



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS *IN VITRO* DE LA EXPOSICIÓN A ARSÉNICO EN LINEAS CELULARES CEREBRALES”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGIA**

PRESENTA

**JOCELYN MORENO CAMACHO**

DIRIGIDA POR

**Dra. VERÓNICA MIREYA RODRÍGUEZ CÓRDOVA**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2015.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS  
IN VITRO DE LA EXPOSICIÓN A ARSÉNICO EN LINEAS  
CELULARES CEREBRALES”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGIA**

PRESENTA

**JOCELYN MORENO CAMACHO**

DIRIGIDA POR

**Dra. VERÓNICA MIREYA RODRÍGUEZ CÓRDOVA**

**SINODALES**

**Dra. VERÓNICA MIREYA RODRÍGUEZ CÓRDOVA** \_\_\_\_\_

**DIRECTOR**

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA** \_\_\_\_\_

**SINODAL**

**Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ** \_\_\_\_\_

**SINODAL**

**Dra. MARGARITA TERESA DE JESÚS GARCÍA GASCA** \_\_\_\_\_

**SINODAL**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Mireya', is written over a horizontal line. Below it, another horizontal line is present, and a portion of a third line is visible at the bottom.



## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	
1.1 Propiedades físico-químicas del As	1
1.2 Historia del As	2
1.3 Usos y aplicaciones del As	4
1.4 Exposición al As	6
1.5 Toxicocinética del As	9
1.6 Toxicodinámica del As	13
1.6.1 Interacción del As con azufre	14
1.6.2 Interacción del As con fosfatos	14
1.6.3 Especies reactivas de oxígeno generadas por la exposición a As	15
1.6.4 Genotoxicidad provocada por exposición a As	16
1.6.5 Alteración de la reparación de ADN por la exposición a As	17
1.6.6 Alteración en la transducción de señales por la exposición a As	18
1.6.7 Proliferación celular inducida por la exposición a As	19
1.6.8 Alteración en la metilación de ADN por la exposición a As	20

1.7 Efectos de la exposición a As en la salud	21
1.8 Efectos del As en el sistema nervioso	23
1.9 Neurotransmisores GABA y glutamato	27
1.9.1 Síntesis y metabolismo de GABA	27
1.9.2 Receptores GABA	30
1.9.3 Síntesis y metabolismo de glutamato	31
1.9.4 Receptores NMDA	33
1.10 Líneas celulares	36
1.10.1 Líneas celulares M213-2O y M213-2O CL-4	37
2. HIPÓTESIS	41
3. OBJETIVOS	42
3.1 General	42
3.2 Específicos	42
4. METODOLOGÍA	43
4.1 Cultivo de células M213-2O y M213-2O CL-4	43
4.2 Experimento dosis-respuesta con arsenito de sodio	43
4.3 Evaluación de la exposición a arsenito de sodio (As <sub>i</sub> ) en los neurotransmisores GABA y glutamato	44
4.4 Cuantificación de GABA y glutamato por HPLC acoplado a detector coulométrico	45
4.5 Análisis estadístico	45
5. RESULTADOS	45
5.1 Determinación de la viabilidad celular en las líneas M213-2O y M213-2O CL-4	45
5.2 Cuantificación de los niveles de GABA y glutamato en la línea celular M213-2O CL-4 después de la incubación con arsenito de sodio (As <sub>i</sub> )	48

5.2.1 Cuantificación de los niveles de GABA extracelular	48
5.2.2 Cuantificación de los niveles de GABA intracelular	51
5.2.3 Cuantificación de los niveles de glutamato extracelular	52
5.2.4 Cuantificación de los niveles de glutamato intracelular	53
6.DISCUSIÓN	55
6.1 Experimento dosis-respuesta con arsenito de sodio	55
6.2 Cuantificación extracelular e intracelular de los niveles GABA y glutamato en la línea celular M213-2O CL-4	57
7. CONCLUSIONES	58
8. REFERENCIAS	60

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Compuestos de As de relevancia ambiental (Hughes y col., 2011).	1
2	Características de los países afectados por la contaminación con As (Modificado de Kapaj y col., 2006).	10
3	Concentraciones de As en diferentes regiones cerebrales (Adaptado de Shila y col., 2005).	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática del aparato de James Marsh para la detección del As (Vahidnia y col., 2007).	3
2	Países afectados con altas concentraciones de As en el agua para consumo humano (Modificado de Wang y Wai, 2004).	11
3	Alteraciones bioquímicas en la célula después del consumo de As (Hughes y col., 2011).	22
4	Síntesis, captura y degradación de GABA (Adaptado de Purves y col., 2001).	32
5	Modelo que muestra la síntesis de glutamato, siendo el principal precursor la glutamina.	34
6	Morfología de la línea celular M213-2O en cultivo (Mejía-Toiber y col., 2010).	38
7	Morfología de la línea celular M213-2O CL-4 en cultivo (Mejía-Toiber y col., 2010).	39
8	Efecto de la incubación con diferentes concentraciones de arsenito de sodio a las 6, 12, 24 y 48 h en la viabilidad celular de la línea M213-2O determinada por la prueba de exclusión azul de tripano. Las cajas representan el número de células viables (mediana, cuartiles superiores e inferiores). Cada caja representa n= 4 por triplicado * $p < 0.05$	47
9	Efecto de la incubación de arsenito de sodio a diferentes concentraciones en la viabilidad celular de la línea M213-2O CL-4 a las 6, 12, 24 y 48 h determinada por la	49

prueba de exclusión azul de tripano. Las cajas representan el número de células viables (mediana, cuartiles superiores e inferiores). Cada una de las cajas representa n= 4, por triplicado \*p<0.05.

- 10 Cuantificación de los niveles de GABA extracelular. El signo (#) representa diferencias significativas en la condición estimulada en comparación con la condición basal; mientras que el signo (\*) representa diferencias significativas entre el tratamiento y el control en ambas condiciones, p<0.05. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar (DE), cada barra representa n=4, por triplicado. 50
- 11 Cuantificación de los niveles de GABA intracelular. El signo (#) representa diferencias significativas en la condición estimulada en comparación con la condición basal; mientras que el signo (\*) representa diferencias significativas entre el tratamiento y el control en ambas condiciones, p<0.05. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar (DE), cada barra representa n=4, por triplicado. 51
- 12 Cuantificación de los niveles de glutamato extracelular. El signo (#) representa diferencias significativas en la condición estimulada en comparación con la condición basal; mientras que el signo (\*) representa diferencias significativas entre el tratamiento y el control en ambas condiciones, p<0.05. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar (DE), cada barra representa n=4, por triplicado. 53

- 13      Cuantificación de los niveles de glutamato intracelular.      54
- El signo (#) representa diferencias significativas en la condición estimulada en comparación con la condición basal; mientras que el signo (\*) representa diferencias significativas entre el tratamiento y el control en ambas condiciones,  $p < 0.05$ . Se representa la media  $\pm$  desviación estándar (DE), cada barra representa  $n=4$ , por triplicado.



## **Resumen**

La exposición ya sea aguda o crónica al As, causa alteraciones en la salud del ser humano principalmente en el sistema nervioso central en donde el As provoca disminución en la coordinación motora, IQ de lenguaje en el aprendizaje y memoria. Estas alteraciones son provocadas por la interacción del As con proteínas involucradas en la síntesis, liberación y recaptura de neurotransmisores del sistema dopaminérgico. Además, los sistemas GABAérgicos y glutamatérgicos también se han relacionado con alteraciones por la presencia del As en estudios *in vivo*; sin embargo, el uso de líneas celulares podría ayudarnos a comprender el efecto del As en los sistemas GABAérgicos y glutamatérgicos. En este estudio evaluamos el efecto dosis-respuesta del arsenito de sodio en las líneas celulares M213-2O y M213-2O CL-4 empleando la prueba de exclusión azul de tripano donde se observó que en ambas líneas no hay un efecto dosis-dependiente después de 48 h de exposición. Se logró determinar que a las 6 h y a la concentración 0.2  $\mu\text{M}$  de arsenito de sodio las células de la línea M213-2O CL-4 se mantenían viables, condición ideal para evaluar la integridad de los sistemas GABAérgico y glutamatérgico. Se determinó que en ambos sistemas hay una disminución significativa en la concentración de los neurotransmisores GABA y glutamato posiblemente por la interacción del arsenito de sodio con las enzimas encargadas de la síntesis de los neurotransmisores. Además se logró caracterizar a la línea M213-2O CL-4 como glutamatérgica lo cual nos abre una ventana más amplia para continuar con futuras investigaciones sobre el efecto del As en los sistemas GABAérgicos y glutamatérgicos.

## 1. Antecedentes

### 1.1 Propiedades físico-químicas del Arsénico

El Arsénico (As) es un metaloide con un peso molecular de 74.92 g/mol, su número atómico es 33, su configuración electrónica es  $4s^23d^{10}4p^3$  y pertenece al grupo 15, subgrupo V A de la tabla periódica; posee varios estados de oxidación los cuales forman enlaces con el hidrógeno, oxígeno, carbono y otros elementos. La solubilidad, estabilidad y toxicidad celular de los compuestos de As dependen de numerosos factores, incluyendo la valencia en la que se encuentran presentes. Penrose (1974) elaboró una lista en la cual ordenó los compuestos de arsénico de acuerdo a su toxicidad, de mayor a menor: arseninas > arsenito > arsenóxidos > arsenato > arsenicos pentavalentes > compuestos de arsonio > arsenicos metálicos. En el Cuadro 1 se enlistan los compuestos de acuerdo a su toxicidad (Smith y col., 1998a; Wang y Wai, 2004).

Cuadro 1. Compuestos de As de relevancia ambiental (Hughes y col., 2011)

Estado de oxidación trivalente	Estado de oxidación pentavalente
Arsenito	Arsenato
Trióxido de Arsénico	Pentóxido de arsénico
Ácido monometilarsenoso	Ácido monometilarsénico
Ácido dimetilarsenoso	Óxido trimetilarsina
	Ácido arsanilico
	Arsenobetaína

La solubilidad, estabilidad y toxicidad celular de varias formas de As son ampliamente variadas. Por lo tanto, los estudios sobre la forma química del As especialmente las dos especies inorgánicas, arsenato ( $\text{As}^{5+}$ ) y arsenito ( $\text{As}^{3+}$ ), su transformación, persistencia y biodisponibilidad nos ayudan a comprender el efecto de los niveles de exposición humana al As (Pradosh y Anupama, 2002).

## 1.2 Historia del As

La palabra arsénico se deriva del vocablo persa *zarnikh*, el cual significa oropimento amarillo; las lenguas orientales la adoptaron a través de la traducción griega de *zarnikh*: *arsenikon*, que en Grecia significa masculino. El sulfuro de arsénico también se encuentra en forma roja como realgar o sandarach. El As fue ampliamente conocido y utilizado por los persas desde tiempos remotos; tanto en China como en India fue empleado en la medicina tradicional y en la producción de cosméticos como sombras para los ojos en la época romana (Cullen, 2008). Desde la Edad Media, el As ha sido reconocido como el “rey de los venenos” debido a que la intoxicación por As es muy discreta y además los síntomas por una intoxicación aguda son fácilmente atribuidos a diarrea asociada a cólera. Se ha descrito que el arsénico ha sido el veneno más ampliamente utilizado para eliminar rivales, un ejemplo claro de esto es la muerte de Napoleón Bonaparte en 1851. Hasta 1850, el As seguía siendo uno de los venenos más populares por varias razones: no tiene sabor ni aroma por lo que es imperceptible cuando es añadido a alimentos o bebidas. Era muy difícil detectar la presencia del As en tejidos o alguna otra muestra, debido a que no se contaba con algún método analítico; en 1700 fueron introducidas las primeras pruebas para la detección de As. En el primer juicio que se llevó a cabo por envenenamiento, una mujer fue sentenciada a muerte debido a que pudo obtenerse como evidencia un polvo blanco, el cual tenía las características de ser As basado en la apariencia, textura, solubilidad en agua y un aroma parecido al ajo, después de haber sido incinerado (Vahidnia y col., 2007; Cullen, 2008). La detección de As dio un paso hacia delante en 1832 cuando a James Marsh, un químico que trabajaba en el Arsenal Real en Woolwich, Reino Unido, le fue encomendada la labor de encontrar una



A pesar de que las historias de intoxicación por As parecen ser de mórbido interés para las personas, estos asesinatos proporcionaron evidencia importante sobre el comportamiento del As en el organismo del ser humano. Por ejemplo, se pudo obtener información sobre los órganos que son principalmente afectados por la intoxicación aguda por As. Además, el desarrollo de métodos analíticos para la detección de As en diferentes tipos de muestra fue de gran importancia para conocer el metabolismo del As. Es debido al conocimiento que se tiene sobre el As, que actualmente no es tan fácil huir de un juicio por envenenamiento empleando As; sin embargo, aún se presentan casos de intoxicación por As (Hughes y col., 2011).

### 1.3 Usos y aplicaciones del As

A lo largo del tiempo, el As ha tenido un gran número de usos, desde usarse como veneno, pesticida, en la fundición de cobre, hasta utilizarse en la medicina moderna para el tratamiento de leucemias. Se cree que Hipócrates, el padre de la medicina, empleó una pasta de arsénico para el tratamiento de úlceras y abscesos; otros pioneros en este campo (como Aristóteles y Paracelsus) también emplearon As para el tratamiento de ciertas enfermedades. Aunque el As se ha empleado desde tiempos antiguos, el primer reporte que se tiene sobre su uso data del siglo XVIII cuando la solución de Fowler (solución de arsenito de potasio 1%) fue empleada para el tratamiento de varias enfermedades como malaria, sífilis, asma, eczema, psoriasis y corea (Antman, 2001; Cullen, 2008). Tiempo después en 1910, Paul Ehrlich introdujo un nuevo fármaco a base de arsénico conocido como Salvarsan para el tratamiento de la sífilis, éste fue empleado antes de la invención de la penicilina (1940). Desde 1880 se han empleado compuestos de As como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de cáncer de mama y de piel, por ejemplo la solución de Fowler se empleaba para disminuir el número de plaquetas en pacientes con leucemia, sin embargo, su uso poco a poco fue disminuyendo debido a la toxicidad que presentaba para los pacientes (Cullen, 2008). En la actualidad se emplea una solución de trióxido de arsénico (Trisenox<sup>®</sup>) para el tratamiento de leucemia promielocítica aguda (Mayorga y col., 2002); sin embargo, algunas de las complicaciones que se han

presentado son a nivel neuronal y en el músculo cardiaco (Sze-Fai y col., 2002). La eficacia del  $\text{As}_2\text{O}_3$  ha sido demostrada *in vitro* en una gran variedad de modelos de cáncer lo que ha brindado un amplio panorama sobre los efectos antitumorales del  $\text{As}_2\text{O}_3$  (Chen y col., 1996; Rècher y col., 2001; Hui-Wen y col., 2011).

Debido a que el As también se ha empleado como pigmento en la industria, éste se ha relacionado, desde 1800, como la mayor fuente de envenenamiento no intencional. Los pigmentos basados en As se encontraban en diversos productos de consumo como juguetes, lámparas y principalmente en los tapices para decorar las paredes de los hogares; esta exposición se relacionaba con el desarrollo de enfermedades y posteriormente la muerte en las personas que se encontraban expuestas. Tiempo después se determinó que el As, que se encontraba en estos tapices, sufría una biotransformación por el moho a un gas tóxico de As (trimetilarsina); sin embargo, las cantidades de gas que se liberaban eran insuficientes para causar las enfermedades y las muertes que se habían detectado en esos años, por lo que se concluyó que el posible responsable era el moho presente en las paredes (Cullen y Bentley, 2005).

El As también se ha empleado como pesticida. Desde 1897 hasta 1900 se empleó el insecticida conocido como Paris Green para el control de plagas de mosquitos y escarabajos en cultivos de papas. Tiempo después se empleó otro pesticida a base de As, arsenato de plomo, el cual fue ampliamente utilizado por sus ventajas ya que ocasionaba menos daño a las plantas y además era bastante eficaz en la eliminación de plagas. Sin embargo, en 1960 se determinó que su uso ocasionaba problemas en la salud a trabajadores, además que los residuos presentes en las frutas, que habían sido rociadas con este pesticida, ocasionaban problemas en la salud de los consumidores. El uso de As en los insecticidas ayudó a determinar que los bajos niveles de exposición durante un periodo prolongado causaban problemas en la salud. A pesar que el uso de los pesticidas con arsenato de plomo se ha eliminado, los residuos aún persisten en las áreas donde fueron aplicados; se ha observado que millones de hectáreas continúan contaminadas con estos residuos (Cullen, 2008). En

la actualidad aún se continúan empleando pesticidas a base de As, como el arsenato de cobre cromado, el cual se ha empleado como conservador y protector de madera, insecticidas y agente microbiano desde 1940 (U.S. EPA, 2006) (Environmental Protection Agency, por sus siglas en inglés). Desde 1950 hasta nuestros días se han empleado insecticidas a base de As orgánico y de estados de oxidación pentavalente, como el metanearsonato monosódico (MSMAs<sup>V</sup>) y el ácido dimetilarsénico (DMAs<sup>V</sup>), debido a que representan menos riesgo a la salud humana (Cohen y col., 2006). De acuerdo a estudios realizados, la EPA determinó que el DMA<sup>V</sup> solo es potencialmente carcinogénico cuando las dosis son lo suficientemente altas para causar citotoxicidad en células de vejiga (U.S. EPA, 2006). Dado que desde la antigüedad, el As se ha utilizado ampliamente en la fabricación de productos, fármacos y en la industria, ha sido de gran interés investigar la toxicidad de este elemento cuando se encuentra en los alimentos, el agua para beber y el suelo. Es de suma importancia conocer los niveles de As en el ambiente al que nos encontramos expuestos (Hughes y col., 2011).

#### 1.4 Exposición al As

Los principales reservorios de As son las rocas y la liberación y movilización del As constituye la disponibilidad de este elemento en el suelo, agua y aire en varias formas. Como resultado de esto, el As se encuentra naturalmente en nuestro ambiente, los seres humanos nos encontramos continuamente expuestos a él. Bajo condiciones ecológicas normales, los niveles de biodisponibilidad del As no representan un riesgo a la salud humana, por ejemplo los suelos contienen aproximadamente entre 0.1 y 40 ppm de As (Pradosh y Anupama, 2002). Sin embargo, debido a las actividades antropogénicas las concentraciones de As en el suelo, agua y aire han incrementado considerablemente (Rodríguez y col., 2003; Hughes y col., 2011). A este respecto, las emisiones industriales presentan un corto periodo de vida, pero son capaces de viajar grandes distancias y acumularse sobre la tierra y formar sedimentos en lagos y ríos. Algunas de las actividades antropogénicas que representan un peligro por la alta emisión de metales a la

atmósfera son los desechos de minas, residuos minerales, elaboración de vidrio, chips para computadora, conservadores de madera, insecticidas, herbicidas, rodenticidas y algunos agroquímicos (Smith y col., 1998a; Wang y Wai, 2004). El suelo es el principal depósito de los compuestos de As en el cual se puede acumular rápidamente debido a la baja captación de los compuestos por las plantas, la lixiviación, metilación o erosión (Smith y col., 1998a; Rodríguez y col., 2003).

Se ha reportado que los compuestos de arsénico orgánico como el ácido monometil arsénico (MMA, por sus siglas en inglés) y el ácido dimetil arsénico (DMA, por sus siglas en inglés) existen de manera natural en el ambiente; sin embargo, su toxicidad es menor a la de las especies de arsénico inorgánico. El MMA, DMA, arsenito y el arsenato son las especies más comunes que se encuentran en el agua de manera natural. El arsenito se presenta de manera natural como ácido arsenioso ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ), el arsenato se encuentra como ácido arsénico ( $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ) y en sus formas desprotonadas como  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  y  $\text{HAsO}_4^{2-}$ . El As inorgánico trivalente  $\text{As}^{\text{III}}$  (arsenito) es la forma más tóxica que se encuentra en la naturaleza a diferencia de las especies pentavalentes de arsénico (arsenato) debido a su fuerte interacción con los grupos sulfuro en los aminoácidos (metionina, cisteína, cistina), Ésto da como resultado la formación de productos que causan un mal funcionamiento del organismo (Wang y Wai, 2004).

La exposición oral a As ocurre principalmente a través de agua contaminada con As de manera natural o antropogénica, además de comida contaminada como mariscos, en los cuales se han encontrado compuestos orgánicos del As como son la arsenobetaína y arsenocolina, los cuales incrementan la concentración de As en sangre. Los compuestos organoarsénicos que se acumulan en los mariscos representan un riesgo mínimo en animales y humanos, debido a que los compuestos de As ingeridos son rápidamente excretados sin haber sido metabolizados (Smith y col., 1998a).

