



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS DE DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE  
LOS ALIMENTOS**

**EFFECTOS NEUROTOXICOS PROVOCADOS POR LA  
CO-EXPOSICION DE ARSENICO Y FLUOR EN CRIAS DE  
RATAS EXPUESTAS DURANTE LA GESTACION Y LA  
LACTANCIA**

Sergio Ariel Domínguez

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2023



## Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas (INBIOSUR) y del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, durante el período comprendido entre los meses de Agosto de 2017 y Octubre de 2023, bajo la dirección de la Dra. Fernanda A. Gumilar, Profesora Adjunta con Dedicación Exclusiva en las asignaturas “Toxicología y Química Legal” y “Toxicología de Fármacos”, y la co-dirección de la Dra. Alejandra Minetti, Profesora Adjunta con Dedicación Exclusiva de la asignatura “Toxicología y Química Legal”.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ...../...../..... , mercediendo la calificación de .....(.....).



Dedicada a mis padres, familia,  
amigos y hermanos en la fe.  
“..por la fe y la paciencia, heredarán  
las promesas” Hb. 6,12

## Agradecimientos

Quiero agradecer a quienes me acompañaron y que fueron parte muy importante en este tiempo de formación, aprendizaje y crecimiento:

- ✓ *A mi jefa, compañera, y amiga, la Dra. Fernanda A. Gumilar, quien se animó a dar su “sí”, para la dirección, con gran dedicación y paciencia, para que yo pueda desarrollar y terminar el presente trabajo.*
- ✓ *A mi codirectora Dra. Alejandra Minetti, que con su gran sencillez, escucha y humildad, me acompañó en mis inicios en la Cátedra y lo sigue haciendo hasta el día de hoy.*
- ✓ *A la Dra. Cristina Bras y al Dr. Javier Baier, por sus asesoramientos en el análisis estadístico y del software utilizado.*
- ✓ *A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Toxicología: Cristinas, Patricia, Mariana, Marcelo, Ileana y Sebastián, con quienes comparto mis horas de trabajo.*
- ✓ *A mi compañera de la vida y esposa, María Inés, por tantos gestos de amor, sencillez y paciencia, y quien con sus consejos, siempre tuvo respeto a mis tiempos.*
- ✓ *A mi hijo Mariano, uno de mis sueños cumplidos, que me enseñó y me sigue enseñando cada día a crecer en este DON que es ser padre.*
- ✓ *A mi padre, por enseñarme cosas importantes para la vida y que aún las tengo presente.*
- ✓ *A mi madre por todo el amor que siempre me brinda, su apoyo incondicional y su compañía para avanzar y terminar este trabajo.*
- ✓ *A mis hermanos Romina y Alberto por acompañarme en la distancia y en la cercanía de corazón en cada día.*
- ✓ *A mis hermanos en la fe: Alicia, Ana, Paola, Silvia, Alejandro, Jorge, Julián y Mariano, por animarme y compartir este camino durante tantos años.*
- ✓ *A Dios, por su infinita Providencia, y por cada signo revelado que me enseña a crecer, caminar y buscar su voluntad en el día a día.*

## Índice General

Prefacio.....	i
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Indice General.....	v
Índice de Contenidos.....	vi
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tablas.....	xiii

## Índice de Contenidos

Resumen.....	4
Abstract.....	7
1. Introducción.....	10
1.1 Niveles permitidos de iAs y F.....	12
1.2 Toxicocinética y toxicodinamia del iAs .....	13
1.3 Toxicocinética y toxicodinamia del F .....	17
1.4 Toxicidad crónica del iAs y el F en humanos.....	19
1.5 Neurotoxicidad del iAs y F en humanos.....	20
1.6 Neurotoxicidad del iAs o F en animales de experimentación.....	21
1.7 Toxicidad prenatal y durante el desarrollo.....	25
1.8 Evaluación de toxicidad por co-exposición e interés de su investigación..	27
1.9 Objetivos generales y específicos de esta tesis.....	31
2. Materiales y métodos.....	34
2.1 Materiales.....	34
2.2 Animales y diseño experimental .....	34
2.3 Registro de pesos corporales, consumo de agua y alimento de las madres y de las crías .....	36
2.4. Evaluaciones neuroconductuales .....	37
2.4.1 Desarrollo sensoriomotor.....	37
2.4.2 Batería de observaciones funcionales (BOF).....	38
2.4.3 Evaluación de la actividad locomotora .....	46
2.4.4 Evaluación de la ansiedad.....	47
2.4.5 Evaluación de la memoria de corta y larga duración .....	49
2.4.6 Evaluación de memoria de reconocimiento.....	50
2.4.7 Evaluación de la depresión.....	52



2.5. Determinaciones neuroquímicas.....	54
2.5.1 Obtención de las áreas cerebrales.....	54
2.5.2 Marcadores de estrés oxidativo.....	56
2.5.2.1 Ensayo de catalasa (CAT).....	57
2.5.2.2 Determinación de tioles totales.....	58
2.5.3 Evaluación de la vía glutamatérgica y colinérgica.....	59
2.5.3.1 Evaluación del glutamato.....	59
2.5.3.2 Evaluación de la actividad colinérgica	
Determinación de acetilcolinesterasa (AChE).....	61
2.5.4 Determinación de Fosfatasa alcalina (ALP).....	62
2.5.5 Determinación de proteínas totales.....	63
2.6 Estadística.....	64
2.7 Ética.....	66
3. Resultados.....	67
3.1 Pesos corporales y consumos de agua y	
alimento.....	68
3.2 Evaluaciones neuroconductuales.....	72
3.2.1 Reflejos sensoriomotores.....	72
3.2.2 Batería de observaciones funcionales.....	75
3.2.3 Evaluación de la actividad locomotora.....	78
3.2.4 Evaluación de la ansiedad.....	83
3.2.5 Evaluación de la memoria de corta y larga duración.....	87
3.2.6 Evaluación de memoria de reconocimiento.....	90
3.2.7 Evaluación de la depresión.....	97
3.3. Determinaciones neuroquímicas.....	101
3.3.1 Marcadores de estrés oxidativo.....	101
3.3.1.1 Ensayo de catalasa (CAT).....	101

3.3.1.2 Determinación de tioles totales.....	105
3.3.2 Evaluación de la vía glutamatérgica y colinérgica.....	108
3.3.2.1 Evaluación de la neurotransmisión glutamatérgica.....	108
3.3.2.2 Evaluación de la actividad colinérgica	
Determinación de acetilcolinesterasa (AChE).....	116
3.3.2.3 Determinación de Fosfatasa alcalina (ALP).....	121
4. Discusión.....	126
5. Conclusión.....	150
Bibliografía.....	154

## Índice de Figuras

**Fig. 2.1:** Reflejos sensoriomotores evaluados en las crías: a) reflejo de enderezamiento b) aversión al precipicio c) geotaxis negativa.

**Fig. 2.2:** Dispositivo de campo abierto

**Fig. 2.3:** Dispositivo de plus maze elevado

**Fig. 2.4:** Dispositivo utilizado para la evaluación de memoria

**Fig. 2.5:** Prueba de reconocimiento de objetos (NOR). Esquema representativo que muestra las dimensiones y la distribución de los objetos en el OF en las etapas de familiarización y de prueba.

**Fig. 2.6:** Imágenes fotográficas del dispositivo utilizado para realizar la prueba de nado forzado.

**Fig. 2.7:** Esquema representativo de un corte cerebral transversal de rata.

**Fig. 2.8:** A) Imagen y fotografía de cerebro entero extraído de rata B) cortes realizados de CPu, HPC y CPF adaptadas de Spijker S. (2011).

**Fig. 2.9:** Diagramas representativos de las secciones coronales de las áreas cerebrales utilizadas para el análisis desde sección AP de +0,12 mm a +0,36 mm para CPu y -2,64 mm a -3,96 AP para HPC (regiones CA1 y CA3); en relación con bregma. Figura adaptada de Paxinos y Franklin (2007).

**Fig. 3.1:** A) Pesos corporales de las crías macho y hembras en DPN=1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 y 21. B) Consumo de alimento de los grupos experimentales (A y B) y controles (C) registrado en las madres durante la gestación y la lactancia. C) Consumo de agua diario de las madres durante la gestación y la lactancia.

**Fig. 3.2:** Día posnatal en el cual las crías adquirieron: A) el reflejo de enderezamiento, B) la aversión al precipicio y C) la geotaxis negativa.

**Fig. 3.3:** Actividad locomotora evaluada en el OF en ratas hembra y machos de 45 días.

**Fig. 3.4:** Número de cuadrados cruzados y rearings registrados en el OF cada 5 min y en un total de 15 min. en ratas de 90 días.

**Fig. 3.5:** Porcentajes de tiempo de permanencia y entradas en los brazos abiertos BA medidos en el Plus Maze en crías hembra y macho de 45 días.

**Fig. 3.6:** Porcentaje de tiempo de permanencia y porcentaje de entradas en los brazos abiertos medidos en el Plus Maze en crías hembra y machos de 90 días.

**Fig. 3.7:** Latencias medidas durante la sesión de entrenamiento (0 min) y las sesiones de prueba para la evaluación de MCD (90 min después del entrenamiento) y MLD (24 h después del entrenamiento), realizadas en crías de 45 días de edad.

**Fig. 3.8 A:** Latencias medidas durante la sesión de entrenamiento (0 min) y las sesiones de prueba para la evaluación de MCD (90 min después del entrenamiento) y MLD (24 h después del entrenamiento) en las hembras.

**Fig. 3.8 B:** Latencias medidas durante la sesión de entrenamiento (0 min) y las sesiones de prueba para la evaluación de MCD (90 min después del entrenamiento) y MLD (24 h después del entrenamiento) en los machos.

**Fig. 3.9:** A) Trayectos realizados por una cría hembra control de 45 días durante la sesión de familiarización (izquierda) y durante la sesión de prueba, donde uno de los objetos es reemplazado (derecha). (B) Tiempo de permanencia e interacción. (C) Mapa de calor que representa la posición del animal en el arena experimental (rojo=más tiempo, azul=menos tiempo).

**Fig. 3.10:** A) Trayectos realizados por una cría hembra de 45 días expuesta a la combinación B durante la sesión de familiarización (izquierda) y durante la sesión de prueba, donde uno de los objetos es reemplazado (derecha). (B) Tiempo de permanencia e interacción. (C) Mapa de calor que representa la posición del animal en el arena experimental (rojo=más tiempo, azul=menos tiempo).

**Fig. 3.11:** Porcentaje de tiempo de exploración en el objeto novedoso en crías hembra y macho de 45 días.

**Fig. 3.12:** A) Trayectos realizados por una cría macho control de 90 días durante la sesión de familiarización (izquierda) y durante la sesión de prueba (derecha). (B) Tiempo de permanencia e interacción. (C) Mapa de calor que representa la posición del animal en el arena experimental (rojo=más tiempo, azul=menos tiempo).

