida la exploración, reconocimiento de objetos y aprendizaje de evitación pasiva (Potter et al., 2010).

La elevación crónica de KYNA oral en ratas preñadas durante los períodos pre y postnatal mostraron anomalías notables en el comportamiento de la progenie en edad adulta (56 DPN), incluido un aumento de KYNA extracelular y una reducción paralela del glutamato extracelular tanto en la corteza prefrontal como en el hipocampo. La descendencia adulta también mostró deficiencias conductuales en el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo y la función ejecutiva mediada prefrontalmente (Alexander et al., 2013; Pocivavsek et al., 2012) que potencialmente pueden explicarse por el fenotipo bioquímico anormal.

Se ha demostrado en repetidas ocasiones que niveles elevados de KYNA están asociados con el envejecimiento, en diversos desórdenes tales como la enfermedad de Huntington, Alzheimer, el complejo demencia-SIDA, Parkinson y esquizofrenia, entre otros (Stone & Darlington, 2002; 2013), así como con alteraciones redox cerebrales, evidenciadas por altos niveles de EROs, disminución de la actividad de enzimas antioxidantes y reducción de glutatión (GSH) (Müller et al., 2001; Siddiqui et al., 2016). Hahn y col. (2018) identificaron déficits en la atención en ratas expuestas prenatalmente a niveles elevados de quinurenina, lo que tiene una sorprendente similitud con los déficits de seguimiento descritos en la esquizofrenia. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la desregulación de la VK está causalmente relacionada con un fenotipo cognitivo asociado con este trastorno y que puede explicar otros.

Varios estudios han sugerido que la VK y formación de KYNA son nuevos blancos moleculares que contribuyen a las alteraciones del sueño y cognitivas: Pocivavsek (2017) y Baratta y col. (2018) sugieren una interacción entre los niveles de KYNA cerebral, el sueño y la función cognitiva, ya que la noción de que el sueño apoya críticamente la consolidación de una memoria dependiente del hipocampo es consistente con informes previos que han investigado el impacto del sueño en la consolidación de la memoria en roedores (Meyer et al., 1995; Pendyala & Creaven, 1995; Noszál et al., 2000; Arfsten et al., 2004; Arfsten et al., 2007; Naggy, 2013). En este sentido hay estudios en los que se determinó una elevación significativa en los niveles cerebrales de KYNA después de la privación aguda del sueño en ratas macho (Baratta et al., 2018); y también existe un deterioro en el hipocampo y la memoria dependiente de la corteza prefrontal después de la elevación prenatal de KYNA en ratas adultas macho (56-85 DPN) (Buck et al., 2020).

Estos hallazgos destacan importantes diferencias en la susceptibilidad a los insultos en la vida temprana y confirman un vínculo entre KYNA y el déficit cognitivo. El aumento de los niveles de KYNA durante los períodos críticos del neurodesarrollo está asociado con cambios cognitivos relevantes a largo plazo, así como a diversas enfermedades y trastornos psiquiátricos (Notarangelo & Pocivavsek, 2017). Las investigaciones en curso continúan utilizando varios enfoques farmacológicos para atenuar el déficit cognitivo en ratas al interferir con la síntesis o función de *novo* de KYNA (Buck et al., 2020).

Dado que tanto las enzimas como los metabolitos de VK están involucrados en las reacciones redox, una alteración en estas puede conducir a un cambio en el proceso celular y posteriormente a la muerte celular, e incluso puede desencadenar trastornos neurodegenerativos y daño cerebral agudo. Esto implica que los metabolitos de VK pueden ser nuevos blancos terapéuticos para ofrecer una mejor calidad de vida, ya que parecen ser potentes reguladores del microambiente celular (González-Esquivel et al., 2017). En este sentido, recientemente se demostró que la N-acetilcisteína es capaz de modular la producción de KYNA, tanto por la vía canónica como por la vía alterna de producción (Blanco-Ayala et al., 2021).

5.2 N-Acetilcisteína

N-acetilcisteína (NAC) es un derivado acetilado del aminoácido L-cisteína (Samuni et al., 2013; Bavarsad Shahripour et al., 2014; Ooi et al., 2018). Se ha utilizado en la práctica clínica desde mediados de la década de 1950, principalmente en aquellas enfermedades asociadas con la hipersecreción de moco, por ejemplo, bronquitis crónica y fibrosis quística y desde mediados de la década de 1970 como el medicamento de elección para el tratamiento de la intoxicación por paracetamol. En particular, la acción mucolítica se debe a la capacidad de NAC para romper los puentes disulfuro en las glicoproteínas de alto peso molecular del moco, lo que resulta en reducción de la viscosidad (Balsamo et al., 2010). Asimismo, se ha utilizado como tratamiento de numerosos trastornos como toxicidad inducida por quimioterapia, VIH/SIDA, toxicidad por metales pesados y trastornos psiquiátricos incluyendo esquizofrenia, trastorno bipolar y adicción. Está disponible farmacéuticamente por vía intravenosa, oral o por inhalación como suplemento nutricional con propiedades antioxidantes y es de venta libre (Berk et al., 2013).

Aunque varios estudios *in vivo* han encontrado que la NAC previene o inhibe significativamente el estrés oxidante en determinadas condiciones, todavía no se conoce un mecanismo molecular claro a través del cual NAC ejerce esta actividad. Sin embargo, esta puede estar relacionada con al menos tres mecanismos diferentes: a) su efecto antioxidante directo sobre determinadas especies oxidantes; b) su efecto antioxidante indirecto como resultado de la capacidad de NAC para actuar como un precursor de Cys, que es un bloque de construcción y el paso limitante de la velocidad en la síntesis de GSH, siendo un antioxidante directo bien conocido y sustrato de varias enzimas antioxidantes; y c) su efecto de ruptura sobre los grupos disulfuro y la capacidad de restaurar los depósitos de tiol, que a su vez regulan el estado redox (Aldini et al., 2018).

Otra de las propiedades de NAC es que muestra un efecto prooxidante; por ejemplo, mejora la citotoxicidad inducida por fisetina que es un flavonoide, mediante la inducción de apoptosis independiente de EROs en células de cáncer de colon humano, un efecto que se consideró de interés en el tratamiento de esta enfermedad (Wu et al., 2014). Este efecto también se demostró en presencia de iones de metales de transición como Cu^{2+} (Zheng et al., 2010) o de vitamina B12 (Zheng & Shetty, 2000). Sin embargo, es importante señalar que es poco probable que el efecto prooxidante se lleve a cabo en condiciones *in vivo*, ya que se encontró que ocurre bajo ciertas condiciones de reacción como la presencia de iones de metales de transición y altas concentraciones de NAC (Aldini et al., 2018).

5.2.1 Efecto de NAC en los niveles de GSH

El glutatión es un tripéptido (γ -l-glutamil-l-cisteinilglicina, GSH) sintetizado y mantenido a altas concentraciones (mM) en las células (Meister & Anderson, 1983) y sirve como sustrato o cofactor de una gran cantidad de enzimas celulares como la GR, glutaredoxina (Grx), GPx, peroxirredoxina (Prx), glioxalasa 1 y 2, glutatión transferasa y MAPEG (proteínas asociadas a la membrana en el metabolismo de eicosanoides y glutatión). El GSH participa ampliamente en la eliminación celular de H_2O_2 y de otros hidroperóxidos (Deponce, 2013). La disminución de los niveles de GSH se asocia con las características comunes del envejecimiento, así como con una amplia gama de afecciones patológicas, incluidos los trastornos neurodegenerativos. En particular, la depleción de GSH y/o las alteraciones en su metabolismo parecen ser cruciales en la aparición de la enfermedad de Parkinson (Homma, 2015; Morris et al., 2014), autismo, esquizofrenia, trastorno bipolar y enfermedad de Alzheimer (Gu et al., 2015).

Cuando una condición oxidante o exposición xenobiótica amenaza los niveles basales celulares de GSH, es pertinente pensar en una intervención terapéutica; por lo que NAC es ideal para aumentar los niveles de GSH. Como ya se mencionó, NAC es un precursor de Cys, el factor limitante en la biosíntesis de GSH celular (Anders & Dekant, 1994).

NAC tiene una toxicidad baja y su biodisponibilidad relativamente baja (4-10%) se asocia con su N-desacetilación en la mucosa intestinal y el metabolismo de primer paso en el hígado. El plasma es un medio bastante prooxidante y, por lo tanto, las reacciones de intercambio redox entre las proteínas NAC, cistina y cisteína en el plasma producen NAC-cisteína, NAC-NAC y cisteína. Este último puede atravesar la membrana de las células epiteliales y mantener la síntesis de GSH, que es la fuente de reserva de tiol en el cuerpo y un importante antioxidante involucrado en numerosos procesos fisiológicos (Giustarini et al., 2012).

La evidencia basada en estudios de investigación preclínica sugiere que NAC puede modular los procesos fisiopatológicos que están involucrados en múltiples trastornos psiquiátricos y neurológicos, que incluyen estrés oxidante, neurogénesis y apoptosis, disfunción mitocondrial, neuroinflamación y desregulación de los sistemas neurotransmisores de glutamato y dopamina. Presuntamente NAC influye en la neurotransmisión glutamatérgica (Olive et al., 2012) y proporciona beneficios cognitivos en animales de experimentación (Farr et al., 2003; Marie et al., 2018). Debido a su biodisponibilidad oral y excelente perfil de seguridad (Sheffner et al., 1966; Samuni et al., 2013; Deepmala et al., 2015), NAC se ha utilizado ampliamente en humanos, especialmente en los esfuerzos por mejorar los déficits cognitivos en diversas enfermedades psiquiátricas y neurológicas (Skvarc et al., 2017). En la mayoría de estos estudios, la mejora de las deficiencias neurocognitivas se atribuyó al hecho de que su producto de desacetilación L-cisteína sirve como bioprecursor del antioxidante glutatión (GSH), que a su vez conduce a una mayor liberación de glutamato (Rushworth y Megson, 2014; Steullet y col., 2016; Klauser y col., 2018; McQueen et al., 2018).

Además de sus usos clínicos, en los últimos años NAC ha sido cada vez más utilizado como herramienta para la investigación básica, particularmente en estudios de bases moleculares y aspectos celulares de la regulación de apoptosis y transcripción de genes (Aldini et al., 2018).

ANTECEDENTES

En experimentos previos de nuestro equipo de trabajo se demostró que ratones intoxicados con Pb^{2+} durante el periodo de lactancia presentan alteraciones en el ambiente redox, disfunción celular, muerte neuronal y aumento de niveles de metabolitos de la VK como KYNA y 3-HK. Asimismo, mediante la prueba conductual de ubicación de alimento enterrado se observó que no sufren alteración en el aprendizaje al momento de realizar una tarea, pero sí hay un deterioro cognitivo al verse afectada la consolidación de la memoria a largo plazo, lo cual se correlacionó con los niveles cerebrales de KYNA. Estos hallazgos previos sugieren que un aumento en los niveles de este metabolito podría ser un mecanismo por el cual el Pb^{2+} induce un deterioro cognitivo en ratones adultos (Ramírez et al., 2020).

Considerando estos antecedentes, nuestra propuesta es que el Pb^{2+} al estar alterando el estado redox celular favorece la degradación del triptófano a través de la VK, lo cual promueve la síntesis de KYNA tanto por la vía canónica como por la vía no canónica, participando en el deterioro cognitivo observado por la intoxicación con este metal. Por lo tanto, la modulación de la vía representa un blanco potencial para mejorar la disfunción cognitiva inducida por esta intoxicación, en especial durante etapas tempranas del neurodesarrollo. Dado que recientemente se identificó que NAC es capaz de reducir los niveles cerebrales de KYNA a través de la inhibición de la KAT II, así como por la mejora en el ambiente redox, nuestra pregunta de investigación fue:

¿Qué efecto cognitivo tendrá la modulación de los niveles de KYNA a través de la administración de NAC en roedores adultos intoxicados con plomo durante la lactancia?

HIPÓTESIS

Si el ácido kinurénico es un factor causal del deterioro cognitivo inducido por la intoxicación de plomo durante la lactancia, entonces su modulación a través de la coadministración de N-acetilcisteína mostrará una atenuación en las alteraciones cognitivas evaluados en la etapa joven-adulta de estos roedores.

OBJETIVOS

- Evaluar el efecto de la coadministración de NAC en la memoria a corto y largo plazo a través de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso en roedores adultos intoxicados con plomo durante la lactancia.
- Evaluar el efecto de la coadministración de NAC en la memoria de trabajo y a largo plazo a través de la prueba de ubicación de alimento enterrado en roedores adultos intoxicados con plomo durante la lactancia.
- Evaluar el efecto de la administración de N-acetilcisteína en el catabolismo del triptófano en roedores adultos intoxicados con plomo durante la lactancia.
- Evaluar el efecto de la coadministración de N-acetilcisteína en el perfil redox de roedores adultos intoxicados con plomo durante la lactancia.

METODOLOGÍA

1. Animales

Se usaron ratones de la cepa C57, obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez (Ciudad de México). Antes de ser usados para los experimentos, se alojaron 6 animales por caja (NOM-062-ZOO-1999), en cajas de acrílico y en condiciones constantes de dieta de roedor comercial estándar y agua *ad libitum* (Walf & Frye, 2007). Se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$) y de iluminación (ciclos de 12 h de luz/oscuridad). Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo a la Guía para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud y las normas locales sobre el uso ético de los animales de la Secretaría de Salud de México. Durante las disecciones, se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

1.1 Formación de grupos

Se formaron 4 grupos experimentales, cada uno con una n de 8-10 animales, teniendo un total de 38 ratones:

Lactancia (desde el día 0 hasta el día 23 postnatal)	n
Control - Agua de la llave y pellets de dieta normal	n=8
Intoxicación con plomo - Agua de bebida con acetato de plomo 500 ppm	n=10
N-acetilcisteína - Pellets con 350 mg de NAC/día	n=10
Plomo + N-acetilcisteína - Agua de bebida con acetato de plomo 500 ppm + Pellets con 350 mg de NAC/día	n=10

Las madres y sus crías se dividieron aleatoriamente en 4 grupos: 1) control, recibió agua potable normal (Sharifi et al., 2010; Gaspar & Cordellini, 2014); 2) Pb^{2+} , recibió 500 ppm de acetato de plomo (AcPb) en agua potable; 3) NAC, recibió 350 mg/día de N-acetil-L-cisteína en el alimento y 4) Pb^{2+} + NAC, recibió 500 ppm de AcPb en el agua de bebida y 350 mg/día de NAC en el alimento. El período de tratamiento fue de 0 a 23 PND. Al destete, los tratamientos se retiraron y se reemplazaron con agua potable normal y dieta de roedor comercial.

Al cumplir los dos meses de edad, todos los grupos fueron sometidos a pruebas conductuales. Más tarde, los roedores se sacrificaron por decapitación y se obtuvo cerebro, hígado y riñón con la finalidad de evaluar el impacto de esta intoxicación en el catabolismo del triptófano (Ramírez et al., 2020).

EVALUACIÓN CONDUCTUAL

2.1 Prueba de reconocimiento de objeto novedoso (RON)

Berlyne (1950) estableció un fenómeno de comportamiento en roedores que denominaron preferencia por la novedad. Este fenómeno alude a la tendencia no aprendida de los animales a preferir y explorar objetos novedosos en comparación con objetos familiares. Una versión modificada de este paradigma fue desarrollada por Ennaceur & Delacour (1988), que permite evaluar la memoria de reconocimiento de objetos en roedores. Este tipo de memoria se ha definido como la capacidad para discriminar la familiaridad de las cosas previamente encontradas en el ambiente (Cassaday & Rawlins, 1997; Mumby, 2001) y ha sido reconocida por diversos autores como un tipo de memoria episódica, en la medida en que los organismos (incluyendo animales no humanos) son capaces de identificar relaciones temporales (cuándo), estimulantes (qué) y espaciales (dónde), que les permiten formar un sistema de memoria integrado relacionado con un evento específico (Aggleton & Brown, 1999; Kart-Teke et al., 2006).