Por otra parte, se presenta un gran riesgo de intoxicación por exposición ocupacional en la agricultura, por el uso de pesticidas, minería o fundición de cobre, debido a que se inhalan grandes cantidades de As. Se ha encontrado que los aplicadores de pesticidas presentan en la orina altas concentraciones de As; el principal metabolito que es excretado en la orina es el DMA<sup>V</sup>, el cual se encuentra en porciones que van del 40-90% del total del As (Gebel, 2002; Rodríguez y col., 2003). Es debido a la toxicidad conocida del As tanto en humanos como en animales, que en los últimos años se han llevado a cabo estudios sobre la dinámica del As y en la forma de desarrollar nuevas estrategias para su eliminación. El método general que se sigue para el tratamiento de agua contaminada por As es la adición de reactivos como Cl<sub>2</sub>, ozono o hipoclorito, para la oxidación de arsenito a arsenato; algunas sustancias son capaces de oxidar más rápido el arsénico inorgánico; después de la adición de estos compuestos se da la interacción de los reactivos con los sedimentos o partículas orgánicas, sedimentación de partículas grandes, filtración de agua, desinfección con cloro y distribución del agua tratada. Sin embargo, este método no resulta ser efectivo para la remoción de concentraciones bajas del arsénico inorgánico (Smith y col., 1998a; Wang y Wai, 2004). Actualmente, el As presente en el ambiente se ha convertido en un tema de gran relevancia a nivel internacional debido a su amplia distribución en varias partes del mundo (Wang y Wai, 2004). El estándar de consumo de As en agua para beber, establecido por la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 1953, fue de 150 ppb. Los niveles permisibles de As en el agua para beber han variado y la OMS tiene establecido actualmente como límite 0.010 mg As/L (10 ppm); sin embargo, hay países en los cuales la concentración de As en las aguas subterráneas es mayor al límite permisible, por ejemplo en México la concentración de As permitida es de 0.025 mg As/L pero en algunas regiones del país se han llegado a encontrar niveles de hasta 0.102 mg/L (Secretaría de salud, 2000; Hurtado-Jimenez y Gardea-Torresdey, 2006). Mientras que, en países como Bangladesh, India, Taiwán y otros países asiáticos, la contaminación de las aguas subterráneas por As puede ser de hasta 0.3 mg As/L. En el Cuadro 2 se muestran los diferentes países afectados por la contaminación de As en el agua (Kapaj y col., 2006;

Rodríguez y col., 2010). En Bangladesh, alrededor de 35-77 millones de personas se encuentran expuestas a As debido al consumo diario de agua contaminada con As en concentraciones mayores a 50 ppm la cual representa la mayor causa de muerte entre la población, principalmente en niños, por el desarrollo de enfermedades como cáncer en diversos órganos y neuropatías periféricas como es la enfermedad del pie negro. En la Figura 2 se muestran los países que presentan contaminación por As (Wang y Wai, 2004; Appelo y Heederik, 2006; Vahidnia y col., 2007). Se ha reportado que las concentraciones normales de As en orina y sangre se encuentran entre 15 y 100  $\mu\text{g As/L}$ , respectivamente, pero pueden variar dependiendo de la exposición ambiental. En humanos, se ha estimado que la dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) por envenenamiento se encuentra entre 1-5 mg/kg, específicamente la  $DL_{50}$  para para el trióxido de As ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) se encuentra entre los 70-180 mg (Vahidnia y col., 2007).

### 1.5 Toxicocinética del As

Las rutas de absorción de los compuestos de arsénico son por la vía oral o por inhalación. Una vez que es ingerido, aproximadamente el 5-15% del As es absorbido principalmente en el intestino delgado y distribuido en el hígado, riñones, pulmones, bazo, corazón, tejido neuronal y en la pared del tracto gastrointestinal después de 24 h de su absorción; cuando se trata de una exposición por inhalación o contacto, la absorción es mínima. Una vez absorbido, el As es metabolizado de compuesto inorgánico a orgánico, variando los niveles de toxicidad; el comportamiento de las diferentes especies de As es variable (Vahidnia y col., 2007).

Pais/Región	Área afectada	Profundidad del pozo	Concentración de As (µg/L)	Mecanismo de contaminación
Bangladesh, BDP (52 distritos)	110,012 Km <sup>2</sup>	8-260 m	<2-900	Reducción de Fe-oxihidróxidos/ oxidación de sulfuro en sedimentos aluviales
Bengala Occidental, India, BDP (8 distritos)	34000 Km <sup>2</sup>	14-132 m	<1-1300	Reducción de Fe-oxihidróxidos/ oxidación de sulfuro en sedimentos aluviales
China, Xinjang, Mongolia Interior(HAB)	4800 Km <sup>2</sup>	Superficial/Profundo	<50-1860	Reducción ambiental de sedimentos aluviales
Taiwan	---	Profundo	Más de 1820	Oxidación de pirita y residuos de minería
Tailandia (10 distritos)	10 Distritos	Superficial	120-6700	Oxidación de desechos y residuos de minería
Ghana	1600 Km <sup>2</sup>	70-100 m		Oxidación de arsenopirita en residuos de
Argentina	10 millones Km <sup>2</sup>	Acuíferos superficiales	100-4800	Ceniza volcánica con 90% vidrio riolítico
Chile	---	Pozos superficiales y	100-1000	Ceniza volcánica
México, Zimapan, Comarca Lagunera	---	Pozos superficiales y profundos	300-1100	Oxidación de sulfuro a partir de desechos mineros
Hungría	4263 Km <sup>2</sup>	80-560 m	25-50	Complejos de arsénico con sustancias
EUA	Grandes áreas	53-56 m	100-500	Desorción de arsénico a partir de Fe-oxihidroxidos/oxidación de sulfuros
Canadá (Nueva Escocia)	---	8-53 m	18-146	Oxidación de sulfuros
Reino Unido (Cornwall)	---	Pozos profundos	>10	Oxidación de sulfuros en residuos de minería

Cuadro 2. Características de los países afectados por la contaminación con As (Modificado de Kapaj y col., 2006)

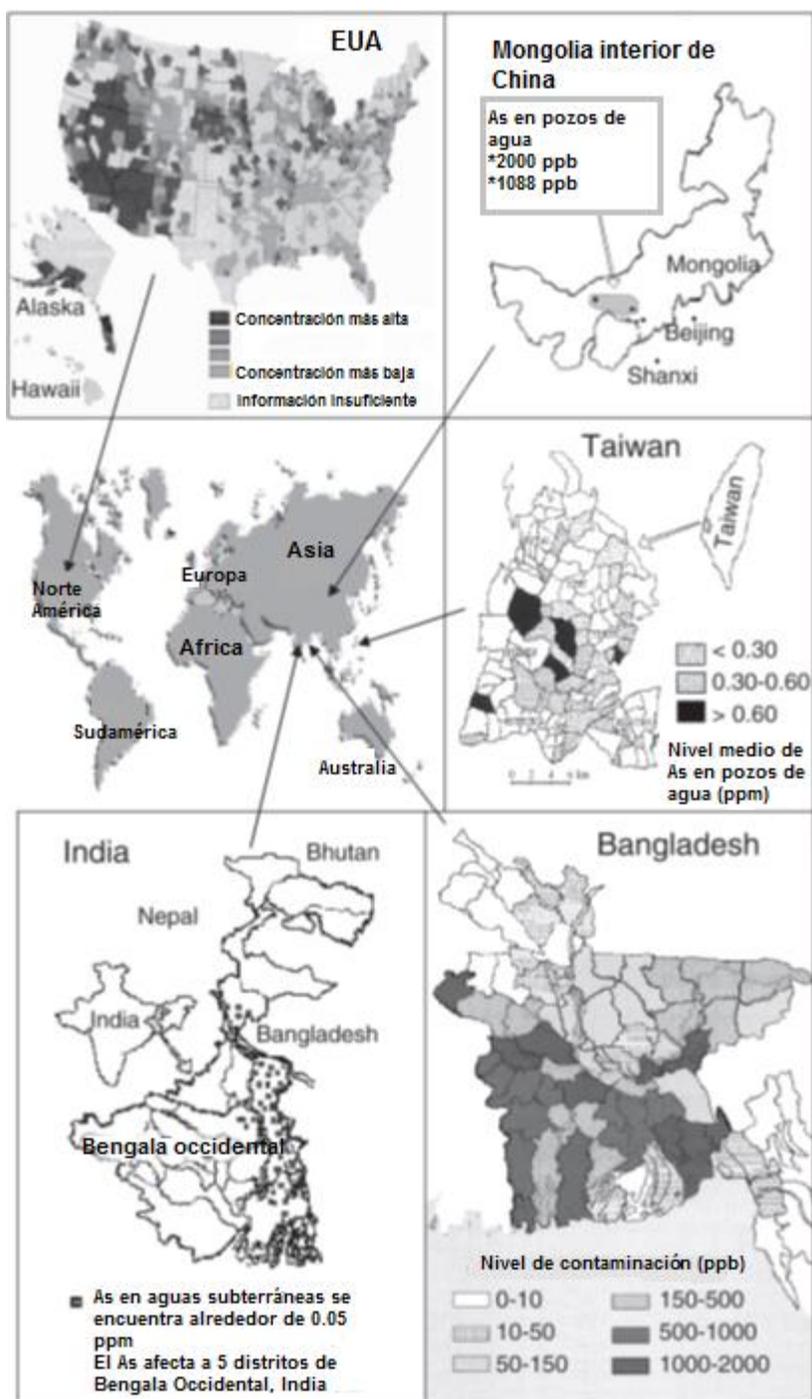


Figura 2. Países afectados con altas concentraciones de As en el agua para consumo humano (Modificado de Wang y Wai, 2004).

Se ha determinado que el As en las formas trivalente y pentavalente son las más tóxicas que existen en la naturaleza. Sin embargo, el  $\text{As}^{\text{V}}$  es reducido a su estado trivalente, este paso de reducción resulta en un compuesto aún más tóxico a través de la biotransformación. De dos a cuatro semanas después de la ingestión, parte del As es depositado en los huesos, cabello, uñas y piel por la unión a la queratina con grupos sulfhidrilo (Smith y col., 1998a; Rodríguez y col., 2003). Las vías principales de la eliminación del As son la urinaria y la biliar; el metabolito que generalmente se encuentra en la orina es el  $\text{MMA}^{\text{III}}$  (Vahidnia y col., 2007).

El As ingresa a la célula a través de dos mecanismos: por acuaporinas, las cuales son una familia de proteínas transmembranales que se encargan de facilitar el movimiento de solutos sin carga a bajas concentraciones; y mediante transportadores permeables de hexosas. Sin embargo, estos transportadores se distribuyen de manera diferente entre los tejidos y es posible que ambos tengan un papel importante en la entrada de arsénico a las células. Otro de los mecanismos que protegen a las células de la toxicidad del As es mediante los transportadores de salida unidos a membrana o cassette de transportadores de unión a ATP, los cuales son factores importantes para remover el As de las células (Thomas, 2007).

A pesar de las numerosas investigaciones que se han llevado a cabo para describir la biotransformación del As la vía postulada por Challenger y colaboradores (1933) con la S-adenosilmetionina como donador del grupo metilo continua siendo la mejor opción para describir la metilación biológica del As (Cullen, 2014). El primer paso para la detoxificación involucra la transformación de As inorgánico a As orgánico y la reducción del arsenato pentavalente a arsenito trivalente. El arsenito es metilado por acción de enzimas que se encuentran en el hígado; sin embargo, no es el principal mecanismo de biotransformación. Se ha determinado otro mecanismo mediante la unión del arsenito a proteínas, las cuales funcionan como reservorio de arsenito, éste es un mecanismo protector y se lleva a cabo cuando se detecta un incremento en la concentración del arsenito. Las proteínas que sirven de reservorio, lentamente liberan cantidades mínimas de arsenito para su metilación. El arsenito es

enzimáticamente catalizado por la arsénico metiltransferasa, una proteína citosólica de 43 kDa, la cual cataliza la transferencia de un grupo metil por el donador de metil S-adenosilmetionina (SAM) para formar monometil arsénico  $\text{MMA}^{\text{V}}$  (pentavalente), éste es reducido a  $\text{MMA}^{\text{III}}$  (trivalente) por el agente reductor glutatión (GSH) (Thomas, 2007). El siguiente paso es por la acción de la metiltransferasa con  $\text{MMA}^{\text{III}}$ , la cual da como resultado DMA. Sin embargo, aún se desconoce si el mismo SAM es empleado para la metilación de MMA y DMA o si son dos SAMs separados. (Thomas, 2007; Vahidnia y col., 2007). Los complejos GSH son importantes para la resistencia contra la citotoxicidad del As, cuando la actividad de algún miembro de la familia GSH-S-transferasa (GST) es alterado la resistencia hacia el As cambia en la célula. Ésto es debido a que las GSTs catalizan la formación de enlaces entre el azufre de tiol en el residuo de cisteína de GSH y  $\text{As}^{\text{III}}$ , de esta manera se forma el arsénico triglutatión ( $\text{As}^{\text{III}} (\text{GS})_3$ ) (Thomas, 2007).

El proceso de metilación se ha determinado que es el principal mecanismo de biotransformación del As; sin embargo, recientes estudios en cultivos celulares y animales han demostrado los efectos adversos de la metilación del As como el  $\text{DMA}^{\text{V}}$  como promotor de tumores o la acción genotóxica directa provocada por  $\text{MMA}^{\text{III}}$  y  $\text{DMA}^{\text{III}}$  *in vitro* (Gebel, 2002; Vahidnia y col., 2007).

#### 1.6 Toxicodinámica del As

El consumo de As ocasiona daños tanto a nivel celular como molecular atribuidos a los metabolitos provenientes de la conversión del As inorgánico a As orgánico, MMA, DMA y TMA. Algunos de los daños que se presentan son: inactivación de algunas enzimas (principalmente aquellas involucradas en la síntesis de ADN, de energía y de reparación) por la unión del arsenito a los grupos sulfhidrilo; mientras que, el arsenato sustituye al grupo fosfato en los compuestos de alta energía como el ATP. Algunos estudios de carcinogénesis han demostrado que el As inorgánico está involucrado en los procesos de reparación de ADN. Por ejemplo, el As inorgánico altera la reparación de nucleótidos por escisión, disminuyendo la expresión del

componente de reparación cruzada del complemento 1 (ERCC1) (Vahidnia y col., 2007).

#### 1.6.1 Interacción del As con azufre

Uno de los primeros mecanismos de acción del arsénico propuesto por Binz y Schulz en 1879 es la interferencia de la oxidación celular durante la inter-conversión de arsenato y arsenito; sin embargo, esta propuesta fue descartada debido a la alta toxicidad del arsenito. Experimentalmente se determinó que el arsénico causa un efecto tóxico sobre el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH, por sus siglas en inglés), específicamente sobre el ácido lipoico, el cual contiene di-tioles vecinales. El As puede inhibir el complejo PDH por la unión de éste a grupos sulfhidrilo dentro de la enzima, aunque también se ha sugerido que el arsenito inhibe la enzima PDH a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que la inactivan. La inhibición de PDH puede provocar la falta de citrato intracelular y, por lo tanto, el ciclo del ácido cítrico puede ser bloqueado, como consecuencia de esto la producción de ATP disminuye drásticamente (Petrick y col., 2001; Hughes y col., 2011).

#### 1.6.2 Interacción del As con fosfatos

Tanto el arsénico como el fósforo poseen propiedades físico-químicas similares debido a que se encuentran en el grupo 15 de la tabla periódica y se ha demostrado que el arsenato puede ser sustituido por el fosfato en diversas reacciones bioquímicas. De manera similar al fosfato, el arsenito forma enlaces éster con grupos hidroxilo, sin embargo la unión es menos estable que las uniones con fosfatos, por esta razón es más factible la disociación entre arsenito y el grupo hidroxilo. Mediante un mecanismo de desacoplamiento, el arsenato logra desestabilizar la formación de ATP *in vitro* por un mecanismo conocido como “arsenólisis”. Este efecto se observa durante la glucólisis y la fosforilación oxidativa en presencia de arsenato. El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo es el siguiente: en la vía glucolítica el arsenato forma el intermediario anhidro arsenato 3-fosfoglicerol, mientras que en la fosforilación oxidativa, el arsenato puede unirse al difosfato de adenosina (ADP-arsenato). Ambas reacciones forman anhídridos de arsenato inestables, los cuales

son fácilmente hidrolizables. El resultado de esto es la disminución en la formación de ATP (Thomas, 2010). A diferencia del arsenato, el arsenito es ineficiente en disminuir el ATP en los eritrocitos humanos (Hughes y col., 2011).

### 1.6.3 Especies reactivas de oxígeno generadas por la exposición a As

Las especies reactivas del oxígeno se forman tanto *in vivo* como *in vitro* en presencia de As y entre ellas se encuentran: anión superóxido ( $O_2^*$ ), radicales hidroxilo ( $OH^*$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2^*$ ), radicales peróxido ( $ROO^*$ ), especies reactivas de nitrógeno ( $NO^*$ ), radicales arsénico peroxilo y radicales dimetilarsénico. Una acumulación de estos radicales produce estrés oxidante en la célula. Sin embargo, hay enzimas que protegen al organismo del daño oxidante como la superóxido dismutasa mitocondrial (Mn-SOD), tioredoxina citosólica (Trx-1) y el factor de transcripción Nrf2 (Factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2). Si las defensas antioxidantes son superadas, el As puede causar alteraciones a nivel transcripcional en los sistemas de neurotransmisión como es el caso de la tirosina hidroxilasa y la glutamato descarboxilasa o en la afinidad de los receptores de dopamina (DAR) (Rodríguez y col., 2010). Shila y colaboradores (2005) llevaron a cabo un estudio en el que administraron a ratas Wistar macho 100 ppm de As, empleando como sal arsenito de sodio en agua de bebida durante 60 días además de 70 mg/kg de peso de ácido alfa lipoico. El ácido alfa lipoico es un antioxidante biológico el cual es reducido por enzimas citosólicas y mitocondriales, su capacidad antioxidante radica en los grupos tiol altamente reactivos (Bast y Guido, 2003). El objetivo de este estudio fue determinar si el ácido lipoico podría prevenir cambios inducidos por As en el sistema de defensa antioxidante como la superóxido dismutasa (SOD, por sus siglas en inglés), catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSG-PX, por sus siglas en inglés) en diferentes regiones cerebrales como corteza, hipotálamo, cerebelo, estriado e hipocampo. Los resultados de este estudio muestran que el ácido lipoico disminuye la peroxidación de lípidos, además brinda protección a los sistemas antioxidantes después de la exposición a As (Shila y col., 2005). Aún se desconoce el proceso mediante el cual se forman las especies reactivas de

oxígeno por la presencia de As; sin embargo, se ha hipotetizado que esto puede ocurrir durante la oxidación de arsenito en arsenato, por la formación de arsina en el metabolismo de As, estimulación de la NADH o NADPH oxidasa, liberación del hierro de la ferritina por la interacción entre el As y el oxígeno reactivo generado por la reacción de Fenton, inhibición de enzimas redox como la glutatión reductasa y la tiorredoxina reductasa o puede ser secundaria por la citotoxicidad inducida del arsénico (Hughes y col., 2011).

Las especies reactivas de oxígeno formadas por la exposición a As se encuentran involucradas en varios mecanismos de acción incluyendo genotoxicidad, transducción de señales, proliferación celular e inhibición en la reparación del ADN (Hughes y col., 2011).

#### 1.6.4 Genotoxicidad provocada por exposición a As

Se ha demostrado que el As no interacciona directamente con el ADN causando mutaciones puntuales en bacterias o mamíferos; sin embargo, es co-mutagénico. A pesar de no ser directamente mutagénico, el arsénico ha demostrado tener capacidad de inducir efectos como mutación por deleciones, rompimiento de hebras de ADN, intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosomales, aneuploidia y micronúcleos. El arsenito acelera la hidrólisis de inosina-5'-trifosfato (ITP) e inhibe tanto la absorción tanto de  $\text{Ca}^{2+}$  como de  $\text{Sr}^{2+}$ . Esta desregulación en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  promueve la actividad de la proteína cinasa C (PKC), la cual es importante en la genotoxicidad inducida por arsenito. Estudios realizados con células de ovario de hámster chino (CHO-K1) demostraron que la exposición a arsenito produce una acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  y activa la actividad de PKC dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , además afecta la integridad cromosómica provocando la formación de micronúcleos y la pérdida de cromosomas completos; sin embargo, no hay evidencia que demuestre que la vía PKC afecte directamente la estabilidad del genoma. Algunas proteínas cromosomales como histonas y ADN metilasa son sustratos potenciales de PKC; la función de estas proteínas puede afectar la estabilidad del genoma (Liu Chien y Huang, 1997).

En 1930 se llevaron a cabo estudios para comprobar el efecto tóxico del arsénico sobre los grupos fosfato, éstos se llevaron a cabo de manera *in vitro*; sin embargo, aún no hay evidencia sobre los efectos que pueden tener éstas interacciones de manera *in vivo* (Hughes y col., 2011).

Todo lo anterior se ha observado tanto en células animales como en animales de laboratorio y humanos. El mecanismo de genotoxicidad del arsénico puede ser el resultado de la generación de especies reactivas de oxígeno, inhibición en la reparación de ADN, y en la alteración en la metilación de ADN por lo que puede causar inestabilidad genómica (Hughes y col., 2011).