**Fig. 3.13:** A) Trayectos realizados por una cría macho de 90 días expuesta a la combinación B durante la sesión de familiarización (izquierda) y durante la sesión de prueba, donde uno de los objetos es reemplazado (derecha). (B) Tiempo de permanencia e interacción. (C) Mapa de calor que representa la posición del animal en el arena experimental (rojo=más tiempo, azul=menos tiempo).

**Fig. 3.14:** Porcentaje de tiempo de exploración en el objeto novedoso en crías hembra y macho de 90 días.

**Fig. 3.15:** Tiempos registrados en las crías de 45 días en los parámetros evaluados en la prueba de nado forzado.

**Fig. 3.16:** Tiempos registrados en las crías de 90 días en los tiempos de escalada en la prueba de nado forzado.

**Fig. 3.17:** Tiempos registrados en las crías de 90 días en los tiempos de nado e inmovilidad en la prueba de nado forzado.

**Fig. 3.18:** Actividades de CAT en las áreas cerebrales de ambos sexos de ratas de 90 días.

**Fig. 3.19:** Contenido de tioles totales en las áreas cerebrales de ambos sexos en ratas de 45 días.

**Fig. 3.20:** Contenido de tioles totales en las áreas cerebrales de ambos sexos en ratas de 90 días.

**Fig. 3.21:** Niveles de ALT en las diferentes áreas de las crías de 45 días controles y expuestas a la combinación A y B.

**Fig. 3.22:** Niveles de ALT en las diferentes áreas de las crías de 90 días controles y expuestas a la combinación A y B.

**Fig. 3.23:** Niveles de AST en las diferentes áreas de las crías de 45 días controles y expuestas a la combinación A y B.

**Fig. 3.24:** Niveles de AST en las diferentes áreas de las crías de 90 días controles y expuestas. a la combinación A y B.

**Fig. 3.25:** Actividad enzimática de AChE ( $(\mu\text{mol tiocolina min}^{-1} \text{ mg proteina}^{-1})$ ) en las diferentes áreas de las crías de 45 días controles y expuestas durante la gestación y lactancia.

**Fig. 3.26:** Actividad enzimática de AChE ( $(\mu\text{mol tiocolina min}^{-1} \text{ mg proteina}^{-1})$ ) en las diferentes áreas de las crías de 90 días controles y expuestas durante la gestación y lactancia.

**Fig. 3.27:** Actividad enzimática de ALP (UI/ug prot.) en la CPF y el CPu de las crías de 45 días.

**Fig. 3.28:** Actividad enzimática de ALP (UI/ug prot.) en el HPC en las crías de 45 días.

**Fig. 3.29:** Actividad enzimática de ALP (UI/ug prot.) en las diferentes áreas de las ratas de 90 días de edad controles y expuestas a las combinaciones A y B.

## Índice de Tablas

**Tabla 2.1:** Principales características del ciclo estral de las ratas.

**Tabla 2.2:** Parámetros evaluados en la batería de observaciones funcionales realizada en ratas.

**Tabla 3.1:** Pesos corporales de las madres y de sus crías

**Tabla 3.2:** Día posnatal en el cual las crías controles y experimentales abrieron los ojos y los canales auditivos.

**Tabla 3.3:** Parámetros evaluados durante las sesiones de la BOF realizadas en crías hembra (♀), y macho (♂) de 45 días de los grupos controles y experimentales luego de la co-exposición.

**Tabla 3.4:** Parámetros evaluados durante las sesiones de la BOF realizadas en crías hembra (♀), y macho (♂) de 90 días de los grupos controles y experimentales luego de la co-exposición.



## LISTADO DE ABREVIATURAS

- **5-HT**: Serotonina
- **ACh**: Acetilcolina
- **AChE**: Acetilcolinesterasa
- **ADN**: Ácido desoxirribonucleico
- **ADP**: Adenosina difosfato
- **ALP**: Fosfatasa alcalina
- **ALT**: Alanina aminotransferasa
- **AMPA**: Ácido metil-4-isoxazolpropiónico
- **ANOVA**: Análisis de la Varianza
- **iAs**: Arsénico inorgánico
- **AsNaO**: Arsenito de sodio
- **AST**: Aspartato aminotransferasa
- **ATP**: Adenosina trifosfato
- **ATSDR**: Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades
- **BOF**: Batería de observaciones funcionales
- **BSA**: Albúmina sérica bovina
- **CAA**: Código Alimentario Argentino
- **CAT**: Catalasa
- **CHAT**: Colina acetiltransferasa
- **COHIFE**: Consejo Hídrico Federal
- **CPF**: Corteza prefrontal
- **CPu**: Cuerpo estriado
- **CYP**: Citocromo P-450
- **DA**: Dopamina
- **DG**: día gestacional
- **DPG**: día posgestacional
- **DPN**: día posnatal
- **DTNB**: 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico)
- **EDTA**: Acido etilen- diamino-tetracético
- **EE**: Error estándar
- **F**: Flúor
- **FST**: Prueba de nado forzado
- **GABA**: Ácido gamaaminobutírico

- **Glu:** Glutamato
- **GOT:** glutamato-oxalacetato transaminasa
- **GPT:** glutamato-piruvato transaminasa
- **GPx:** Glutación peroxidasa
- **GR:** Glutación reductasa
- **GSH:** Glutación reducido
- **GSH/mg prot.:** Glutación reducido por miligramo de proteína
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de Hidrógeno
- **HACRE:** Hidro Arsenicismo Crónico Regional Endémico
- **HPC:** Hipocampo
- **IARC:** Agencia Internacional de Investigación del Cáncer
- **iAs:** Arsénico inorgánico
- **iAsIII:** Arsénico inorgánico trivalente
- **iAsV:** Arsénico inorgánico pentavalente
- **k/mg prot:** kates por miligramo de proteínas
- **MCD:** Memoria de corta duración
- **MDA:** Malondialdehído
- **mg/L:** Miligramos por litro
- **mg/ml:** Miligramos por mililitro
- **mmol/L:** Milimol por litro
- **MLD:** Memoria de larga duración
- **mM:** Milimolar
- **NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido
- **NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- **NaF:** Fluoruro de Sodio
- **NE:** Norepinefrina
- **NMDA:** N-metil-D-aspartato
- **NOR Test:** Prueba de reconocimiento de objeto novedoso
- **O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Anión superóxido
- **OECD:** Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
- **OF:** Open field
- **OH•:** Radical hidroxilo
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **PBS:** Solución tamponada fosfato
- **PME:** Plus maze elevado

- **ROS**: Especies reactivas de oxígeno
- **SAM**: S-adenosil metionina
- **SH**: Tioles totales
- **SNC**: Sistema nervioso central
- **SOD**: Superóxido dismutasa
- **TBA**: Ácido tiobarbitúrico
- **TBARS**: Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
- **TNB**: ácido 3-tio-2-nitrobenzoico
- **UI/L**: Unidades internacionales por litro
- **US NRC**: Consejo Nacional de Investigación
- **UV-Vis**: Ultravioleta-Visible
- **U/ug prot**: Unidades por microgramo de proteína

# RESUMEN

## Resumen

El arsénico (iAs) y el flúor (F) son dos de los contaminantes inorgánicos más importantes que se encuentran omnipresentes en el medio ambiente. En numerosos países del mundo, entre ellos Argentina, existe una amplia franja poblacional susceptible a enfermedades como consecuencia de la exposición a estos elementos a través del consumo de agua.

Cuando dos tóxicos diferentes son absorbidos en el cuerpo humano, pueden ejercer su acción en forma independiente, sinérgica, antagónica e incluso, su combinación, puede producir efectos nuevos. En la literatura existen numerosas publicaciones que hacen referencia a la toxicidad individual de iAs y F, sin embargo, existe escasa información con respecto a los efectos ocasionados como consecuencia de la co-exposición.

En este trabajo de tesis, nuestro objetivo fue investigar los efectos neurotóxicos provocados por la co-exposición de iAs/F en crías de ratas expuestas durante la gestación y la lactancia. Las ratas Wistar fueron expuestas a una combinación de 0.05 mg/L de iAs y 5 mg/L de F (Combinación A), o a una combinación de 0.10 mg/L iAs y 10 mg/L F (Combinación B). Se utilizaron crías de 45 y 90 días de edad, evaluándose la funcionalidad del sistema nervioso central (SNC) a nivel neuromotor, sensorial y autonómico mediante una batería de observaciones funcionales (BOF). También se estudió la actividad locomotora, la ansiedad, diferentes tipos de memoria y el comportamiento depresivo. Posteriormente, se realizaron diferentes estudios neuroquímicos, determinando los niveles de catalasa (CAT), transaminasas, tioles totales (SH<sup>-</sup>), fosfatasa alcalina (ALP) y acetilcolinesterasa (AChE) en diferentes áreas cerebrales [corteza prefrontal (CPF), cuerpo estriado (CPu) e hipocampo (HPC)], con el fin de poder dilucidar

los posibles mecanismos moleculares involucrados en los trastornos neuroconductuales.

Los resultados obtenidos demostraron que la co-exposición de iAs/F realizada durante la gestación y la lactancia produce en las crías, un retraso en la madurez de los reflejos sensoriomotores y una disminución en la respuesta del reflejo nociceptivo. En las crías de 45 días se observó un efecto bifásico en la actividad locomotora de las hembras, disminución de la ansiedad, disminución de la memoria de corta y de larga duración (MCD y MLD) en ambos sexos y un efecto depresivo en las crías hembra. En las crías de 90 días, la co-exposición provocó un aumento en la actividad locomotora, disminución de la ansiedad, disminución en la MCD, MLD y en la memoria de reconocimiento, y un efecto depresivo en las hembras.

Al realizar las determinaciones neuroquímicas, se observó un aumento del estrés oxidativo, manifestado por una disminución de la actividad catalásica y tioletos totales, diversas alteraciones en las enzimas que participan en la vía glutamatérgica (AST y ALT) y una disminución en la actividad de AChE en las crías, que depende de la edad, el sexo y la combinación utilizada.

Debido a que estos dos elementos se encuentran generalmente en forma conjunta, y que la población se encuentra expuesta a esta combinación, se consideró muy relevante iniciar este estudio para realizar una adecuada evaluación de riesgo sobre la población expuesta. Dicha información puede contribuir finalmente al establecimiento de límites máximos permitidos en aguas de consumo, cuidando la salud de la población.