Esta prueba se realizó en una caja de acrílico transparente (42 cm x 42 cm x 36 cm) forrada con papel blanco y con una cama de aserrín de 2 cm aprox. Consistió de dos fases: entrenamiento y prueba. Previo al entrenamiento se habitúan los individuos a la caja durante dos días consecutivos: se colocó al ratón de frente hacia una de las caras de la caja, la cual no tenía ningún objeto en su interior y se dejó explorar durante 10 min.

En el día del entrenamiento se colocaron dos objetos iguales (A, A') (Fig. 1A) con medidas de 8 cm de alto a una distancia de 15 cm entre sí, el ratón se colocó de espaldas a estos y se dejó explorar durante 5 min. Entre cada animal se limpiaron las paredes de la caja y los objetos con alcohol al 10%, se removió el aserrín de la arena para evitar señales olfativas dejadas por los sujetos experimentales. La fase de prueba para evaluar MCP se realizó dos horas más tarde, se cambió el objeto A' por uno nuevo (B) (Fig. 1B) y se realizó el mismo procedimiento que el ensayo anterior. Después de un intervalo de retención de 24 horas y para evaluar memoria a largo plazo, los ratones se colocaron de nuevo en la caja y uno de los objetos conocidos (B) fue reemplazado por uno nuevo (C) (Fig. 1C) donde exploraron durante 5 min. Los objetos fueron colocados en distinta posición al azar para cada sujeto. Todos los ensayos fueron grabados para poder analizarlos con el programa Solomon Coder.

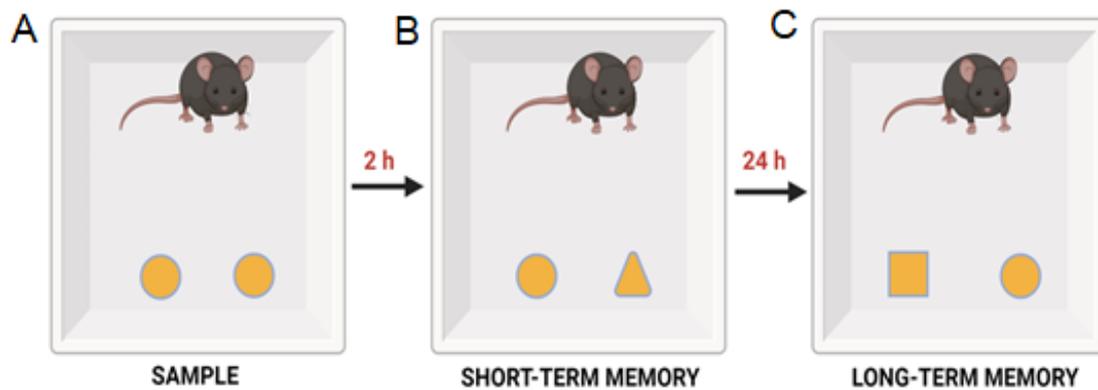


Figura 1. Prueba de reconocimiento de objeto novedoso (RON). A) Fase de entrenamiento; B) Fase de prueba para evaluación de MCP dos horas después; C) Fase de prueba para evaluación de MLP 24 horas más tarde.

2.2 Prueba de ubicación de alimento enterrado

La prueba de ubicación de alimento enterrado es una adaptación del modelo descrito por Lehmkuhl y col. (2014) para la evaluación de la disfunción olfatoria, la cual se ha relacionado con distintas enfermedades tales como Parkinson y Alzheimer.

Se empleó una caja cuadrada de acrílico de 42 cm x 30 cm con 2 cm de aserrín y en cada cara interna se colocó una pista de 8 cm x 8 cm. Para la habituación de los ratones al alimento se les proporcionaron pequeños pedazos de “aros de cereales de maíz, trigo y avena con sabores naturales de frutas”, siete días anteriores a la prueba en su propia caja, una vez al día, verificando que los consumieran al momento. Semanas previas este cereal se eligió entre varios alimentos azucarados que se ha demostrado con estudios anteriores que les interesan a los roedores y es un estímulo para realizar alguna tarea; dicho cereal tiene presentación en diversos sabores y colores; sin embargo, el que preferentemente consumieron fue el sabor uva. Asimismo, se les habituó a la caja dos días antes de la prueba: se colocó al ratón dentro de esta partiendo de la esquina del cuadrante opuesto (respecto al objetivo) y se dejó explorar durante un tiempo de 10 min.

Los individuos permanecieron 24 horas en ayuno antes de realizar la prueba. En el primer día se llevaron a cabo 6 ensayos consecutivos con 3 min de descanso entre uno y otro, en los cuales se entrenó a cada individuo para que encontrara el cereal partiendo en cada ensayo de una esquina distinta de la caja, omitiendo dónde se encontraba el cereal. El cereal se enterró a 1 cm aprox. de profundidad y a 5 cm de la esquina del cuadrante objetivo. También se incluyó un ensayo cero donde se colocó el alimento en la superficie para que el individuo lo localizara por primera vez (Fig. 2^a). En cada ensayo se tomó el tiempo que cada individuo tardó en encontrar el cereal y se permitió roer durante 8-10 s.

La MLP fue evaluada 24 horas después, se colocó nuevamente al individuo dentro de la caja durante 3 min, pero esta vez sin alimento, con el fin de medir el tiempo que tardó en llegar al sitio objetivo y la distancia recorrida, respectivamente (Fig. 2B). Todos los ensayos fueron grabados para poder analizarlos con el programa ImageJ.

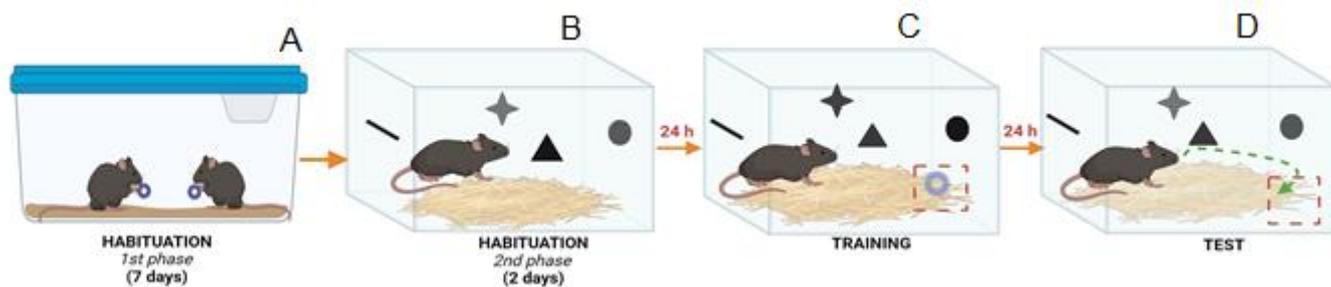


Figura 2. Prueba de ubicación de alimento enterrado. A) Habituaación al alimento 7 días previos a la prueba. B) Habituaación a la caja de acrílico 24 y 48 hrs previas a la prueba. C) Fase de adquisición: en el ensayo 0 el pellet azucarado permaneció en la superficie y posteriormente se enterró 1 cm aprox. debajo del aserrín. D) Fase de prueba para evaluación de memoria a largo plazo (MLP) 24 hrs después sin el aro de cereal, tomando en cuenta el tiempo y distancia que tardó el individuo en llegar al sitio objetivo.

3. Cuantificación de niveles de GSH y GSSG

Inmediatamente, después del término de las pruebas conductuales, los ratones fueron sacrificados por decapitación. Los cerebros se extrajeron rápidamente en hielo. El tejido cerebral (20 mg) se trató inmediatamente para cuantificar los niveles de GSH, el tejido restante se congeló para su posterior análisis.

Para la determinación de los niveles de GSH, el tejido cerebral se homogeneizó (1:10, p/v) en buffer A (154 mM KCl, 5 mM ácido dietilentriaminopentaacético, (DTPA) y 0.1 M buffer fosfato de potasio, pH 6.8. Posteriormente, se adicionó el buffer frío B (10 mM DTPA, 20 mM ácido ascórbico) y se añadió 40 mM HCl y ácido tricloroacético al 10% (buffer A 1:1). Los homogeneizados se centrifugaron a 14,000 x g durante 10 min y los sobrenadantes se filtraron (0.22 μ m). Para cuantificar los niveles de GSSG se realizaron pasos adicionales: 1) neutralización de GSH mezclando sobrenadantes con NEM (7.5 mM) y 2) los niveles de GSSG se redujeron a GSH con 100 mM de hidrosulfito de sodio, y finalmente, se detectó GSSG como GSH para su cuantificación como isoindol al agregar OPA. El producto final se cuantificó fluorométricamente con una excitación de 370 nm y una emisión de 420 nm en un espectrofotómetro lector de microplacas Synergy™ HTX (Biotek Instruments). Los niveles de GSH y GSSG se expresaron como nmoles/g de tejido (Senft et al., 2000).

4. Actividad de KAT II y niveles de KYNA

Para la determinación de la actividad de KAT II, los tejidos cerebrales se pesaron y homogeneizaron (1:10, p/v) mediante sonicación (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, EE.UU.) en buffer Krebs pH 7.4 (19 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM glucosa, 13 mM NaH₂PO₄ y 3 mM NaH₂P₂O₄). Los tejidos se diluyeron 1:2 (v/v) en Tris-acetato 5 mM (pH 8.0) que contenía piridoxal-5'-fosfato (50 μ M) y 2-mercaptoetanol (10 mM). Se incubaron 100 μ L del homogeneizado durante 1 hora a 37 °C con L-Kyn (concentración final: 100 μ M) en Tris-acetato (150 mM, pH 7.4) que contenía piruvato (1 mM) y piridoxal-5'-fosfato (80 μ M) en un volumen total de 200 μ L. Posterior al tiempo de incubación, la reacción se detuvo por la adición de 50 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 50% (p/v) y 1 mL de HCl 0.1

M. Se inyectaron 50 µL de la solución a una columna de fase inversa C18 de 3 µm (ZORBAX Eclipse XDB 5 µm, 4.6 x 150 mm; Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.), y KYNA se eluyó utilizando una fase móvil que contenía acetato de zinc 250 mM + acetato de sodio 50 mM + acetonitrilo al 3%, pH 6.2 a un flujo de 1 mL/min. KYNA se detectó fluorométricamente a una longitud de onda de excitación de 344 nm y de emisión de 398 nm en un detector de fluorescencia S200a; Perkin-Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos). El tiempo de retención de KYNA fue de 7 min (Blanco-Ayala et al., 2021).

Para la determinación de los niveles de KYNA endógenos, se descongeló el tejido cerebral y se homogeneizó en agua desionizada (1:10, p/v). Se añadieron 30 µL de ácido perclórico (6%) a 200 µL a cada una de las muestras, se mezclaron y las proteínas precipitadas se eliminaron por centrifugación a 14,600 x g durante 10 min. Se tomaron 50 µl del sobrenadante para analizarlo en el cromatógrafo, y se evaluó KYNA como se describió anteriormente. Todos los datos obtenidos fueron corregidos por proteína (Blanco-Ayala et al., 2015).

5. Determinación de peroxidación de lípidos (PL)

La peroxidación de lípidos (PL) se evaluó por medio de la producción de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). El tejido cerebral de los animales se pesó y luego se homogeneizó (1:10, p/v) en Krebs buffer (pH 7.4). Se adicionaron 250 µL de TBA (100 mL: 0.375 g de ácido tiobarbitúrico, 15 g de TCA, 2.54 mL de HCl) con 125 µl de homogeneizado en un volumen final de 500 µl. La muestra se puso en un baño de ebullición durante 15 minutos. Al término se colocaron las muestras en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 12,000 x g durante 5 min a 4°C. El cromógeno MDA-TBA se determinó como un producto colorimétrico usando un lector de microplacas multimodal Synergy™ HTX (Biotek Instruments) a una longitud de onda de 532 nm. Los resultados se expresaron como micromoles de MDA por mg de proteína (Pérez et al., 2010).

6. Cuantificación de proteína por Lowry

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método de Lowry utilizando albúmina de suero bovino como estándar. Se tomaron 10 µl del homogenado y se llevó a un volumen final de 200 µl con agua (1:20 v/v). Se le agregó 1 ml de solución C (Solución A: Na₂CO₃ 2%, NaOH 0.4% y tartrato de sodio 0.2% + solución B: Cu(SO₄)₃ 0.5% en agua). Se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregaron 100 µl de solución de Folin al 50% con agitación simultánea y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, la absorbancia se determinó a 550 nm en un lector de placas Eon (Biotek) (Lowry et al., 1951).

Estadística

Todos los datos se expresan como media ± S.E.M. (error estándar de la media). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba de Dunn para comparaciones múltiples por pares. Las comparaciones por pares de datos de pruebas de reconocimiento de objeto novedoso se analizaron utilizando la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon. Se utilizó la correlación de Spearman para evaluar la

asociación entre variables. La significación estadística se fijó en $p < 0.05$. Todas las estadísticas se calcularon con Graph Prism 9.1.0. (GraphPad, San Diego, California, EE. UU.).

RESULTADOS

1.1 Efecto de la N-Acetilcisteína en las alteraciones cognitivas inducidas por la exposición a plomo durante el periodo de lactancia en ratones

Los ratones de 60 DPN expuestos a Pb^{2+} durante la etapa de lactancia fueron sometidos a dos pruebas conductuales: la primera fue la prueba de RON y la segunda la de ubicación de alimento enterrado. En la prueba de RON se muestran los índices de reconocimiento (IR) en cada una de las fases para cada grupo experimental. Como se observa en la Figura 3, esta prueba consiste en 3 fases, la primera que es de entrenamiento, memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo.

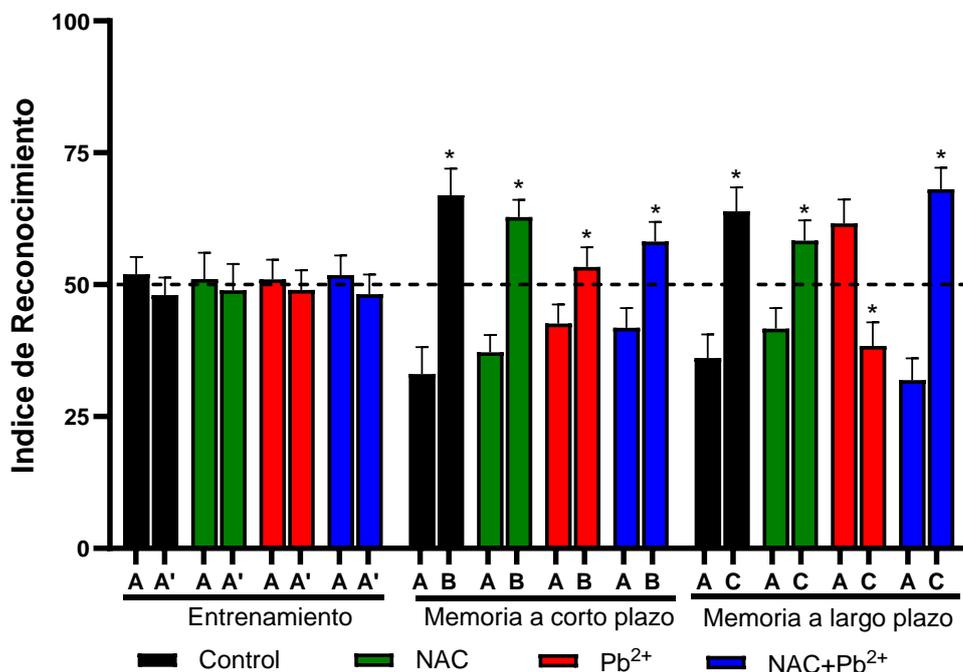


Figura 3. Evaluación de las fases de familiarización, memoria a corto (MCP) y largo plazo (MLP) después de la exposición a Pb^{2+} y/o NAC durante el periodo de lactancia por medio de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (RON). El índice de reconocimiento (tiempo de exploración de un objeto novedoso/tiempo de exploración de ambos objetos $\times 100$) se calculó para 8-10 animales por grupo. Los datos son medias \pm SEM, * $p < 0.05$ entre los objetos nuevos y familiares para cada grupo y fase según la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon.