#### 1.6.5 Alteración de la reparación de ADN por la exposición a As

El As inhibe la reparación de ADN en células mamíferas y bacterianas. Esta inhibición es debido al efecto co-genotóxico del As con N-metil-N-nitrosourea y radiación UV (Rossman, 2003). El mecanismo exacto por el cual el As es co-carcinogénico es desconocido, hasta el momento ha sido difícil detectar los efectos genotóxicos del As *per se* a niveles ambientales (Andrew y col., 2006). Uno de los primeros estudios que examinó el efecto del As sobre la reparación de ADN, empleó cepas de *E. coli* con diferentes fenotipos de reparación de ADN. Este estudio demostró que el As *per se* no es mutagénico; sin embargo, cuando es combinado con luz UV la frecuencia de mutación incrementa (Rossman y col., 1977). Se han llevado a cabo estudios en los cuales se demuestra la relación del As y la alteración en la reparación de ADN; Hartwig y colaboradores (1997) llevaron a cabo un experimento empleando fibroblastos humanos, encontraron que a bajas concentraciones de As la eficiencia de reparación por escisión de nucleótidos disminuía, en particular después de la exposición a luz UV. La exposición a As está relacionada de manera dosis-dependiente a una disminución en la expresión de tres genes de reparación por escisión de nucleótidos *ERCC1*, *XPB* y *XPF* (Andrew y col., 2003). Las enzimas involucradas en los mecanismos de reparación de ADN como la reparación por escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés) y la reparación por escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés) son afectadas por el As (Hartwig y col.,

2003; Rossman, 2003). Los compuestos de As trivalente inhiben la actividad de BER y NER al interactuar con motivos de dedos de zinc de proteínas en estos dos sistemas de reparación de ADN (Piatek y col., 2008; Ding y col., 2009). La función catalítica de los dedos de zinc depende de la unión de zinc a residuos de cisteína. El As desregula la función proteica desplazando el zinc de su sitio de unión o mediante la inactivación de los grupos sulfhidrilos de cisteína por oxidación (Hughes y col., 2011).

#### 1.6.6 Alteración en la transducción de señales por la exposición a As

Las vías de transducción de señales transmiten las señales extracelulares por medio de series intracelulares de moléculas de señalización, y se transforman en alteraciones en la expresión de genes. Los procesos celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis están relacionados con estas vías o cascadas. El As puede alterar la transducción de señales, lo cual da como resultado la activación o inhibición de factores de transcripción, proteínas de regulación las cuales se unen al ADN e intervienen en la transcripción de genes (Hughes y col., 2011). Liu y colaboradores (1996) demostraron que el As activa JNK/SAPK y p38, pero activa moderadamente ERK. La *N*-Acetil-L-cisteína previene la activación de las cinasas, lo cual sugiere que una señal oxidativa inicia las respuestas. Además, se observó que el efecto de Ras en la activación de JNK/SAPK y p38 por As es mínimo; sin embargo, la activación de ERK requiere el efecto de Ras. Se ha demostrado que ERK es activado cuando las células son expuestas a bajas concentraciones de arsenito de sodio (2  $\mu$ M), éste puede actuar como un inductor de la proliferación celular (Chowdhury y col., 2010). Simeonova y colaboradores (2002) utilizaron arsenito de sodio para demostrar que la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal y de la proteína cinasa reguladora de la señal extracelular, es dependiente de arsenito de sodio. Sin embargo, la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidermal es ligando independiente de arsenito de sodio. Además, se demostró que la actividad de c-Src también es inducida por el arsenito de sodio y es

requerida para la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal y de la proteína cinasa reguladora de la señal extracelular.

#### 1.6.7 Proliferación celular inducida por la exposición a As

El As tiene efectos sobre la proliferación celular principalmente en la vejiga. Se ha observado que la actividad tanto c-jun como c-fos está asociada con la proteína AP-1, la cual es activada de manera dosis-dependiente por la presencia de arsenito de sodio (Simeonova y col., 2000; Chowdhury y col., 2010). Posteriormente, Simeonova y colaboradores (2002) demostraron que el arsenito de sodio induce la activación de EGFR, dependiente de c-Src, además activa la vía proteína kinasa mitogénica en células UROtsa. Estudios recientes han confirmado que la exposición a arsenito de sodio promueve la proliferación celular. Chowdhury y colaboradores (2010) llevaron a cabo una serie de experimentos para determinar la manera en la que el arsenito de sodio actúa en diferentes niveles, desde la entrada del arsenito de sodio a las células hasta los genes que se expresan, los cuales promueven carcinogénesis. La ciclina A es una proteína que participa durante el ciclo celular para la progresión de la fase S, ésta es expresada activamente cuando las células se encuentran expuestas a concentraciones bajas de arsenito de sodio (2  $\mu\text{M}$ ). Poonepalli y colaboradores (2013) llevaron a cabo un estudio para demostrar de qué manera el arsenito de sodio afecta a la polimerasa poli (ADP-ribosa), esta proteína es crítica para la estabilidad del ADN genómico. Para esto se emplearon fibroblastos de embriones de ratón modificados los cuales estuvieron expuestos a diferentes dosis de arsenito de sodio (11.5  $\mu\text{mol/L}$  o 23  $\mu\text{mol/L}$ ) durante 24 y 48 h. Este estudio demostró que el arsenito de sodio induce muerte celular, desgaste de telómeros e inestabilidad genómica cuando las células no expresan PARP-1, además se concluyó que PARP-1 es necesaria para la resistencia celular cuando las células se encuentran expuestas a arsenito de sodio. Zhang y colaboradores (2003) utilizaron células HL-60 y HaCaT para demostrar que la exposición de arsenito de sodio a bajas concentraciones promueve la actividad de la telomerasa e incrementa o mantiene la longitud de los telómeros. Ésto corresponde con la inducción de la proliferación

celular. Sin embargo, la exposición a altas concentraciones de arsenito de sodio disminuye la actividad de la telomerasa y por lo tanto se muestra una rápida pérdida de telómeros, provocando así la muerte por apoptosis.

#### 1.6.8 Alteración en la metilación de ADN por la exposición a As

La metilación de ADN es importante para que se lleve a cabo la transcripción de genes; sin embargo, algunos componentes pueden alterar la metilación de ADN como los compuestos que contienen As. En 1990, varios grupos de investigación se dedicaron a establecer el vínculo entre la toxicidad por As y la metilación del ADN (Hughes y col., 2011). El As es un carcinógeno humano no mutagénico el cual induce tumores a través de mecanismos desconocidos. Han surgido evidencias recientes las cuales indican que la carcinogenicidad es resultado de cambios epigenéticos, particularmente en la metilación de ADN (Rèichard y Puga, 2010). La hipótesis sobre el mecanismo de carcinogénesis del As y la alteración en la metilación de ADN, se encuentra basada sobre la vía de biotransformación del As (SAM/metiltransferasa) ya que ésta también está relacionada con la vía de metilación de ADN, en la cual la donación de grupos metilo a partir de SAM a citosinas produce 5-metilcitosina en el ADN. Se sabe que la regulación de la expresión de genes es controlada por la metilación de citosina (Chanda y col., 2005). Mass y Wang (1997) emplearon células murinas expuestas a As para demostrar la hipermetilación en las islas CpG del gen supresor de tumores p53. Posteriormente Chanda y colaboradores (2005) investigaron la asociación entre los cambios en la metilación de ADN y la exposición a As. Sus experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* demostraron que la exposición crónica a As causaba la hipermetilación de los promotores p53 y p16; sin embargo, los resultados contrastan con la hipometilación del promotor p16 en células tumorales de hígado. Además de estos estudios, se han llevado a cabo otros estudios en los que se demuestra la importancia de la alimentación, las dietas deficientes en folato, metionina, colina y vitamina B-12 puede inducir la hipometilación genómica de ADN debido a que una dieta deficiente en metilos puede inducir errores en la metilación de ADN reduciendo la cantidad de metilos durante la replicación (Pilsner y col., 2007).

En la Figura 3 se observan en resumen de los efectos del As en el metabolismo de la célula.

### 1.7 Efectos de la exposición a As en la salud

La exposición a As en el agua de bebida representa una crisis mundial y se ha relacionado con el desarrollo de varias enfermedades como cáncer de diversos órganos, hipertensión y diabetes. Los efectos que promueven el desarrollo del cáncer por la exposición al As se han evaluado mediante estudios epidemiológicos y experimentales, los cuales han determinado que la exposición oral se encuentra relacionada con el desarrollo de cáncer de vejiga, riñón, hígado y piel, mientras que la exposición por inhalación se encuentra relacionada con cáncer de pulmón. Se han realizado estudios sobre los efectos no cancerígenos del As; la evidencia epidemiológica sugiere que la diabetes mellitus tipo 2 es una de las enfermedades no-cancerígenas más relacionadas a la exposición crónica al As (Rodríguez y col., 2003; Paul y col., 2007). Los efectos de la intoxicación aguda o crónica de As varían dependiendo del sexo, edad, dosis, tiempo de exposición y el estado de oxidación del compuesto de As (Smith y col., 1998a). A una sola exposición a dosis altas se desarrollan síntomas como diarrea, vómito, dolor, deshidratación y debilidad. A nivel respiratorio y cardiaco, se desarrollan síntomas como hipotensión, shock, edema pulmonar y fallo cardiaco (Vahidnia y col., 2007). Las complicaciones neurológicas como la neuropatía distal, simétrica, sensorial y axonal son efectos tardíos por una intoxicación aguda con As (Rodríguez y col., 2003).

La presencia de líneas blancas en las uñas (líneas de Mee) es un signo característico de intoxicación crónica por As; estas líneas aparecen como una línea sólida, transversal, de color blanco de 1-2 mm las cuales cruzan las uñas de todos los dedos, relativamente en la misma distancia a partir de la base de la uña. Los síntomas crónicos de la exposición al As son cambios en la pigmentación, síntomas gastrointestinales, anemia, enfermedades del hígado, sabor metálico en la boca, enfermedad del pie negro y diabetes mellitus (Rodríguez y col., 2003; Paul y col., 2007; Vahidnia y col., 2007).

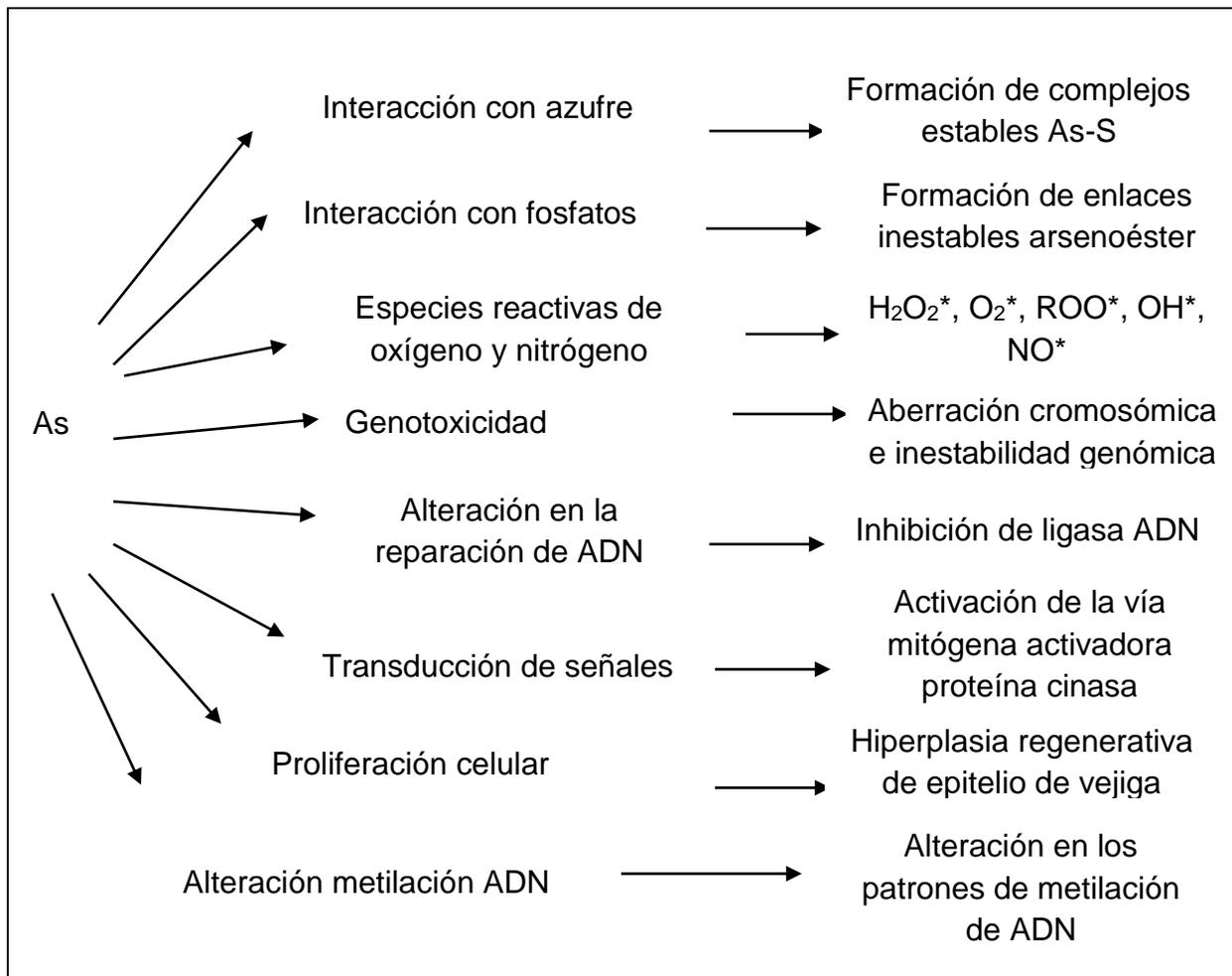


Figura 3. Alteraciones bioquímicas en la célula después del consumo de As (Hughes y col., 2011).

El sistema nervioso se ve afectado por la exposición a As y los síntomas son mareo, debilidad, delirio, encefalopatía y neuropatía periférica como la enfermedad de pie negro. La correlación entre la exposición a As y la neuropatía periférica muestra un incremento en el umbral de vibración táctil y la pérdida de sensación vibratoria en las extremidades bajas (Greenberg, 1996; Rodríguez y col., 2003; Vahidnia y col., 2007; Hughes y col., 2011). Para el tratamiento de los padecimientos por As se han

empleado quelantes como el 2,3-dimercapto-1-propanol, el cual muestra una disminución del As en el tejido y su eliminación por orina o heces; sin embargo, este tratamiento no ha resultado del todo eficaz para las complicaciones neurológicas (neuropatías periféricas) (Vahidnia y col., 2007).

#### 1.8 Efectos del As en el sistema nervioso

Los efectos del As sobre las funciones del sistema nervioso continúan siendo estudiados debido a que el As ha sido relacionado con diversas alteraciones tanto motoras como de aprendizaje. El As ingresa al cerebro a través de un mecanismo que aún es desconocido y se acumula en el plexus coroideo aproximadamente 0.079 µg/g, después de la exposición a 2 mg As/kg usando como sal arsenato de sodio (Zheng y col., 1991; Zheng, 2001). El As pentavalente es transportado a través de un sistema de transportador de fosfatos en procariontes y eucariontes; el As trivalente puede ser transportado a través de una familia integral de membranas conocidas como acuaporinas, AQP's por sus siglas en inglés, las cuales transportan selectivamente agua y algunos solutos pequeños neutros como glicerol y urea (Rosen y Tamás, 2010). Una vez que el As ingresa al cerebro, éste puede distribuirse en las diferentes regiones cerebrales. Shila y colaboradores en 2005 realizaron un estudio en el cual determinaron las concentraciones de As presentes en corteza, hipotálamo, estriado, cerebelo e hipocampo de ratas Wistar macho. Como puede apreciarse en el Cuadro 3, las ratas expuestas de manera crónica al arsenito de sodio mostraron un incremento considerable en la concentración de As en comparación con el grupo control en las diferentes regiones que se analizaron. En este estudio utilizaron ácido lipoico el cual disminuyó la concentración de As en las regiones estudiadas.

Cuadro 3. Concentraciones de As en diferentes regiones cerebrales expresadas en  $\mu\text{g/g}$  de tejido (Adaptado de Shila y col., 2005)

<b>Región</b>	<b>Grupo I Control</b>	<b>Grupo II Arsénico</b>
Corteza	$0.063 \pm 0.008$	$0.26 \pm 0.040^a$
Hipotálamo	$0.068 \pm 0.009$	$0.21 \pm 0.027^a$
Estriado	$0.082 \pm 0.007$	$0.32 \pm 0.045^a$
Cerebelo	$0.047 \pm 0.006$	$0.13 \pm 0.017^a$
Hipocampo	$0.054 \pm 0.004$	$0.18 \pm 0.023^a$

Posiblemente la acumulación de As en estas regiones esté relacionada con daños en la neurotransmisión por lo que puede provocar neuropatías centrales y periféricas. Algunos de los síntomas que se desarrollan después de una exposición aguda a As son convulsiones, déficit mental y encefalopatía (De La Cruz-Aguilera y Ríos-Castañeda, 1998). Se ha reportado que las neuropatías centrales causan alteraciones en el funcionamiento neurológico como el aprendizaje, memoria de corto plazo y la concentración. Las personas expuestas de manera crónica al As por vivir en áreas contaminadas con As pueden llegar a presentar delirio por la toxicidad y encefalopatías. Algunas pruebas neuropsicológicas en personas demostraron una disminución media en la velocidad psicomotora y procesos de atención, mientras que los procesos de aprendizaje y memoria se afectaron severamente incluyendo alteración en la percepción visual, problemas con la integración visual-motora y déficit del IQ verbal (Calderón y col., 2001; Wasserman y col., 2004; Rodríguez y col., 2003; Wright y col., 2006; Rosado y col., 2007) el signo clínico más relevante es la aparición de la neuropatía periférica, la cual puede presentarse por algunos años o el resto de la vida de la persona. La neuropatía periférica puede dar como resultado un incremento en la debilidad, similar al síndrome Guillan-Barré. Esta enfermedad es

muy común en personas que se encuentran expuestas de manera crónica a agua contaminada con As (Kim y col., 2012). A este respecto, varios grupos han reportado que la exposición a As causa neuropatía periférica simétrica caracterizada por nervios sensoriales más sensibles que los nervios motores, las neuronas con axones largos son más afectadas que las neuronas con axones cortos. Algunos de los síntomas clínicos incluyen efectos sensoriales simétricos como entumecimiento y parestesia de las extremidades distales; se ha observado que las piernas son severamente afectadas a diferencia de los brazos (Murphy y col., 1981). Se ha reportado que los signos y síntomas motores se desarrollan entre las 2 h a 2 años de exposición, presentando vómito o diarrea o ambos simultáneamente con el desarrollo de neuropatías (Chuttani y col., 1967). Al llevarse a cabo una examinación detallada se mostró que después de la exposición a As los principales cambios que se observan en los nervios son axonopatía y desmielinización. Análisis posteriores determinaron que pacientes intoxicados con As presentaban fragmentación y resorción de la mielina, desintegración de los cilindros axiales, con una reducción en el número de fibras mielinizadas (Murphy y col., 1981; Donofrio y col., 1987). Cuando la exposición a As es crónica, se observa alterada la coordinación motora, por ejemplo la disminución en la coordinación mano-ojo y en la fuerza de agarre (Gerr y col., 2000). La coordinación motora se encuentra regulada en la región del estriado, la cual es una estructura que realiza operaciones rápidas mediadas por neurotransmisores a través de sus proyecciones a las células medianas espinosas. El estriado está conformado por el caudado y el putamen, los cuales forman parte de los ganglios basales en conjunto con otras estructuras como el globo pálido interno y externo, núcleo subtalámico y sustancia *nigra*. Estas estructuras son núcleos complejos que trabajan de manera sinérgica con la corteza cerebral (Di-Chiara y col., 1994; Smith y col., 1998b). El complejo estriatal recibe señales excitatorias glutamatérgicas desde la estructura cortical y talámica. Estas señales de entrada convergen en el estriado para establecer sinapsis con las neuronas medianas espinosas, tanto con las neuronas GABAérgicas (que representan el 95% de las neuronas estriatales) como con las interneuronas colinérgicas y GABAérgicas. Otras

aferencias neuromodulatorias como las entradas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* llegan al estriado (Dubé y col., 1988; Lapper y Bolam, 1992; Pickel y col., 1992). La complejidad de los circuitos neuronales ha dificultado la manera de investigar las funciones del estriado (Do y col., 2013). Se han llevado a cabo diferentes experimentos en animales para estudiar los efectos que tiene el As sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) principalmente en los sistemas dopaminérgicos de los ganglios basales. Rodríguez y colaboradores (2010) evaluaron el efecto del arsenito de sodio en la coordinación motora y en la neuroquímica dopaminérgica de ratas macho Sprague-Dawley después de la exposición a 5, 10 y 20 mg As/kg durante 1 año, usando como sal arsenito de sodio, demostrando una disminución en la coordinación motora bajo la dosis de 20 mg/kg. Además, los niveles de dopamina, ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC, por sus siglas en inglés) y ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA, por sus siglas en inglés) aumentan en estriado después de la exposición a 20 mg As/Kg con arsenito de sodio. En otro estudio se evaluó la actividad locomotora de ratas macho Sprague-Dawley después de administrarles 0.05, 0.5 y 50 mg As/kg usando como sal arsenito de sodio disuelto en agua de bebida los resultados muestran hipoactividad después de 1 año de exposición a la dosis más alta (Rodríguez y col., 2003; Bardullas y col., 2009; Rodríguez y col., 2009; Rodríguez y col., 2010). Además del sistema dopaminérgico, otros de los sistemas afectados por la exposición a As son los sistemas GABAérgico y glutamatérgico. A este respecto, Nagaraja y Desiraju (1993) realizaron un estudio en el cual determinaron el efecto de la exposición a arsenato de sodio en la neuroquímica GABAérgica y glutamatérgica de diferentes regiones cerebrales. Estos autores administraron durante un lapso de 60 días, 5 mg/kg de peso usando como sal arsenato de sodio a ratas Wistar macho en desarrollo (P2), después de este tiempo se observó una disminución de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD, por sus siglas en inglés) en el cerebelo y el hipotálamo. Por otro lado, el contenido de glutamato aumentó considerablemente únicamente en el tallo cerebral mientras que para el neurotransmisor GABA hubo una disminución en hipotálamo y cerebelo. Para determinar el efecto del arsenato de sodio en el cerebro adulto de ratas se utilizaron

ratas de 90 días y fueron expuestas a 5 mg/kg de arsenato de sodio durante 90 días mostraron una disminución en la actividad de la enzima GAD en núcleo accumbens, hipocampo, hipotálamo y cerebelo; se observó un aumento significativo de glutamato en el núcleo accumbens, el estriado, la corteza motora y el hipocampo. Con este estudio se determinó que la disminución de GABA en determinadas regiones podría deberse a la interacción del arsenato con el co-factor fosfato de piridoxal que la enzima GAD utiliza para la síntesis de GABA. El incremento de glutamato sólo es metabólico debido a que no produjo daños excitotóxicos en los animales (Nagaraja y Desiraju, 1993). Con esta información es posible determinar que el As ocasiona daños en la neuroquímica del estriado tanto en su sistema dopaminérgico como en el GABAérgico y el glutamatérgico.