# **ABSTRACT**

## **Abstract**

Arsenic (iAs) and fluoride (F) are two of the most important inorganic pollutants that are ubiquitous in the environment. In numerous countries around the world, including Argentina, there is a wide segment of the population susceptible to diseases as a result of exposure to these elements through water consumption.

When two different toxins are absorbed in the human body, they can exert their action independently or in a synergistic or antagonistic way, and even their combination can produce new effects. In the literature there are numerous publications that refer to the individual toxicity of iAs and F, however, there is little information regarding the effects caused as a consequence of the co-exposure.

In this thesis work, our objective was to investigate the neurotoxic effects caused by co-exposure of iAs/F in rat offspring exposed during gestation and lactation.

Wistar rats were exposed to a combination of 0.05 mg/L iAs and 5 mg/L F (Combination A), or to a combination of 0.10 mg/L iAs and 10 mg/L F (Combination B). Pups of 45 and 90 days of age were used, evaluating the functionality of the central nervous system (CNS) at the neuromotor, sensory and autonomic levels through Functional observational battery (BOF). Locomotor activity, anxiety, different types of memory and depressive behavior were also studied. Subsequently, different neurochemical studies were performed, determining the levels of catalase (CAT), transaminases, total thiols (SH-), alkaline phosphatase (ALP) and acetylcholinesterase (AChE) in different brain areas [prefrontal cortex (PFC), striatum (CPu) and hippocampus (HPC)], in order to elucidate the possible molecular mechanisms involved in neurobehavioral disorders.

The results obtained demonstrated that the co-exposure of iAs/F carried out during pregnancy and lactation produces in the offspring a delay in the maturity of



sensorimotor reflexes and a decrease in the response of the nociceptive reflex. In 45-day-old offspring, a biphasic effect was observed in the locomotor activity of females, a decrease in anxiety, a decrease in short- and long-term memory (MCD and MLD) in both sexes, and a depressive effect in female offspring in the forced swim test. In 90-day-old offspring, co-exposure caused an increase in locomotor activity, a decrease in anxiety, a decrease in MCD, MLD and recognition memory, and a depressive effect in females.

When performing neurochemical determinations, an increase in oxidative stress was observed, manifested by a decrease in catalase activity and total thiols, various alterations in the enzymes that participate in the glutamatergic pathway (AST and ALT) and a decrease in AChE activity in offspring, which depends on age, sex and the combination used.

Because these two elements are generally found together, and that the population is exposed to this combination, it was considered very relevant to initiate this study to carry out an adequate risk assessment on the exposed population. This information can ultimately contribute to the establishment of maximum limits allowed in drinking water, taking care of the health of the population.

# **INTRODUCCION**

## 1. Introducción

La toxicología alimentaria es el área que estudia la detección de sustancias tóxicas presentes en los alimentos y en el agua de bebida, sus propiedades, la toxicocinética, la toxicodinámica y los efectos adversos para la salud, entre otros. Los tóxicos en los alimentos pueden estar presentes naturalmente, formarse durante el procesamiento y el almacenamiento, llegar a través del ambiente o por la intervención del ser humano. Más del 50% de la población mundial utiliza el agua subterránea como fuente de bebida para diferentes propósitos hogareños (Jadhav y col., 2015), sin embargo, la presencia de contaminantes naturales puede comprometer su calidad. El arsénico inorgánico (iAs) y el flúor (F) en su forma iónica, son reconocidos dentro de los contaminantes más importantes y de mayor relevancia en la salud pública (Lindberg y col., 2006; OMS, 2017).

El iAs es un metaloide que se presenta en forma natural en toda la corteza terrestre. Dentro de sus formas, según las condiciones oxidantes/reductoras y el pH del medio, se lo encuentra principalmente como arsénico inorgánico trivalente (iAsIII) y arsénico inorgánico pentavalente (iAsV), siendo estas especies consideradas mundialmente tóxicas para la salud humana. Naturalmente se encuentra en el suelo, el agua, las rocas, el aire y los alimentos (Gomez Caminero y col., 2001).

El F es el decimotercer elemento más abundante de la corteza terrestre, se encuentra dentro de la familia de los halógenos y entre las propiedades químicas más importantes podemos mencionar su alta electronegatividad y reactividad. Forma parte de la composición de algunos minerales y sus sales inorgánicas están presentes naturalmente en el suelo, el agua y los alimentos. Diversas actividades agrícolas e industriales (uso de plaguicidas, cerámica, quema de carbón, vidrio, catalizadores, etc.) contribuyen a sus altas

concentraciones en el medio ambiente. Dado que es un elemento esencial para el desarrollo de los dientes y huesos, en algunos países se añade al agua potable o a la sal para proteger a la población de las caries dentales, pero su exposición a concentraciones más altas que las permitidas puede ocasionar toxicidad (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2017).

Numerosos estudios científicos hacen referencia a la presencia de iAs y F en diferentes concentraciones y en diferentes acuíferos, entre ellos Asia, Africa y Latinoamérica (NRC, 2006; Dutta, 2013; Yang y col., 2013), sin embargo, son escasas las investigaciones que hacen referencia a la coexistencia de estos elementos en el agua de bebida, como así también los efectos que producen sobre la salud (Chouhan and Flora, 2010; Rosso y col., 2011; Nicolli y col., 2012; Alarcón Herrera y col., 2013; González Horta y col., 2015).

### **1.1 Niveles permitidos de As y F**

En Argentina, existen muchos cursos hídricos superficiales y subterráneos que poseen niveles de iAs y F mayores a los permitidos por el Código Alimentario Argentino (CAA) y la OMS, en particular los situados en las provincias que integran la región Chaco-Pampeana. Muchos de éstos son utilizados para consumo humano, por lo tanto en las zonas afectadas, la población es susceptible a distintas enfermedades de origen hídrico (Esposito y col., 2013; Villaamil Lepori, E. C., 2015).

En su última versión de las Guías de Calidad de Agua para consumo humano, la OMS establece como valor orientativo que la concentración máxima permitida de As es 0.01mg/L, debido a la incertidumbre científica existente sobre los riesgos a bajas concentraciones y las dificultades prácticas para conseguir su eliminación hasta esos niveles (OMS, 2017).

En nuestro país, el CAA establece lo siguiente: “La autoridad sanitaria competente podrá admitir valores distintos, si la composición normal del agua de la zona y la imposibilidad de aplicar tecnologías de corrección lo hicieran necesario. En aquellas regiones del país con suelos de alto contenido de arsénico, la autoridad sanitaria competente podrá admitir valores mayores a 0.01 mg/L con un límite máximo de 0.05 mg/L cuando la composición normal del agua de la zona y la imposibilidad de aplicar tecnologías de corrección lo hicieran necesario; ello hasta contar con los resultados del estudio Hidroarsenicismo y Saneamiento Básico en la República Argentina - Estudios básicos para el establecimiento de criterios y prioridades sanitarias en cobertura y calidad de aguas (CAA, 2021)”. Dicho estudio consiste en realizar una evaluación epidemiológica del impacto sanitario del consumo de aguas arsenicales en poblaciones de todo el país.

En el caso del F, la OMS establece en la Guías de Calidad del Agua un valor de 1.5 mg/L, mientras que la cantidad máxima permitida por el CAA en agua destinada a consumo, está establecida en función de la temperatura promedio de la zona y teniendo en cuenta el consumo diario del agua de bebida, estableciéndose como límites inferiores y superiores a 0.6 y 1.7 mg/L, respectivamente.

## **1.2 Toxicocinética y toxicodinamia del iAs**

La principal fuente de exposición a iAs es el uso de agua contaminada para diferentes propósitos domésticos, siendo la vía digestiva la principal ruta de absorción. El iAs, tanto en su forma pentavalente como trivalente, se absorbe en el tracto gastrointestinal (80% a 90%), distribuyéndose posteriormente en diferentes tejidos. Para ingresar a la célula, el iAsIII utiliza acuaporinas 3 y 10, polipéptidos transportadores de aniones orgánicos, transportador de glucosa

dependiente de sodio y la vía paracelular (Calatayud y col., 2012), mientras que el iAsV es absorbido a través de transportadores de fosfato.

En su metabolismo hepático, el iAsV puede reducirse a iAsIII, seguido de una serie de reacciones de metilación y conjugación, produciéndose la reoxidación de iAsIII a iAsV en algunas de ellas. Las especies trivalentes son más citotóxicas, más genotóxicas y más potentes inhibidores enzimáticos en comparación con las pentavalentes (Thomas y col., 2001). Históricamente, se ha considerado que los metabolitos metilados presentan una menor toxicidad y reactividad que el iAs, pero diversas investigaciones refieren que los intermediarios metabólicos metilados trivalentes, como el ácido monometilarsenioso (MMAIII) y el ácido dimetilarsenioso (DMAIII), son más citotóxicos que iAsIII, iAsV, el ácido monometilarsónico (MMAV) y el ácido dimetilarsínico (DMAV) (Styblo y col., 1999, 2000; Petrick y col., 2001; Dopp y col., 2004; Hall y Gamble, 2012; Zamora y col., 2014).

La principal ruta de eliminación de los compuestos arsenicales en sus formas trivalentes y pentavalentes es a través de la vía renal.

Con respecto a la toxicodinamia, existen numerosas líneas de investigación que hacen referencia a los mecanismos de toxicidad del iAs a distintos niveles (moleculares, subcelulares, celulares, tisulares, orgánicos, sistémicos y los asociados a carcinogénesis (Olmos y col., 2018).

El arsenito y los intermediarios metabólicos trivalentes, inhiben alrededor de 200 proteínas y enzimas, entre ellas la glutatión reductasa (GR), la tiorredoxina, la tiorredoxina reductasa, las enzimas reparadoras de ADN (ácido desoxirribonucleico), las ADN ligasas, y la piruvato kinasa (Hughes 2002; Shen y col., 2013; Kim y Kim, 2015). Esta inhibición se produce por unión del iAs a grupos sulfhidrilos de cisteínas localizadas en las estructuras proteicas, a sitios activos enzimáticos o por unión a cofactores enzimáticos ditiólicos.

El arseniato puede sustituir al fosfato en muchas reacciones bioquímicas, uniéndose a grupos hidroxilos y dar como resultado ésteres de arseniato, que son más lábiles y se hidrolizan más fácilmente (Hughes y col., 2011).

Adicionalmente, el arseniato se une a la adenosina difosfato (ADP) para formar el ADP-arseniato, desacoplando la fosforilación oxidativa y alterando la producción de adenosina trifosfato (ATP) en las mitocondrias. Este mecanismo es conocido como arsenólisis y puede ocurrir también durante la glucólisis (Chouhan y Flora, 2010). Por lo tanto, el iAsV pueden causar toxicidad por ocasionar alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, falla energética y disfunción mitocondrial.