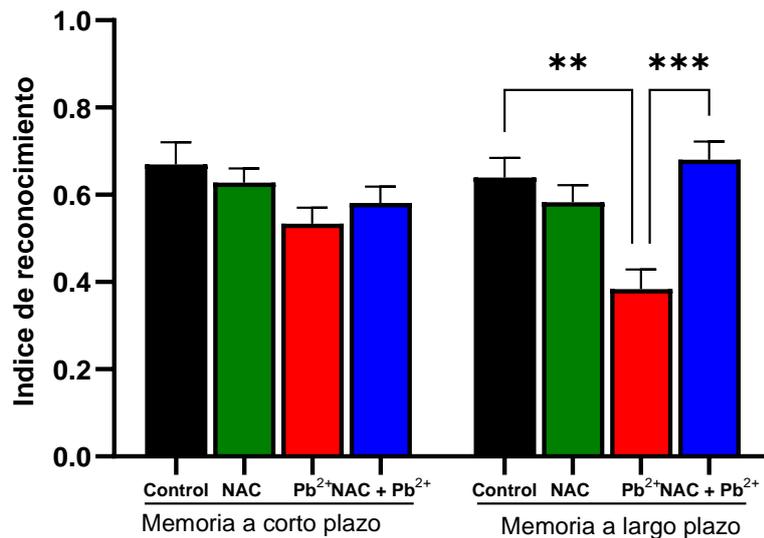


Figura 4. Efecto de la coadministración de NAC en las alteraciones en MCP y MLP inducidas por la exposición a Pb²⁺ durante el periodo de lactancia por medio de la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (RON) considerando el tiempo explorado en el objeto novedoso. Los datos son medias \pm S.E.M. del índice de reconocimiento, de 8-10 animales por grupo, * $p < 0.05$ vs. control con base en la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon.

Los resultados obtenidos para la fase de familiarización (A-A') indican que, en todos los grupos, los roedores fueron capaces de identificar ambos objetos como iguales entre sí (Figura 3). Al evaluar la MCP, se observó que sí existe diferencia significativa en los IR, es decir, los individuos de todos los grupos fueron capaces de reconocer un objeto novedoso (B), de uno conocido (A). Este índice hace referencia al tiempo de exploración de cada objeto respecto al tiempo de exploración total, lo que indica que exploran con mayor medida el objeto novedoso (Hammond, Tull & Stackman, 2004). Sin embargo, en la evaluación de MLP se observa que el grupo intoxicado con Pb²⁺ fue el único donde se invirtieron los valores de los IR, es decir, el objeto familiar (A) fue más explorado que el novedoso (C).

Lo anterior se corrobora en la figura 4 donde se observa que no hay diferencia significativa entre grupos para la evaluación de MCP, los individuos fueron capaces de discriminar entre un objeto conocido y uno nuevo. En cambio, para la memoria a largo plazo el IR del grupo de Pb²⁺ fue distinto significativamente respecto a los grupos control, donde los individuos no fueron capaces de reconocer un objeto novedoso. Cabe destacar que el grupo intoxicado con Pb²⁺ en coadministración con NAC, tuvo un IR alto, indicando en primera instancia que NAC previene las alteraciones en la consolidación de la memoria en ratones intoxicados con este metal, ya que son capaces de diferenciar entre un objeto conocido y uno nuevo.

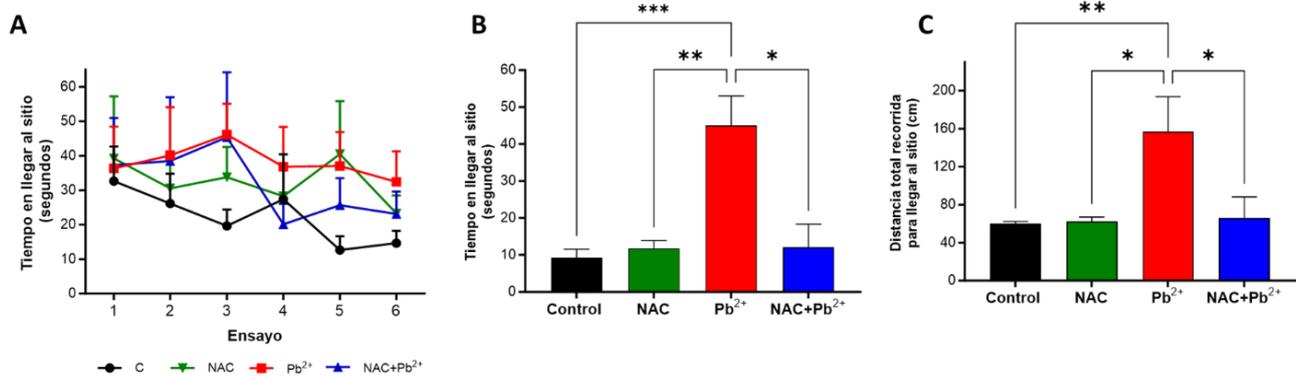


Figura 5. Efecto de la administración de NAC después de la exposición a Pb²⁺ y/o NAC durante el período de lactancia, mediante la prueba de ubicación de alimento enterrado. Se evaluó a través del tiempo para alcanzar el objetivo (B) 24 h después de la fase de adquisición (A) y la distancia recorrida (C). Los datos son medias \pm S.E.M., de 8-10 animales por grupo. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$ con base en la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba de Dunn para comparaciones múltiples.

Adicionalmente, se evaluó el aprendizaje y la memoria a través de la segunda prueba, denominada de ubicación de alimento enterrado. Se observa en la figura 5A que no hubo diferencias significativas en ningún grupo, respecto al control en cuanto al aprendizaje, es decir, los ratones de todos los grupos fueron capaces de realizar la tarea. Sin embargo, cuando se evaluó la consolidación de la memoria se encontró diferencia significativa en el grupo intoxicado con Pb²⁺ respecto al resto de los grupos, los ratones del grupo de Pb²⁺ tardaron aprox. 4 veces más en llegar al sitio objetivo (Fig. 5B), respecto al control; así como la distancia recorrida también fue significativamente mayor en este grupo (Fig. 5C). En el grupo de Pb²⁺+NAC se observa que la coadministración con NAC previene el efecto de la intoxicación por Pb²⁺, disminuyendo tanto el tiempo en llegar como la distancia recorrida hacia el sitio objetivo, respecto al grupo de Pb²⁺.

1.2 Efecto de la administración de NAC en los niveles de KYNA y actividad enzimática de KAT II de ratones expuestos a Pb²⁺ durante el periodo de lactancia

Se determinaron los niveles de KYNA y la actividad enzimática de KAT II con la finalidad de evaluar el catabolismo del triptófano a través del brazo corto de la vía de las kinureninas.

Como se puede observar en la figura 6, los niveles de KYNA en el grupo de Pb²⁺ aumentan significativamente respecto al grupo control; mientras que en el grupo de Pb²⁺+NAC hay una reducción de este efecto, es decir, la coadministración con NAC podría estar atenuando el efecto de la intoxicación por este metal. Para determinar si el efecto de NAC en los niveles de KYNA se debía a la modulación sobre la enzima que lo produce canónicamente, se evaluó la actividad de KAT II. Como se puede observar en la figura 7, tanto la administración de NAC o la exposición a Pb²⁺ parecen tener una tendencia a la baja no significativa en la actividad de esta enzima. Sin embargo, al evaluar la actividad de la KAT II (Fig. 7) en el grupo que corresponde a la coadministración de Pb²⁺+NAC se observa que esta disminuye significativamente comparada con el grupo control.

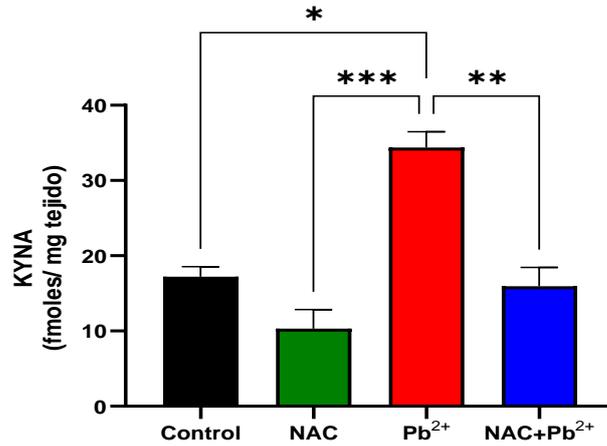


Figura 6. Niveles de KYNA en cerebro después de la exposición a Pb²⁺ y/o NAC. Los datos son medias \pm S.E.M., de 7-10 animales por grupo. *p < 0.01, **p < 0.001 y ***p < 0.0001 con base en la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn para comparaciones múltiples.

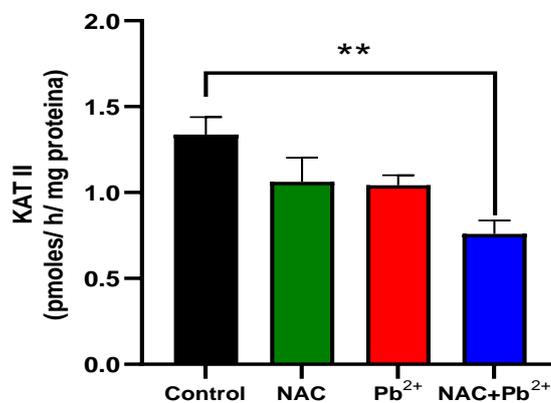


Figura 7. Actividad de KAT II en cerebro de ratones expuestos a Pb²⁺ y/o NAC durante la lactancia. Los datos son medias \pm S.E.M., de 7-10 animales por grupo. *p < 0.01, **p < 0.001 y ***p < 0.0001, con base en la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn para comparaciones múltiples.

1.3 Efecto de NAC en las alteraciones redox cerebrales inducidas por la exposición a Pb²⁺ durante el periodo de lactancia

Dado que KYNA puede producirse por vías no canónicas que involucran el estado redox celular, se evaluó la peroxidación de lípidos y el contenido de GSH/GSSG en el tejido cerebral. Como se observa en la Fig. 8, el Pb²⁺ induce un ambiente prooxidante, lo cual puede evidenciarse por un aumento en la PL, el grupo de NAC no muestra efectos en este marcador, sin embargo, la coadministración de Pb²⁺+NAC muestra una reducción significativa con respecto al grupo de Pb²⁺.

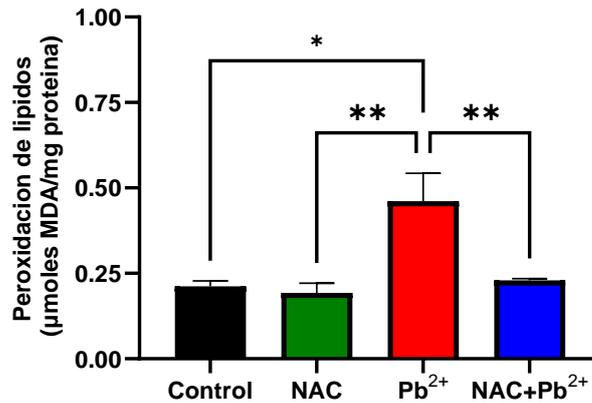


Figura 8. Peroxidación de lípidos en cerebro después de la exposición a Pb²⁺ y/o NAC. Los datos son medias ± S.E.M., de 4-5 animales por grupo. *p < 0.01, **p < 0.001 y ***p < 0.0001 con base en la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn para comparaciones múltiples.

En cuanto a la relación de GSH/GSSG (Fig. 9), se observa que el Pb²⁺ induce una tendencia no significativa respecto al control a reducir este antioxidante endógeno. El grupo de NAC no muestra cambios con respecto al control, sin embargo, en el grupo Pb²⁺+NAC aumenta significativamente esta relación, lo que sugiere que NAC al ser precursor de GSH y frente a un insulto, promueve su producción para mitigar los niveles de EROs y así atenuar el efecto de intoxicación por este metal.

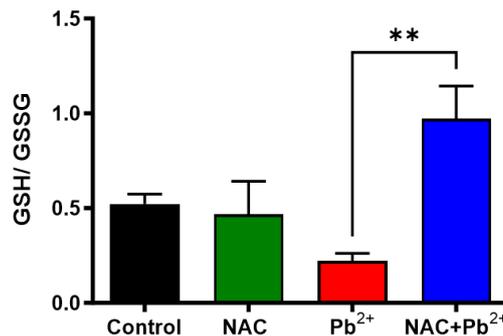


Figura 9. Niveles corticales de la relación GSH/GSSG evaluados en todos los grupos experimentales a los 60 DPN. Los datos son medias ± S.E.M., de 4-5 animales por grupo. **p < 0.001, con base en la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn para comparaciones múltiples

Con los resultados obtenidos en la prueba de alimento enterrado (tiempo y distancia) de todos los grupos evaluados y los niveles de KYNA encontrados en el tejido cerebral se realizaron correlaciones de Spearman. Como se observa en la figura 10, se encontraron correlaciones positivas entre los parámetros conductuales y los niveles de KYNA, lo que podríamos traducir en mayores niveles de KYNA se relaciona con un mayor deterioro cognitivo.

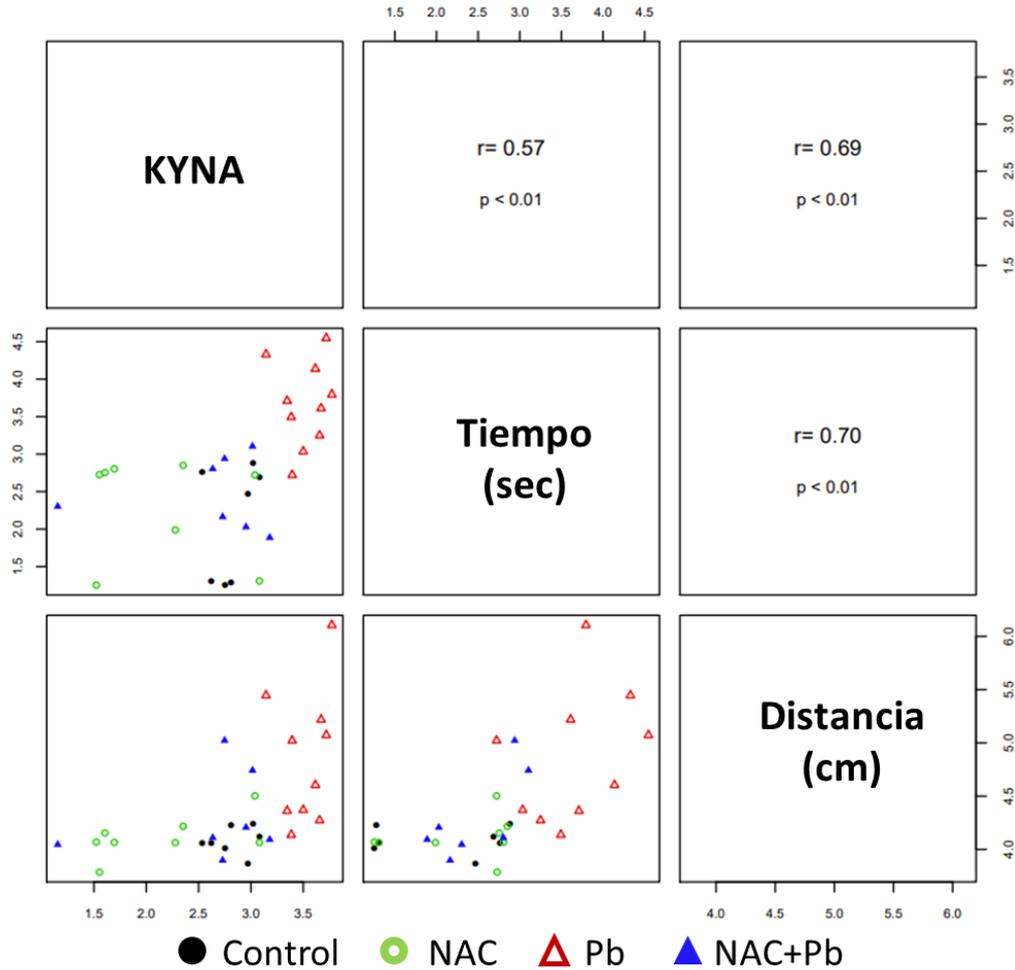


Figura 10. Correlación entre la memoria a largo plazo y los niveles cerebrales de KYNA. La matriz triangular inferior contiene el diagrama de dispersión para cada par de variables para todos los grupos. La matriz triangular superior contiene el coeficiente de correlación de rango de Spearman (r) y su valor p asociado (p), de 7-10 animales por grupo.