A continuación se describe la síntesis y el metabolismo de los neurotransmisores GABA y glutamato.

### 1.9 Neurotransmisores GABA y glutamato

Tanto GABA como glutamato forman parte de un complejo balance entre la excitación y la inhibición en el SNC; mientras que, glutamato es el mayor excitador, GABA es el principal inhibidor en la corteza cerebral de los mamíferos. Este balance es de vital importancia en el control de la excitabilidad cortical (Petroff, 2002).

#### 1.9.1 Síntesis y metabolismo de GABA

El neurotransmisor GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) fue identificado en 1950, es el neurotransmisor inhibitor más importante del SNC. David Curtis y Jeffrey Watkins fueron los primeros en demostrar que GABA poseía la habilidad de inhibir los potenciales de acción en los mamíferos. A diferencia de glutamato, GABA no es un metabolito esencial ni se encuentra incorporado a proteínas. GABA se encuentra en los circuitos interneuronales locales y las células de Purkinje del cerebelo son un ejemplo claro de la proyección neuronal GABAérgica (Purves y col., 2001). El principal precursor para la síntesis de GABA es la glucosa, la cual es metabolizada por las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos; sin embargo, el piruvato y la

glutamina también pueden actuar como precursores. La enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), la cual solo se encuentra presente en las neuronas GABAérgicas, cataliza la conversión de glutamato a GABA. La enzima GAD es responsable de la síntesis de GABA, ésta posee una estructura homodimérica y la reacción se lleva a cabo en un solo paso, la cual requiere la presencia del cofactor fosfato de piridoxal (PLP) y glutamato como sustrato, obteniendo CO<sub>2</sub> como co-producto. La falta de vitamina B<sub>6</sub> ocasiona una reducción en el contenido de GABA en el cerebro, debido a que ésta es precursor del cofactor fosfato de piridoxal y, por lo tanto, la subsecuente falta de inhibición sináptica ocasiona convulsiones, las cuales pueden llegar a ser fatales. Además, la deficiencia de neuronas GABAérgicas puede provocar movimientos incontrolables como en las personas que padecen la enfermedad de Huntington (Purves y col., 2001; Mejía-Toiber y col., 2010; Fox, 2013). Existen dos isoformas de la enzima GAD, la GAD<sub>65</sub> y la GAD<sub>67</sub>, la diferencia entre sus nombres es debido al peso molecular que corresponde a ~65 y ~67 kDa, respectivamente. Ambas poseen diferentes características, una de ellas es el gen que las codifica; GAD<sub>65</sub> se localiza en el cromosoma 10 y el de GAD<sub>67</sub> se encuentra en el cromosoma 2 en el humano. Por otro lado la secuencia de aminoácidos es diferente en ambas enzimas, las secuencias de GAD<sub>65</sub> y la GAD<sub>67</sub> coinciden en un 65%, esto explica las diferencias en algunos aspectos entre estas isoenzimas (Bu y col., 1992; Kelly y col., 1992). Estas isoenzimas difieren en su localización debido a que la GAD<sub>65</sub> se encuentra principalmente en las terminales nerviosas mientras que GAD<sub>67</sub> se encuentra en las terminales nerviosas, el soma y las dendritas. Además, estas isoenzimas difieren en la unión y el requerimiento por el PLP. El 93% de la GAD<sub>65</sub> se encuentra en un estado inactivo debido a que una vez que se ha sintetizado GABA, la GAD<sub>65</sub> se convierte en apoenzima. Sin embargo, 72% de la GAD<sub>67</sub> se encuentra en forma de, holoenzima, es decir, de enzima activa. Por lo tanto, se ha determinado que el principal aporte de GABA al cerebro es derivado de la GAD<sub>67</sub> (Soghomonian y Martin, 1998; Martín y col., 2000). Se llevaron a cabo estudios de cristalografía en donde se demostró que el sitio catalítico, ubicado en el centro del dominio de unión al PLP, en la GAD<sub>67</sub>, está cubierto mientras que en la GAD<sub>65</sub> el sitio

es móvil. De estos estudios se puede concluir que al finalizar la reacción el cofactor es liberado, lo que resulta en la autoinactivación de la GAD<sub>65</sub> (Langendorf y col., 2013). Este fenómeno promueve la síntesis de GABA a través de la GAD<sub>67</sub>, la cual no requiere PLP adicional para llevar a cabo la reacción (Fenalti y col., 2007). Una vez que GABA es sintetizado, es almacenado por el transportador vesicular de GABA (VGAT) conocido también como transportador de aminoácidos inhibidores (VIAAT), ya que se ha determinado que también transportan glicina. Se ha determinado que sólo GAD<sub>65</sub> posee una estructura capaz de asociarse a las membranas vesiculares; sin embargo, la GAD<sub>67</sub> es capaz de formar heterómeros con la GAD<sub>65</sub> y de esa manera contribuye con el llenado de las vesículas en las neuronas GABAérgicas (Kaanani y col., 2010). El GABA liberado por exocitosis puede provenir de la síntesis de GABA, a partir tanto de la actividad de GAD<sub>65</sub> como de la GAD<sub>67</sub> (Mejía-Toiber y col., 2010). Para que se lleve a cabo el efecto inhibitor de GABA, es fundamental su liberación al espacio sináptico. La liberación ocurre una vez que el potencial de acción llega a la terminal axónica, entonces se libera el neurotransmisor sincrónicamente en múltiples terminales de una misma neurona. Se ha concluido que este tipo de liberación, inducida por la llegada del potencial de acción a la terminal sináptica o inducida experimentalmente con estímulos eléctricos, es dependiente de Ca<sup>2+</sup>. La entrada de Ca<sup>2+</sup> induce la movilización de las vesículas ancladas a las zonas de liberación, es decir, al sitio activo de la neurona. Una vez fusionadas las vesículas y la membrana presináptica de la neurona, su contenido es liberado al espacio sináptico, este fenómeno es conocido como exocitosis (Holz, 2006).

### 1.9.2 Receptores GABA

Una vez que el neurotransmisor es liberado al espacio sináptico, éste se une a receptores los cuales poseen alta afinidad al neurotransmisor. La activación del receptor resulta en una serie de eventos moleculares lo cual representa la respuesta de la célula al neurotransmisor. Los receptores se han clasificado de acuerdo a sus propiedades farmacológicas, bioquímicas y electrofisiológicas en receptores ionotrópicos, GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>, y receptores metabotrópicos, GABA<sub>B</sub>. Todos son

activados por el ligando endógeno GABA (Olsen y Bertz, 2006). Estos receptores poseen una estructura pentamérica, donde cada subunidad cuenta con cuatro dominios  $\alpha$ -hélice (M1-M4), siendo los M2 los que forman el canal central del receptor permeable al  $\text{Cl}^-$ . Cada subunidad posee un peso molecular de 50-60 kDa y se clasifican en  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ , siendo la combinación  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  la que se encuentra ampliamente distribuida en las neuronas GABAérgicas del cerebro (Olsen y Sieghart, 2008). Cada una de las subunidades cuenta con un dominio extracelular largo, cuatro dominios transmembranales y una unión intracelular larga entre el dominio tres y cuatro. Los estudios electrofisiológicos de los receptores  $\text{GABA}_A$  indican que la activación del receptor incrementa la conducción de  $\text{Cl}^-$  en la membrana lo que conduce a la célula a un estado de hiperpolarización y aleja a las células del umbral de disparo, ocasionando la inhibición neuronal (Steffensen y col., 1998). Tanto las neuronas como la glía poseen transportadores de alta afinidad por GABA y son transportadores dependientes de  $\text{Na}^{2+}$ . Estos transportadores han sido denominados en la rata como rGAT1-4 y comparten una estructura similar de doce segmentos transmembranales; en cuanto a la distribución, los rGAT-1 y GAT-4 se localizan en terminales nerviosas, los GAT-2 en la glía y los rGAT-3 en el plexo coroideo. Su estequiometría indica que la recaptura de GABA es electrogénica ya que cada molécula es transportada junto con 2 iones  $\text{Na}^+$  y un ión  $\text{Cl}^-$ . Una vez que GABA se encuentra dentro de la neurona o la glía, GABA es convertido a succinato, el cual es metabolizado más tarde en el ciclo del ácido tricarboxílico. Las enzimas que se requieren para su degradación son las enzimas mitocondriales GABA aminotransferasa y semialdehído succínico deshidrogenasa. La inhibición en la ruptura de GABA causa un aumento en el contenido de GABA y por lo tanto incrementa la actividad de las neuronas inhibitoras. En la Figura 4 se observa la síntesis, captura y degradación del neurotransmisor GABA (Purves y col., 2001; Mejía-Toiber y col., 2010).

### 1.9.3. Síntesis y metabolismo de glutamato

En el SNC se encuentran varios tipos de transmisores encargados de la excitabilidad de las neuronas, los más importantes son aspartato y glutamato. Algunas de las funciones en las que se involucra el glutamato son: incorporación a proteínas, síntesis de ácidos grasos, regulación de amoniaco, control del balance osmótico, precursor de GABA y varios de los intermediarios en el ciclo de Krebs. Éstos se encuentran en altas concentraciones en el SNC y su liberación depende de la estimulación eléctrica y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las vías glutamatérgicas se encuentran involucradas en varios procesos neuronales como el aprendizaje y la epilepsia (Siegel y col., 1994). El glutamato es el mayor neurotransmisor excitador que se encuentra en el SNC, produciendo potenciales excitadores postsinápticos. Su concentración es seis veces mayor al principal neurotransmisor inhibitorio, GABA (Siegel y col., 1994; Fox, 2003).

El glutamato es considerado como aminoácido no esencial, el cual no puede atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que no es suministrado al cerebro a través de la circulación sanguínea. Sin embargo, se sintetiza a partir de varios precursores como la glutamina, la cual se encuentra en las terminales sinápticas (Siegel y col., 1994).

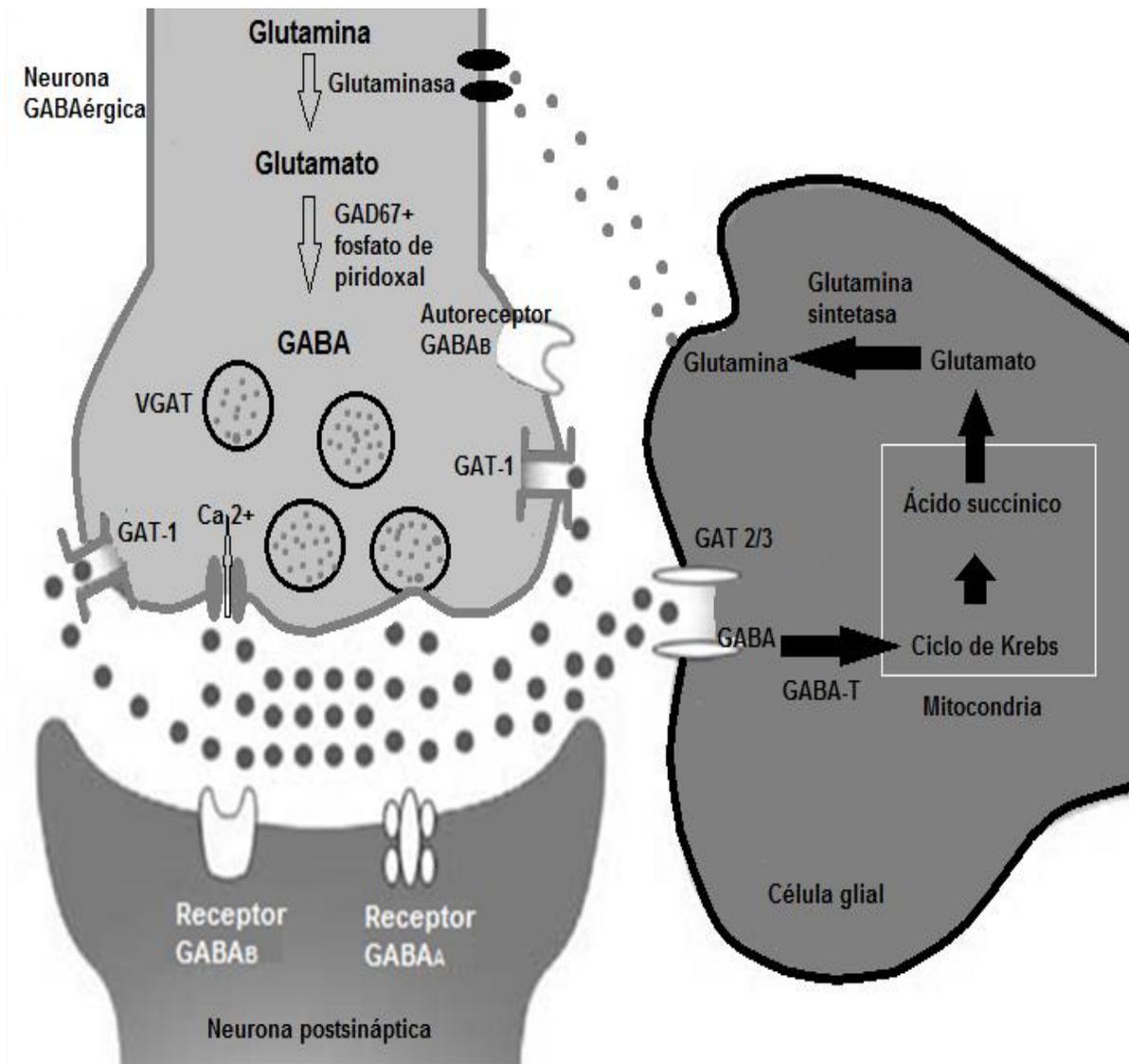


Figura 4. Síntesis, captura y degradación de GABA (Adaptado de Purves y col., 2001).

La síntesis de glutamato se lleva a cabo en neuronas y células gliales; tanto la síntesis como el metabolismo dependen de la interacción entre los nervios terminales y la glía (Siegel y col., 1994). La síntesis se lleva a cabo a partir de 2 vías principales:

- La conversión de glutamina a glutamato involucra la acción enzimática de la glutaminasa en el compartimento mitocondrial (Siegel y col., 1994; Purves y col., 2001)

- La formación de glutamato puede ocurrir a través de la transaminación de 2-oxoglutarato, un intermediario del ciclo del ácido tricarboxílico. Por lo tanto, cierta parte de glucosa metabolizada puede ser empleada para la síntesis de glutamato (Purves y col., 2001).

Después de que el glutamato es sintetizado, se almacena en vesículas a través de un proceso dependiente de  $Mg^{2+}$  y ATP. El glutamato es liberado a partir de una terminal nerviosa y posteriormente es capturado por las células gliales, las cuales lo convierten a glutamina. La remoción de glutamato se lleva a cabo a través de transportadores de glutamato, los cuales se encuentran presentes en las células gliales y en las terminales presinápticas. Las células gliales contienen la enzima glutamina sintetasa, ésta convierte el glutamato en glutamina, la cual es transportada fuera de las células gliales y se introduce en el botón terminal de la neurona presináptica. De esta manera, las terminales presinápticas cooperan con las células gliales para mantener una adecuada concentración del neurotransmisor. Esta secuencia es conocida como el ciclo de glutamato y glutamina. En la Figura 5 se puede apreciar la síntesis de glutamato (Siegel y col., 1994; Purves y col., 2001).

#### 1.9.4. Receptores NMDA

Estos receptores son canales catiónicos dependientes de glutamato, altamente permeables a la entrada de  $Ca^{2+}$ ; son importantes para el desarrollo del SNC, la generación de los ritmos para respiración y la locomoción, además de los procesos de aprendizaje, memoria y neuroplasticidad. Requieren de varias condiciones para que el canal iónico pueda abrirse y permitir el flujo de iones a través de la membrana celular. La activación de los receptores NMDA es más lenta que la activación de los receptores de kainato y AMPA. Como se describió anteriormente, el glutamato liberado de las terminales presinápticas es removido eficientemente del espacio sináptico por acción de los transportadores de glutamato localizados en la terminal presináptica; por lo que, el glutamato se encuentra disponible para la unión al receptor sólo brevemente durante la baja frecuencia de la transmisión sináptica (VanDongen y col., 2009).

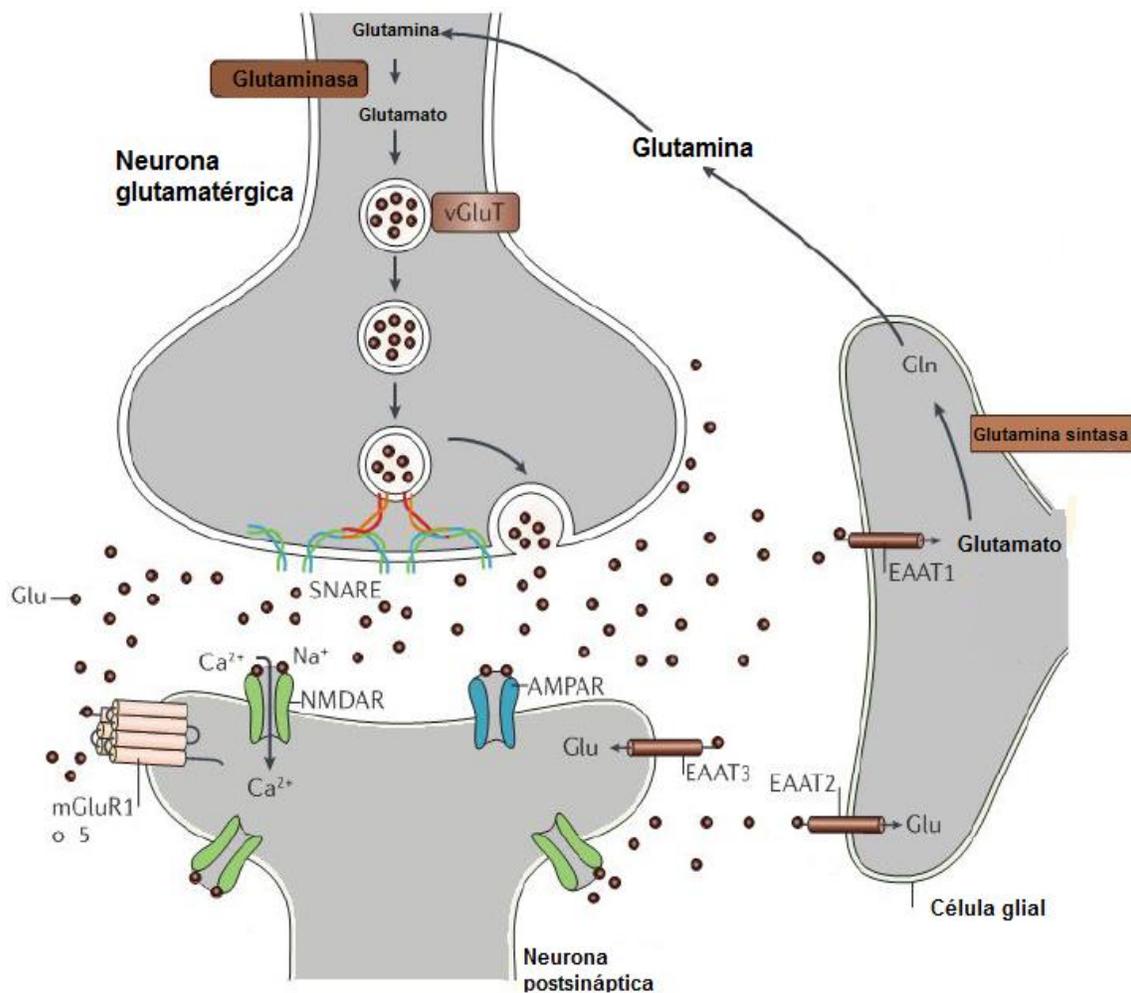


Figura 5. Modelo que muestra la síntesis de glutamato, siendo el principal precursor la glutamina.