El iAs está implicado también en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o en la inhibición de distintas enzimas antioxidantes del organismo. Las ROS son producidas como consecuencia del metabolismo aeróbico fisiológico normal celular, siendo las más representativas los aniones superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), los radicales hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Las acciones protectoras contra las ROS son llevadas a cabo por diversas enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y también por compuestos no enzimáticos (vitamina E, ascorbato, glutatión, transferrina, ceruloplasmina, etc.). A niveles fisiológicos, las ROS son moduladores cruciales de las funciones celulares, participando en las vías de señalización celular, la inducción de la respuesta mitogénica y la defensa contra agentes infecciosos, pero ante situaciones de daño o envejecimiento, se produce un aumento de la formación de las ROS, alterando la función celular, promoviendo el daño en lípidos, ácidos nucleicos y proteínas e induciendo apoptosis (Singh y col., 2011; Olsen y col., 2013; Prakash y col., 2015). Este desbalance entre la producción de las ROS y los sistemas de defensas

antioxidantes en los sistemas ocasiona un estado conocido como estrés oxidativo (Lu y col., 2014; Forman, 2016).

El mecanismo de formación de ROS ocasionado por el iAs no está totalmente esclarecido, podría tratarse de un mecanismo directo de inducción de peroxidación lipídica por parte del arsenito o de sus intermediarios metabólicos, también podría generarse como consecuencia de la inhibición de la actividad de enzimas como la GR y la tiorredoxina reductasa, o debido a la estimulación de las enzimas NADH o NADPH oxidasas (Flora, 2011; Hughes y col., 2011; Jomova y col., 2011). Existen otros mecanismos que postulan esta formación de ROS, como la liberación del hierro de la ferritina por parte del iAs o de algunos de sus intermediarios metabólicos, la oxidación de arsenito a arseniato, o mecanismos secundarios a la citotoxicidad inducida (Ahmad y col., 2000; Del Razo y col., 2001; Hughes y col., 2002; Wei y col., 2005).

Con respecto a los mecanismos que ejercen su acción a nivel neuronal, se encuentran los que alteran el metabolismo de los neurotransmisores (dopamina [DA], norepinefrina [NE], serotonina [5-HT]) y ácido  $\gamma$ -aminobutírico [GABA]) y los que actúan sobre sus respectivos receptores, provocando disfunciones neuroconductuales en la locomoción, la ansiedad y la memoria, entre otras (Rodríguez y col., 2003).

Se ha demostrado que el iAs está involucrado en mecanismos epigenéticos. La biotransformación del iAs realizada por las metiltransferasas y la recuperación de grupos sulfhidrilos para mantener una adecuada capacidad de amortiguación redox, consume SAM (S-Adenosil metionina). La SAM es requerida también para los cambios dependientes de metilación tales como la metilación del ADN y la modificación de histonas. Por lo tanto, la exposición al iAs afecta el control epigenético de los genes de expresión por la reducción o agotamiento de los niveles de SAM (Martinez y col., 2011; Rojas y col., 2015).



Por otro lado, si bien la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) incluye al iAs en el Grupo 1, dentro de los agentes carcinógenos para los seres humanos IARC (IARC, 2012), los mecanismos por los cuales se desarrollan los distintos tipos de cáncer aún permanecen sin esclarecer. Entre ellos se encuentran la genotoxicidad, la alteración de la reparación del ADN, la modificación de histonas, la alteración de la metilación del ADN y la proliferación celular (Chanda y col., 2006; Faita y col., 2013; Dodmane y col., 2013; Holcomb y col., 2017; Tam y col., 2017).

Mecanismos adicionales hacen referencia a diferentes efectos sobre la reproducción, el eje adenohipofisario (Li y col., 2012; Ronchetti y col., 2014) y el sistema inmune (Hunt y col., 2014).

### **1.3 Toxicocinética y toxicodinamia del F**

El F inorgánico es ingerido a través del agua y los alimentos, y se absorbe principalmente (75-90%) en el intestino delgado proximal a través de uniones estrechas, transportadores acoplados de protones y transportadores aniónicos de proteínas Band3 (Mondal y col., 2019). Una proporción menor es absorbida en el estómago como fluoruro de hidrógeno (10-25%). Los máximos niveles plasmáticos se alcanzan entre los 20-60 min posteriores a su ingestión, reteniéndose aproximadamente el 99% en huesos y dientes (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, ATSDR, 2003). Se excreta a través de la vía renal, y sólo una fracción menor a través de las heces y sudor (Villa y col., 2010, Buzalaf y Whitford, 2011).

Diferentes publicaciones hacen referencia a los distintos mecanismos por los cuales el F ejerce su acción tóxica. Entre ellos podemos mencionar el bloqueo del metabolismo celular, la inhibición de la glucólisis, interferencia con el

metabolismo del calcio y alteración en la conducción de los impulsos nerviosos (Strunecka y col., 2007; Pain G., 2017; Guth y col., 2020; Strunecka y col., 2020).

El F es un potente inhibidor enzimático, por lo tanto se produce una alteración en la funcionalidad y en diferentes eventos que participan en la señalización celular (Murphy y Coll, 1992; Baykov y col., 1999; Chouhan y Flora, 2010; Kajander y col., 2013; Waugh, 2019).

Algunos autores sugieren que el estrés oxidativo es el mecanismo clave de la toxicidad del fluoruro. La exposición al F puede reducir los niveles celulares de Glutación reducido (GSH) e inhibir la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), glutación peroxidasa (GPx), GR y superóxido dismutasa (SOD) provocando un aumento de las ROS (Srivastava y Flora, 2020; Ailani y col., 2009). El F produce peroxidación lipídica, siendo el malondialdehído (MDA) el indicador biológico cuantificable como nivel de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Adebayo y col., 2013; Varol y col., 2013; Reddy y col., 2014).

Adicionalmente, el F influye sobre la síntesis de distintos neurotransmisores (adrenalina, 5-HT, glutamato [Glu], NE, acetilcolina [ACh] y DA), sobre la expresión de distintos receptores, la actividad enzimática y la plasticidad de las neuronas, produciendo daños estructurales y funcionales en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Bhatnagar y col., 2006; Chirumari y Redy, 2007).

Existen otros mecanismos de toxicidad, como la unión a iones calcio, disminución de los niveles de células del sistema inmune, daños sobre el ADN e inducción de apoptosis (Li y col., 1987; Singh y col., 2016).

#### 1.4 Toxicidad crónica del iAs y el F en humanos

El consumo crónico de agua contaminada con As durante años a niveles más altos que los permitidos, da lugar al desarrollo de una enfermedad que afecta muchas regiones del mundo y es conocida como Hidro Arsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE) que presenta una sintomatología característica (queratosis, hiperpigmentación y neoplasia). Adicionalmente, puede provocar numerosos efectos tóxicos en diferentes tejidos, órganos y sistemas, siendo los más conocidos, la aparición de alteraciones cardiovasculares (ateroesclerosis, hipertensión, enfermedad vascular periférica), alteraciones en el metabolismo de la glucosa, hepatotoxicidad (hepatomegalia, fibrosis portal), nefrotoxicidad, efectos sobre el sistema inmune, sobre el tracto gastrointestinal, la reproducción y el eje adenohipofisario (Singh y col., 2011; Calatayud y col., 2013; Dangleben y col., 2013; Rodríguez y col., 2016; Li y col., 2018). Con respecto a su carcinogenicidad, los principales órganos afectados son la piel, la vejiga, el hígado y el pulmón (IARC, 2012).

Con respecto al F, personas que están expuestas crónicamente, pueden presentar alteraciones neurológicas, cardiovasculares, gastrointestinales, y hormonales, siendo las manifestaciones más comunes la fluorosis dental y la esquelética (Spak y col., 1989; Dasarathy y col., 1996; Ayoob y Gupta, 2006; Rovet JF, 2014; Srivastava y Flora, 2020). La gravedad de estas alteraciones dependen de distintos factores, entre ellos la edad, la ingesta diaria y las características individuales de las personas expuestas.

### **1.5 Neurotoxicidad del iAs y F en humanos**

Las investigaciones realizadas sobre los efectos que producen el iAs y el F a nivel del SNC, son menores en comparación a los estudios realizados sobre el cáncer, la genotoxicidad y la alteración de distintos tejidos, órganos o células. Ambos elementos, una vez absorbidos y metabolizados (en el caso de iAs, junto a sus metabolitos), pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), acumularse en diferentes áreas cerebrales y producir neurotoxicidad (Varner y col., 1998; Xi y col., 2010).

Numerosos trastornos del desarrollo neurológico que incluyen autismo, déficit de atención y dislexia, entre otras discapacidades cognitivas, afectan a millones de niños en todo el mundo y gran parte de los mismos son producto de la injuria producida por químicos que afectan el desarrollo del sistema nervioso (Grandjean y Landrigan, 2014). El cerebro es un órgano que presenta una alta sensibilidad al daño oxidativo debido a la alta utilización de oxígeno, una baja capacidad detoxificante y a sus elevados niveles de lípidos y ácidos grasos insaturados (Patel, 2016; Salim, 2017). La acumulación de iAs y/o F en el SNC puede facilitar la formación de ROS y de esta manera conducir a la neurotoxicidad (Flora, 1999; Shila y col., 2005; He y col., 2006; Rodríguez y col., 2010).

Investigaciones realizadas en niños expuestos a iAs a través del agua de bebida revelaron alteraciones en el desarrollo neurológico y cognitivo, con afectación del coeficiente intelectual, alteraciones en la memoria y la atención (Rodríguez Barranco y col., 2013). Otros estudios clínicos realizados en adultos que estuvieron expuestos crónicamente a iAs mostraron diversas alteraciones en el aprendizaje, la memoria y la concentración, con confusión mental y aumento de la ansiedad (Bolla Wilson y Bleecker, 1987; Morton y Caron, 1989; Hall, 2002; Rodríguez y col., 2003). También se ha asociado su exposición con el desarrollo

de la enfermedad de Parkinson, neuropatía periférica y polineuropatías tipo Guillain-Barré (Vahidnia y col., 2007; Singh y col., 2011).

En el caso del F, diferentes estudios revelan que el mismo produce disfunciones neurológicas que incluyen: alteraciones en la atención, en el coeficiente intelectual, la memoria, el sensorio, el aprendizaje y el estado emocional (Choi y col., 2012; Sharma y col., 2017; Lu y col., 2000; Till y col., 2020).

También podría estar involucrado en la etiología de otros trastornos neurológicos como el autismo, fluctuaciones del comportamiento, pérdida de la coordinación motora, parálisis de brazos y piernas, y en algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson (Blaylock, 2004; Carton y Park, 2006; Prystupa, 2011).