DISCUSIÓN

La toxicidad asociada a la exposición a Pb^{2+} es ampliamente conocida. Sin embargo, este metal al no tener ninguna función conocida en el cuerpo humano, sus mecanismos de interacción bioquímicos y moleculares con el organismo están poco estudiados. Se sabe que el Pb^{2+} ingresa al SNC a través del DMT1 y una vez dentro del cerebro provoca efectos deletéreos. Se ha evidenciado que el cerebro en desarrollo es particularmente vulnerable a este metal y cuyos efectos perduran a lo largo de la vida (Kordas, 2010). Uno de los mecanismos más estudiados por los que el Pb^{2+} ejerce sus efectos tóxicos es su interacción con sitios estereoespecíficos para cationes divalentes como Ca^{2+} , los cuales están asociados a la generación de metabolitos tóxicos y con estrés oxidante (Aguilar et al., 2014; Azcona et al., 2015). Recientemente, nuestro grupo de trabajo demostró alteraciones en el catabolismo

del triptófano derivado de la exposición a Pb^{2+} durante la lactancia. Dentro de estas alteraciones destacaron los altos niveles cerebrales de KYNA, un metabolito endógeno que modula la neurotransmisión glutamatérgica, dopaminérgica, colinérgica y gabaérgica. Cabe resaltar que las alteraciones cognitivas derivadas de la exposición a Pb^{2+} durante etapas tempranas del neurodesarrollo fueron asociadas a este metabolito del triptófano. Con estos resultados previos, el propósito de este estudio fue determinar el grado de participación de KYNA en la neurotoxicidad causada por este metal y para ello usamos como herramienta a la NAC. La NAC, es un agente redox del cual recientemente se reportó que inhibe a la KAT II (enzima encargada de la producción de KYNA en cerebro) y en consecuencia reduce los niveles cerebrales de KYNA (Blanco-Ayala et al., 2021). Utilizando esta estrategia, pudimos evidenciar que la administración paralela de NAC con Pb^{2+} previene las alteraciones cognitivas inducidas por este metal, y esto se asoció a la modulación en los niveles de KYNA.

Particularmente, en este estudio se llevaron a cabo dos pruebas conductuales con el fin de evaluar tanto la memoria a corto como la de largo plazo, así como la curva de aprendizaje en una de ellas. En la prueba de ubicación de alimento enterrado, los resultados corroboran lo que describió nuestro equipo de trabajo previamente (Ramírez et al., 2020), en donde los ratones intoxicados con Pb^{2+} no presentaron dificultades para realizar una tarea, es decir, aprenden similar al grupo control; sin embargo, sí sufrieron deterioro en la MLP al no recordar la ubicación de un sitio objetivo 24 horas después, tardando mucho más tiempo y recorriendo mayor distancia para llegar a dicho sitio, respecto al grupo control, es decir, se bloqueó la consolidación de la memoria. Sin embargo, estas alteraciones provocadas por la exposición a Pb^{2+} fueron revertidas por la coadministración de la NAC. Adicionalmente, en este estudio se utilizó la prueba de RON para determinar las alteraciones cognitivas inducidas por Pb^{2+} , ya que ofrece ventajas sobre otras que también involucran objetos para evaluar la memoria de reconocimiento, por ejemplo: no requiere ninguna motivación externa, recompensa o castigo; los ratones no necesitan un entrenamiento extenso, únicamente la habituación a la caja; y no generan condiciones estresantes. Aunado a que ofrece una prueba robusta de memoria episódica en roedores (Cohen & Stackman, 2015). Al realizar esta prueba se observó que los roedores no tratados (controles) mostraron una preferencia significativa por los objetos nuevos durante la evaluación de la memoria a corto plazo como era de esperarse (Cohen & Stackman, 2015); sin embargo, no se observaron cambios significativos entre los grupos experimentales con respecto al control. En este contexto, diversos estudios han demostrado que el 72% de roedores sin ninguna manipulación y sometidos a esta prueba muestran preferencia por objetos nuevos, y este efecto muchas veces se conserva en los roedores con lesiones en el hipocampo durante la fase de prueba, mientras que el 28% restante informa una preferencia deficiente por objetos nuevos durante esta fase. Se ha sugerido que esta discrepancia en el resultado de la lesión depende de la relativa integridad de la lesión del hipocampo, lo que concuerda con nuestros resultados, en los cuales no hubo diferencias significativas en la fase de prueba de MCP. Sin embargo, se observó un déficit en la consolidación de memoria en el grupo de Pb^{2+} , ya que los ratones intoxicados no pudieron diferenciar entre un objeto novedoso y uno conocido 24 horas después de la adquisición y refuerza la evidencia obtenida en la prueba de alimento enterrado.

Por otra parte, cuando se evaluó el efecto de NAC en el déficit cognitivo inducido por Pb^{2+} , a través de la prueba de alimento enterrado, se pudo observar que no se encontraron diferencias significativas entre grupos en cuanto al aprendizaje, pero sí en el tiempo y distancia recorrida en llegar al sitio objetivo en el grupo de Pb^{2+} +NAC respecto al grupo de Pb^{2+} , ambos parámetros disminuyeron significativamente, lo que se traduce en una

atenuación del déficit de la MLP. La administración de NAC previene estas alteraciones inducidas por Pb^{2+} . De la misma manera, los resultados obtenidos de la prueba RON, nos muestran que el co-tratamiento con NAC previene las alteraciones en la consolidación de la memoria inducidas por Pb^{2+} . Como se ha descrito, ambas pruebas realizadas en este estudio indican que NAC previene la inhibición en la consolidación de la memoria inducida por el Pb^{2+} , lo que sugiere que la intoxicación con dicho metal durante la lactancia podría provocar un daño en el hipocampo, región cerebral involucrada de manera importante en el aprendizaje y memoria explícita, como la espacial y episódica, evaluadas con los modelos empleados en este estudio (Sun et al., 2005). En este contexto, en el lóbulo temporal medial hay un conjunto de estructuras, en particular el hipocampo y las áreas corticales adyacentes que incluyen la corteza entorrinal, perirrinal y parahipocampal que están involucradas en la memoria explícita. Estas estructuras están altamente integradas, pero mientras que la corteza perirrinal parece estar involucrada en el reconocimiento de objetos después de intervalos de retención cortos, el hipocampo es responsable del reconocimiento de objetos a largo plazo. El hipocampo recibe entradas de la corteza perirrinal, que a su vez es el sitio de varias entradas de información como estímulos visuales, olfativos y somatosensoriales, todos ellos necesarios para el reconocimiento de objetos por lo que juega un papel importante, especialmente cuando la información espacial o contextual es un factor relevante (Antunes & Biala, 2012). Nuestros resultados son acordes con diversos estudios que indican que la inactivación temporal del hipocampo en roedores afecta la memoria de reconocimiento de objetos. En esta línea, Hammond y col. (2004) informaron que la microinfusión intrahipocampal bilateral de lidocaína antes de la sesión de muestra perjudicó la preferencia por objetos novedosos en ratones durante una sesión de prueba 24 hrs.

En cuanto a la memoria a largo plazo, Cohen y col. (2015) examinaron seis estudios con efectos retrógrados de las lesiones del hipocampo, de los cuales en dos de ellos se encontraron que dicha lesión afecta la recuperación de la memoria del objeto codificado antes de la lesión. Estos resultados respaldan la idea de que el hipocampo es fundamental para la codificación y consolidación de la memoria de objetos; la lesión posterior al entrenamiento probablemente interrumpe los procesos de consolidación de la memoria en curso o interfiere con la recuperación de esta respecto al objeto. Considerando esta información, y tomando en cuenta que después de la intoxicación con Pb^{2+} durante la lactancia, este metal se encuentra en grandes cantidades en el hipocampo (Ramírez, 2020; Ramírez et al., 2020) es posible que se estén llevando a cabo estas alteraciones en la consolidación.

Cabe mencionar que nosotros utilizamos un modelo experimental de intoxicación durante etapas tempranas del desarrollo debido a que, de acuerdo con la literatura, la población infantil es la más vulnerable a la intoxicación por Pb^{2+} . Se ha documentado que existe una correlación negativa entre los NPS infantil y el volumen del cerebro adulto en regiones asociadas con la función ejecutiva y problemas de conducta infantil (Muller et al., 2018). Adicionalmente, se han asociado mutaciones (cisteína a tirosina en la posición 82 (C282Y) e histidina a ácido aspártico en la posición 63 (H63D)) en el gen de hemocromatosis hereditaria (HFE) ubicado en 6p21.3 con una regulación positiva de los transportadores de metales divalentes y un aumento de la absorción de hierro en el intestino. Debido a que el Pb^{2+} interactúa metabólicamente con el hierro, se cree que estas mutaciones alteran los efectos del Pb^{2+} a través del aumento del estrés oxidante, por lo tanto, modera su efecto en la sangre sobre los síntomas del trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) en los niños (Nigg et al., 2016).

Dado que el estrés oxidante es un factor predominante en la toxicidad inducida por el Pb^{2+} , y este regula diversas vías endógenas, entre ellas la VK, ha sido de gran interés su estudio en la participación como mecanismo de toxicidad de este metal pesado. Previamente se encontraron alteraciones en el catabolismo del triptófano que correlacionaron con un deterioro cognitivo en ratones jóvenes-adultos intoxicados con Pb^{2+} durante la lactancia (Ramírez et al., 2020), lo que nos llevó a considerar que la modulación de esta vía, principalmente de los niveles cerebrales de KYNA podrían atenuar el daño inducido por Pb^{2+} . Esta idea se deriva de innumerables reportes en donde se ha demostrado que altos niveles de KYNA están asociados a distintas enfermedades neurodegenerativas y desórdenes psiquiátricos, tal es el caso de la esquizofrenia, en la cual se ha observado elevaciones de KYNA en tejido cerebral y líquido cefalorraquídeo *post mortem* de personas con este padecimiento (Nilsson et al., 2005; Sathyaikumar et al., 2011). Lo anterior aunado a estudios preclínicos donde se elevan de forma aguda los niveles cerebrales de KYNA respaldan la idea de que el aumento de este metabolito puede contribuir a disfunción cognitiva y, por lo tanto, una relevancia clínica tanto en esquizofrenia como en otros desórdenes neurológicos (Chess et al., 2007; Pocivavsek et al., 2011; Pocivavsek et al., 2017).

La estrategia que seguimos para modular los niveles de KYNA fue el empleo de NAC, un agente mucolítico que recientemente fue descrito como inhibidor de la KAT II, enzima encargada de la producción de KYNA, pero además posee la ventaja de que es un modulador del ambiente redox, capaz de promover un ambiente antioxidante a nivel celular. Bajo nuestras condiciones experimentales, no se observaron cambios en la actividad de KAT II en el grupo de Pb^{2+} , pero sí un aumento en los niveles cerebrales de KYNA, lo cual concuerda con el estudio previo de Ramírez (2020) en que demuestran que el porcentaje de células positivas a KAT II incrementó con respecto al control, sugiriendo que la proporción de neuronas/astrocitos disminuye en el grupo con Pb^{2+} , y siendo los astrocitos los que expresan primordialmente KAT II, no es posible ver afectación directa en su actividad. Sin embargo, el hecho de que los niveles cerebrales de KYNA se vean aumentados casi al doble tras la exposición con Pb^{2+} , nos sugiere que este metabolito pueda estarse formando además por rutas no canónicas, es decir, ya se ha descrito que la formación de KYNA puede favorecerse en condiciones en donde las especies reactivas de oxígeno estén presentes (Lugo-Huitrón et al., 2011). Estas vías alternas no canónicas involucran la interacción química entre L-KYN y especies reactivas de oxígeno ($\bullet OH$ y $ONOO^-$) llevando a la producción de KYNA (Blanco-Ayala et al., 2015). Considerando las rutas de formación canónicas y no canónicas de KYNA decidimos modular su producción con el empleo de NAC, ya que de esta manera se evitaría la formación de este metabolito proveniente de vías alternas o no canónicas (Lugo-Huitrón et al., 2011), así como de la vía canónica.

Empleando NAC como estrategia experimental, encontramos que los niveles de KYNA se atenúan significativamente comparados con el grupo de Pb^{2+} , lo cual se relaciona con una mejora cognitiva. Estos resultados son acordes con estudios preclínicos que han reportado una correlación entre los niveles reducidos de KYNA en el cerebro y mejora en el rendimiento cognitivo (Blanco-Ayala et al., 2015). En este contexto, se observó un efecto pro-cognitivo en ratones knock-out para KAT II en los cuales los niveles de KYNA se ven considerablemente reducidos. Dentro de los efectos pro-cognitivos observados en estos roedores se encuentra un mejor rendimiento en distintos parámetros conductuales (exploración y reconocimiento de objetos, evitación pasiva y memoria espacial), así como una mayor LTP evaluada electrofisiológicamente en el hipocampo (Potter et al., 2010). De la misma manera, la reducción farmacológica aguda de KYNA por inhibidores selectivos de KAT II mejora

significativamente el rendimiento cognitivo en ratas adultas que presentan altos niveles de KYNA en el desarrollo cerebral temprano (Pocivavsek et al., 2019).

En este estudio se determinaron los niveles de KYNA en la etapa adulta de animales expuestos a Pb^{2+} durante la lactancia, sin embargo, el incremento cerebral de KYNA se observa desde tiempos tempranos de la intoxicación (Ramírez et al., 2020). Considerando que las alteraciones en el catabolismo del triptófano se dan desde el inicio de la intoxicación con este metal, podemos especular que KYNA puede antagonizar a NMDAR y $\alpha 7nAChR$ durante la etapa postnatal temprana, que impacta directamente la neurotransmisión y la formación de redes neuronales, lo cual repercute más tarde en las alteraciones cognitivas que nosotros estamos observando. Adicionalmente, el aumento de KYNA que persiste hasta la edad adulta sugiere que KYNA puede unirse tanto al sitio co-agonista de glicina en los receptores NMDA (Stone & Darlington, 2002) como al sitio alostérico de $\alpha 7nAChR$ (Lopes et al., 2007). Si bien algunos estudios *ex vivo* cuestionan las acciones de KYNA sobre $\alpha 7nAChR$ (Arnaiz-Cot et al., 2008; Mok et al., 2009; Dobelis et al., 2012) varios estudios *in vivo* y electrofisiológicos sugieren que estos receptores son los objetivos preferenciales de KYNA en el cerebro (Hilmas et al., 2001; Alkondon et al., 2004; Rassoulpour et al., 2005; Wu et al., 2007; Konradsson-Geuken et al., 2010). Estos receptores son probablemente el primer sitio de acción para el antagonismo de KYNA, y su inhibición conduce posteriormente a una cascada de eventos neuromoduladores *in vivo*. En el cerebro están ubicados abundantemente en las terminales presinápticas (Vizi y Lendvai, 1999), y los cambios bidireccionales *in vivo* en KYNA regulan la liberación de neurotransmisores, incluido el glutamato (Carpenedo et al., 2001; Konradsson-Geuken et al., 2010; Wu et al., 2010; Pocivavsek et al., 2011), GABA (Beggiato et al., 2013, 2014), dopamina (Rassoulpour et al., 2005; Wu et al., 2007; Amori et al., 2009) y ACh (Zmarowski et al., 2009). En este sentido, el bloqueo excesivo de los $\alpha 7nAChR$ por niveles elevados de KYNA puede estar relacionado causalmente con déficits cognitivos atribuidos a una pérdida de función de estos sistemas de neurotransmisores (Gioanni et al., 1999; López et al., 2001; Cao et al., 2005; Rousseau et al., 2005; Bruno et al., 2006; Fallon et al., 2007) que están estrechamente regulados por los $\alpha 7nAChR$ que se encuentran en las interneuronas corticales, las neuronas en proyección y diversas aferencias corticales (Schröder et al., 1989; Krenz et al., 2001; Dickinson et al., 2008). La demostración de que tanto los $\alpha 7nAChR$ como los NMDAR extrasinápticos en el cerebro maduro son inhibidos selectivamente por KYNA producido endógenamente respalda la afirmación de que la VK es un blanco potencial para la comercialización de fármacos con el fin de tratar patologías relacionadas con las fluctuaciones de este metabolito en el cerebro (Alkondon et al., 2011).