Debido a que el receptor NMDA posee una alta afinidad por el glutamato, el impulso de los neurotransmisores debe ser capaz de activar parcial y lentamente los receptores NMDA. Sin embargo, los impulsos sinápticos excitatorios no son capaces de generar el flujo de calcio debido a que estos receptores poseen una alta dependencia de voltaje (VanDongen, 2009; Fox, 2013). El receptor NMDA posee al menos 5 diferentes sitios de unión a ligandos endógenos; estos consisten en dos sitios diferentes para el reconocimiento de agonistas (glutamato y glicina); sitios de unión a poliaminas y sitios separados de reconocimiento para  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , estos

últimos actúan como inhibidores del flujo de iones a través del canal (Siegel y col., 1994). Se requiere de dos condiciones especiales para permitir la apertura del canal: (1) al receptor NMDA deben unirse tanto el glutamato como la glicina, ya que actúan como coagonistas; y (2) la membrana debe encontrarse parcialmente despolarizada por un neurotransmisor unido a un receptor diferente. Una vez que el canal se ha abierto, éste permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{2+}$ , así como la salida de  $\text{K}^{+}$ , en las dendritas de la neurona postsináptica (Fox, 2013). Por lo tanto, el glutamato, la glicina y las poliaminas actúan en conjunto para la apertura de los canales iónicos NMDA. Además de la unión de ligandos, se debe considerar que la habilidad del glutamato y la glicina para activar el receptor NMDA es influenciado por el pH extracelular y el estado de fosforilación del receptor. El intervalo de pH óptimo es entre 6.8 y 8.4 (Siegel y col., 1994).

La transmisión sináptica excitatoria se basa en la liberación de L-glutamato en las terminales presinápticas. El L-glutamato atraviesa el espacio sináptico para unirse a los receptores postsinápticos NMDA y AMPA. La activación de éste último es rápido y transitorio, ocasiona breves despolarizaciones (duración de milisegundos). Sin embargo, los receptores NMDA regulan la plasticidad funcional y estructural de sinapsis individuales, dendritas y neuronas, permitiendo la activación de específicas cascadas de señalización dependientes de calcio (VanDongen, 2009).

Los neurotransmisores GABA y glutamato se distribuyen en diferentes regiones cerebrales, por ejemplo, en el estriado. Es en esta región donde evaluaremos el efecto tóxico del As empleando líneas celulares cerebrales que a continuación se describen.

#### 1.10 Líneas celulares

Las líneas celulares han contribuido a grandes descubrimientos. Desde 1907 hasta la fecha, como por ejemplo la creación de hibridomas para obtener anticuerpos monoclonales, el desarrollo de vacuna contra la polio empleando células HeLa, la reprogramación de células pluripotenciales inducida por ácido valproico, entre otros

(Scherer y col., 1953; Köhler y Milstein, 1975; Huangfu y col., 2008). Se pueden llevar a cabo numerosos tipos de investigaciones tanto básicas como aplicadas. El uso de líneas celulares en investigación tiene varias ventajas como control del ambiente (pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, temperatura, presión osmótica), caracterización y homogeneidad de las células, replicabilidad y variabilidad, ahorro de tiempo, reducción en el número de animales experimentales, control de las condiciones fisiológicas (Freshney, 2006). Representan un modelo ideal para estudiar la actividad intracelular cuando las células son incubadas con As. Se han llevado a cabo diferentes estudios en donde se demuestra el efecto del As en la sobrevivencia celular. Con respecto a la exposición a As, Mengesdorf y colaboradores (2002) realizaron un estudio en donde se emplearon cultivos primarios de corteza expuestos a 1 ó 100 µM de arsenito de sodio. Después de 24 h disminuyó drásticamente la síntesis de proteínas, además se observó alteración de genes como la proteína de choque térmico 70, GRP78, GRP94 y GADD153. El arsenito de sodio en altas concentraciones (>5 µM) representa un daño grave para la célula ya que se producen especies reactivas de oxígeno, daño mitocondrial y la inactivación de enzimas a través de la formación de tioles; estas acciones en conjunto pueden llegar a ocasionar muerte celular. Uno de los estudios más recientes sobre el efecto del arsenito de sodio en un sistema *in vitro* es el que llevaron a cabo Ivanov y Hei (2013), en el cual se emplearon células madre neuronales humanas, tratadas con diferentes concentraciones de arsenito de sodio durante 3 días. Los resultados indican que el tratamiento con arsenito de sodio (1-4 µM) no permitió que las células continuaran proliferando y además se observó un incremento en los niveles de muerte celular en cultivos confluentes. Estos autores también llevaron a cabo experimentos dosis-respuesta demostrando una baja sobrevivencia de las células después de 3 días de exposición al tratamiento a una concentración de 4 µM; la cual presentó una alta tasa de muerte por apoptosis durante las primeras 24 a 48 hrs de exposición a arsenito de sodio.

En este apartado se describirán con mayor detalle las líneas celulares neuronales que se emplearon en este proyecto.

#### 1.10.1 Líneas celulares M213-2O y M213-2O CL-4

Las líneas celulares neuronales derivadas del sistema nervioso central son empleadas para estudiar los procesos neurobiológicos y su posible uso como terapia en determinadas enfermedades (Truckenmiller y col., 2002). Las líneas derivadas de tumores no son ideales para estudiar estos procesos debido a las varias anomalías que presentan por lo que se realizan nuevos métodos para obtener líneas celulares no derivadas de tumores, tal es el caso de la línea celular M213-2O. Esta línea se obtuvo a partir de la eminencia ganglionar de ratas Sprague-Dawley (P14) y fue immortalizada empleando el alelo A58 sensible a la temperatura del antígeno T largo SV40, el cual contiene el gen de resistencia a geneticina. El antígeno T largo SV40 es ampliamente utilizado para immortalizar las células animales debido a que interfiere con componentes del ciclo celular, incluyendo p53, p300 y retinoblastoma, lo cual produce células con fenotipo indiferenciado (Truckenmiller y col., 1998; William y col., 2005). Por otro lado, al immortalizar la línea con el alelo A58 permite mantener un mayor control en las células tanto en su replicación como en su diferenciación debido a que la temperatura es un factor clave para la replicación y diferenciación de las células. En particular, esta línea celular posee una morfología multipolar poligonal, cortas proyecciones y múltiples nucléolos, no exhibe inhibición por contacto como se puede observar en la Figura 6, además estudios inmunocitoquímicos han revelado que es positiva a MAP-2, marcador primario neuronal, y a GAD. Se ha demostrado que esta línea celular posee niveles de GABA similares a los encontrados en el estriado de rata (Giordano y col., 1993).

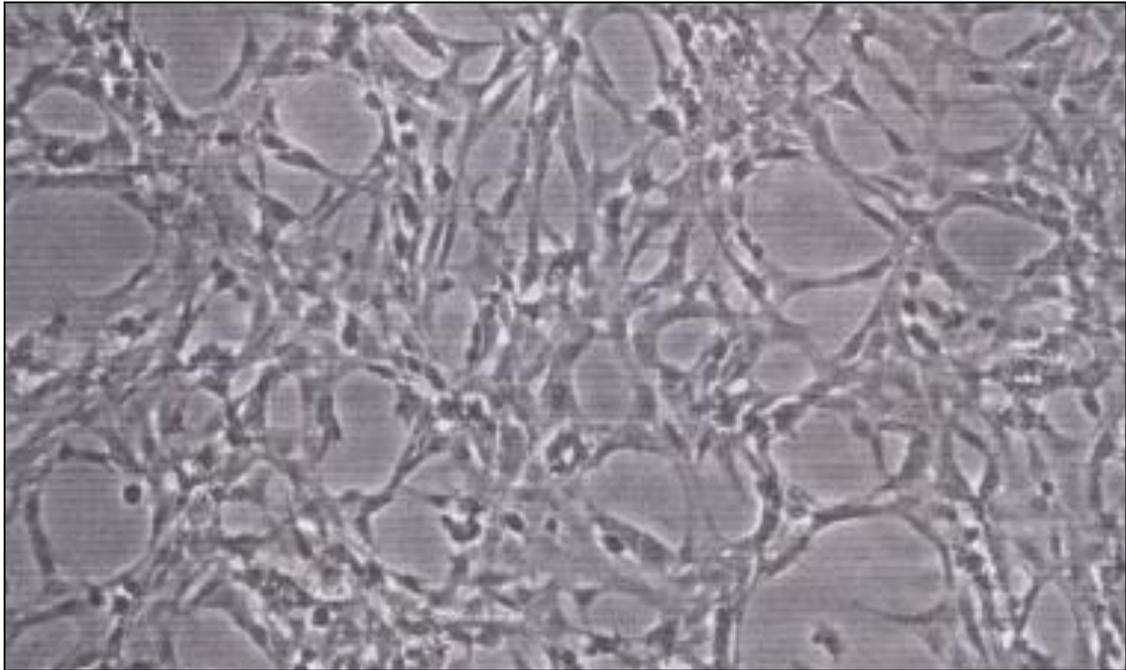


Figura 6. Morfología de la línea celular M213-2O en cultivo (Mejía-Toiber y col., 2010)

Para aumentar sus propiedades GABAérgicas, las células M213-2O fueron transfectadas con un plásmido episomal Epstein-Barr no viral pREP10-hGAD<sub>67</sub>, que contiene un sitio de origen de replicación, un promotor basado en el virus del sarcoma de Rous y además expresa el antígeno nuclear Epstein-Barr (EBNA, por sus siglas en inglés) el cual permite la replicación episomal del plásmido (Conejero-Goldberg, 2000). La transfección se llevó a cabo empleando lípidos catiónicos. Una de las clonas resultantes (M213-2O CL-4) expresa altos niveles de hGAD-67 y la producción de los niveles de GABA es aún mayor, la liberación de este neurotransmisor aumenta después del estímulo despolarizante como  $K^+$  a comparación con la línea celular parental M213-2O (Conejero-Goldberg y col., 2000). En la Figura 6 se observa la morfología de la línea M213-2O CL-4.

Empleando la técnica de imágenes de calcio se caracterizó la actividad de M213-2O CL-4 en condiciones de despolarización. Se encontró que estas células son

activadas por glutamato, al interactuar con los receptores tipo AMPA/NMDA, y esto induce la liberación de GABA; posteriormente estas células sintetizan, captan y liberan GABA de manera  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente (Mejía-Toiber y col., 2010).

De acuerdo a los estudios arriba mencionados, las células M213-2O y M213-2O CL-4 han sido consideradas líneas celulares GABAérgicas por los niveles de GABA y glutamato que son sintetizados después de un estímulo despolarizante. Se observó que la línea M213-2O CL-4, a diferencia de la línea M213-2O, posee concentraciones 34 veces mayores de GABA intracelular y la actividad de GAD incrementa 16 veces (Ross y col., 2002; Mejía-Toiber y col., 2010).

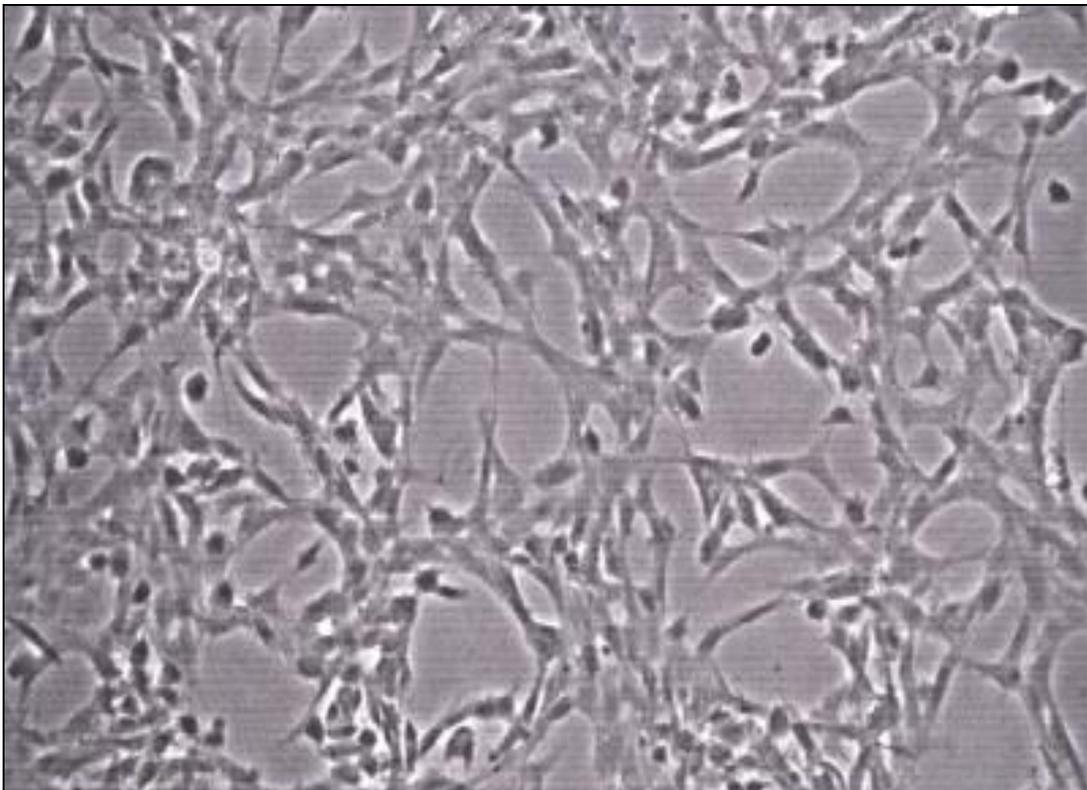


Figura 5. Morfología de la línea celular M213-2O CL-4 en cultivo (Mejía-Toiber y col., 2010).

Los neurotransmisores GABA y glutamato participan en diversos procesos en el SNC por lo que la alteración en su síntesis, liberación o recaptura ocasionaría daños a la salud del individuo. Se ha determinado que el As provoca daños en el SNC y es por esta razón que en este proyecto se propuso determinar el efecto del As en la viabilidad de líneas celulares cerebrales como la línea M213-2O y M213-2O CL-4, además se determinó la toxicidad del arsenito de sodio en la línea celular M213-2O CL-4 sobre la neuroquímica de GABA y glutamato. Los resultados obtenidos en este proyecto nos proporcionaron evidencia sobre el efecto del arsenito de sodio en la neuroquímica GABAérgica y glutamatérgica

## **2. HIPÓTESIS**

Debido a que el arsénico es responsable de alterar la neuroquímica de GABA y glutamato en un sistema *in vivo*, la exposición a arsenito de sodio provocará la alteración en la neuroquímica GABAérgica y glutamatérgica en la línea celular M213-2O CL-4.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1 General

Determinar la toxicidad de la exposición a arsenito de sodio en las líneas celulares M213-2O, M213-2O CL-4.

#### 3.2 Específicos

- Determinar curva dosis-respuesta de la viabilidad de las líneas celulares neuronales M213-2O, M213-2O CL-4 después de ser expuestas a diferentes concentraciones de arsenito de sodio
- Evaluar el efecto del arsenito de sodio, sobre la neuroquímica de los neurotransmisores GABA y glutamato, en la línea celular M213-2O CL-4.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1 Cultivo de células M213-2O y M213-2O CL-4**

Las líneas celulares M213-2O y M213-2O CL-4 se cultivaron en medio DMEM/F12 (1:1 Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 1% penicilina y estreptomina (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A) en una placa de 24 pozos a 35.5°C y 5% CO<sub>2</sub>. Después de haber crecido las células adecuadamente, éstas se trataron con tripsina/EDTA (0.25%) para despegarlas. Posteriormente, se añadió medio DMEM/F12 a cada pocillo, se colectaron las células y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante fue descartado y al precipitado se le añadió medio DMEM/F12 para suspender las células. Una vez obtenida la cantidad de células suficiente, una parte se mantuvo bajo congelación en DMEM/F12 suplementado con DMSO (10%) y otra se empleó para experimentación.

### **4.2 Experimento dosis-respuesta con arsenito de sodio**

Las líneas celulares M213-2O y M213-2O CL-4 se propagaron a la misma densidad ( $1.5 \times 10^6$  células/pocillo) en medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB y 1% penicilina/estreptomina en placas de 24 pozos a 35.5°C, 5% CO<sub>2</sub>. Las células se cultivaron y se crecieron hasta alcanzar el 70% de confluencia y no al 100% para evitar que durante el tratamiento se mostrara un mayor número de células muertas por inhibición por contacto o falta de nutrientes. Las células se cultivaron en placas de 24 pozos, cuando éstas alcanzaron el 70% de confluencia el medio se reemplazó con DMEM/F12, SFB 5% y arsenito de sodio a diferentes concentraciones (0.2, 6, 10, 30, 45 ó 60  $\mu$ M). El arsenito de sodio se preparó en PBS 0.1 M pH 7.4. El medio de las células control sólo se reemplazó por medio DMEM/F12 95%, SFB 5% y PBS 0.1 M. La viabilidad de las células se determinó a las 6, 12, 24 ó 48 h; para determinar la curva dosis-respuesta de la viabilidad de las células se empleó la prueba de exclusión por azul de tripano. Se llevaron a cabo cuatro conteos independientes por cada concentración.

#### 4.3 Evaluación de la exposición a arsenito de sodio (As<sub>i</sub>) en los neurotransmisores GABA y glutamato

Para determinar los niveles de GABA y glutamato en las líneas celulares M213-2O y M213-2O CL-4, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos hasta alcanzar el 70% de confluencia. Posterior a esto, el medio de las placas con tratamiento se aspiró y reemplazó por medio DMEM/F12 suplementado con SFB 5% y arsenito de sodio. Tanto para la línea M213-2O como para la línea M213-2O CL-4 se empleó una concentración de 2  $\mu$ M de arsenito de sodio (As<sub>i</sub>) durante 6 h. Transcurrido este tiempo, el medio fue aspirado y las células se lavaron con solución salina (0.9% NaCl); posteriormente, se añadió a cada pocillo 500  $\mu$ L de solución Ringer bajo potasio (4 mM KCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 3.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM glucosa, pH 7.4). La solución se colectó después de haber transcurrido 5 min para obtener niveles basales de GABA y glutamato. Posteriormente en la misma placa se añadió, a los pocillos restantes, 500  $\mu$ L de la solución Ringer de alto potasio (50 mM KCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 3.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 94 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM glucosa, pH 7.4), la cual fue colectada después de 15 min. El sobrenadante colectado en ambas condiciones se congeló a -70°C hasta la realización del análisis de GABA y glutamato por la técnica de HPLC acoplado a un detector coulométrico (Coulochem III, ESA). A las células que fueron tratadas para la determinación de GABA y glutamato basal y evocado por la solución Ringer de alto potasio (50 mM) se les adicionó 1 mL de ácido sulfosalicílico (35%) a cada pocillo y se incubó durante 20 min. Las células se despegaron con un gendarme y se colocaron en tubos para su posterior almacenamiento a -4°C toda la noche; éstas se centrifugaron por 5 min a 3000 rpm (Sorvall Legend Micro 21-R, Thermo Scientific, Waltham MA, USA), el sobrenadante se colectó y se almacenó a -70°C para la determinación de GABA y glutamato intracelular. El precipitado se analizó por el método de Lowry para la cuantificación de proteínas, empleando albúmina sérica bovina como estándar.

4.4 Cuantificación de GABA y glutamato por HPLC acoplado a detector coulométrico. Los niveles de GABA y glutamato se cuantificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC Agilent Technologies Series 1200, Waldbronn, Germany), empleando una columna fase reversa C-18 (ESA HR-80, 4.6 x 80 mm; 3  $\mu$ m), acoplado a un sistema de detección coulométrica (E1 600 mV, 50 nA; E2 400 mV; 50 nA). Para las muestras tratadas con arsenito de sodio en condición basal se cambiaron las condiciones de detección (E1 600 mV, 10 nA; E2 400 mV, 10 nA), después de llevar a cabo una derivatización pre-columna con una solución de ortoftalaldehído y 2-mercaptoetanol (Castillo y col., 2008; Mejía-Toiber y col., 2010). Se utilizó un método lineal empleando una fase móvil la cual contiene fosfato de sodio monobásico (50 mM) y 15% vol/vol metanol; flujo de 1.2 ml/min durante 60 min. Los resultados obtenidos se analizaron con el ChemStation for LC Rev. A. 08. 01 [783] (Agilent Technologies). Los niveles de GABA y glutamato se calcularon de acuerdo a estándares externos. La concentración de cada muestra se expresó en  $\mu$ g por mg de proteína.