### **1.6 Neurotoxicidad del As o F en animales de experimentación**

Diversos estudios de investigación en roedores hacen referencia a los efectos provocados sobre la actividad locomotora y el aprendizaje como consecuencia de la exposición al iAs. En un estudio realizado en ratones de 4 semanas de edad, se administró diariamente iAs a través de la vía oral, utilizando diferentes dosis durante un período de 14 días. Se evaluó la actividad locomotora luego de la primera y de la segunda semana de la exposición, observándose que en la primera semana aumenta la actividad locomotora de los animales expuestos a dosis bajas, y en la segunda semana disminuye la actividad locomotora de los animales expuestos a dosis altas (Tadanobu y col., 1990).

En otro estudio experimental, se expusieron a iAs ratas macho adultas por vía intragástrica durante 2, 3 y 4 semanas, demostrando una disminución de la actividad locomotora y algunas alteraciones en el aprendizaje (Rodríguez y

col., 2001). También se observó que el iAs afecta la memoria en ratas de diferentes edades expuestas a altas concentraciones durante tres meses. Se evidenciaron alteraciones significativas en la memoria de corto plazo en los animales adultos, y en la memoria a largo plazo en los animales jóvenes (Bikashvili y col., 2017). El iAs también está involucrado en el estado depresivo de los animales de experimentación. En ratas expuestas en forma subcrónica a iAs, se observaron alteraciones en el tiempo de inmovilidad de la prueba de nado forzado, indicando un comportamiento compatible con un aumento en la depresión (Samad y col., 2021).

Se ha demostrado que la exposición crónica a iAs aumenta el estrés oxidativo en las mitocondrias del cerebro de ratas, seguidos de un aumento en la formación de ROS, carbonilación de proteínas y peroxidación lipídica (Jomova y col., 2011, Flora S.J., 2011 y Prakash y col., 2015). Adicionalmente, se altera el factor de transcripción mitocondrial A, conduciendo a una disminución en la biogénesis mitocondrial (Prakash y Kumar, 2016). Los radicales peroxilo también pueden ser generados por el iAs y a su vez mediar la peroxidación lipídica y la acumulación de subproductos oxidados, causando daños deletéreos en diferentes áreas cerebrales.

Varios trabajos realizados en roedores expuestos a iAs a través del agua de bebida demuestran que este elemento puede producir un desbalance en los niveles de neurotransmisores, provocando una disfunción neuroconductual. En estudios realizados en ratas Wistar jóvenes expuestas a diferentes concentraciones de iAs durante 6 semanas, se observó un aumento en el nivel de Glu extracelular, excitotoxicidad y cambios en la expresión del receptor GLT-1 y Glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) en hipocampo (HPC) (Huo y col., 2014). La exposición a iAs produce en corteza cerebral de ratones una

*downregulation* de la subunidad GluA1 del receptor del Glu  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-del ácido metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Maekawa y col., 2013).

Estudios realizados *in vitro* sugieren que en la microglia, el iAs activa el sistema de intercambio de la cisteína/Glu para aumentar los niveles de Glu extracelular, mientras que en los astrocitos, el iAs disminuye la expresión y los niveles de actividad de la glutamina sintetasa y de los transportadores de Glu (Castro Coronel y col., 2011; Zhao y col., 2012; Singh y col., 2016).

Un estudio realizado en ratas demostró que el iAs induce un aumento en los niveles de DA y 5-HT, con una disminución en los niveles de NE en diversas regiones cerebrales (Mejia y col., 1997). Otro estudio demostró que la exposición realizada a ratones con iAs durante 60 días, redujo los niveles de NE, DA y 5-HT en el cerebro (Zhang y col., 2013). En otro estudio se expusieron ratas a diferentes concentraciones de iAs a través del agua de bebida y se observó una disminución en los niveles de DA en el CPu y en el hipotálamo sólo en las hembras (Bardullas y col., 2009). Por el contrario, en otro estudio, se observó un incremento en el contenido de DA en el CPu en los machos, sin alteraciones en las otras áreas cerebrales (Rodríguez y col., 2010). La exposición a altos niveles de iAs, producen déficits más evidentes en la señalización dopaminérgica y serotoninérgica en el CPu, HPC y CPF (Yadav y col., 2009, 2010).

Varias publicaciones demuestran que el iAs está involucrado en la alteración del sistema colinérgico. En roedores, el iAs inhibe la síntesis, liberación y recaptación de la ACh y como consecuencia de esto, se observa un aumento de la actividad de la colina acetiltransferasa (CHAT) (enzima encargada de la síntesis de la ACh), con una disminución de la acetilcolinesterasa (AChE) (Kobayashi y col., 1982, 1987; Vani y Reddy, 2000; Rodriguez y col., 2001; Yadav y col., 2011).

Con respecto al F, diversos estudios realizados en animales revelaron que se acumula en distintas áreas cerebrales, entre ellas el HPC, la amígdala, la corteza cerebral y el cerebelo. Diversos estudios experimentales hacen referencia a los efectos provocados sobre la coordinación y la actividad locomotora como consecuencia de su exposición. En un estudio realizado en ratones hembras adultas, se administró 120 mg/L de F a través del agua de bebida durante 30 días, y se observaron notables cambios en la coordinación motora (Bhatnagar y col., 2002). Diversas investigaciones realizadas en roedores expuestos a F, demostraron diversas alteraciones en la memoria y el aprendizaje (Gui y col., 2010; Jiang y col., 2014; Zhang y col., 2001). En un estudio realizado en ratones expuestos a 68 mg/L de F a través del agua de bebida durante 120 días, se observaron alteraciones en las pruebas que evalúan la ansiedad y el comportamiento depresivo (Li y col., 2019). También se ha demostrado que diferentes exposiciones a F, producen un aumento del estrés oxidativo, registrándose una disminución de actividad en las enzimas antioxidantes CAT, glutatión peroxidasa (GPx), GSH reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD) (García Montalvo y col., 2009; Chauhan y col., 2013; Banala y Carnati, 2015).

Otras investigaciones realizadas demuestran que el F puede producir modificaciones en el contenido de monoaminas, catecolaminas y 5-HT en diversas regiones cerebrales en los animales que fueron expuestos. En un estudio realizado en ratas adultas hembras expuestas a F, se reportó un aumento significativo en los niveles de DA y 5-HT en el HPC y en la corteza de dichos animales, con una disminución de epinefrina y NE (Chirumari y Reddy, 2007).

En otro estudio realizado en ratas adultas macho expuestas a F a través del agua de bebida, se registró un aumento de NE y 5-HT en el CPu, HPC y



corteza. También se observó DA elevada en el CPu de animales expuestos al fluoruro (Pereira y col., 2011).

Con respecto al metabolismo del Glu, diversos estudios comprobaron que existen alteraciones de sus niveles en el HPC y en la CPF en ratas, como así también en las actividades de las enzimas relacionadas con su metabolismo, incluyendo la aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y ácido glutámico descarboxilasa (Niu y col., 2009; Jiang y col., 2014).

El F también afecta la transmisión del impulso nervioso colinérgico a nivel central, alterando el número de receptores nicotínicos de la ACh (nAChR) y reduciendo la actividad de la acetilcolinesterasa en el cerebro de ratas que fueron expuestas a F (Long y col., 2002; Chen y col., 2003; Gao y col., 2009; Flora y col., 2009; Singh y col., 2013; Thadani y col., 2014; Singh y col., 2014; Akinrinade y col., 2015).

### **1.7 Toxicidad prenatal y durante el desarrollo**

En el período embrionario de humanos y roedores, el SNC es altamente sensible a los agentes tóxicos (Anderson y col., 2000). El iAs y el F son capaces de atravesar las barreras placentarias y BHE, acumularse en el cerebro y provocar diversos disturbios neuroconductuales y neuroquímicos (Luo y col., 2009; Xi y col., 2010).

El iAs, al ingresar al cerebro, también puede metilarse y acumularse en diferentes regiones que expresan arsenito metil transferasas (Rodríguez y col., 2005; Sánchez Peña y col., 2010,). Las especies metiladas en circulación también pueden atravesar la BHE, pero los mecanismos implicados no han sido estudiados.

La exposición gestacional de ratones a iAs induce alteraciones en la plasticidad sináptica y en el aprendizaje y memoria, asociados con un aumento

en los niveles de Glu extracelular y a una *downregulation* de las subunidades del receptor AMPA y NMDA (Ramos Chavez y col., 2015; Nelson Mora y col., 2018).

En un estudio realizado en ratas preñadas donde se administró iAs a través del agua de bebida entre el DG1 y el DPN 21, se observó una disminución de la actividad locomotora en las crías (Chandravanshi y col., 2019). En otras investigaciones se expusieron roedores a iAs a través del agua de bebida durante las primeras etapas de gestación y desarrollo, observándose un incremento en la actividad locomotora vertical y diversas alteraciones en la memoria (Rodríguez y col., 2002; Martínez-Finley y col., 2009).

Estudios realizados en ratas en nuestro laboratorio demostraron que la administración de bajas concentraciones de iAs durante la gestación y la lactancia, alteró en las crías algunos parámetros neuroconductuales, observándose un retraso en la adquisición de los reflejos sensoriomotores, una disminución de la actividad locomotora y un aumento de la sensibilidad al estímulo nociceptivo. Adicionalmente, las crías adultas cuyas madres fueron expuestas a bajas concentraciones de iAs, presentaron una disminución de la memoria de larga duración y de la ansiedad (Gumilar y col., 2015).

Por otro lado, la toxicidad por exposición al iAs durante la etapa gestacional también se ha relacionado con cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes, una disminución en los niveles de expresión del receptor neuronal nicotínico  $\alpha 7$  y una alteración en el desarrollo de los sistemas colinérgico, dopaminérgico, noradrenérgico, glutamérgico y serotoninérgico (Ramos Chavez y col., 2015; Nelson Mora y col., 2018; Mónaco y col., 2018; Chandravanshi y col., 2019).

Con respecto al F, diversas investigaciones de exposición realizadas en roedores durante el período gestacional, demostraron alteraciones en el comportamiento, observándose disminución en la actividad locomotora, ansiedad

y depresión (Laloux y col., 2012; Liu y col., 2014). Otros estudios evidenciaron alteraciones en el aprendizaje y la memoria, con inhibición de la expresión de ARNm de las subunidades del receptor de Glu (GluR) en HPC e inducción de estrés oxidativo (Bera y col., 2007; Sun y col., 2018; Ferreira y col., 2021).