De manera interesante se observó que la administración crónica de NAC no inhibe de manera significativa a la KAT II, sin embargo, cuando es coadministrada con el Pb^{2+} se observa una inhibición significativa de esta enzima, sugiriendo en parte que los bajos niveles encontrados en KYNA corresponden a esta inhibición, pero podría ser que el efecto observado se deba a la sumatoria de efectos que se observan en los grupos NAC y Pb^{2+} de manera independiente. Debido a que el aumento en los niveles cerebrales de KYNA podrían deberse en parte a rutas no canónicas que involucra la interacción entre L-KYN y EROs, evaluamos el ambiente redox a través de la determinación de GSH y los niveles de lípidos peroxidados, dado que los efectos tóxicos del Pb^{2+} en el cerebro en desarrollo se atribuyen en parte al estrés oxidante inducido por este metal. Cabe mencionar que el SNC es un blanco de la toxicidad inducida por Pb^{2+} debido a que consume grandes cantidades de oxígeno para llevar a cabo sus procesos fisiológicos, lo que conduce a una elevada generación de radicales libres (RL)

(Skoczyńska et al., 1993; Antonio et al., 1999; Wang et al., 2006). El escape de las EROs de los mecanismos antioxidantes y su progresiva acumulación desencadenan daño estructural a las proteínas y el DNA, entre otros efectos (Ahamed et al., 2008).

En este estudio nosotros corroboramos estudios previos, ya que observamos que hay una disminución de los niveles de GSH tras la intoxicación con Pb^{2+} , lo cual se relaciona con un aumento en la cantidad de lípidos peroxidados. El agotamiento de las defensas antioxidantes es el resultado de los efectos inhibitorios del Pb^{2+} sobre varias enzimas, atribuido principalmente a la alta afinidad de este metal por los grupos sulfhidrilo de CAT, SOD, entre otras, lo que conduce a la inhibición de sus actividades enzimáticas. A la vez, esto ocasiona que las células sean más susceptibles al estrés oxidante, sobre todo en diferentes regiones del cerebro, particularmente en el hipocampo y corteza cerebral, siendo estas las más vulnerables a la neurotoxicidad inducida por Pb^{2+} (Prasanthi et al., 2010). El hipocampo constituye únicamente el 13.4% del peso fresco del cerebro; sin embargo, contiene aproximadamente el 50% del Pb^{2+} total (Fjerdingstad et al., 1974).

La mayor inhibición en el sistema antioxidante por la intoxicación con Pb^{2+} se observó en ratones 28 DPN, debido a que el Pb^{2+} atraviesa fácilmente la BHE durante el período de desarrollo, por lo que los animales inmaduros acumulan más Pb^{2+} en el cerebro que los adultos como consecuencia de una BHE subdesarrollada y también por una mayor absorción gastrointestinal. Siendo así las primeras tres semanas de vida de los roedores el período de mayor vulnerabilidad al Pb^{2+} (Widmer et al., 1991). Esto concuerda con los resultados obtenidos, y además demuestra que la administración crónica de NAC previene estas alteraciones redox causadas por este metal pesado, cabe mencionar que en el grupo de NAC no se encontraron mejoras en el perfil redox; sin embargo, puede que solo prepare el ambiente celular el cual responde a un insulto tóxico por la exposición a Pb^{2+} . La parte clave de este estudio fue utilizar como herramienta farmacológica al NAC para ver si la protección ya reportada tenía que ver con la modulación del catabolismo del Trp.

NAC es un antioxidante bien establecido como lo demuestran diversos estudios *in vitro* e *in vivo* realizados en animales y seres humanos, actúa como precursor de GSH, que a su vez es un conocido antioxidante directo y sirve como sustrato o cofactor de un gran número de enzimas celulares antioxidantes, incluyendo GR, GRx, GPx, Prx, glioxalinas 1 y 2 y MAPEG (proteínas asociadas a la membrana en el metabolismo de eicosanoides y glutatión) (Deponte, 2013). Este mecanismo está respaldado por la capacidad de NAC para reponer las reservas de GSH agotadas (Aldini et al., 2018). Es por ello que se ha empleado para el tratamiento de diversos trastornos psiquiátricos y neurológicos, por la asociación del estrés oxidante con estas afecciones (Minarini et al., 2017); por ejemplo: en la enfermedad de Alzheimer se asoció con mejoras en las habilidades verbales y las tareas cognitivas de control ejecutivo en comparación con los controles (Adair et al., 2001). La administración de NAC después de una lesión cerebral traumática por explosión se asoció con una mejor función ejecutiva en comparación con la observada para los controles (Hoffer et al., 2013).

Los efectos clínicos favorables de NAC se atribuyen a que es precursor de GSH, ya que favorece su formación. En nuestro caso en particular, la administración crónica de NAC no aumentó los niveles de GSH con respecto al grupo control, ni tampoco redujo la peroxidación basal, sin embargo, cuando se da a la par del Pb^{2+} se observa un aumento de GSH, lo que sugiere que, ante un insulto, en este caso, un metal pesado, NAC induce a una mayor producción de GSH, atenuando el ambiente oxidante a causa de la intoxicación. Esto se ha observado *in vivo*, ya que NAC tiene el efecto para mejorar el contenido de GSH en tejidos

en diversos modelos animales tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. El tratamiento con NAC aumentó el contenido de GSH y la proporción de GSH a GSSG en el hígado de lechones lactantes con daño hepático (Zhang et al., 2018). En un modelo de estrés oxidante inducido por paraquat en ratones, el agotamiento de GSH en el hígado y el cerebro fue contrarrestado por NAC, lo que resultó en un menor daño oxidante (Ortiz et al., 2016). Arfsten y col. (2007) midieron la distribución de NAC radiomarcado y los niveles tisulares de GSH en ratas, donde las concentraciones de GSH aumentaron un 20% en la piel y un 50% en el hígado después de una dosis de 1200 mg/kg de NAC. El efecto del tratamiento crónico con NAC fue descrito por Arfsten y col. (2004) al cabo de 30 días con una dosis oral de 600 o 1200 mg/kg/día y se observó un aumento de NAC del 24-81% en riñones y piel. De acuerdo a estos estudios y un sinfín más en animales, está claro que el tratamiento con NAC oral agudo o crónico aumenta el contenido de GSH en varios tejidos, incluidos el hígado, los riñones, la piel y el cerebro (Aldini et al., 2018). Asimismo, algunos estudios en humanos han encontrado que el tratamiento oral con NAC tiene el efecto de aumentar los niveles de GSH en eritrocitos y linfocitos sanguíneos. Kasperczyk y col. (2016) encontraron en trabajadores expuestos a Pb^{2+} los cuales recibieron 400 y 800 mg de NAC, que los niveles de GSH en eritrocitos aumentaron significativamente en un 5%-6% respectivamente, en comparación con los de la línea de base.

La importancia de NAC no se debe solo a las propiedades mencionadas anteriormente, sino a que es una molécula bastante estable y disponible comercialmente a un precio bajo (Aldini et al., 2018). Los resultados obtenidos en este proyecto refuerzan el hecho de que KYNA es un mecanismo de daño adicional a los ya reportados por el cual el Pb^{2+} ejerce sus efectos neurotóxicos.

CONCLUSIÓN

Este trabajo robustece la evidencia de que KYNA está implicado en el deterioro cognitivo inducido por plomo y que la modulación de su formación a través de NAC representa una estrategia valiosa a probar en diversos padecimientos donde se encuentre como factor fluctuaciones en los niveles de KYNA.

A pesar de que con este estudio observamos que la coadministración de NAC previene las alteraciones cognitivas inducidas por plomo a través de la modulación de los niveles cerebrales de KYNA, aún nos falta describir a detalle los mecanismos específicos por los cuales NAC modula los niveles de este metabolito, dado que los efectos que estamos observando son 30 días posteriores a la administración de NAC, lo cual podría ser un indicativo de que NAC activó ciertos mecanismos durante su administración que previnieron las alteraciones cognitivas causadas por plomo que nosotros estamos observando.

REFERENCIAS

- Adair, J. C., Knoefel, J. E., & Morgan, N. (2001). Controlled trial of N-acetylcysteine for patients with probable Alzheimer's disease. *Neurology*, *57*(8), 1515–1517.
- Aggleton, J. P., & Brown, M. W. (1999). Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci.*, *22*(3), 425-444.
- Aguilar, I. C., Hernández, G., Quintanar, M. A., Maldonado, M., Rosas, M., & Calderón, J. V. (2014). Eryptosis in lead-exposed workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *281*, 195-202.
- Aguirre Siancas, Elías (2015). La función del hipocampo en el procesamiento de la memoria y su deterioro durante el envejecimiento. *Revista Mexicana de Neurociencia*, *16*, 21-30.
- Ahamed, M., Fareed, M., Kumar, A., Siddiqui, W. A., & Siddiqui, M. K. (2008). Oxidative stress and neurological disorders in relation to blood lead levels in children. *Redox report: communications in free radical research*, *13*(3), 117–122.
- Ahamed, M., Verma, S., Kumar, A., & Siddiqui, M.K.J. (2005). Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. *Science of the Total Environment*, *346*, 48-55.
- Akagbosu, C. O., Evans, G. C., Gulick, D., Suckow, R. F., & Bucci, D. J. (2012). Exposure to kynurenic acid during adolescence produces memory deficits in adulthood. *Schizophrenia bulletin*, *38*(4), 769–778.
- Aldini, G., Altomare, A., Baron, G., Vistoli, G., Carini, M., Borsani, L., & Sergio, F. (2018). N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free radical research*, *52*(7), 751–762.
- Alkondon, M., Pereira, E. F., Eisenberg, H. M., Kajii, Y., Schwarcz, R., & Albuquerque, E. X. (2011). Age dependency of inhibition of alpha7 nicotinic receptors and tonically active N-methyl-D-aspartate receptors by endogenously produced kynurenic acid in the brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *337*(3), 572–582.
- Alkondon, M., Pereira, E. F., Yu, P., Arruda, E. Z., Almeida, L. E., Guidetti, P., Fawcett, W. P., Sapko, M. T., Randall, W. R., Schwarcz, R., Tagle, D. A., & Albuquerque, E. X. (2004). Targeted deletion of the kynurenine aminotransferase ii gene reveals a critical role of endogenous kynurenic acid in the regulation of synaptic transmission via alpha7 nicotinic receptors in the hippocampus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *24*(19), 4635–4648.
- Amori, L., Guidetti, P., Pellicciari, R., Kajii, Y., & Schwarcz, R. (2009). On the relationship between the two branches of the kynurenine pathway in the rat brain in vivo. *Journal of neurochemistry*, *109*(2), 316–325.
- Anders, M. W., & Dekant, W. (1994). Aminoacylases. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, *27*, 431–448.
- Antonio, M. T., Corpas, I., & Leret, M. L. (1999). Neurochemical changes in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicology letters*, *104*(1-2), 1–9.
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive processing*, *13*(2), 93–110.
- Arfsten, D. P., Johnson, E. W., Wilfong, E. R., Jung, A. E., & Bobb, A. J. (2007). Distribution of radio-labeled N-Acetyl-L-Cysteine in Sprague-Dawley rats and its effect on glutathione metabolism following single and repeat dosing by oral gavage. *Cutaneous and ocular toxicology*, *26*(2), 113–134.

- Arfsten, D., Johnson, E., Thitoff, A., Jung, A., Wilfong, E., Lohrke, S., Bausman, T., Eggers, J., & Bobb, A. (2004). Impact of 30-day oral dosing with N-acetyl-L-cysteine on Sprague-Dawley rat physiology. *International journal of toxicology*, 23(4), 239–247.
- Arnaiz-Cot, J. J., González, J. C., Sobrado, M., Baldelli, P., Carbone, E., Gandía, L., García, A. G., & Hernández-Guijo, J. M. (2008). Allosteric modulation of alpha 7 nicotinic receptors selectively depolarizes hippocampal interneurons, enhancing spontaneous GABAergic transmission. *The European journal of neuroscience*, 27(5), 1097–1110.
- Athos, J., Impey, S., Pineda, V. V., Chen, X., & Storm, D. R. (2002). Hippocampal CRE-mediated gene expression is required for contextual memory formation. *Nature Neuroscience*, 5, 1119–1120.
- Azcona, M. I., Ramírez, R., & Vicente, G. (2015). Efectos tóxicos del plomo. *Rev Esp Méd Quir.*, 20, 72-77.
- Baddeley A. (2003). Working memory: looking back and looking forward. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(10), 829–839.
- Baghurst, P. A., McMichael, A. J., Wigg, N. R., Vimpani, G. V., Robertson, E. F., Roberts, R. J., & Tong, S. L. (1992). Environmental exposure to lead and children's intelligence at the age of seven years. The Port Pirie Cohort Study. *The New England journal of medicine*, 327(18), 1279–1284.
- Balsamo, R., Lanata, L., & Egan, C. G. (2010). Mucoactive drugs. *European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society*, 19(116), 127–133.
- Baratta, A. M., Buck, S. A., Buchla, A. D., Fabian, C. B., Chen, S., Mong, J. A., & Pocivavsek, A. (2018). Sex Differences in Hippocampal Memory and Kynurenic Acid Formation Following Acute Sleep Deprivation in Rats. *Scientific reports*, 8(1), 6963.
- Baratta, A. M., Viehweg, S. S., Mong, J. A., & Pocivavsek, A. (2018). A High-performance Liquid Chromatography Measurement of Kynurenine and Kynurenic Acid: Relating Biochemistry to Cognition and Sleep in Rats. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (138), 58129.
- Bazrgar, M., Goudarzi, I., Lashkarbolouki, T., & Elahdadi Salmani, M. (2015). Melatonin ameliorates oxidative damage induced by maternal lead exposure in rat pups. *Physiology & Behavior*, 151, 178-188.
- Beggiato, S., Antonelli, T., Tomasini, M. C., Tanganelli, S., Fuxe, K., Schwarcz, R., & Ferraro, L. (2013). Kynurenic acid, by targeting $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors, modulates extracellular GABA levels in the rat striatum in vivo. *The European journal of neuroscience*, 37(9), 1470–1477.
- Beggiato, S., Tanganelli, S., Fuxe, K., Antonelli, T., Schwarcz, R., & Ferraro, L. (2014). Endogenous kynurenic acid regulates extracellular GABA levels in the rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology*, 82, 11–18.
- Ben-Ari, Y., Khazipov, R., Leinekugel, X., Caillard, O., & Gaiarsa, J. L. (1997). GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'ménage à trois'. *Trends in neurosciences*, 20(11), 523–529.
- Berlyne, D. E. (1950). Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. *British Journal of Psychology*, 1-2(41), 68-80.
- Blanco Ayala, T., Lugo Huitrón, R., Carmona Aparicio, L., Ramírez Ortega, D., González Esquivel, D., Pedraza Chaverrí, J., Pérez de la Cruz, G., Ríos, C., Schwarcz, R., & Pérez de la Cruz, V. (2015). Alternative kynurenic acid synthesis routes studied in the rat cerebellum. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 178.
- Blanco Ayala, T., Ramírez Ortega, D. R., Ovalle Rodríguez, P. O., Pineda, B., Pérez de la Cruz, G. P., González Esquivel, D. G., Schwarcz, R., Sathyasaikumar, K. V., Jiménez