#### 4.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa estadístico STATVIEW, versión 5.0. Mientras que para graficar los resultados se utilizó el programa GraphPad Prism, versión 6.01. Se utilizó el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis y como prueba post hoc se utilizó la U de Mann Whitney para analizar los resultados obtenidos del experimento de viabilidad celular y las diferencias en la concentración de GABA y glutamato por HPLC. Se consideró que los efectos son estadísticamente significativos si el nivel de probabilidad es menor a 0.05.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Determinación de la curva dosis-respuesta en las líneas M213-2O y M213-2O CL-4

Se determinó la viabilidad de las línea M213-2O y M213-2O CL-4 después de la incubación con arsénico inorgánico ( $As_i$ ) como arsenito de sodio a diferentes concentraciones (0.2, 6, 10, 30, 45 ó 60  $\mu$ M) a las 6, 12, 24 y 48 h de exposición por

la prueba de exclusión de azul de tripano. En la Figura 8 se observan los resultados obtenidos en este experimento con la línea M213-2O.

Se observa una disminución significativa en la viabilidad de las células a las 6 h [Kruskal-Wallis  $H = (5, N=24) = 15.065, p < 0.05$ ]. Las células tratadas con el arsenito de sodio fueron comparadas contra las células control y se encontró que la concentración de arsenito de sodio 0.2  $\mu\text{M}$  [ $U = 7.5, p > 0.05$ ] no mostró diferencias significativas en la disminución de la viabilidad, mientras que bajo las concentraciones de 6  $\mu\text{M}$  [ $U = 0, p < 0.05$ ] y 10  $\mu\text{M}$  [ $U = 0, p < 0.05$ ] la viabilidad de las células disminuyó considerablemente. Las concentraciones siguientes 30  $\mu\text{M}$  [ $U = 6, p > 0.05$ ], 45  $\mu\text{M}$  [ $U = 7.5, p > 0.05$ ] y 60  $\mu\text{M}$  [ $U = 7.5, p > 0.05$ ] no mostraron diferencias significativas en cuanto a la viabilidad celular con respecto al control.

Después de 12 h de tratamiento [Kruskal-Wallis  $H = (5, N=24) = 17.411, p < 0.05$ ] se obtuvieron diferencias significativas únicamente en las concentraciones más altas 45  $\mu\text{M}$  [ $U = 0, p < 0.05$ ] y 60  $\mu\text{M}$  [ $U = 0, p < 0.05$ ] donde podemos observar una disminución significativa en la viabilidad celular. Sin embargo, las concentraciones 6 y 10 que a las 6 h mostraron disminución en la viabilidad celular, a las 12 h presentan un aumento en su viabilidad. Las células bajo las concentraciones 0.2 y 30  $\mu\text{M}$  no muestran disminución en la viabilidad con respecto al control.

Se encontraron efectos significativos en la viabilidad celular a las 24 h [Kruskal-Wallis  $H = (4, N=24) = 24.054, p < 0.05$ ] de tratamiento. Se mostraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos. A las concentraciones 0.2, 6 y 10  $\mu\text{M}$  [ $U = 0, p < 0.05$ ], la viabilidad celular disminuyó aproximadamente 20% en comparación con el control, mientras que para las concentraciones 30, 45 y 60  $\mu\text{M}$  [ $U = 0, p < 0.05$ ] se observó con mayor énfasis la disminución en la viabilidad celular.

Sin embargo, después de 48 h [Kruskal-Wallis  $H = (6, N=24) = 16.288, p < 0.05$ ] la disminución en la viabilidad celular se observó sólo bajo las concentraciones 30 y 60  $\mu\text{M}$  [ $U = 0, p < 0.05$ ] mientras que para las concentraciones 0.2, 6, 10 y 45  $\mu\text{M}$  no se observó disminución significativa en la viabilidad con respecto al control; sin

embargo, es importante mencionar que en comparación con el efecto observado a las 24 h de exposición al arsenito la viabilidad celular aumentó en éstas concentraciones.

Los resultados obtenidos en este experimento muestran que la línea celular M213-20 no sufre un efecto dosis dependiente al incubarse con el arsenito de sodio a diferentes concentraciones y tiempos de incubación.

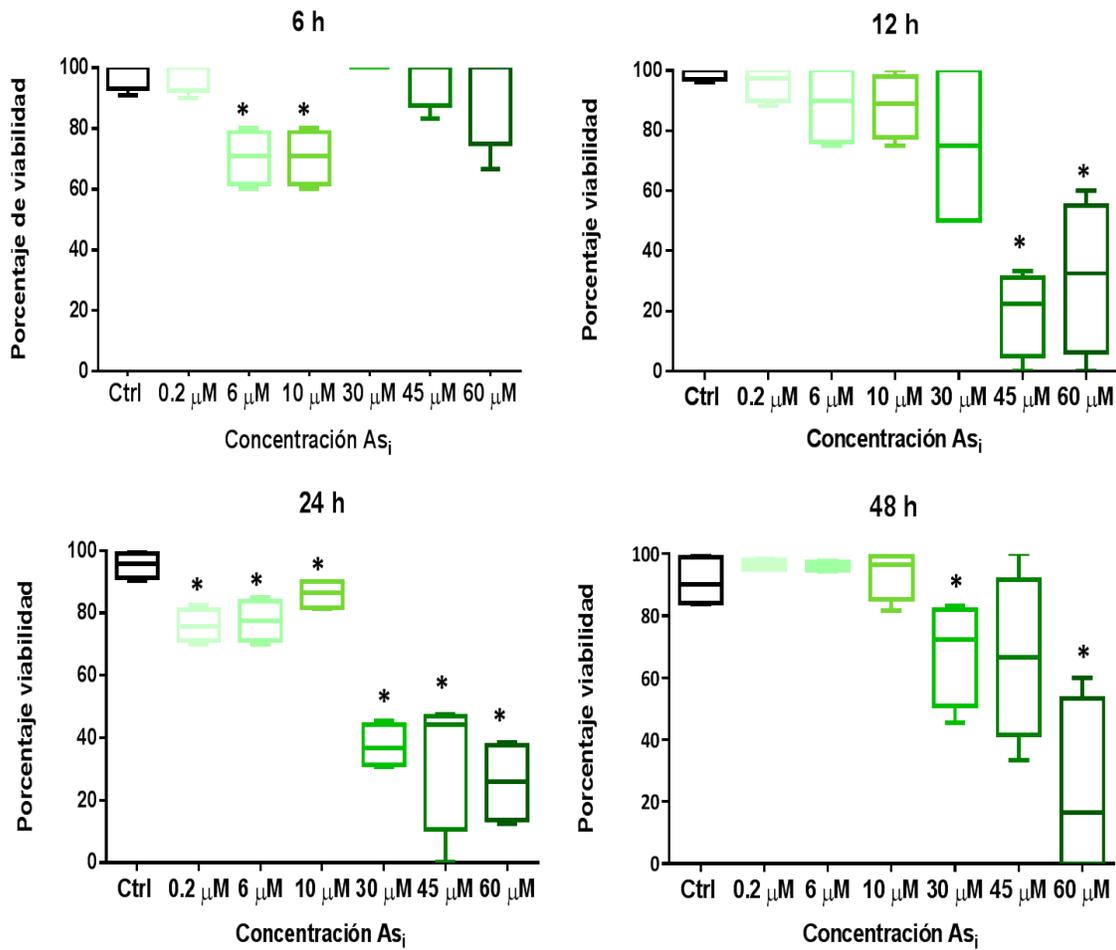


Figura 8. Efecto del arsenito de sodio en la viabilidad celular de la línea M213-20 determinada por la prueba de exclusión azul de tripano a las 6, 12, 24 y 48 h. Las cajas representan el número de células viables (mediana, cuartiles superiores e inferiores). Cada caja representa n= 4 por triplicado \*  $p < 0.05$

Los resultados del efecto del arsenito de sodio en la línea M213-2O CL-4 se muestran en la Figura 9. Con esta línea celular se obtuvieron diferencias significativas a las 6 h [Kruskal-Wallis  $H = (6, N=24) = 16.334, p < 0.05$ ] en donde los grupos tratados con arsenito de sodio fueron significativamente diferentes en comparación con el control. Las células bajo la concentración de 0.2  $\mu\text{M}$  no mostraron diferencias significativas en cuanto a la disminución de la viabilidad [ $U = 4.5, p > 0.05$ ]. Mientras que las células expuestas a las concentraciones 6, 10, 30 y 60  $\mu\text{M}$  [ $U = 0, p < 0.05$ ] mostraron una disminución significativa con respecto al control, no así las células bajo la concentración de 45  $\mu\text{M}$ .

Después de 12 h de tratamiento con arsenito de sodio [Kruskal-Wallis  $H = (5, N=24) = 12.320, p < 0.05$ ] no se observaron efectos significativos bajo ninguna de las concentraciones en comparación con el control. Transcurridas 24 h [Kruskal-Wallis  $H = (2, N=24) = 12.772, p < 0.05$ ], el tratamiento mostró efectos significativos sólo al llevar a cabo comparaciones entre las diferentes concentraciones; sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas al compararse contra el control. El mismo efecto se mostró a las 48 h [Kruskal-Wallis  $H = (3, N=24) = 21.429, p < 0.05$ ] hay diferencias significativas al compararse entre sí los tratamientos pero no al compararse contra el control.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la línea M213-2O CL-4 se utilizó la concentración 0.2  $\mu\text{M}$  de arsenito de sodio durante un tiempo de incubación de 6 h para evaluar el efecto de la exposición a arsenito de sodio en los niveles de GABA y glutamato, debido a que, bajo estas condiciones las células se mantuvieron viables lo cual fue ideal para llevar a cabo los siguientes experimentos.

## 5.2 Cuantificación de los niveles de GABA y glutamato en la línea celular M213-2O CL-4 después de la incubación con arsenito de sodio ( $\text{As}_i$ ).

### 5.2.1 Cuantificación de los niveles de GABA extracelular

Posterior a la determinación de la concentración y el tiempo en el que se incubarán las células con arsenito de sodio se llevó a cabo el experimento GABA y glutamato

para la liberación de los neurotransmisores y su posterior cuantificación por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés). Se analizaron los neurotransmisores tanto extracelular como intracelularmente. En la Figura 10 podemos observar los resultados obtenidos de la liberación extracelular del neurotransmisor GABA posterior al tratamiento con arsenito de sodio [Kruskal-Wallis  $H = (0, N=16) = 14.118$   $p < 0.05$ ]. Al comparar el control basal y el control estimulado con alto potasio [ $U = 0$   $p < 0.05$ ] se encontraron diferencias significativas en la concentración de GABA al estimular las células.

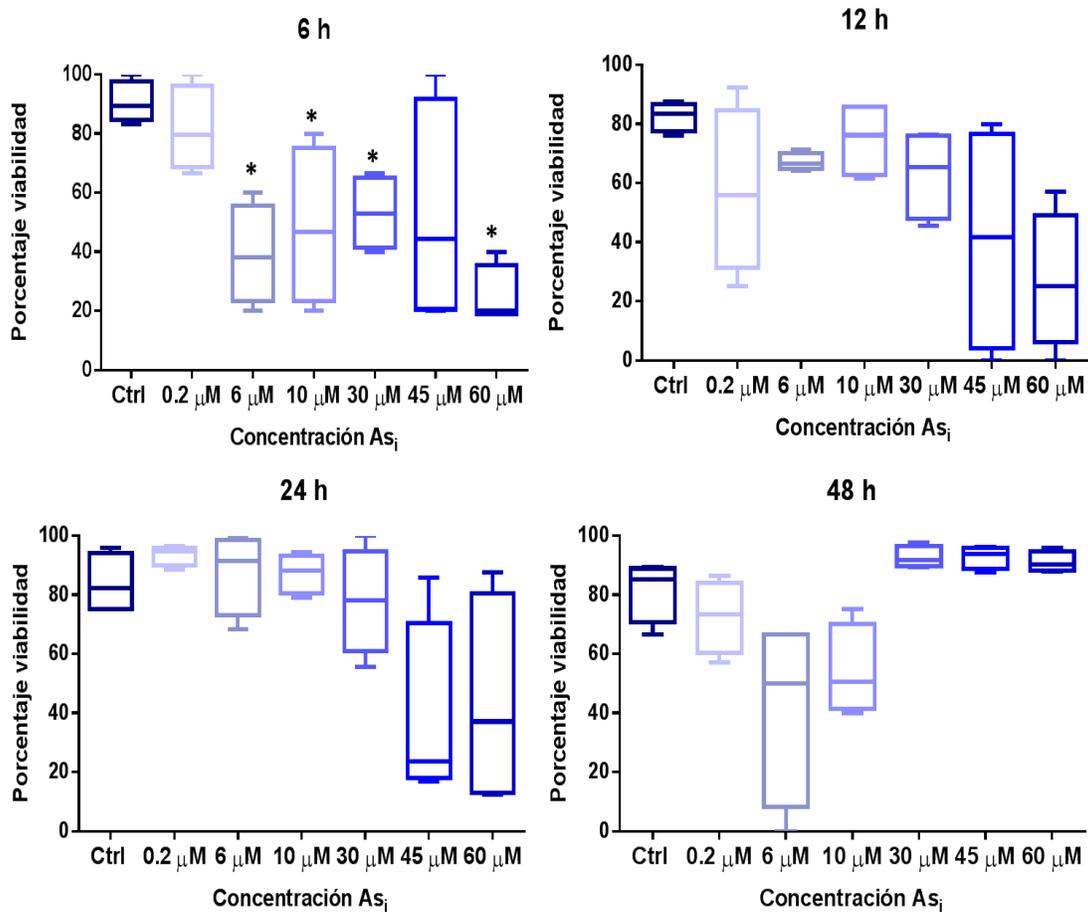


Figura 9. Efecto del arsenito de sodio en la viabilidad celular de la línea M213-20 CL-4 determinada por la prueba de exclusión azul de tripano a las 6, 12, 24 y 48 h. Las cajas representan el número de células viables (mediana, cuartiles superiores e inferiores). Cada caja representa  $n = 4$  por triplicado \*  $p < 0.05$

Las células de la línea M213-2O mostraron efectos significativos al tratamiento con  $As_i$  en la liberación de GABA, tanto en la condición basal como en la estimulada con alto potasio [ $U= 0$ ,  $p<0.05$ ], mostrando un aumento en la liberación de GABA bajo la condición estimulante. Al comparar el efecto del arsenito de sodio entre el tratamiento y el control, ambos en condición basal [ $U= 0$ ,  $p<0.05$ ], se obtuvo una disminución significativa de la concentración de GABA en el espacio extracelular en las células tratadas con arsenito de sodio. Se muestra el mismo efecto cuando se compara el control y el tratado, ambos estimulados con alto potasio [ $U= 0$ ,  $p<0.05$ ], hay una disminución significativa en la concentración de GABA liberado por las células tratadas con arsenito de sodio.

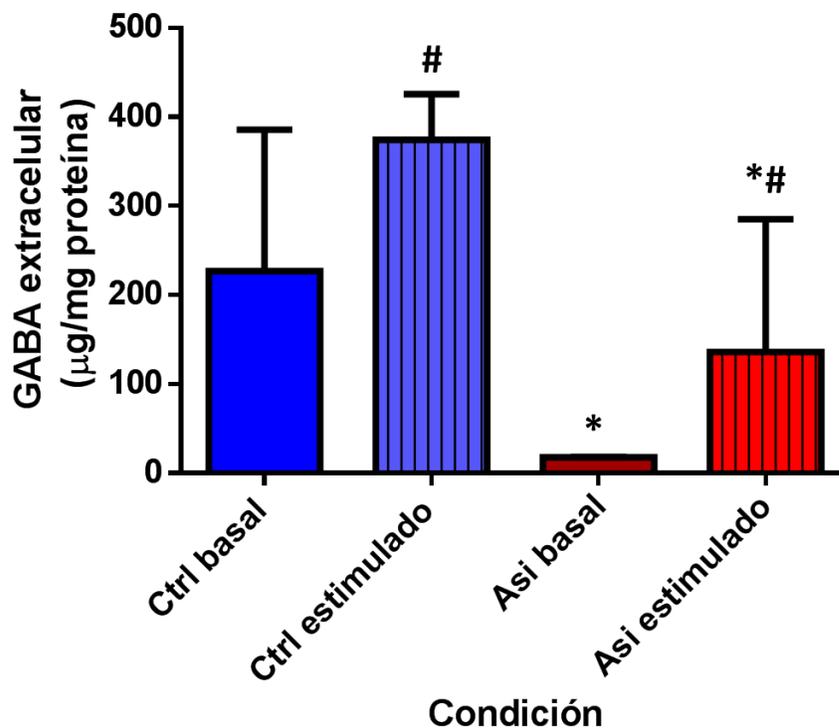


Figura 10. Cuantificación de los niveles de GABA extracelular. El signo (#) representa diferencias significativas en la condición estimulada en comparación con la condición basal; mientras que el signo (\*) representa diferencias significativas entre el tratamiento y el control en ambas condiciones,  $p<0.05$ . Se representa la media  $\pm$  desviación estándar (DE), cada barra representa  $n=4$ , por triplicado.

### 5.2.2 Cuantificación de los niveles de GABA intracelular

Posterior a la liberación de GABA, se cuantificó la concentración del mismo en el interior de la célula (intracelular). En la Figura 11 podemos observar los resultados obtenidos después de provocar la ruptura de las células y liberar su contenido al medio. El análisis nos indica que entre grupos hay diferencias significativas [Kruskal-Wallis  $H = (0, N=16) = 10.478, p < 0.05$ ], por lo que se procedió a realizar las comparaciones dentro de grupos y entre grupos.

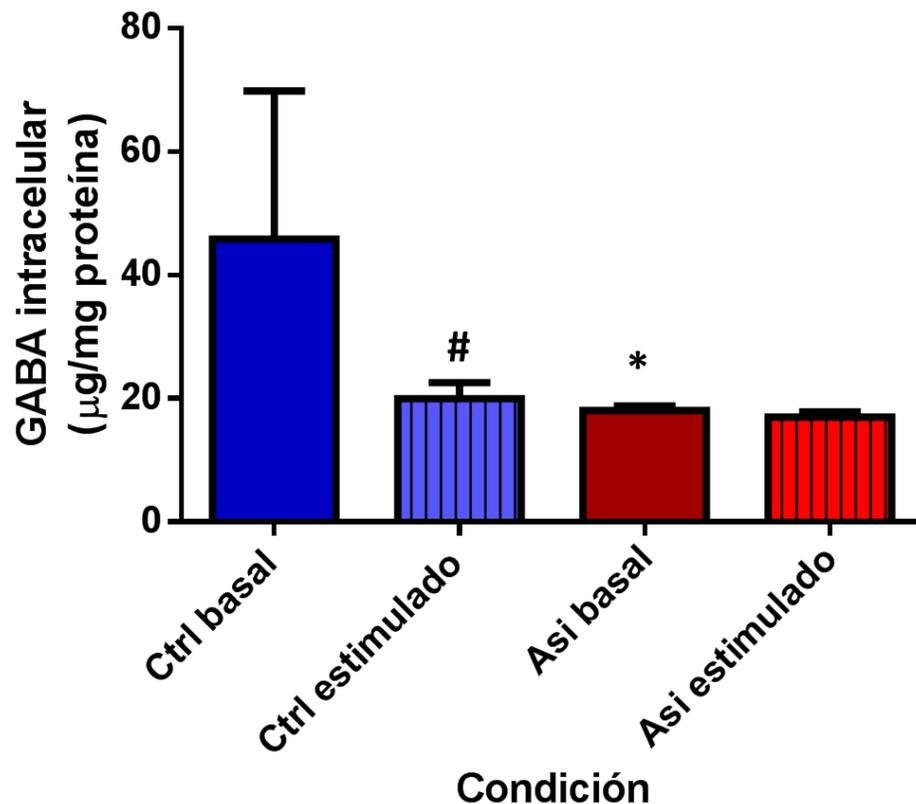


Figura 11. Cuantificación de los niveles de GABA intracelular. El signo (#) representa diferencias significativas en la condición estimulada en comparación con la condición basal; mientras que el signo (\*) representa diferencias significativas entre el tratamiento y el control en ambas condiciones,  $p < 0.05$ . Se representa la media  $\pm$  desviación estándar (DE), cada barra representa  $n=4$ , por triplicado.

Al comparar los controles tanto basales como estimulados con alto potasio [ $U= 0$ ,  $p<0.05$ ] se obtuvieron diferencias significativas. La concentración de GABA intracelular en condiciones basales fue mayor que en aquellas células estimuladas por alto potasio. Las células tratadas con arsenito de sodio en ambas condiciones, no mostraron efectos significativos al compararse entre sí. Por otro lado, al comparar el control basal y el tratado basal se observan diferencias significativas al disminuir la concentración de GABA en el interior de las células cuando son expuestas a arsenito de sodio [ $U= 0$ ,  $p<0.05$ ]. Al estimular las células con alto potasio se observa una baja concentración de GABA dentro de las células tanto en el control como en el tratamiento con arsenito de sodio; sin embargo, no hay significancia estadística al comparar estos grupos. Es posible apreciar que la concentración de GABA es similar en el control estimulado, el  $As_i$  basal y el  $As_i$  estimulado.