Estudios realizados en nuestro laboratorio revelaron que la exposición a bajas concentraciones de F durante etapas tempranas del desarrollo produce en las crías hembra jóvenes y adultas una disminución de la ansiedad. También se observó en las crías adultas hipoactividad y aumento de la emocionalidad (Bartos y col., 2015). Posteriormente, se demostró que la exposición a F durante las etapas tempranas del desarrollo produce una disminución de la memoria de larga duración, de la expresión del receptor nicotínico neuronal  $\alpha 7$  (nAChR) y de la actividad de CAT, AST, ALT, SH<sup>-</sup> y AChE en diversas áreas cerebrales implicadas en desórdenes neuroconductuales (Bartos y col., 2022, 2019, 2018).

Los efectos observados en los estudios experimentales previamente mencionados, fueron dependientes de la especie animal utilizada, la vía de administración, el período de exposición y las concentraciones de iAs o F utilizadas.

### **1.8. Evaluación de toxicidad por co-exposición e interés de su investigación**

La exposición simultánea del iAs y del F puede modificar la cinética o las propiedades toxicológicas con respecto a cada uno en su forma aislada, influir individualmente sobre los efectos adversos, los mecanismos de acción u órganos a los que afecta.

Diversos estudios revelaron que administrando estos elementos en forma conjunta pueden ejercer un efecto antagónico, un efecto aditivo, mostrar un

efecto final sinérgico, un efecto potenciado e incluso un efecto nuevo (Calderón y col., 2003; Rao y Tiwari, 2006; Flora y col., 2009 y 2012; Jiang y col., 2014).

Sárközi y colaboradores estudiaron los efectos sobre la locomoción y la toxicidad general producida por la administración conjunta de iAs y F a ratas macho adultas, utilizando una sonda gástrica durante 6 semanas. Se concluyó que el iAs, solo o combinado con el F, produce una disminución de la actividad locomotora y del rearing (elevación sobre las patas posteriores del animal). El F, por su lado, no evidenció efecto propio ni influenció sobre los efectos del iAs. Finalmente, teniendo en cuenta las concentraciones utilizadas y el tiempo de co-exposición evaluado, no se pudo demostrar la existencia de interacción entre el iAs y el F (Sárközi y col., 2015).

En otra investigación, se observó que la co-exposición a iAs/F produce efectos tóxicos menos pronunciados, comparados con los efectos de iAs y F administrados individualmente, concluyendo que esto ocurre debido posiblemente a una interacción en los sitios gastrointestinales que interfiere con la absorción de estos elementos (Mittal y Flora, 2006). En otra investigación se expusieron ratones machos durante 10 semanas a iAs y F a través del agua de bebida, demostrando que la exposición combinada no conduce necesariamente a una toxicidad más pronunciada, ya que se observaron algunos efectos antagónicos en comparación a la exposición individual (Flora y col., 2009).

Estudios posteriores realizados en ratones machos adultos, en donde se evaluó el estrés oxidativo y la integridad del ADN, confirmaron que la toxicidad individual de iAs o del F es mayor que la producida por estos dos elementos combinados (Flora y col., 2012).

Investigaciones previas realizadas determinaron que la capacidad de aprendizaje y memoria disminuye en ratas expuestas a iAs/F, en comparación con los controles. El mecanismo puede estar asociado con cambios en los

niveles de Glu y de expresión mGluR5 en la corteza y el HPC (Jiang y col., 2014). Estos resultados corroboraron los obtenidos previamente por Wu y col., 2006, donde demostraron que la exposición conjunta de estos elementos durante 90 días realizadas en ratas jóvenes Wistar y a través del agua de bebida, reduce la capacidad de aprendizaje y memoria.

Otras investigaciones demostraron que el tratamiento combinado de iAs/F produce alteraciones en la expresión de genes relacionados con procesos inflamatorios, aberraciones cromosómicas, aneuploidía y apoptosis (Rao y Tiwari, 2006; Salgado Bustamante y col., 2010).

En resumen, los resultados obtenidos al evaluar las toxicidades individuales producidas por iAs o F, incluyendo sus efectos sobre el SNC, son ampliamente documentadas en la literatura tanto en humanos como en animales de experimentación, pero estos datos, en general, hacen referencia a exposiciones realizadas a la edad adulta, y a altas dosis o concentraciones. Existe escasa bibliografía respecto a los posibles efectos e interacciones que estos elementos pueden ocasionar a las personas que consumen agua de perforación durante la gestación y lactancia, donde estos elementos pueden estar presentes en bajas concentraciones. Los efectos de la combinación de ambos elementos que pueden producir sobre diversas funciones cognitivas y neuroconductuales durante estas etapas han sido poco estudiados, y los resultados, son contradictorios. En relación a lo anteriormente expuesto, es que esta tesis se plantearon diferentes objetivos, cuyos resultados podrían aportar a una mejor evaluación de riesgo.

# **OBJETIVOS**

### **1.9. Objetivos generales y específicos de esta Tesis**

El objetivo general de esta tesis fue evaluar el efecto neurotóxico de concentraciones bajas de la combinación iAs/F, presentes en acuíferos de varias regiones de nuestro país, en crías de ratas jóvenes y adultas de ambos sexos, expuestas durante la gestación y la lactancia, como así también dilucidar los posibles mecanismos moleculares de neurotoxicidad producidos por dicha co-exposición.

Los **objetivos específicos** fueron:

- Evaluar la adquisición de reflejos sensoriomotores en las crías de 3 días de edad.
- Evaluar la funcionalidad del sistema nervioso autónomo y central mediante la realización de una batería de observaciones funcionales en crías jóvenes y adultas.
- Evaluar la actividad locomotora, la ansiedad y el estado depresivo a ambas edades.
- Evaluar diferentes tipos de memoria: de corta duración, de larga duración y memoria de reconocimiento.
- Determinar o cuantificar marcadores de estrés oxidativo en distintas áreas cerebrales implicadas en los desórdenes neuroconductuales, como indicio del posible mecanismo neurotóxico provocado por la co-exposición de iAs/F.
- Evaluar distintas vías de neurotransmisión implicadas en los disturbios observados, como la colinérgica y la glutamatérgica, en distintas áreas cerebrales.

- Comparar los resultados previos existentes de la exposición individual de estos elementos con los obtenidos como consecuencia de la co-exposición, con el fin de evaluar la aparición de efectos nuevos, sinérgicos o antagónicos.



# **MATERIALES Y METODOS**

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Materiales**

Se utilizó arsénico en forma de Arsenito de sodio (AsNaO) y se adquirió en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), protegido de la luz solar. El flúor fue comprado como Fluoruro de sodio (NaF) a Anedra (San Fernando, Buenos Aires, Argentina).

### **2.2. Animales y diseño experimental**

Los animales utilizados como parentales fueron ratas albinas de la cepa Wistar, nulíparas, entre 80-90 días de edad al momento del inicio del ensayo. Las mismas se obtuvieron de colonias de crías pertenecientes al Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur.

Durante el transcurso de los experimentos se mantuvieron en dicha dependencia en condiciones constantes de temperatura ( $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) y humedad relativa (60-70 %). La iluminación fue artificial, con una frecuencia de ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Las ratas fueron alojadas en jaulas metálicas y recibieron libre acceso al agua y alimento (Ganave®, Alimentos Pilar S.A., Argentina).

A las hembras provistas por el bioterio se les controló el ciclo estral. Dicho ciclo tiene en promedio una duración de cuatro a cinco días, y ocurre desde el inicio de la pubertad hasta la senescencia, incluso durante el posparto (Kohn y Clifford, 2002). Los diferentes cambios producidos a nivel de los ovarios, útero, vagina y conducta, son debidos a fluctuaciones en los niveles de gonadotrofinas, hormonas sintetizadas por la hipófisis. Las ratas generalmente muestran ciclos regulares que no se interrumpen fácilmente, y constan de cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro (Tabla 2.1).

<b>FASE</b>	<b>Duración (hs)</b>	<b>Citología vaginal</b>	<b>Conducta</b>
<b>Proestro</b>	~12	Frotis vaginal con células epiteliales nucleadas.	Receptividad a la copulación en la etapa final de la fase.
<b>Estro</b>	~12	Frotis vaginal con células nucleadas (75%) y cornificadas (25%)	Máxima receptividad. Lordosis. Copulación. Máxima probabilidad de fertilización.
<b>Metaestro</b>	~21	Frotis vaginal con abundante cantidad de leucocitos con células nucleadas y cornificadas.	Ausencia de receptividad.
<b>Diestro</b>	~57	Frotis vaginal con abundante leucocitos.	Ausencia de receptividad.

**Tabla 2.1:** Principales características del ciclo estral de las ratas.

Para la detección de la fase del ciclo estral se realizó un examen de la morfología celular vaginal a través de un frotis tomado a una hora fija del día, ya que se produce una variación de las poblaciones celulares a lo largo de las 24 horas. Se recolectaron las secreciones vaginales y se observaron las características microscópicas de los frotis. En la etapa del proestro las ratas hembra fueron colocadas en las jaulas junto a los machos durante la noche, en una proporción de 3/1 (3 hembras por cada macho). A la mañana siguiente se consideraron preñadas aquellas que presentaron espermatozoides en los extendidos vaginales. Esto fue registrado como día de gestación 0 (DG 0).

Las hembras preñadas se pesaron y alojaron individualmente en jaulas de policarbonato (~860 cm<sup>2</sup> y 18 cm de altura) y fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos: a) grupo control, b) grupo experimental tratado con la combinación A, y c) grupo experimental tratado con la combinación B.

Las ratas del grupo control fueron provistas con agua de red, reemplazando la misma en forma diaria.

La combinación **A** se preparó disolviendo arsenito de sodio y fluoruro de sodio en agua de red, en una concentración final de 0.05 + 5 mg/L iAs/F.

La combinación **B** se preparó disolviendo arsenito de sodio y fluoruro de sodio en agua de red, en una concentración final de 0.1 + 10 mg/L iAs/F.

Las concentraciones de iAs y F utilizadas en el diseño experimental se encuentran presentes en distintos cursos hídricos de nuestro país y corresponden a una proporción de 5 y 10 veces más en relación a los niveles máximos permitidos por la Organización Mundial de la Salud.

Ambas combinaciones se administraron a las ratas preñadas desde el DG 0 hasta el día posnatal 21 (DPN 21), día en el que se realizó el destete. Una vez destetadas, se retiraron las combinaciones A y B de las jaulas y se reemplazaron por agua de red. Luego se evaluaron las crías a los 45 (jóvenes) y 90 (adultas) días de edad, a los fines de poder observar efectos tempranos que persisten o revierten en la adultez y efectos nuevos que no se observaron tempranamente. Se utilizó un macho y una hembra de cada camada para los diferentes ensayos neuroconductuales y neuroquímicos, teniéndose en cuenta el grado de estrés de cada prueba, empleando las mismas crías, o reemplazándolas por otras.