- Anguiano, A. J., & Pérez de la Cruz, V. P. (2021). Subchronic *N*-acetylcysteine Treatment Decreases Brain Kynurenic Acid Levels and Improves Cognitive Performance in Mice. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *10*(2), E147.
- Bozdagi, O., Shan, W., Tanaka, H., Benson, D. L., & Huntley, G. W. (2000). Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron*, *28*, 245–259.
- Braun, J. M., Kahn, R. S., Froehlich, T., Auinger, P., & Lanphear, B. P. (2006). Exposures to environmental toxicants and attention deficit hyperactivity disorder in U.S. children. *Environmental health perspectives*, *114*(12), 1904–1909.
- Bredt, D. S., Ferris, C. D., & Snyder, S. H. (1992). Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*, 10976–10981.
- Bressler, J., Kim, K. A., Chakraborti, T., & Goldstein, G. (1999). Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochemical Research*, *24*, 595–600.
- Bruno, J. P., Gash, C., Martin, B., Zmarowski, A., Pomerleau, F., Burmeister, J., Huettl, P., & Gerhardt, G. A. (2006). Second-by-second measurement of acetylcholine release in prefrontal cortex. *The European journal of neuroscience*, *24*(10), 2749–2757.
- Buck, S. A., Baratta, A. M., & Pocivavsek, A. (2020). Exposure to elevated embryonic kynurenine in rats: Sex-dependent learning and memory impairments in adult offspring. *Neurobiology of learning and memory*, *174*, 107282.
- Cao, Y. J., Surowy, C. S., & Puttfarcken, P. S. (2005). Different nicotinic acetylcholine receptor subtypes mediating striatal and prefrontal cortical [3H] dopamine release. *Neuropharmacology*, *48*(1), 72–79.
- Caravanos, J., Dowling, R., Téllez, M. M., Cantoral, A., Kobrosly, R., Estrada, D., Orjuela, M., Gualtero, S., Ericson, B., Rivera, A., & Fuller, R. (2014). Blood Lead Levels in Mexico and Pediatric Burden of Disease Implications. *Annals of Global Health*, *80*(4), 269-277.
- Carew, T., Castellucci, V. F., & Kandel, E. R. (1979). Sensitization in *Aplysia*: restoration of transmission in synapses inactivated by long-term habituation. *Science (New York, N.Y.)*, *205*(4404), 417–419.
- Carpenedo, R., Pittaluga, A., Cozzi, A., Attucci, S., Galli, A., Raiteri, M., & Moroni, F. (2001). Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release. *The European journal of neuroscience*, *13*(11), 2141–2147.
- Carrillo-Mora, Paul. (2010^a). Sistemas de memoria: reseña histórica, clasificación y conceptos actuales. Primera parte: Historia, taxonomía de la memoria, sistemas de memoria de largo plazo: la memoria semántica. *Salud mental*, *33*(1), 85-93.
- Carrillo-Mora, Paul. (2010^b). Sistemas de memoria: reseña histórica, clasificación y conceptos actuales. Segunda parte: Sistemas de memoria de largo plazo: Memoria episódica, sistemas de memoria no declarativa y memoria de trabajo. *Salud mental*, *33*(2), 197-205.
- Cassaday, H., & Rawlins, J. (1997). The hippocampus, objects, and their contexts. *Behavioral neuroscience*, *111*, 1228-1244.
- Castellucci, V. F., Carew, T. J., & Kandel, E. R. (1978). Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. *Science (New York, N.Y.)*, *202*(4374), 1306–1308.
- Chess, A. C., Landers, A. M., & Bucci, D. J. (2009). L-kynurenine treatment alters contextual fear conditioning and context discrimination but not cue-specific fear conditioning. *Behavioural brain research*, *201*(2), 325–331.

- Chess, A. C., Simoni, M. K., Alling, T. E., & Bucci, D. J. (2007). Elevations of endogenous kynurenic acid produce spatial working memory deficits. *Schizophrenia bulletin*, 33(3), 797–804.
- Cohen, N. J., & Squire, L. R. (1980). Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science (New York, N.Y.)*, 210(4466), 207–210.
- Cohen, S. J., & Stackman, R. W., Jr (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural brain research*, 285, 105–117.
- Collingridge, G. L., Volianskis, A., Bannister, N., France, G., Hanna, L., Mercier, M., Tidball, P., Fang, G., Irvine, M. W., Costa, B. M., Monaghan, D. T., Bortolotto, Z. A., Molnár, E., Lodge, D., & Jane, D. E. (2013). The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. *Neuropharmacology*, 64, 13–26.
- Cordova, F. M., Rodrigues, L. S., Giacomelli, M. B. O., Oliveira, C. S., Posser, T., Dunkley, P. R., & Leal, R. B. (2004). Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Research*, 998, 65–72.
- Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S., & Smith, S. J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: Long-range glial signaling. *Science*, 247, 470–473.
- Cortés, C., Estrada, M., Manzo, S. & Saavedra, A. (2009). Influencia de la Peroxidación de Lípidos sobre el Daño Oxidativo Mitocondrial y la Integridad de *Saccharomyces cerevisiae*. *Inf. tecnol*, 20(2), 71-81.
- Covarrubias, M. & Estrada, D. (2010). Uso de Plomo en la Alfarería en México, INFORME. *Fondo Nacional para el Fomento de las Artesanías (FONART)*, 1-51.
- Cuartero, M. I., de la Parra, J., García-Culebras, A., Ballesteros, I., Lizasoain, I., & Moro, M. Á. (2016). The Kynurenine Pathway in the Acute and Chronic Phases of Cerebral Ischemia. *Current pharmaceutical design*, 22(8), 1060–1073.
- Cunningham, E. (2012). What Role Does Nutrition Play in the Prevention or Treatment of Childhood Lead Poisoning? *J Acad Nutr Diet.*, 112, 1916.
- De Roo, M., Klauser, P., & Muller, D. (2008). LTP promotes a selective long-term stabilization and clustering of dendritic spines. *PLoS Biology*, 6, 1850–1860.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3217–3266.
- Dhimal, M., Karki, K. B., Aryal, K. K., Dhimal, B., Joshi, H. D., Puri, S., Pandey, A. R., Dhakal, P., Sharma, A. K., Raya, G.B., Ansari, I., Groneberg, D. A., Müller, R., & Kuch, U. (2017). High blood levels of lead in children aged 6-36 months in Kathmandu Valley, Nepal: A cross-sectional study of associated factors. *PLoS ONE*, 12(6), e0179233.
- Diaz-Ruiz, A., Tristán-López, L. A., Medrano-Gómez, K. I., Torres-Domínguez, J. A., Ríos, C., & Montes, S. (2016). Glazed clay pottery and lead exposure in Mexico: Current experimental evidence. *Nutritional neuroscience*, 20(9), 513–518.
- Dickinson, J. A., Kew, J. N., & Wonnacott, S. (2008). Presynaptic alpha 7- and beta 2-containing nicotinic acetylcholine receptors modulate excitatory amino acid release from rat prefrontal cortex nerve terminals via distinct cellular mechanisms. *Molecular pharmacology*, 74(2), 348–359.
- Dobelis, P., Staley, K. J., & Cooper, D. C. (2012). Lack of modulation of nicotinic acetylcholine alpha-7 receptor currents by kynurenic acid in adult hippocampal interneurons. *PLoS one*, 7(7), e41108.

- Du, F., Schmidt, W., Okuno, E., Kido, R., Koehler, C., & Schwarcz, R. (1992). Localization of kynurenine aminotransferase immunoreactivity in the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 321, 477–487.
- Dudai Y. (2012). The restless engram: consolidations never end. *Annual review of neuroscience*, 35, 227–247.
- Dudai, Y., & Morris, R. (2000). *To consolidate or not to consolidate: What are the questions? In Brain, perception, memory advances in cognitive sciences*. Oxford University Press.
- Dudai, Y., & Morris, R. G. (2013). Memorable trends. *Neuron*, 80(3), 742–750.
- Earl, R., Burns, N., Nettelbeck, T., & Baghurst, P. (2015). Low-level environmental lead exposure still negatively associated with children's cognitive abilities. *Australian Journal of Psychology*, 68(2), 98–106.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47-59.
- Erhardt, S., Schwieler, L., Emanuelsson, C., & Geyer, M. (2004). Endogenous kynurenic acid disrupts prepulse inhibition. *Biological Psychiatry*, 56, 255–260.
- Fallon, S., Shearman, E., Sershen, H., & Lajtha, A. (2007). The effects of glutamate and GABA receptor antagonists on nicotine-induced neurotransmitter changes in cognitive areas. *Neurochemical research*, 32(4-5), 535–553.
- Farr, S. A., Poon, H. F., Dogrukol-Ak, D., Drake, J., Banks, W. A., Eyerman, E., Butterfield, D. A., & Morley, J. E. (2003). The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *Journal of neurochemistry*, 84(5), 1173–1183.
- Feksa, L. R., Oliveira, E., Trombini, T., Luchese, M., Bisi, S., Linden, R., Berlese, D. B., Rojas, D. B., Andrade, R. B., Schuck, P. F., Machado, L., Wajner, M., Duval, C. M., & Emanuelli, T. (2012). Pyruvate Kinase Activity and d-Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity as Biomarkers of Toxicity in Workers Exposed to Lead. *Arch Environ Contam Toxicol.*, 63, 453–460.
- Fjeringstad, E. J., Danscher, G., & Fjeringstad, E. (1974). Hippocampus: selective concentration of lead in the normal rat brain. *Brain research*, 80(2), 350–354.
- Fontana, D., Lascano V. M., Solá, N., Martínez, S., Virgolini, M., & Mazzieri, M. R. (2013). Intoxicación por plomo y su tratamiento farmacológico. *Revista de Salud Pública*, 17(1), 49-59.
- Fukui, S., Schwarz, R., Rapoport, S. I., Takada, Y., & Smith, Q. R. (1991). Blood-brain barrier transport of kynurenines: Implications for brain synthesis and metabolism. *Journal of Neurochemistry*, 56, 2007–2017.
- García-Lestón, J., Méndez, J., Pásaro, E., & Laffon, B. (2010). Genotoxic effects of lead: an updated review. *Environment international*, 36(6), 623–636.
- Gaspar, A. F., & Cordellini, S. (2014). Combination therapy for the cardiovascular effects of perinatal lead exposure in young and adult rats. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 103(3), 219–230.
- Gioanni, Y., Rougeot, C., Clarke, P. B., Lepoué, C., Thierry, A. M., & Vidal, C. (1999). Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission. *The European journal of neuroscience*, 11(1), 18–30.
- Giorgini, F., Huang, S. Y., Sathyaikumar, K. V., Notarangelo, F. M., Thomas, M. A., Tararina, M., Wu, H. Q., Schwarcz, R., & Muchowski, P. J. (2013). Targeted deletion of kynurenine 3-monooxygenase in mice: a new tool for studying kynurenine pathway

metabolism in periphery and brain. *The Journal of biological chemistry*, 288(51), 36554–36566.

Giustarini, D., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Tsikas, D., & Rossi, R. (2012). N-Acetylcysteine ethyl ester (NACET): a novel lipophilic cell-permeable cysteine derivative with an unusual pharmacokinetic feature and remarkable antioxidant potential. *Biochemical pharmacology*, 84(11), 1522–1533.

Goda, K., Kishimoto, R., Shimizu, S., Hamane, Y., & Ueda, M. (1996). Quinolinic acid and active oxygens. Possible contribution of active Oxygens during cell death in the brain. *Advances in experimental medicine and biology*, 398, 247–254.

González-Esquivel, D., Ramírez-Ortega, D., Pineda, B., Castro, N., Ríos, C., & Pérez de la Cruz, V. (2017). Kynurenine pathway metabolites and enzymes involved in redox reactions. *Neuropharmacology*, 112(Pt B), 331–345.

Goyer R. A. (1990). Transplacental transport of lead. *Environmental health perspectives*, 89, 101–105.

Goyer R. A. (1997). Toxic and essential metal interactions. *Annual review of nutrition*, 17, 37–50.

Gu, F., Chauhan, V., & Chauhan, A. (2015). Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 18(1), 89–95.

Hahn, B., Reneski, C. H., Pocivavsek, A., & Schwarcz, R. (2018). Prenatal kynurenine treatment in rats causes schizophrenia-like broad monitoring deficits in adulthood. *Psychopharmacology*, 235(3), 651–661.

Hammond, R. S., Tull, L. E., & Stackman, R. W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory*, 82(1), 26–34.

Han, Q., Cai, T., Tagle, D. A., & Li, J. (2010). Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 67(3), 353–368.

Han, Q., Robinson, H., Cai, T., Tagle, D. A., & Li, J. (2009). Biochemical and structural properties of mouse kynurenine aminotransferase III. *Molecular and cellular biology*, 29(3), 784–793.

Hanna-Attisha, M., LaChance, J., Sadler, R. C., & Champney Schnepf, A. (2016). Elevated Blood Lead Levels in Children Associated With the Flint Drinking Water Crisis: A Spatial Analysis of Risk and Public Health Response. *American journal of public health*, 106(2), 283–290.

Hardeland, R., Zsizsik, B. K., Poeggeler, B., Fuhrberg, B., Holst, S., & Coto-Montes, A. (1999). Indole-3-pyruvic and -propionic acids, kynurenic acid, and related metabolites as luminophores and free-radical scavengers. *Advances in experimental medicine and biology*, 467, 389–395.

Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., & Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neuroscience*, 5(5), 405–414.

Hartai, Z., Klivenyi, P., Janaky, T., Penke, B., Dux, L., & Vecsei, L. (2005). Kynurenine metabolism in plasma and in red blood cells in Parkinson's disease. *Journal of Neurological Sciences*, 239, 31–35.

Hilmas, C., Pereira, E. F., Alkondon, M., Rassoulpour, A., Schwarcz, R., & Albuquerque, E. X. (2001). The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *The*

Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 21(19), 7463–7473.

Hoffer, M. E., Balaban, C., Slade, M. D., Tsao, J. W., & Hoffer, B. (2013). Amelioration of acute sequelae of blast induced mild traumatic brain injury by N-acetyl cysteine: a double-blind, placebo controlled study. *PloS one*, 8(1), e54163.

Holstege, C. (2019). *Pathophysiology and Etiology of Lead Toxicity: Pharmacokinetics, Mechanisms of Toxicity*. Medscape.com. <https://emedicine.medscape.com/article/2060369-overview?form=fpf>

Holtzman, D., Olson, J. E., DeVries, C., & Bensch, K. (1987). Lead toxicity in primary cultured cerebral astrocytes and cerebellar granular neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 89, 211–225.

Homma, T., & Fujii, J. (2015). Application of Glutathione as Anti-Oxidative and Anti-Aging Drugs. *Current drug metabolism*, 16(7), 560–571.

Ivanov, A., Pellegrino, C., Rama, S., Dumalska, I., Salyha, Y., Ben-Ari, Y., & Medina, I. (2006). Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *The Journal of Physiology*, 572(Pt 3), 789–798.

Kanai, M., Nakamura, T., & Funakoshi, H. (2009). Identification and characterization of novel variants of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene: differential regulation in the mouse nervous system during development. *Neuroscience research*, 64(1), 111–117.

Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science*, 294, 1030–1038.

Kart-Teke, E., De Souza, M. A., Huston, J. P., & Dere, E. (2006). Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiology of learning and memory*, 85, 173–182.

Kasperczyk, S., Dobrakowski, M., Kasperczyk, A., Romuk, E., Rykaczewska-Czerwińska, M., Pawlas, N., & Birkner, E. (2016). Effect of N-acetylcysteine administration on homocysteine level, oxidative damage to proteins, and levels of iron (Fe) and Fe-related proteins in lead-exposed workers. *Toxicology and industrial health*, 32(9), 1607–1618.