### 5.2.3 Cuantificación de los niveles de glutamato extracelular

En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos por el HPLC [Kruskal-Wallis  $H=(0, N=16) = 12.750$ ,  $p<0.05$ ] donde encontramos diferencias significativas tanto dentro como entre grupos. Al comparar los controles basal y estimulado por alto potasio [ $U= 0$ ,  $p<0.05$ ] podemos observar un aumento en la concentración de glutamato en las células estimuladas. Un efecto similar es encontrado al comparar los grupos basal y estimulado del  $As_i$  [ $U= 0$ ,  $p<0.05$ ], se observa un aumento en la concentración de glutamato cuando las células son estimuladas con alto potasio; sin embargo, la concentración es menor que en los controles. Este efecto se observa al comparar el grupo control basal y el grupo  $As_i$  basal [ $U= 0$ ,  $p<0.05$ ], es en este último donde la concentración de glutamato disminuye considerablemente. El mismo efecto se aprecia cuando se comparan el control y el tratado, ambos estimulados con alto potasio; las células tratadas con arsenito de sodio muestran una disminución en la concentración de glutamato extracelular en comparación con el grupo control [ $U= 0$ ,  $p<0.05$ ].

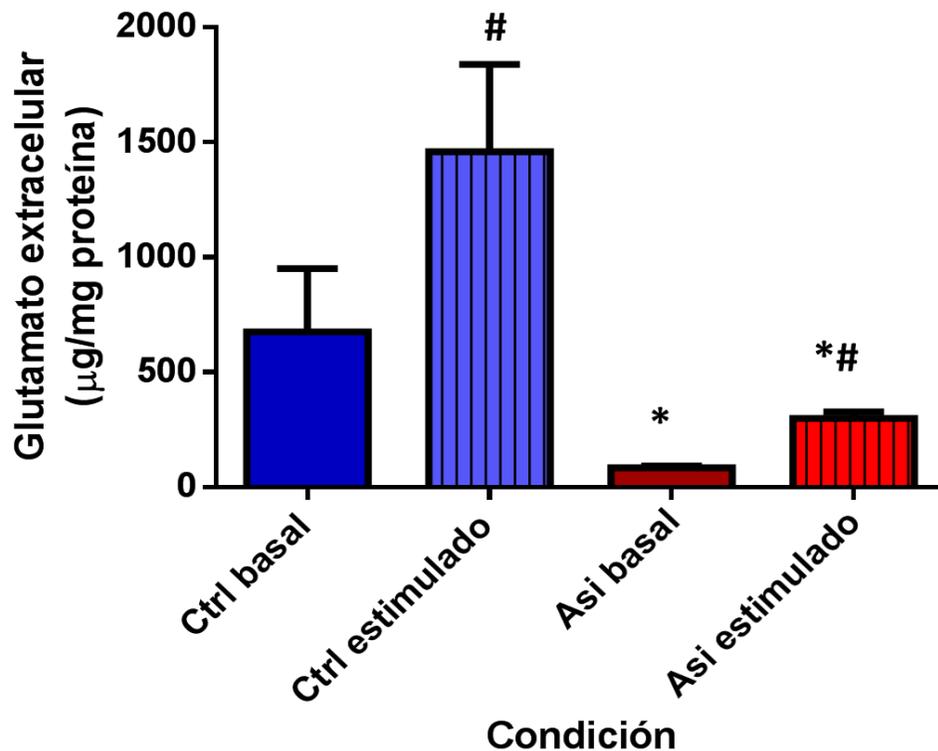


Figura 12. Cuantificación de los niveles de glutamato extracelular. El signo (#) representa diferencias significativas en la condición estimulada en comparación con la condición basal; mientras que el signo (\*) representa diferencias significativas entre el tratamiento y el control en ambas condiciones,  $p < 0.05$ . Se representa la media  $\pm$  desviación estándar (DE), cada barra representa  $n=4$ , por triplicado.

#### 5.2.4 Cuantificación de los niveles de glutamato intracelular

Además de cuantificar la concentración de glutamato en el medio extracelular, también se analizó la concentración de manera intracelular, obteniendo resultados significativos [Kruskal-Wallis  $H = (0, N=16) = 13.787, p < 0.05$ ] como se puede apreciar en la Figura 13. Comparando los controles entre ellos se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas [ $U = 0, p < 0.05$ ], después de la estimulación con alto potasio se observa una disminución en la concentración de glutamato intracelular, por otro lado es posible apreciar una mayor concentración de glutamato en el grupo basal.

Esto mismo ocurrió con los tratados con arsenito de sodio al compararse entre ellos [U= 1, p<0.05], se observó una disminución de glutamato en el grupo estimulado por alto potasio mientras que en el grupo basal hay una mayor cantidad de glutamato. Al llevar a cabo comparaciones entre grupos se aprecian diferencias significativas entre el grupo control basal y el grupo Asi basal [U= 0 p<0.05], obteniendo una menor concentración en la cantidad de glutamato en el grupo tratado con arsenito de sodio; el mismo efecto es observado al comparar el grupo control estimulado y el grupo Asi estimulado con alto potasio [U= 0, p<0.05], donde este último muestra una menor concentración en la cantidad de glutamato que en el grupo control.

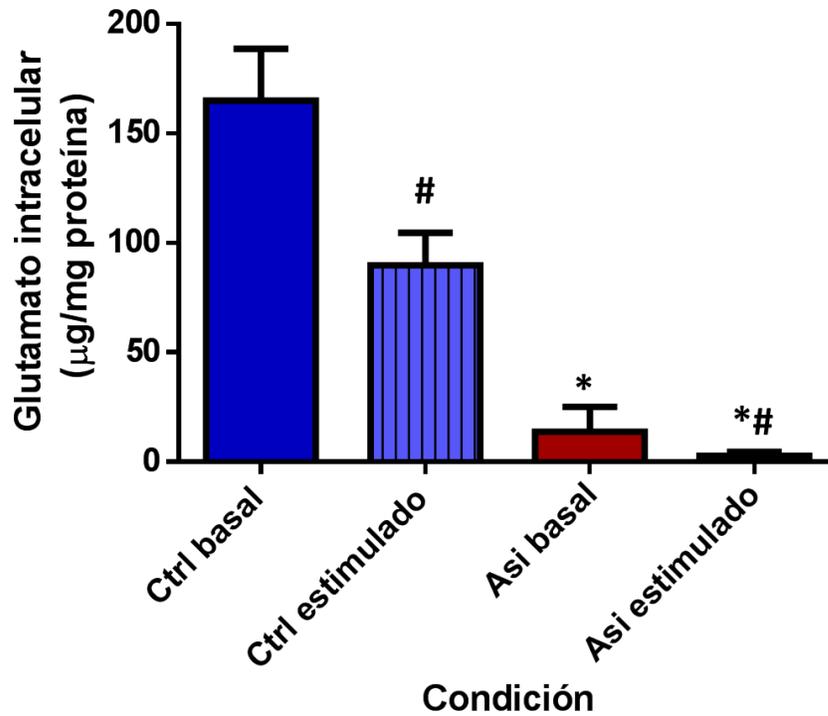


Figura 13.

Cuantificación de los niveles de glutamato intracelular. El signo (#) representa diferencias significativas en la condición estimulada en comparación con la condición basal; mientras que el signo (\*) representa diferencias significativas entre el tratamiento y el control en ambas condiciones, p<0.05. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar (DE), cada barra representa n=4, por triplicado.

## 6. DISCUSIÓN

## 6.1 Experimento dosis-respuesta con arsenito de sodio

Las células pueden responder al estrés de diferentes maneras, desde la activación de las vías de sobrevivencia celular hasta el inicio de la muerte celular (apoptosis, necrosis o autofagia). Lo anterior depende tanto de factores exógenos como de la habilidad de las células para manejar el estrés. La respuesta inicial a un estímulo de estrés está orientado hacia la defensa de la célula contra el estímulo pero si las defensas celulares no son suficientes se activan las vías de muerte celular (Fulda y col., 2010). Dependiendo del nivel y del tipo de estrés se activan diferentes mecanismos de defensa y estrategias de pro-sobrevivencia de la célula, como por ejemplo la respuesta de las proteínas de choque térmico, las proteínas no plegadas (mediadoras en el incremento de la actividad de chaperonas y potenciadoras de la capacidad de plegamiento en las células), y el aumento en la captura de glucosa (Widnell y col., 1990; Nylandsted y col., 2004; Osowski y Urano, 2011). Como se describió anteriormente, el arsenito de sodio es capaz de alterar la viabilidad celular, este efecto lo podemos observar en los resultados obtenidos en este estudio tanto con la línea M213-2O como con la línea M213-2O CL-4. En los resultados obtenidos con la línea M213-2O es posible determinar que el efecto tóxico del arsenito de sodio en la viabilidad celular no muestra un comportamiento dosis dependiente, como en otros estudios se ha determinado empleando modelos transformados y no transformados. Concentraciones micromolares de arsenito de sodio disminuyen la viabilidad celular de manera dependiente en tiempo (12-48 h) y dosis (1 a 50  $\mu\text{M}$ ) (Jin y col., 2004; Lee y col., 2005; McCollum y col., 2005; Liao y col., 2007; Abnosi y col., 2010; Yadav y col., 2010).

Es posible observar el efecto inmediato que tiene sobre la viabilidad celular el arsenito de sodio, bajo las concentraciones 6 y 10  $\mu\text{M}$  donde se presenta una disminución en la viabilidad celular de aproximadamente del 20%, este mismo efecto es reportado por Namgung y Xia (2000) bajo las concentraciones 5, 7 y 10  $\mu\text{M}$  después de 8 h de tratamiento empleando un cultivo primario de células neuronales corticales.

Por otro lado el efecto nulo del arsenito de sodio en la viabilidad celular bajo las concentraciones 30, 45 y 60  $\mu\text{M}$  podría deberse a que la capacidad de las células para activar mecanismos de defensa como por ejemplo las proteínas de choque térmico, las cuales de acuerdo a los resultados obtenidos por Mengesdorf y colaboradores (2002) aumentan su expresión después 6 h de la incubación con arsenito de sodio bajo concentraciones de 30-100  $\mu\text{M}$ . Después de 12 h de tratamiento las concentraciones más altas de arsenito de sodio (45 y 60  $\mu\text{M}$ ) disminuyen la viabilidad de las células en la línea M213-2O, este efecto se observa hasta las 48 h de tratamiento. Yadav y colaboradores (2010) realizaron un experimento empleando células embrionales adultas incubadas con arsenito de sodio bajo las concentraciones 1, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$  durante 6-48 h y observaron disminución en la viabilidad celular en concentraciones mayores a 5  $\mu\text{M}$ ; sin embargo, a bajas concentraciones no observaron efectos significativos en la viabilidad celular. Sus resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos en este estudio. A bajas concentraciones de arsenito de sodio (0.2, 6 y 10  $\mu\text{M}$ ) después de 24 h la disminución en la viabilidad de las células es al menos de un 20% mientras que, la viabilidad celular disminuye drásticamente en un 70% a las concentraciones 30, 45 y 60  $\mu\text{M}$ . Hernández-Zavala y colaboradores (2005) determinaron que después de 24 h a una concentración mayor a 10  $\mu\text{M}$  la viabilidad celular disminuye de manera dosis-dependiente. Los efectos encontrados a las 48 h nos muestran que la línea M213-2O posee mecanismos de defensa que ayudan a que las células eliminen de manera eficiente el arsenito de sodio, como es posible observar en los resultados, después de 48 h la viabilidad de las células bajo las concentraciones 0.2, 6 y 10  $\mu\text{M}$  es similar al control. Estos resultados nos indican que el arsenito de sodio afecta parcialmente la viabilidad de las células M213-2O. Es importante mencionar que los efectos en la magnitud del arsenito de sodio sobre la viabilidad celular en nuestro estudio podrían variar debido a la construcción genética de esta línea celular, ya que contiene el antígeno T largo SV40 alelo A58 sensible a temperatura y genes que le confieren resistencia a geneticina. Las características genéticas de esta línea

celular podrían ayudar a que las células generen resistencia ante la presencia de arsenito de sodio.

Por otro lado, los resultados obtenidos con la línea M213-2O CL-4 después de la incubación con arsenito de sodio son completamente diferentes en comparación con la línea M213-2O. Los efectos en la disminución de la viabilidad se observan bajo las concentraciones 6, 10, 30 y 60  $\mu\text{M}$  después de 6 h de tratamiento. Nuestros resultados difieren completamente con lo reportado por Yadav y colaboradores (2010) debido a la diferencia en las líneas celulares empleadas. Después de las 6 h de exposición no se mostró cambio en la viabilidad celular en las horas siguientes. Esta respuesta ante la presencia del arsenito de sodio podría deberse a la genética de esta línea celular. La construcción genética de la línea celular M213-2O CL-4 es más compleja, por lo que las características que contiene el plásmido episomal pueden conferirle resistencia frente al arsenito de sodio, provocando que éste sea expulsado de la célula al medio o transformarlo a un compuesto menos tóxico para la célula. Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios para poder responder qué mecanismos se activan específicamente en esta línea celular que le confieren resistencia frente al arsenito de sodio.

## 6.2 Cuantificación extracelular e intracelular de los niveles GABA y glutamato en la línea celular M213-2O CL-4

La línea M213-2O CL-4 es un modelo ideal para estudiar los efectos del arsenito de sodio sobre la neuroquímica de GABA ya que posee un fragmento ADNc de hGAD67 lo cual le proporciona características GABAérgicas a esta línea celular como se describió previamente (Conejero-Goldberg y col., 2000; Castillo y col., 2008; Mejía-Toiber y col., 2010). En este estudio logramos caracterizar esta línea celular como una línea glutamatérgica; sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios sobre la síntesis de glutamato en esta línea celular.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la línea M213-2O CL-4, la concentración de GABA extracelular incrementa cuando las células son estimuladas con una

solución que contiene alto potasio, lo que se puede observar tanto en el control como en el tratado. Este efecto sobre la neuroquímica de GABA podría deberse a varios factores como la inhibición de la enzima glutaminasa mediada por la interacción del arsenito de sodio y los grupos sulfhidrilo (Wu, 1963). Otro de los factores que podrían disminuir la concentración de GABA es la inhibición de la enzima GAD67 por el arsenito de sodio en el sitio de unión del cofactor PLP, por su interacción con los grupos fosfato del cofactor o en el sitio de unión del sustrato. Por otro lado, la concentración de GABA intracelular es similar tanto en el control estimulado como en los tratados con arsenito de sodio en ambas condiciones. La depleción en el neurotransmisor GABA intracelular en la condición de control basal es debido a la previa estimulación con alto potasio, lo que ocasiona una disminución en sus reservas. El mismo efecto se observa en las células tratadas con arsenito de sodio previamente estimuladas. La disminución en la concentración de GABA intracelular puede deberse a la inhibición de alguna o quizá de todas las enzimas que se encargan de la síntesis del neurotransmisor; por lo que, cuando las células son despolarizadas con alto potasio la concentración de GABA liberado al medio se encuentra considerablemente disminuido. Posiblemente las reservas del neurotransmisor son las que están siendo liberadas al medio.

Además de la cuantificación del neurotransmisor GABA, también se cuantificaron los niveles de glutamato en esta misma línea celular. Anteriormente no se tenían reportes sobre las características glutamatérgicas de esta línea; sin embargo, en este estudio logramos determinar que además de poseer características GABAérgicas también posee características glutamatérgicas. De acuerdo a los resultados obtenidos, la línea M213-2O CL-4 posee altos niveles del neurotransmisor glutamato. Sin embargo, cuando las células son incubadas con arsenito de sodio disminuyen las concentraciones de glutamato extracelular, esto podría deberse a la reducción en la síntesis de glutamato por la inactivación o inhibición de la enzima glutaminasa debido a que es la única enzima necesaria para la síntesis de glutamato. Por otro lado, la concentración de glutamato intracelular disminuye drásticamente en

comparación con los controles, lo que puede deberse a la depleción de los niveles de glutamato intracelular, el arsenito de sodio, podría interferir en la síntesis de glutamato y por esta razón después del estímulo con alto potasio los niveles en la concentración intracelular disminuyen. El arsenito de sodio al ocasionar la inhibición en la síntesis de glutamato, las reservas de éste son las únicas con las que cuenta la célula por lo que cuando las células se despolarizan con el alto potasio son las reservas las que están siendo liberadas al medio provocando que la célula se quede sin más neurotransmisor por liberar, por lo que si hay una segunda despolarización las células no tendrían neurotransmisor que liberar al medio. Los resultados obtenidos nos demuestran que si las células son incubadas con arsenito de sodio a una concentración de 0.2  $\mu\text{M}$  durante un periodo de tiempo corto (6 h), los efectos en la neuroquímica tanto GABAérgica como glutamatérgica pueden ser afectados debido a la interacción del arsenito de sodio con los grupos tiol de las enzimas encargadas de la síntesis de estos neurotransmisores como por ejemplo la glutaminasa.

## **7. CONCLUSIONES**

En este proyecto fue posible determinar que las líneas M213-2O y M213-2O CL-4 muestran diferencias en cuanto al efecto del arsenito de sodio en la viabilidad celular. Al parecer la construcción genética de cada línea celular les confiere mecanismos de

protección que son necesarios ser dilucidados para comprender su resistencia al arsenito de sodio. A pesar del efecto nulo en la viabilidad celular de la línea M213-20 CL-4 se determinó el daño que ocasiona el arsenito de sodio en la neuroquímica GABAérgica y glutamatérgica; sin embargo, aún es necesario determinar si este daño es ocasionado por la interacción del arsenito de sodio con la enzima de síntesis de glutamato o si es debido a otros factores. Por ejemplo, en estudios anteriores se había demostrado la actividad GABAérgica de esta línea; sin embargo, no se habían realizado estudios que demostraran la actividad glutamatérgica. Este estudio nos ayuda a comprender más sobre los daños que puede causar el arsenito de sodio en la neuroquímica GABAérgica y glutamatérgica; sin embargo, algunas de las desventajas de estos estudios es que no pueden ser extrapolados a humanos por lo que es necesario llevar a cabo estudios *in vivo* sobre los efectos que puede llegar a tener la exposición prolongada a arsenito de sodio en la conducta, aprendizaje y memoria, debido a que estos neurotransmisores se encuentran involucrados en estos procesos.

## PERSPECTIVAS

Después de determinar el efecto del arsenito de sodio sobre la neuroquímica de GABA y glutamato se podrían llevar a cabo un sinnúmero de investigaciones como por ejemplo, determinar los mecanismos de protección contra arsenito de sodio en las células utilizadas en este proyecto y el daño en su morfología. Además de llevar a cabo experimentos *in vivo* para determinar el efecto del arsenito de sodio sobre la neuroquímica de GABA y glutamato, sus receptores, el daño en las enzimas de síntesis cuando interactúan con arsenito de sodio; además del efecto sobre la conducta, el aprendizaje y la memoria.

## 8. REFERENCIAS

**Abnosi** MH, Soleimani MM, Momeni HR, Mahdih N, Shojafar E, Barati M. Effect of sodium arsenite on rat bone marrow mesenchymal stem cells: cells viability and

morphological study. Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences. **2010**; 17: 1-10.

**Andrew** AS, Burgess JF, Meza MM, Demidenko E, Waugh MG, Hamilton JW, Karagas MR. Arsenic exposure is associated with decreased DNA repair *in vitro* and in individuals exposed to drinking water arsenic. Environmental Health Perspectives. **2006**; 114: 1193-1198.

**Andrew** AS, Karagas MR, Hamilton JW. Decreased DNA repair gene expression among individuals exposed to arsenic in United States drinking water. International Journal of Cancer. **2003a**; 104: 263-268.

**Antman** KH. Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy. The Oncologist. **2001**, 6: 1-2

**Appelo** T, Heederik JP. Arsenic in groundwater: A world problem. Proceedings Seminar Utrecht. **2006**: 1-142.

**Bardullas** U, Limón-Pacheco JH, Giordano M, Carrizales L, Mendoza-Trejo MS, Rodríguez VM. Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. Toxicology and Applied Pharmacology. **2009**; 239: 169-177.

**Bast** A, Haenen GR. Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. Biofactors. **2003**; 17: 207-213.

**Bu** DF, Erlander MG, Hitz BC, Tillakaratne NJK, Kaufman DL, Wagner-Mcpherson CB, Evans GA, Tobin AJ. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. Proceedings of the National Academy of Sciences. **1992**; 89: 2115-2119.

**Calderón** J, Navarro ME, Jimenez-Capdeville ME, Santos-Diaz MA, Golden A, Rodriguez-Leyva I, Borja-Aburto V, Díaz-Barriga F. Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in mexican children. Environmental Research Section A. **2001**; 85: 69-76.

**Castillo** CG, Mendoza-Trejo S, Aguilar MB, Freed WJ, Giordano M. Intranigral transplants of a GABAergic cell line produce long-term alleviation of established motor seizures. Behavioural Brain Research. **2008**; 193: 17-27.

**Challenger** F, Higgenbottom C, Ellis L. The formation of organo-metalloid compounds by microorganisms. Part I. Trimethylarsine and dimethylethylarsine. Journal of Chemical Society. **1933**: 95-101.

**Chanda** S, Dasgupta UB, GuhaMazumber D, Gupta M, Chaudhury U, Lahiri S, Das S, Ghosh N, Chatterjee D. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in Arsenic-exposed people with and without malignancy. Toxicological Sciences. **2005**; 82: 431-437.

**Chen** GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, Jin XL, Tang W, Li XS, Xong SM, Shen ZX, Sun GL, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Gazin C, Naoe T, Chen SJ, Wang ZY, Chen Z. *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) in the treatment of acute promyelocytic leukemia:  $As_2O_3$  induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. Blood. **1996**; 88: 1052-1061.