### **2.3. Registro de pesos corporales, consumo de agua y alimento de las madres y de las crías**

Previamente a la realización de los diferentes experimentos se midieron diversos parámetros. Los pesos corporales se determinaron utilizando una balanza Marca AND modelo EK1200A. Se registró el aumento de peso materno y la ingesta de alimento en diferentes DG (DG 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 20). Dentro de las 24 h posteriores al nacimiento, se registró la duración de la gestación, el número de crías por sexo y el peso de las mismas (de manera conjunta, por camada). Este último parámetro se controló en los DPN 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 y 21 y fue considerado como indicativo de la evolución del desarrollo y madurez de

las crías. Por otra parte, se controló el consumo diario de agua. En el DPN 21, las crías fueron destetadas, provistas de agua de red y alojadas en grupos de seis, según el sexo y tratamiento recibido, hasta los DPN 45 y DPN 90 respectivamente.

## **2.4. Evaluaciones neuroconductuales**

### **2.4.1. Evaluación de los reflejos sensoriomotores**

A partir del tercer DPN de cada cría (DPN 3) o tercer día de edad, cada cría fue evaluada con una batería de pruebas de desarrollo. Se realizó una prueba de ensayo por día a cada cría: reflejo de enderezamiento, aversión al precipicio, geotaxis negativa y apertura de ojos y oídos (Molina y col., 1987). La variable dependiente analizada para cada prueba consistía en el DPN en el cual cada cría alcanzó la madurez del reflejo o condición de acuerdo con diferentes criterios.

#### **Reflejo de enderezamiento**

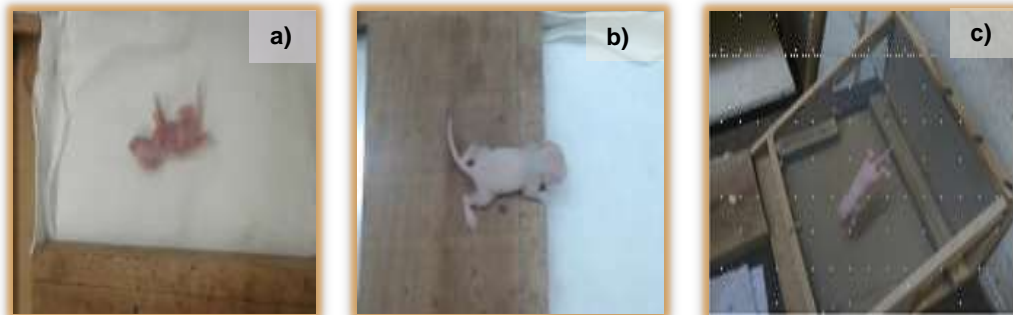
Cada cría fue colocada en posición supina sobre una superficie cubierta por una tela y se registró la latencia hasta que cada una logró enderezar su cuerpo. Este reflejo es considerado maduro cuando cada cría logra esta respuesta en un tiempo menor a 5 s en 2 días consecutivos (Fig. 2.1).

#### **Aversión al precipicio**

Cada cría fue colocada con sus patas delanteras en el borde de una plataforma de madera y el hocico sobresalía más allá del borde de la misma plataforma. Se registró la latencia para retraer su cuerpo a 1,5 cm del borde. El criterio de aversión al precipicio se registró como maduro cuando la cría realizó esta respuesta en menos de 5 s en 2 días consecutivos (Fig. 2.1).

### **Geotaxis negativa**

Cada cría fue colocada sobre una rampa de malla de alambre inclinada (ángulo de inclinación desde la base: 30°) con la cabeza hacia abajo. Este reflejo se registró como maduro cuando la cría alcanzó una rotación de 180° del cuerpo y sube hacia arriba en un tiempo menor a 10 s durante 2 días consecutivos (Fig. 2.1).



**Fig. 2.1:** Reflejos sensoriomotores evaluados en las crías: a) reflejo de enderezamiento b) aversión al precipicio c) geotaxis negativa.

### **Apertura de ojos y oídos**

Se registró el DPN en los que ambos ojos y canales auditivos se abrieron completamente.

#### **2.4.2. Evaluación de los Sistemas Nervioso Central y Autonómico. Batería de observaciones funcionales (BOF)**

Esta metodología consiste en la observación de un conjunto de parámetros que evalúan diferentes aspectos de la funcionalidad del sistema nervioso de los animales, tales como la función neuromuscular, sensorial y autonómica (U.S. EPA, 1998; Allen, 2010).

Para ello se evaluó una serie de parámetros a los cuales se le asignó una escala de puntuación con las posibles manifestaciones o respuestas que podía realizar el animal sobre dicho parámetro. Los datos obtenidos a partir de las

observaciones realizadas correspondieron a tipos de datos diferentes, según la escala de puntuación empleada para cuantificarlos:

✓ *Datos binarios (B)*: obtenidos en parámetros en los cuales sólo podía haber dos respuestas posibles (ausencia/presencia o reacción/no reacción);

✓ *Datos descriptivos(D)*: obtenidos en parámetros en cuyas escalas cada puntuación correspondía a la descripción de uno entre varios estados posibles;

✓ *Datos ordinales (O)*: presentes en parámetros en los cuales las respuestas se evaluaron según una escala de intensidad creciente (0-8, de respuesta ausente a severa)

✓ *Datos continuos (C)*: representan valores obtenidos de mediciones cuantitativas (longitud, cantidad) (Moser y Ross, 1996).

En primer lugar, se registró el comportamiento espontáneo de cada rata en su caja: la postura en la que se encontraba, el grado o nivel de actividad, la apertura de párpados, la presencia o ausencia de temblores, convulsiones con movimientos tónicos o clónicos, vocalizaciones espontáneas y mordisqueo.

Posteriormente se retiró el animal de su caja evaluando el grado de dificultad de remoción y su reactividad frente a su manipulación. En esta etapa, se realizó una observación clínica general del animal, evaluando signos de lagrimeo y salivación, apariencia del pelo y el reflejo prensil de las garras.

A continuación, se colocó a cada rata en el centro de un campo exploratorio, cuyas medidas fueron 70 x 50 x 10 cm de altura, cubierto con una hoja limpia absorbente de papel madera. Luego de cada observación cada hoja fue reemplazada para evitar cualquier alteración en la conducta de los animales evaluados posteriormente debido a la presencia de rastros de olor (Bind y col., 2013). Se permitió que el animal explorara el campo libremente y sin interferencias durante

3 minutos, observando la conducta frente al ambiente desconocido. Los parámetros registrados fueron: características de la marcha, postura y la presencia de estereotipias (conductas repetitivas y sin sentido). Al finalizar dicha evaluación, se observó y registró el número de bolos fecales, número de manchas de orina y presencia o ausencia de diarrea.

Luego se registró la respuesta de cada cría respecto a diversos tipos de reflejos y diferentes reacciones posturales, las cuales se detallan a continuación:

#### **Reflejos sensoriales:**

- ✓ *Auditivo:* se hizo sonar un “click” metálico 5 cm por encima y detrás de la cabeza de la rata;
- ✓ *Visual:* se acercó un objeto por delante del animal y se lo mantuvo a una distancia de 3 cm del hocico durante 4 segundos;
- ✓ *Táctil:* se tocó un flanco de la rata con un objeto romo;
- ✓ *Nociceptivo:* se ejerció presión leve con una pinza metálica en la cola del animal, a una distancia de 3 a 4 cm desde el extremo distal de la misma;
- ✓ *Pupilar:* se registró la respuesta de contracción pupilar frente a un haz de luz dirigido a la pupila de cada ojo.
- ✓ *Palpebral:* se rozó suavemente el borde del párpado con una varilla delgada de metal;
- ✓ *Pinnal:* se tocó suavemente el interior de la oreja con una varilla delgada de metal.

#### **Reflejos motores:**

- ✓ *Flexor:* se extendió una de las patas posteriores, se pellizcó y se registró la respuesta/fuerza flexora;
- ✓ *Extensor:* se presionó las patas posteriores hacia el cuerpo y se evaluó la respuesta/fuerza extensora.



- ✓ *Reflejo del salto (“hopping”)*: se sostuvo a la rata con ambas manos de modo que uno de sus miembros anteriores y ambos posteriores permanecieran plegados contra su cuerpo. El miembro anterior libre se apoyó sobre la superficie del área de evaluación y se deslizó al animal hacia un lado, de manera que el miembro anterior se moviliza dando pequeños saltos para sostener el peso del cuerpo. Se procedió de igual manera con el otro miembro anterior.
- ✓ *Reflejo propioceptivo*: se apoyó a la rata sobre la superficie y se extendió hacia atrás uno de sus miembros posteriores, de manera que la parte dorsal de la extremidad queda apoyada sobre la superficie. Se liberó el miembro y se registró si éste retornaba a la postura normal
- ✓ *Extensión de miembros anteriores*: se elevó a la rata hasta una altura de 30 cm sujetándola desde la base de la cola, y se la acercó lentamente hacia la superficie. Se observó si el animal extendía los miembros anteriores en busca del apoyo sobre la superficie.
- ✓ *Extensión de los miembros posteriores*: se elevó al animal sujetándolo por el tórax y se lo acercó hacia la superficie. Se registró si la rata extendía los miembros posteriores en busca del apoyo basal.
- ✓ *Reacción de enderezamiento en superficie*: se sujetó a la rata en posición supina sobre la superficie, con su región ventral hacia arriba, y se la suelta posteriormente. Se registró la reacción del animal para retornar a su posición normal, con sus cuatro miembros apoyados sobre la superficie.
- ✓ *Reacción de enderezamiento aéreo*: se sujetó a la rata en posición supina, elevada a una altura de 20 cm y se la dejó caer sobre el campo exploratorio. Se registró si el animal gira sobre su dorso en el aire y cae sostenido sobre sus cuatro patas.

- ✓ *Separación de los miembros posteriores al caer (“landing foot splay”):* se pintaron las bases de las patas posteriores con tinta al agua. Se sostuvo a cada animal por la región del tórax y proximal de la cola, y se lo dejó caer dos veces desde una altura de 30 cm sobre una superficie cubierta por una hoja de papel. Posteriormente se midió la distancia de centro a centro de las marcas de tinta (cm) y se usó el promedio de los dos valores de separación.

Todos los detalles del procedimiento, observaciones, parámetros, escalas de puntuación y tipo de datos mencionados se realizaron de acuerdo a lo establecido en el Manual de Referencia para una Batería de Observaciones Funcionales (Moser y Ross, 1996) y se presentan a modo de resumen en la siguiente Tabla 2.2:

**Tabla 2.2:** Parámetros evaluados en la batería de observaciones funcionales realizada en ratas. Para cada parámetro, se indica el tipo de dato y la escala de puntuación empleada.