Kessler, M., Terramani, T., Lynch, G., & Baudry, M. (1989). A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *Journal of neurochemistry*, 52(4), 1319–1328.

Kim, K. A., Chakraborti, T., Golstein, G., Johnston, M., & Bressler, J. (2002). Exposure to lead elevates induction of zif268 and ARC mRNA in rats after electroconvulsive shock: The involvement of protein kinase C. *Journal of Neuroscience Research*, 69, 268–277.

Kita, T., Morrison, P. F., Heyes, M. P., & Markey, S. P. (2002). Effects of systemic and central nervous system localized inflammation on the contributions of metabolic precursors of the L-kynurenine and quinolinic acid pools in brain. *Journal of Neurochemistry*, 82, 258–268.

Knobloch, M., Farinelli, M., Konietzko, U., Nitsch, R. M., & Mansuy, I. M. (2007). Ab oligomer-mediated long-term potentiation impairment involves protein phosphatase 1-dependent mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 27, 7648–7653.

Knyihar-Csillik, E., Okuno, E., & Većsei, L. (1999). Effects of *in vivo* sodium azide administration on the immunohistochemical localization of kynurenine aminotransferase in the rat brain. *Neuroscience*, 94, 269–277.

Kondo, H., Takahashi, M., & Niki, E. (1997). Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. *FEBS letters*, 413(2), 236–238.

Konradsson-Geuken, A., Wu, H. Q., Gash, C. R., Alexander, K. S., Campbell, A., Sozeri, Y., Pellicciari, R., Schwarcz, R., & Bruno, J. P. (2010). Cortical kynurenic acid bi-directionally

modulates prefrontal glutamate levels as assessed by microdialysis and rapid electrochemistry. *Neuroscience*, 169(4), 1848–1859.

Kordas K. (2010). Iron, Lead, and Children's Behavior and Cognition. *Annual review of nutrition*, 30, 123–148.

Kostrzewa, R. M. (2014). *Handbook of neurotoxicity*. United States. Springer.

Krenz, I., Kalkan, D., Wevers, A., de Vos, R. A., Steur, E. N., Lindstrom, J., Pilz, K., Nowacki, S., Schütz, U., Moser, N., Witter, B., & Schröder, H. (2001). Parvalbumin-containing interneurons of the human cerebral cortex express nicotinic acetylcholine receptor proteins. *Journal of chemical neuroanatomy*, 21(3), 239–246.

Lanphear, B. P., Rauch, S., Auinger, P., Allen, R. W., & Hornung, R. W. (2018). Low-level lead exposure and mortality in US adults: a population-based cohort study. *The Lancet. Public health*, 3(4), e177–e184.

Lechner, H. A., Squire, L. R., & Byrne, J. H. (1999). 100 years of consolidation—remembering Müller and Pilzecker. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 6(2), 77–87.

Lehmkuhl, A. M., Dirr, E. R., & Fleming, S. M. (2014). Olfactory assays for mouse models of neurodegenerative disease. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (90), e51804.

Leiser, S. C., Bowlby, M. R., Comery, T. A., & Dunlop, J. (2009). A cog in cognition: how the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor is geared towards improving cognitive deficits. *Pharmacology & therapeutics*, 122(3), 302–311.

Lopes, C., Pereira, E. F., Wu, H. Q., Purushottamachar, P., Njar, V., Schwarcz, R., & Albuquerque, E. X. (2007). Competitive antagonism between the nicotinic allosteric potentiating ligand galantamine and kynurenic acid at alpha7* nicotinic receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 322(1), 48–58.

López, E., Arce, C., Vicente, S., Oset-Gasque, M. J., & González, M. P. (2001). Nicotinic receptors mediate the release of amino acid neurotransmitters in cultured cortical neurons. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 11(2), 158–163.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275.

Lugo-Huitrón, R., Blanco-Ayala, T., Ugalde-Muñoz, P., Carrillo-Mora, P., Pedraza-Chaverrí, J., Silva-Adaya, D., Maldonado, P. D., Torres, I., Pinzón, E., Ortiz-Islas, E., López, T., García, E., Pineda, B., Torres-Ramos, M., Santamaría, A., & La Cruz, V. P. (2011). On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicology and teratology*, 33(5), 538–547.

Madison, D. V., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1991). Mechanisms underlying long-term potentiation of synaptic transmission. *Annual Review of Neuroscience*, 14, 379–397.

Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1993). NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: Multiple forms and mechanisms. *Trends in Neurosciences*, 16, 521–527.

Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1999). Long-term potentiation – A decade of progress? *Science*, 285, 1870–1874.

Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 103–126.

Mani, M. S., Kunnathully, V., Rao, C., Kabekkodu, S. P., Joshi, M. B., & D'Souza, H. S. (2018). Modifying effects of δ -Aminolevulinatase dehydratase polymorphism on blood lead levels and ALAD activity. *Toxicology letters*, 295, 351–356.

Mansuy, I. M., & Shenolikar, S. (2006). Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory. *Trends in Neurosciences*, 29(12), 679–686.

- Marie, A., Meunier, J., Brun, E., Malmstrom, S., Baudoux, V., Flaszka, E., Naert, G., Roman, F., Cosnier-Pucheu, S., & Gonzalez-Gonzalez, S. (2018). N-acetylcysteine Treatment Reduces Age-related Hearing Loss and Memory Impairment in the Senescence-Accelerated Prone 8 (SAMP8) Mouse Model. *Aging and disease*, *9*(4), 664–673.
- Martin, K. C., Casadio, A., Zhu, H., Yaping, E., Rose, J. C., Chen, M., Bailey, C. H., & Kandel, E. R. (1997). Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: A function for local protein synthesis in memory storage. *Cell*, *91*, 927–938.
- Massicotte, G., & Baudry, M. (1991). Triggers and substrates of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *15*, 415–423.
- Mazumdar, I., & Goswami, K. (2014). Congenital lead poisoning: an unusual presentation. *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*, *29*(2), 257–259.
- McNaughton, B. L. (1993). The mechanism of expression of long-term enhancement of hippocampal synapses: Current issues and theoretical implications. *Annual Review of Physiology*, *55*, 375–396.
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry*, *52*, 711–760.
- Meng, X. M., Zhu, D. M., Ruan, D. Y., She, J. Q., & Luo, L. (2005). Effects of chronic lead exposure on 1H MRS of hippocampus and frontal lobes in children. *Neurology*, *64*(9), 1644–1647.
- Meyer, A., Buhl, R., Kampf, S., & Magnussen, H. (1995). Intravenous N-acetylcysteine and lung glutathione of patients with pulmonary fibrosis and normals. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *152*(3), 1055–1060.
- Minarini, A., Ferrari, S., Galletti, M., Giambalvo, N., Perrone, D., Rioli, G., & Galeazzi, G. M. (2017). N-acetylcysteine in the treatment of psychiatric disorders: current status and future prospects. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, *13*(3), 279–292.
- Mok, M. H., Fricker, A. C., Weil, A., & Kew, J. N. (2009). Electrophysiological characterisation of the actions of kynurenic acid at ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, *57*(3), 242–249.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, *12*(3), 529–540.
- Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria. *CIC. Cuadernos de Información y Comunicación*, *10*, 221-233.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., & Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, *354*(6348), 31–37.
- Moroni, F. (1999). Tryptophan metabolism and brain function: Focus on kynurenine and other indole metabolites. *European Journal of Pharmacology*, *375*, 87–100.
- Moroni, F., Russi, G., Lombardi, G., Beni, M., & Carla, V. (1988). Presence of kynurenic acid in the mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*, *51*, 177–180.
- Morris, G., Anderson, G., Dean, O., Berk, M., Galecki, P., Martin-Subero, M., & Maes, M. (2014). The glutathione system: a new drug target in neuroimmune disorders. *Molecular neurobiology*, *50*(3), 1059–1084.
- Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S., & Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, *319*, 774–776.
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, *297*, 681–683.

- Müller, B., Oske, M., Hochscheid, R., Seifart, C., Barth, P. J., Garn, H., & von Wichert, P. (2001). Effect of N-acetylcysteine treatment on NO₂-impaired type II pneumocyte surfactant metabolism. *European journal of clinical investigation*, 31(2), 179–188.
- Muller, C., Sampson, R. J., & Winter, A. S. (2018). Environmental Inequality: The Social Causes and Consequences of Lead Exposure. *Annual Review of Sociology*, 44(1), 263-282.
- Müller, G. E., & Pilzecker, A. (1900). Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z Psychol Ergänzungsband*, 1, 1–300.
- Müller, Y., Rivero, L., Carvalho, M., Kobus-Bianchini, K., Farina, M., & Nazari, E. (2008). Behavioral impairments related to lead-induced developmental neurotoxicity in chicks. *Archives of toxicology*, 82, 445-51.
- Mumby, D. G. (2001). Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behavioural Brain Research*, 1–2(127), 159-181.
- Murphy, G. G. (2013). Spatial Learning and Memory-What's TLE Got To Do With It?. *Epilepsy currents*, 13(1), 26–29.
- Namihira, D., Saldivar, L., Pustilnik, N., Carreón, G. J., & Salinas, M. E. (1993). Lead in human blood and milk from nursing women living near a smelter in Mexico City. *Journal of toxicology and environmental health*, 38(3), 225–232.
- Navarrete, F., Pérez-Ortiz, J. M., Femenía, T., García-Gutiérrez, M. S., García-Payá, M. E., Leiva-Santana, C., & Manzanares, J. (2008). Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales [Methods to evaluate cognitive disorders in animal models]. *Revista de neurología*, 47(3), 137–145.
- Neal, A. P., & Guilarte, T. R. (2010). Molecular neurobiology of lead (Pb(2+)): effects on synaptic function. *Molecular neurobiology*, 42(3), 151–160.
- Nehru, B. & Kanwar, S. S. (2004). N-acetylcysteine exposure on lead-induced lipid peroxidative damage and oxidative defense system in brain regions of rats. *Biol Trace Elem Res*, 101(3), 257–264.
- Nigg, J. T., Elmore, A. L., Natarajan, N., Friderici, K. H., & Nikolas, M. A. (2016). Variation in an Iron Metabolism Gene Moderates the Association Between Blood Lead Levels and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Children. *Psychological science*, 27(2), 257–269.
- Nihei, M. K., & Guilarte, T. R. (2001). Molecular changes in glutamatergic synapses induced by Pb²⁺: Association with deficits of LTP and spatial learning. *Neurotoxicology*, 22, 635–643.
- Nihei, M. K., Desmond, N. L., McGlothan, J. L., Kuhlmann, A. C., & Guilarte, R. T. (2000). N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes are associated with lead-induced deficits of long-term potentiation and spatial learning. *Neuroscience*, 99, 233–242.
- Nilsson, L. K., Linderholm, K. R., & Erhardt, S. (2006). Subchronic treatment with kynurenine and probenecid: effects on prepulse inhibition and firing of midbrain dopamine neurons. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 113(5), 557–571.
- Nkomo, P., Naicker, N., Mathee, A., Galpin, J., Richter, L. M., & Norris, S. A. (2018). The association between environmental lead exposure with aggressive behavior, and dimensionality of direct and indirect aggression during mid-adolescence: Birth to Twenty Plus cohort. *The Science of the total environment*, 612, 472–479.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación, México, 107-165.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-199-SSA1 (2000). Salud ambiental. Niveles de plomo en sangre y acciones como criterios para proteger la salud de la población expuesta no ocupacionalmente. Diario Oficial de la Federación, México.

- Noszál, B., Visky, D., & Kraszni, M. (2000). Population, acid-base, and redox properties of N-acetylcysteine conformers. *Journal of medicinal chemistry*, 43(11), 2176–2182.
- Notarangelo, F. M., & Pocivavsek, A. (2017). Elevated kynurenine pathway metabolism during neurodevelopment: Implications for brain and behavior. *Neuropharmacology*, 112(Pt B), 275–285.
- Ogawa, T., Matson, W. R., Beal, M. F., Myers, R. H., Bird, E. D., Milbury, P., & Saso, S. (1992). Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology*, 42, 1702–1706.
- Okuno, E., Nakamura, M., & Schwarcz, R. (1991). Two kynurenine aminotransferases in human brain. *Brain research*, 542(2), 307–312.
- Ortega-Loubon, C., & Franco, J. (2010). Neurofisiología del Aprendizaje y la Memoria. Plasticidad Neuronal. *Archivos De Medicina*, 6(1).
- Ortiz, M. S., Forti, K. M., Suárez Martínez, E. B., Muñoz, L. G., Husain, K., & Muñiz, W. H. (2016). Effects of Antioxidant N-acetylcysteine Against Paraquat-Induced Oxidative Stress in Vital Tissues of Mice. *International journal of sciences, basic and applied research*, 26(1), 26–46.
- Ostapiuk, A., & Urbanska, E. M. (2022). Kynurenic acid in neurodegenerative disorders-unique neuroprotection or double-edged sword?. *CNS neuroscience & therapeutics*, 28(1), 19–35.
- Ozawa, S., Kamiya, H., & Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 54(5), 581–618.
- Pájaro, N. P., Maldonado, W., Pérez, N. E., & Díaz, J. A. (2013). Revisión de las implicaciones ocupacionales por exposición al plomo. *Informador Técnico*, 77(2), 183-191.
- Pantic, I., Tamayo, M., Rosa, A., Bautista, L., Wright, R. O., Peterson, K. E., Schnaas, L., Rothenberg, S. J., Hu, H. & Téllez, M. M. (2018). Children's Blood Lead Concentrations from 1988 to 2015 in Mexico City: The Contribution of Lead in Air and Traditional Lead-Glazed Ceramics. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 15, 2153.
- Pawlas, N., Dobrakowski, M., Kasperczyk, A., Kozłowska, A., Mikołajczyk, A., & Kasperczyk, S. (2016). The Level of Selenium and Oxidative Stress in Workers Chronically Exposed to Lead. *Biological trace element research*, 170(1), 1–8.
- Pendyala, L., & Creaven, P. J. (1995). Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of N-acetylcysteine, a potential chemopreventive agent during a phase I trial. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 4(3), 245–251.
- Pérez-De La Cruz, V., Elinos-Calderón, D., Carrillo-Mora, P., Silva-Adaya, D., Konigsberg, M., Morán, J., Ali, S. F., Chánez-Cárdenas, M. E., Pérez-De La Cruz, G., & Santamaría, A. (2010). Time-course correlation of early toxic events in three models of striatal damage: modulation by proteases inhibition. *Neurochemistry international*, 56(6-7), 834–842.
- Pocivavsek, A., Baratta, A. M., Mong, J. A., & Viechweg, S. S. (2017). Acute Kynurenine Challenge Disrupts Sleep-Wake Architecture and Impairs Contextual Memory in Adult Rats. *Sleep*, 40(11).
- Pocivavsek, A., Elmer, G. I., & Schwarcz, R. (2019). Inhibition of kynurenine aminotransferase II attenuates hippocampus-dependent memory deficit in adult rats treated prenatally with kynurenine. *Hippocampus*, 29(2), 73–77.
- Pocivavsek, A., Notarangelo, F. M., Wu, H. Q., Bruno, J. P., & Schwarcz, R. (2016). Astrocytes as pharmacological targets in the treatment of schizophrenia: Focus on kynurenic acid. En M. Pletnikov & J. Waddington (Eds.), *Behavioral Neuroscience* (pp. 223–243). Elsevier.
- Pocivavsek, A., Thomas, M. A. R., Elmer, G. I., Bruno, J. P., & Schwarcz, R. (2014). Continuous kynurenine administration during the prenatal period, but not during

adolescence, causes learning and memory deficits in adult rats. *Psychopharmacology*, 231(14), 2799–2809.

Pocivavsek, A., Wu, H. Q., Elmer, G. I., Bruno, J. P., & Schwarcz, R. (2012). Pre- and postnatal exposure to kynurenine causes cognitive deficits in adulthood. *The European journal of neuroscience*, 35(10), 1605–1612.