**Chowdhury** R, Chatterjee R, Giri AK. Arsenic-induced cell proliferation is associated with enhanced ROS generation, *Erk* signaling and *CyclinA* expression. Toxicology Letters. **2010**; 198: 263-271.

**Chuttani** PN, Chawla LS, Sharma TD. Arsenic neuropathy. Neurology. **1967**; 17:269.

**Cohen** SM, Arnold LL, Eldan M, Lewis As, Beck BD. Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment. Critical Reviews in Toxicology. **2006**; 36: 99-133.

**Conejero-Goldberg** C, Tornatore C, Abi-Saab W, Monaco MC, Dillon-Carter O, Vawter M, Elsworth J, Freed W. Transduction of human GAD67 cDNA into immortalized striatal cell lines using an Epstein-Barr virus-based plasmid vector increases GABA content. Experimental Neurology. **2000**; 161: 453-461.

**Cullen** WR, y Bentley R. The toxicity of trimethylarsine: an urban myth. Journal of Environmental Monitoring. **2005**; 7:11-15.

**Cullen** WR. Chemical mechanism of arsenic biomethylation. Chemical Research in Toxicology. **2014**; 27: 457-461.

**Cullen** WR. Medical arsenic: Toxic Arsenic. En Cullen WR, Is arsenic an aphrodisiac? The sociochemistry of an element. London. The Royal Society of Chemistry, **2008**:1-55.

**De la Cruz-Aguilera** DL, Rios-Castañeda C. Effects of arsenic chronic exposure on central gabaergic systems of mice. Toxicology letters. **1998**; 95: 54-55.

**Di-Chiara** G, Morelli M, Consolo S. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. Trends in Neuroscience. **1994**; 17: 228-233.

**Ding** W, Liu W, Cooper KL, Qin XJ, de Souza Bergo P L, Hudson LG, Liu KJ. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase-1 by arsenite interferes with repair of oxidative DNA damage. Journal of Biological Chemistry. **2009**; 384: 6809-6817.

**Do** J, Kim JI, Bakes J, Lee K, Kaang BK. Functional roles of neurotransmitters and neuromodulators in the dorsal striatum. Learning and Memory. **2013**; 20: 21-28.

**Donofrio** PD, Wilbourn AJ, Albers JW, Rogers L, Salanga V, Greenberg HS. Acute arsenic intoxication presenting as Guillain-Barré-like syndrome. Muscle & Nerve. **1987**; 10: 114-120.

**Dubé** L, Smith AD, Bolam JP. Identification of synaptic terminals of thalamic or cortical origin in contact with distinct medium-size spiny neurons in the rat neostriatum. Journal of Comparative Neurology. **1998**; 267: 455-471.

**Evans** CD, LaDow K, Schumann BL, Savage Jr RE, Caruso J, Vonderheide A, Succop P, Talaska G. Effect of arsenic on benzo(a)pyrene DNA adduct levels in mouse skin and lung. Carcinogenesis. **2004**; 25: 493-497.

**Fenalti** G, Law RHP, Buckle AM, Langendorf C, Tuck K, Rosado CJ, Faux NG, Mahmood K, Hampe CS, Banga JP, Wilce M, Schmidberger J, Rossjohn J, El-Kabbani O, Pike RN, Smith AI, Mackay IR, Rowley MJ, Whisstock JC. GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. Nature Structural & Molecular Biology. **2007**; 14: 280-286.

**Fox** SI. Human Physiology. 8ª Edición. California: Editorial McGraw-hill, **2003**; vol. 5-726.

**Freshney** IR. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6a Edición. Nueva Jersey: Editorial Wiley-Blackwell; **2010**; 1-8.

**Fulda** S, Gorman MA, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*. **2010**; 2010: 1-24.

**Gebel** TW. Arsenic methylation is a process of detoxification through accelerated excretion. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. **2002**; 205: 505-508.

**Gerr** F, Letz R, Ryan PB, Green RC. Neurological effects of environmental exposure to arsenic in dust and soil among humans. *Neurotoxicology*. **2000**. 21: 475-487.

**Giordano** M, Takashima H, Herranz A, Poltorak M, Geller HM, Marone M, Freed WJ. Immortalized GABAergic cell lines derived from rat striatum using a temperature-sensitive allele of the SV40 large T antigen *Experimental Neurology*. **1993**; 124: 395-400.

**Greenberg** A. Acute demyelinating polyneuropathy with arsenic ingestion. *Muscle Nerve* **1996**; 19: 1611-1703.

**Hartwig** A, Blessing H, Schwerdtle T, Walter I. Modulation of DNA repair process by arsenic and selenium compounds. *Toxicology*. **2003**; 193: 161-169.

**Hernández-Zavala** A, Córdova E, Del Razo LM, Cebrián ME, Garrido E. Effects of arsenite on cell cycle progression in a human bladder cancer cell line. *Toxicology*. **2005**; 207: 49-57.

**Holz** WRF, K S. Synaptic transmission and cellular signaling: an overview. In: Siegel GJ, RWA, Scott TB, Donald LP Ed. *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. Academic Press. San Diego, CA, **2006**; 167

**Huangfu** D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature Biotechnology*. **2008**; 25: 795-797.

**Hughes** M, Beck B, Chen Y, Lewis A, Thomas D. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicological Sciences*. **2011**; 123: 305-332.

**Hui-Wen C**, Yuan-Soon H, Ying-Jan W. Arsenic trioxide induces autophagy and apoptosis in human glioma cells *in vitro* and *in vivo* through downregulation of survivin. *Journal of Molecular Medicine*. **2011**; 89: 927-941.

**Hurtado-Jiménez R**, Gardea-Torresdey JL. Arsenic in drinking water in the Los Altos de Jalisco region of Mexico. *Revista Panamericana Salud Pública*. **2006**; 20: 236-246.

**Ivanov VN**, Hei TK. Induction of apoptotic death and retardation of neuronal differentiation of human neural stem cells by sodium arsenite treatment. *Experimental Cell Research*. **2013**; 319: 875-887.

**Jin Y**, Sun G, Li X, Li G, Lu C, Qu L. Study on the toxic effects induced by different arsenicals in primary cultured rat astroglia. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2004**; 196: 396-403.

**Kaanani J**, Kolibachuk J, Martinez H, Baekkeskov S. Two distinct mechanisms target GAD67 to vesicular pathways and presynaptic clusters. *Journal of Cell Biology*. **2010**; 190: 911-925.

**Kapaj S**, Peterson H, Liber Karsten, Bhattacharya P. Human health effects from chronic arsenic poisoning-A review. *Journal of environmental science and health part a*. **2006**; 41: 2399-2428.

**Kelly CD**, Edwards Y, Johnstone AP, Harfst E, Nógrádi A, Nussey SS, Povey S, Carter ND. Nucleotide sequence and chromosomal assignment of a cDNA encoding the large isoform of human glutamate decarboxylase. *Annals of Human Genetics*. **1992**; 56: 255-265.

**Kim S**, Takeuchi A, Kawasumi Y, Endo Y, Lee H, Kim Y. A Guillain-Barré Syndrome-like neuropathy associated with arsenic exposure. *Journal of Occupational Health*. **2012**; 54: 344-347.

**Köhler G**, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **1975**; 256: 495-497.

**Langendorf CG**, Tuck KL, Key TLG, Fenalti G, Pike RN, Rosado CJ, Wong ASM, Buckle AM, Law RHP, Whisstock JC. Structural characterization of the mechanism

through which human glutamic acid decarboxylase auto-activates. *Bioscience Reports*. **2003**; 33: 137-149.

**Lapper** SR, Bolam JP. Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat. *Neuroscience*. **1992**; 51: 533-545.

**Lee** PC, Ho IC, Lee TC. Oxidative stress mediates sodium arsenite-induced expression of heme oxygenase-1, monocyte chemoattractant Protein-1, and interleukin-6 in vascular smooth muscle cells. *Toxicological Sciences*. **2005**; 85: 541-550.

**Liao** Wt, Lin P, Cheng TS, Yu HS, Chang LW. Arsenic promotes centrosome abnormalities and cell colony formation in p53 compromised human lung cells. *Toxicology Applied and Pharmacology*. **2007**; 225: 162-170.

**Liu Chien-Y**, Huang H. Involvement of calcium-dependent protein kinase C in arsenite-induced genotoxicity in chinese hamster ovary cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. **1997**; 64: 423-433.

**Liu** Y, Guyton KZ, Gorospe M, Xu Q, Lee JC, Holbrook NJ. Differential activation of ERK, JNK/SAPK and p38/CSPB/RK MAP kinase family members during the cellular response to arsenite. *Free Radical Biology & Medicine*. **1996**; 21: 771-781.

**Martin** LD, Hongcheng L, Martin SB, Wu SJ. Structural features and regulatory properties of the brain glutamate decarboxylases. *Neurochemistry International*. **2000**. 31:111-119.

**Mass** MJ, Wang L. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutation Research*. **1997**; 386: 263-277.

**Mayorga** J, Richardson-Hardin C, Dicke KA. Arsenic trioxide as effective therapy for relapsed acute promyelocytic leukemia. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. **2002**, 6: 1-6.

**McCullum** G, Keng G, States JC, McCabe MJ Jr. Arsenite delays progression through each cell cycle phase and induces apoptosis following G2/M arrest in U937

myeloid leukemia cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **2005**; 313: 877-887.

**Mejía-Toiber J**, Márquez-Ramos A, Díaz-Muñoz M, Peña F, Aguilar MB, Giordano M. Glutamaergic excitation and GABA release from a transplantable cell line. *Cell Transplantation*. **2010**; 19: 1037-1323.

**Mengesdorf T**, Althausen S, Paschen W. Genes associated with pro-apoptotic and protective mechanisms are affected differently on exposure of neuronal cell cultures to arsenite. No indication for endoplasmic reticulum stress despite activation of grp78 and gadd153 expression. *Molecular Brain Research*. **2002**; 104: 227-239.

**México, Secretaría de salud**. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. México. Diario de la Federación: Secretaría de salud, **2000**.

**Miller W**, Hyman M, Lee J. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Research*. **2002**; 62: 3893-3903.

**Murphy MJ**, Lyon LW, Taylor JW. Subacute arsenic neuropathy: clinical and electrophysiological observations. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. **1981**; 44: 896-900.

**Nagaraja TN**, Desiraju T. Regional alterations in the levels of brain biogenic amines, glutamate, GABA, and GAD activity due to chronic consumption of inorganic arsenic in developing and adult rats. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*. **1993**; 50: 100-107.

**Namgung U**, Xia Z. Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-jun N-terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of Neuroscience*. **2000**; 20: 6442-6451.

**Nylansted J**, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademman U, Høyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M, Jäättelä M. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *Journal of Experimental Medicine*. **2004**; 200: 425-435.

**Olsen** RW, Bertz W. GABA and glycine. In: Siegel GJ, RWA, Scott TB, Donald LP (Ed. Basic Neurochemistry. Academic Press. London, **2006**; 291-302)

**Olsen** RW, Sieghart W. Subtypes of gamma-aminobutyric acid (A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update Pharmacology. Rev. **2008**; 60: 243-260.

**Osowski** MC, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. Methods Enzymology. **2011**; 490: 71-92.

**Paul** D, Harmon A, Devesa V, Thomas D, Stýblo M. Molecular mechanisms of the diabetogenic effects of arsenic: inhibition of insulin signaling by arsenite and methylarsonous acid. Environmental Health Perspectives. **2007**; 115: 734-742.

**Penrose** W R. Arsenic in the marine and aquatic environments: analysis, occurrence and significance. CRC Critical Reviews in Environmental Control. **1974**; 4: 465-482.

**Petrick** JS, Jagadish B, Mash EA, Aposhian HV. Monomethylarsonous acid (MMAIII) and arsenite: LD50 in hamsters and *in vitro* inhibition of pyruvate dehydrogenase. Chemical Research in Toxicology. **2001**; 14, 651-656.

**Petroff** O. Book review: GABA and glutamate in the human brain. Neuroscientist. **2002**; 8-562.

**Piatek** K, Schwerdtle T, Hartwig A, Bal W. Monomethylarsonous acid destroys a tetrathiolate zinc finger much more efficiently than inorganic arsenite: mechanistic considerations and consequences for DNA repair inhibition. Chemical Research in Toxicology. **2008**; 21: 600-606.

**Pickel** VM, Chan J, Sesack SR. Cellular basis for interactions between catecholaminergic afferents and neurons containing Leu-enkephalin-like immunoreactivity in rat caudate-putamen nuclei. Journal of Neuroscience Research. **1992**; 31: 212-230.

**Pilsner** JR, Liu X, Ahsan H, Ilievski V, Slavkovich V, Levy D, Factor-Litvak P, Graziano JH, Gamble MV. Genomic and methylation of peripheral blood leukocyte DNA: influences of arsenic and folate in Bangladeshi adults. The American Journal of Clinical Nutrition. **2007**; 86: 1179-1186.

**Poonepalli** A, Balakrishnan L, Khaw AK. Lack of poly (ADP-ribose) polymerase-1 gene product enhances cellular sensitivity to arsenite. *Cancer research*. **2005**; 65: 10977-10983.

**Poonepalli** A, Kalakrishnan L, Khaw AK. Lack of poly (ADP-ribose) polymerase-1 gene product enhances cellular sensitivity to arsenite. *Cancer Research*. **2005**; 65: 10977-10983.

**Pradosh** R, Anupama S. Metabolism and toxicity of arsenic: A human carcinogen. *Current Science*. **2002**; 82: 38-45.

**Purves** D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara O, Williams SM. *Neuroscience*. 2a Edición. Sunderland; Sinauer Associates, **2001**; 503.

**Rècher** C, Chopin M, Raffoux E, Pierron G, Poupon J, Sigaux F, Dombret H, Stern MH. *In vitro* and *in vivo* effectiveness of arsenic trioxide against murine T-cell prolymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. **2002**. 117; 343-350.

**Reichard** JF, Puga A. Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic regulation. *Epigenomics*. **2010**; 2: 87-104.

**Rodríguez** VM, Giordano M. Oxidative stress induced by arsenic exposure: Their implication on the nervous system. *Research Signpost*. **2009**; 2: 121-153.

**Rodríguez** VM, Jiménez-Capdeville M, Giordano M. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicology Letters*. **2003**; 145: 1–18.

**Rodríguez** VM, Limón-Pacheco J, Carrizalez L, Mendoza-Trejo M, Giordano M. Chronic exposure to low levels of inorganic arsenic causes alterations in locomotor activity and in the expression of dopaminergic and antioxidant systems in the albino rat. *Neurotoxicology and Teratology*. **2010**; 32: 640-647.

**Rosado** JL, Ronquillo D, Kordas K, Rojas O, Alatorre J, Lopez P, Garcia-Vargas G, Caamaño MC, Cebrián ME, Stoltzfus RJ. Arsenic exposure and cognitive performance in mexican schoolchildren. *Environmental Health Perspectives*. **2007**; 115: 1371-1375.

**Rosen** BP, Tamás MJ. Arsenic transport in prokaryotes and eukaryotic microbes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **2010**; 679: 47-55.

**Ross** KC, Waldman BC, Conejero-Goldberg C, Freed W, Coleman JR. Transplantation of M213-2O cells with enhanced GAD67 expression into the inferior colliculus alters audiogenic seizures. *Experimental Neurology*. **2002**; 177: 338-340.

**Rossman** TG, Meyn MS, Troll W. Effects of arsenite on DNA repair in *Escherichia coli*. *Environmental Health Perspective*. **1977**; 19: 229-233.

**Rossman** TG. Mechanisms of arsenic carcinogenesis. An integrated approach. *Mutation research*. **2003**; 533: 37-65.

**Sánchez** JF, Crooks DR, Lee CT, Schoen CJ, Amable R, Zeng X, Florival-Victor T, Morales N, Truckenmiller ME, Smith R, Freed WJ. GABAergic lineage differentiation of AF5 neural progenitor cells *in vitro*. *Cell Tissue Research*. **2006**; 324(1): 1-8.

**Scherer** WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of Experimental Medicine*. **1953**; 97: 695-710.

**Shila** S, Kokilavani V, Subathra C, Panneerselvann C. Brain regional responses in antioxidant system to  $\alpha$ -lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology*. **2005**; 210: 25-36.

**Siegel** JG, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB. *Basic Neurochemistry*. 5a Edición. Nueva York: Editorial Raven Press, **1994**; vol. 5:1080.

**Simeonova** PP, Wang S, Hulderman T, Luster MI. c-Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway by arsenic: role in carcinogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. **2002**; 277: 2945-2950.

**Simeonova** PP, Wang S, Toriuma W. Arsenic mediates cell proliferation and gene expression in the bladder epithelium: Association with activating protein-1 transactivation. *Cancer Research*. **2000**; 60: 3445-3453.

**Sitges** M, Chiu LM, Gonzalez L. Vesicular and carrier-mediated depolarization-induced release of [3H] GABA: inhibition by amiloride and verapamil. *Neurochemical Research*. **1993**; 18:1081-1087.

**Smith E, Naidu R, Alston A M.** Arsenic in the soil environment: a review. *Advances in Agronomy*. **1998a**; 64: 149-184.

**Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP.** Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*. **1998b**; 86: 353-387.

**Soghomonian JJ, Martin LD.** Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? Review. *Trends in Pharmacological Sciences*. **1998**; 19: 500-505.

**Steffensen SC, Svingos AL, Pickel VM, Henriksen SJ.** Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience*. **1998**; 19: 8003-8015.

**Sze-Fai Y, Yiu-Ming Y, Edmond-Yik-Kong T.** Severe neurotoxicity following arsenic therapy for acute promyelocytic leukemia: potentiation by thiamine deficiency. **2002**, 99: 3481-3482.

**Thomas JD.** Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2007**; 222: 365-373.

**Thomas JD.** Arsenolys and thiol-dependent arsenate reduction. *Toxicological Sciences*. **2010**; 117: 249-252.

**Truckenmiller ME, Tornatore C, Wright RD, Dillon-Carter O, Meiners S, Geller HM, Freed WJ.** A truncated SV40 large T antigen lacking the p53 binding domain overcomes p53-induced growth arrest and immortalizes primary mesencephalic cells. *Cellular Tissue Research*. **1998**; 291: 175-189.

**Truckenmiller ME, Vawter MP, Zhang P, Conejero-Goldberg C, Dillon-Carter O, Morales N, Cheadle C, Becker KG, Freed WJ.** Af5, a CNS cell line immortalized with an N-terminal fragment of SV40 large T: growth, differentiation, genetic stability, and gene expression. *Experimental Neurology*. **2002**; 175: 318-337.

**U.S. EPA.** Environmental Protection Agency. Inorganic arsenic. Toxicity and exposure assessment for children's health, **2006**.

**Vahidnia A, Van Der Voet G, De Wolff F.** Arsenic neurotoxicity-a review. *Human Experimental Toxicology*. **2007**; 26:823-832.

**VanDongen, AM.** Biology of the NMDA receptor. Boca Raton; CRC Press, 2009; 620.

**Wang** JS, Wai CM. Arsenic in drinking water a global environmental problem. *Journal of Chemical Education*. **2004**; 81: 207-213.

**Wasserman** GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Factor-Litvak P, van Green A, Slavkovich V, Lolocono NJ, Cheng Z, Hussain Iftikhar, Momotaj H, Graziano J. Water arsenic exposure and children's intellectual function in Araihasar, Bangladesh. *Environmental Health Perspectives*. **2004**; 112: 1329-1333.

**Widnell** CC, Baldwin AS, Davies E, Martin S, Parternak CA. Cellular stress induces a redistribution of the glucose transporter. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **1990**; 4: 1634-1637.

**William** JF, Zhang P, Sanchez JF, Dillon-Carter O, Coggiano M, Errico SL, Lewis BD, Truckenmiller. Truncated N-terminal mutants of SV40 large T antigen as minimal immortalizing agents for CNS cells. *Experimental Neurology*. **2005**; 191: S45-S59.

**Wright** RO, Amarasiriwardena C, Woolf AD, Jim R, Bellinger DC. Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese, and cadmium levels in school-age children residing near a hazardous waste site. *Neurotoxicology*. **2006**; 27: 210-216.

**Wu** C. Glutamine synthetase: VL mechanism of the dithiol-dependent inhibition by arsenite. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1965**; 96: 134-147.

**Yadav** S, Shi Y, Wang F, Wang H. Arsenite induces apoptosis in human mesenchymal stem cells by altering Bcl-2 family proteins and by activating intrinsic pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2010**; 244: 263-272.

**Zhang** TC, Schmidt MT, Mumford JL. Effects of arsenic on telomerase and telomeres in relation to cell proliferation and apoptosis in human keratinocytes and leukemia cells *in vitro*. *Carcinogenesis Advance Access*. **2003**; 1: 1-18.

**Zheng** W, Perry DF, Nelson DL, Aposhian HV. Choroid plexus protects cerebrospinal fluid against toxic metals. *The FASEB Journal*. **1991**; 5: 2188-2193.

**Zheng** W. Toxicology of choroid plexus: Special reference to metal-induced neurotoxicities. *Microscopy Research and Technique*. **2001**; 103: 52-89.