Pocivavsek, A., Wu, H. Q., Potter, M. C., Elmer, G. I., Pellicciari, R., & Schwarcz, R. (2011). Fluctuations in endogenous kynurenic acid control hippocampal glutamate and memory. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(11), 2357–2367.

Potter, M. C., Elmer, G. I., Bergeron, R., Albuquerque, E. X., Guidetti, P., Wu, H. Q., & Schwarcz, R. (2010). Reduction of endogenous kynurenic acid formation enhances extracellular glutamate, hippocampal plasticity, and cognitive behavior. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(8), 1734–1742.

Prasanthi, R. P., Devi, C. B., Basha, D. C., Reddy, N. S., & Reddy, G. R. (2010). Calcium and zinc supplementation protects lead (Pb)-induced perturbations in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in developing mouse brain. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 28(2), 161–167.

Ramírez Ortega, D. (2020). Efecto de la intoxicación por plomo en los metabolitos de la vía de la kinurenina: posible impacto en la memoria y aprendizaje en ratones wild-type y knock-out para la kinurenina aminotransferasa II. [Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio institucional de la Universidad Nacional Autónoma de México. <http://132.248.9.195/ptd2020/octubre/0804375/Index.html>

Ramírez Ortega, D., Ovalle Rodríguez, P., Pineda, B., González Esquivel, D. F., Ramos Chávez, L. A., Vázquez Cervantes, G. I., Roldán Roldán, G., Pérez de la Cruz, G., Díaz Ruiz, A., Méndez Armenta, M., Marcial Quino, J., Gómez Manzo, S., Ríos, C., & Pérez de la Cruz, V. (2020). Kynurenine Pathway as a New Target of Cognitive Impairment Induced by Lead Toxicity During the Lactation. *Scientific reports*, 10(1), 3184.

Rassoulpour, A., Wu, H. Q., Ferre, S., & Schwarcz, R. (2005). Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum. *Journal of neurochemistry*, 93(3), 762–765.

Recommended actions based on blood lead level: CDC. (2018) Cent. Dis. Control Prev. https://www.cdc.gov/nceh/lead/acclpp/actions_s.html

Robotka, H., Sas, K., Agoston, M., Ro'zsa, E., Sze'na'si, G., Gigler, G., Ve'csei, L., & Toldi, J. (2008). Neuroprotection achieved in the ischaemic rat cortex with L-kynurenine sulphate. *Life Sciences*, 82, 915–919.

Rossi, F., Schwarcz, R., & Rizzi, M. (2008). Curiosity to kill the KAT (kynurenine aminotransferase): Structural insights into brain kynurenic acid synthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, 18, 748–755.

Rousseau, S. J., Jones, I. W., Pullar, I. A., & Wonnacott, S. (2005). Presynaptic alpha7 and non-alpha7 nicotinic acetylcholine receptors modulate [3H]d-aspartate release from rat frontal cortex in vitro. *Neuropharmacology*, 49(1), 59–72.

Russi, P., Carlà, V., & Moroni, F. (1989). Indolpyruvic acid administration increases the brain content of kynurenic acid. Is this a new avenue to modulate excitatory amino acid receptors in vivo?. *Biochemical pharmacology*, 38(15), 2405–2409.

- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., & Vécsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the neurological sciences*, 257(1-2), 221–239.
- Sathyasaikumar, K. V., Stachowski, E. K., Wonodi, I., Roberts, R. C., Rassoulpour, A., McMahon, R. P., & Schwarcz, R. (2011). Impaired kynurenine pathway metabolism in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*, 37(6), 1147–1156.
- Scheetz, A. J., & Constantine-Paton, M. (1994). Modulation of NMDA receptor function: Implications for vertebrate neural development. *The FASEB Journal*, 8, 745–752.
- Schröder, H., Zilles, K., Luiten, P. G., Strosberg, A. D., & Aghchi, A. (1989). Human cortical neurons contain both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors: an immunocytochemical double-labeling study. *Synapse (New York, N.Y.)*, 4(4), 319–326.
- Schwarcz, R. & Pellicciari, R. (2002). Manipulation of brain kynurenines: Gliatargets, neuronal effects, and clinical opportunities. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303, 1–10.
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 20(1), 11–21.
- Senft, A. P., Dalton, T. P., & Shertzer, H. G. (2000). Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Analytical biochemistry*, 280(1), 80–86.
- Sharifi, A. M., Mousavi, S. H., & Jorjani, M. (2010). Effect of chronic lead exposure on pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 protein expression in rat hippocampus in vivo. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(5), 769–774.
- Shimizu, E., Tang, Y. P., Rampon, C., & Tsien, J. Z. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a process for memory consolidation. *Science*, 290, 1170–1174.
- Siddiqui, M. R., Wabaidur, S. M., Ola, M. S., AlOthman, Z. A., Rafiquee, M. Z., & Khan, M. A. (2016). High-Throughput UPLC-MS Method for the Determination of N-Acetyl-L-Cysteine: Application in Tissue Distribution Study in Wistar Rats. *Journal of chromatographic science*, 54(7), 1244–1252.
- Simons, T. J., & Pocock, G. (1987). Lead enters bovine adrenal medullary cells through calcium channels. *Journal of neurochemistry*, 48(2), 383–389.
- Singh, N., Kumar, A., Gupta, V. K., & Sharma, B. (2018). Biochemical and Molecular Bases of Lead-Induced Toxicity in Mammalian Systems and Possible Mitigations. *Chemical research in toxicology*, 31(10), 1009-1021.
- Sirivarasai, J., Kaojarern, S., Chanprasertyothin, S., Panpunuan, P., Petchpoung, K., Tatsaneeyapant, A., Yoovathaworn, K., Sura, T., Kaojarern, S., & Sritara, P. (2015). Environmental lead exposure, catalase gene, and markers of antioxidant and oxidative stress relation to hypertension: an analysis based on the EGAT study. *BioMed research international*, 2015, 856319.
- Sirivarasai, J., Wananukul, W., Kaojarern, S., Chanprasertyothin, S., Thongmung, N., Ratanachaiwong, W., Sura, T., & Sritara, P. (2013). Association between inflammatory marker, environmental lead exposure, and glutathione S-transferase gene. *BioMed research international*, 2013, 474963.
- Skerfving, S., Löfmark, L., Lundh, T., Mikoczy, Z., & Strömberg, U. (2015). Late effects of low blood lead concentrations in children on school performance and cognitive functions. *Neurotoxicology*, 49, 114–120.
- Skoczyńska, A., Smolik, R., & Jeleń, M. (1993). Lipid abnormalities in rats given small doses of lead. *Archives of toxicology*, 67(3), 200–204.

- Solís, H., & López, E. (2009). Neuroanatomía funcional de la memoria. *Arch Neurocienc.*, 14(3):176-187.
- Squire, L. R., & Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current opinion in neurobiology*, 5(2), 169–177.
- Squire, L. R., & Dede, A. J. (2015). Conscious and unconscious memory systems. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(3), a021667.
- Squire, L. R., & Wixted, J. T. (2011). The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annual review of neuroscience*, 34, 259–288.
- Squire, L. R., & Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5026), 1380–1386.
- Stone, T. W., & Darlington, L. G. (2002). Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nature reviews. Drug discovery*, 1(8), 609–620.
- Stone, T. W., & Darlington, L. G. (2013). The kynurenine pathway as a therapeutic target in cognitive and neurodegenerative disorders. *British journal of pharmacology*, 169(6), 1211–1227.
- Stone, T. W., Forrest, C. M., & Darlington, L. G. (2012). Kynurenine pathway inhibition as a therapeutic strategy for neuroprotection. *The FEBS journal*, 279(8), 1386–1397.
- Struzynska, L. (2009). A glutamatergic component of lead toxicity in adult brain: The role of astrocytic glutamate transporters. *Neurochemistry International*, 55, 151–156.
- Sueishi, Y., Hori, M., Ishikawa, M., Matsu-Ura, K., Kamogawa, E., Honda, Y., Kita, M., & Ohara, K. (2014). Scavenging rate constants of hydrophilic antioxidants against multiple reactive oxygen species. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 54(2), 67–74.
- Sun, L., Zhao, Z. Y., Hu, J., & Zhou, X. L. (2005). Potential association of lead exposure during early development of mice with alteration of hippocampus nitric oxide levels and learning memory. *Biomedical and Environmental Sciences*, 18, 375–378.
- Swaringen, B. F., Gawlik, E., Kamenov, G. D., McTigue, N. E., Cornwell, D. A., & Bonzongo, J. J. (2022). Children's exposure to environmental lead: A review of potential sources, blood levels, and methods used to reduce exposure. *Environmental research*, 204(Pt B), 112025.
- Téllez, M. M., Bautista, L. F., Richardson, V., Estrada, D., Ávila, L., Ríos, C., Cantoral, A., Romero, M., Flores, D., Melo, M. C., Romero, A., León, M. A., Montes, S., Fuller, R., & Hernández, M. (2017). Intoxicación por plomo y nivel de marginación en recién nacidos de Morelos, México. *Salud Pública de México*, 59(3), 218-226.
- Teyler, T. J., & DiScenna, P. (1987). Long-term potentiation. *Annual Review of Neuroscience*, 10, 131–161.
- Tiffany-Castiglioni, E. (1993). Cell culture models for lead toxicity in neuronal and glial cells. *Neurotoxicology*, 14, 513–536.
- Tiffany-Castiglioni, E., Zmudzki, J., & Bratton, G. R. (1986). Cellular targets of lead toxicity: In vitro models. *Toxicology*, 42, 305–315.
- Timofeeva, O. A., & Levin, E. D. (2011). Glutamate and nicotinic receptor interactions in working memory: importance for the cognitive impairment of schizophrenia. *Neuroscience*, 195, 21–36.
- Tong, S., von Schirnding, Y. E., & Prapamontol, T. (2000). Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bulletin of the World Health Organization*, 78(9), 1068-1077.

- Toscano, C. D., Hashemzadeh-Gargari, H., McGlothan, J. L., & Guilarte, T. R. (2002). Developmental Pb²⁺ exposure alters NMDAR subtypes and reduces CREB phosphorylation in the rat brain. *Developmental Brain Research*, *139*, 217–226.
- Toscano, C. D., McGlothan, J. L., & Guilarte, T. R. (2003). Lead exposure alters cyclic-AMP response element binding protein phosphorylation and binding activity in the developing rat brain. *Developmental Brain Research*, *145*, 219–228.
- Toscano, C. D., O’Callaghan, J. P., & Guilarte, T. R. (2005). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity and expression are altered in the hippocampus of Pb²⁺-exposed rats. *Brain Research*, *1044*, 51–58.
- Tulving, E. (1985). *Elements of episodic memory*. Oxford University Press.
- Tulving, E., & Schacter, D. L. (1990). Priming and human memory systems. *Science (New York, N.Y.)*, *247*(4940), 301–306.
- Turski, W. A., Nakamura, M., Todd, W. P., Carpenter, B. K., Whetsell, W. O., & Schwarz, R. (1988). Identification and quantification of kynurenic acid in human brain tissue. *Brain Research*, *454*, 164–169.
- Urbańska, E., Ikonomidou, C., Sieklucka, M., & Turski, W. A. (1991). Aminooxyacetic acid produces excitotoxic lesions in the rat striatum. *Synapse (New York, N.Y.)*, *9*(2), 129–135.
- Ussher, J. R., Jaswal, J. S., & Lopaschuk, G. D. (2012). Pyridine nucleotide regulation of cardiac intermediary metabolism. *Circulation research*, *111*(5), 628–641.
- Vanderbist, F., Maes, P., & Nève, J. (1996). In vitro comparative assessment of the antioxidant activity of nacystelyn against three reactive oxygen species. *Arzneimittel-Forschung*, *46*(8), 783–788.
- Vanhoutte, P., & Bading, H. (2003). Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. *Current Opinion in Neurobiology*, *13*(3), 366–371.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, *2*(2), 322–328.
- Wallace, T. L., & Porter, R. H. (2011). Targeting the nicotinic alpha7 acetylcholine receptor to enhance cognition in disease. *Biochemical pharmacology*, *82*(8), 891–903.
- Wang, J., Wu, J., & Zhang, Z. (2006). Oxidative stress in mouse brain exposed to lead. *The Annals of occupational hygiene*, *50*(4), 405–409.
- Wani, A. L., Ara, A., & Usmani, J. A. (2015). Lead toxicity: a review. *Interdisciplinary toxicology*, *8*(2), 55–64.
- Weber, M., Dietrich, D., Gräsel, I., Reuter, G., Seifert, G., & Steinhäuser, C. (2001). 6-Hydroxykynurenic acid and kynurenic acid differently antagonise AMPA and NMDA receptors in hippocampal neurones. *Journal of neurochemistry*, *77*(4), 1108–1115.
- Widmer, H. R., Bütikofer, E. E., Schlumpf, M., & Lichtensteiger, W. (1991). Pre- and postnatal lead exposure affects the serotonergic system in the immature rat brain. *Experientia*, *47*(5), 463–466.
- Wolf H. (1974). The effect of hormones and vitamin B6 on urinary excretion of metabolites of the kynurenine pathway. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum*, *136*, 1–186.
- Wu, H. Q., Pereira, E. F., Bruno, J. P., Pellicciari, R., Albuquerque, E. X., & Schwarcz, R. (2010). The astrocyte-derived alpha7 nicotinic receptor antagonist kynurenic acid controls extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex. *Journal of molecular neuroscience: MN*, *40*(1-2), 204–210.

- Wu, H. Q., Rassoulpour, A., & Schwarcz, R. (2007). Kynurenic acid leads, dopamine follows: a new case of volume transmission in the brain?. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 114(1).
- Wu, M. S., Lien, G. S., Shen, S. C., Yang, L. Y., & Chen, Y. C. (2014). N-acetyl-L-cysteine enhances fisetin-induced cytotoxicity via induction of ROS-independent apoptosis in human colonic cancer cells. *Molecular carcinogenesis*, 53 Suppl 1, E119–E129.
- Xie, X., Liu, Y., Qiu, H., & Yang, X. (2020). Quantifying ecological and human health risks of heavy metals from different sources in farmland soils within a typical mining and smelting industrial area. *Environmental geochemistry and health*, 45(8), 5669–5683.
- Yang, Y., Paspalas, C. D., Jin, L. E., Picciotto, M. R., Arnsten, A. F., & Wang, M. (2013). Nicotinic $\alpha 7$ receptors enhance NMDA cognitive circuits in dorsolateral prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), 12078–12083.
- Zhang, H., Su, W., Ying, Z., Chen, Y., Zhou, L., Li, Y., Zhang, J., Zhang, L., & Wang, T. (2018). N-acetylcysteine attenuates intrauterine growth retardation-induced hepatic damage in suckling piglets by improving glutathione synthesis and cellular homeostasis. *European journal of nutrition*, 57(1), 327–338.
- Zhang, J., Wang, X. F., Lu, Z. B., Lio, N. Q., & Zhao, B. L. (2004). The effects of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid and oligo procyanidins on acute lead neurotoxicity in rat hippocampus. *Free Radic Biol Med.*, 37(7), 1037-1050.
- Zheng, J., Lou, J. R., Zhang, X. X., Benbrook, D. M., Hanigan, M. H., Lind, S. E., & Ding, W. Q. (2010). N-Acetylcysteine interacts with copper to generate hydrogen peroxide and selectively induce cancer cell death. *Cancer letters*, 298(2), 186–194.
- Zheng, Z., & Shetty, K. (2000). Solid-state bioconversion of phenolics from cranberry pomace and role of *Lentinus edodes* beta-glucosidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(3), 895–900.
- Zmarowski, A., Wu, H. Q., Brooks, J. M., Potter, M. C., Pellicciari, R., Schwarcz, R., & Bruno, J. P. (2009). Astrocyte-derived kynurenic acid modulates basal and evoked cortical acetylcholine release. *The European journal of neuroscience*, 29(3), 529–538.