Parámetros	Dato		Puntuación
<b>Dentro de la caja</b>			
Postura	D	1 2 3 4 5	Acostado, dormido Acostado, despierto Sentado o parado, normal Rearing Avanza a tirones
Actividad	O	1 2 3 4	Inactivo, acostado o parado Actividad ocasional Activo de manera continua Muy activo
Párpados	O	1 2 3 4	Bien abiertos Ligeramente caídos Ptosis: caídos hasta la mitad del ojo Completamente cerrados
Convulsiones	D	0 1 2	Ausentes Clónicas (contracciones y relajaciones) Tónicas (contracciones constantes)
Mordisqueo	D	0 1 2	Ausente Muerde la caja Muerde en forma autodestructiva
Vocalizaciones	B	0 1	Ausente Presente

Continuación en la página siguiente

Continuación Tabla 2.2

<b>Fuera de la caja</b>			
Facilidad de remoción	O	1	Fácil, sin o poca vocalización, sin o ligera resistencia
		2	Moderadamente difícil, rearing
		3	Difícil, corre alrededor de la caja, con o sin vocalización
Reactividad a la manipulación	O	1	Fácil, alerta
		2	Moderadamente fácil, sin resistencia
		3	Difícil, se retuerce, se enrosca, intenta morder
Salivación	O	1	Ausente
		2	Leve
		3	Severa
Lagrimo	O	1	Ausente
		2	Leve
		3	Severo
Apariencia del pelo	D	1	Normal
		2	Levemente sucio
		3	Muy sucio, costroso
		4	Áspero, erizado
Respiración	D	1	Normal
		2	Disnea: respiración dificultosa
		3	Apnea:
		4	Cianosis en cola, hocico y patas
		5	Taquipnea: respiración rápida y superficial
Signos cardiovasculares	D	1	Normal
		2	Bradycardia
		3	Taquicardia
		4	Vasodilatación: enrojecimiento de la piel, cuerpo caliente
		5	Vasoconstricción: palidez de la piel, cuerpo frío
		6	Arritmia
Tono de los miembros	D	1	Miembros flácidos
		2	Algo flácidos
		3	Tono normal
		4	Miembros rígidos
Tono abdominal	D	1	Flácido
		2	Normal
		3	Resistente
Reflejo prensil	B	0	Ausente
		1	Presente

Continuación en la página siguiente

Continuación Tabla 2.2

En el campo arena experimental			
Alerta	O	1	Muy bajo
		2	Bajo: algún movimiento de cabeza o del cuerpo, sniffing, rearing
		3	Algo bajo: algunos movimientos de exploración con períodos de inmovilidad
		4	Normal: alerta, con movimientos exploratorios
		5	Algo elevado: ligera excitación, movimientos rápidos y repentinos
		6	Muy elevado: hiperalerta, excitado, con corridas repentinas
Marcha	D	1	Normal
		2	Ataxia: movimientos incoordinados
		3	Marcha en puntas de pie (tip-toe gait)
		4	Miembros posteriores separados
		5	Miembros posteriores muy flexionados
		6	Marcha tambaleante
		7	Arrastra los miembros posteriores
		8	Incapacidad para caminar
Postura	D	1	Normal
		2	Muy curvado
		3	Aplastado
Estereotipias	D	1	Ausente
		2	Sniffing
		3	Grooming en forma repetitiva y de larga duración, sin pausa
		4	Retropulsión (camina para atrás)
		5	Giro continuo en forma circular
		6	Automutilación
Movimientos inusuales	D	1	Ausentes
		2	Temblores o sacudidas en miembros o todo el cuerpo
		3	Mioclonus (movimientos involuntarios leves, contracción de masa muscular)
		4	Temblores con mioclonus
		5	Fasciculaciones (contracciones involuntarias de los músculos faciales)
		6	Cola de Straub (cola elevada sigmoidea)
Bolos fecales	C	-	N° de bolos fecales depositados
Manchas de orina	C	-	N° de manchas de orina depositadas
Diarrea	B	0	Presente
		1	Ausente

Continuación en la página siguiente

Continuación Tabla 2.2

<b>Reflejos sensoriales</b>			
Respuesta auditiva	O	1	No reacciona
		2	Reacciona levemente, sacude las orejas o manifiesta evidencia que escucha el ruido
		3	Respuesta más enérgica
		4	Se inmoviliza, contracción muscular
		5	Reacción exagerada: salta, muerde o ataca
Respuesta visual	O	1	No reacciona
		2	Leve aproximación, olfateo o desvío del objeto
		3	Respuesta más enérgica
		4	Se inmoviliza, contracción muscular
		5	Reacción exagerada: salta, muerde o ataca
Respuesta táctil	O	1	No reacciona
		2	Se aleja, se desvía
		3	Respuesta más enérgica
		4	Se inmoviliza, contracción muscular
		5	Reacción exagerada: salta, muerde o ataca
Respuesta al dolor	D	1	No reacciona
		2	Se marcha, se desvía ligeramente
		3	Respuesta más enérgica
		4	Se inmoviliza, contracción muscular
		5	Reacción exagerada: salta, muerde o ataca
Reflejo pupilar	B	0	No responde
		1	Responde (miosis)
Reflejo palpebral	B	0	No responde
		1	Responde (el párpado se cierra rápido y completamente )
Reflejo pinnal	B	0	No responde
		1	Responde (las orejas se aplastan sobre la cabeza)
<b>Reflejos motores</b>			
Reflejo flexor	B	0	No flexiona dichos miembros
		1	Flexiona los miembros posteriores
Reflejo extensor	B	0	No extiende dichos miembros
		1	Extiende los miembros posteriores
Reflejo del salto	B	0	No se moviliza adecuadamente
		1	Salta en una pata
Reflejo propioceptivo	B	0	La pata no retorna a su posición normal
		1	La pata retorna a su posición normal

Continuación en la página siguiente

Continuación Tabla 2.2

Reacciones posturales			
Extensión miembros anteriores	B	0 1	No extiende Extiende los miembros anteriores, cuello y tronco
Extensión miembros posteriores	B	0 1	No extiende Extiende los miembros posteriores
Enderezamiento en superficie	O	1 2 3	Normal, enderezamiento rápido Leve incoordinación No se endereza
Enderezamiento aéreo	O	1 2 3 4	Normal, enderezamiento en el aire Leve incoordinación Cae sobre un costado Cae de espaldas
Separación de los miembros posteriores al caer	C	-	Medición de la distancia (cm.) entre improntas de patas traseras
Referencia de los diferentes tipos de datos: descriptivos (D), ordinales (O), binarios (B) y continuos(C).			

Una vez finalizadas las evaluaciones de la BOF en los diferentes grupos de 45 y 90 días de edad, se pesó cada cría y se la guardó en su jaula respectiva para realizar las evaluaciones posteriores.

### 2.4.3. Evaluación de la actividad locomotora

La evaluación de la actividad motora se considera una prueba que evalúa la funcionalidad del sistema nervioso y refleja un conjunto complejo de conductas que integran diferentes procesos sensoriales, motores y asociativos (Hübler y col., 2005). Para analizar dicha actividad, las observaciones se llevaron a



**Fig. 2.2:** Dispositivo de campo abierto

cabo en un campo abierto experimental, también conocido como open field (OF), cuya dimensión fue 50 x 50 x 60 cm de altura. Una de las paredes del dispositivo es de naturaleza acrílica, cuya finalidad es facilitar las observaciones realizadas

a los animales. La base del OF estaba dividida en 16 cuadrados de 12 cm x 12 cm cada uno (Fig. 2.2).

Cada rata se colocó en el interior del OF, en una de las esquinas del mismo, contabilizando luego, en períodos de 5 minutos, durante 15 minutos, el número de cuadrados atravesados con las cuatro patas y el número de rearings realizados (posición en la que el animal se eleva sobre sus patas posteriores, quedando completamente erguido). Estos parámetros reflejan la actividad locomotora horizontal y vertical, respectivamente, y su disminución gradual en el transcurso de la sesión, es indicativa de una habituación por parte de los animales al campo abierto. La habituación es una de las formas más elementales de aprendizaje que involucra al hipocampo, donde la disminución de la exploración en función de la exposición repetida a un ambiente nuevo, se toma como índice de memoria (Thiel y col., 1999).

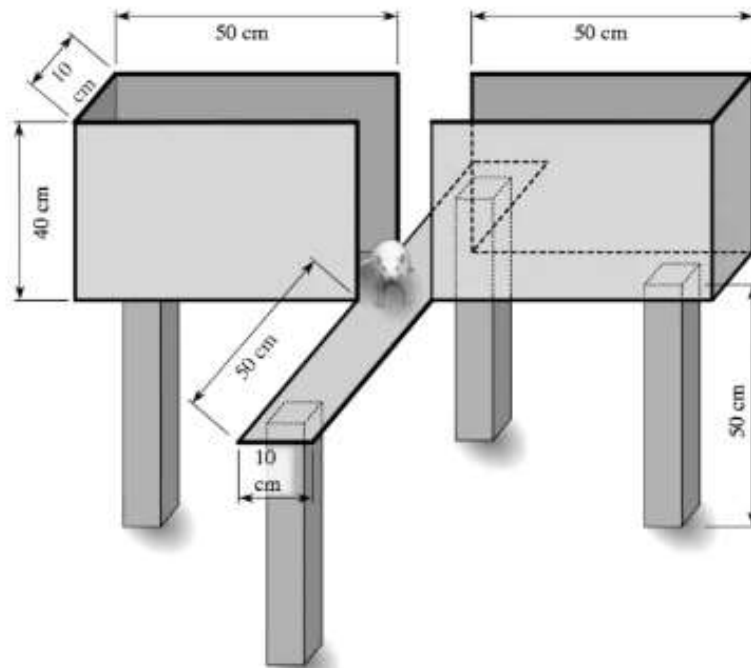
También se registró el número de groomings (lavado de cara, evidenciado por lamidos de la pata delantera y frotado ligero de la cabeza y conductas de acicalamiento) y la cantidad de bolos fecales depositados por el animal, ambos considerados como parámetros de emocionalidad (Kalueff y Tuohimaa, 2005; Brenes y col., 2009).

Una vez transcurrido el período de observación, cada rata fue devuelta a su caja y se limpió el dispositivo del OF con un algodón humedecido con agua y alcohol al 10 % con agua entre los ensayos para eliminar los rastros de olor que pueden interferir en la conducta de los animales.

#### **2.4.4. Evaluación de la ansiedad**

*El plus maze* elevado (PME) o “laberinto en cruz” es uno de los dispositivos más utilizados para estudiar la ansiedad y está constituido por cuatro brazos elevados a 50 cm del suelo, de iguales dimensiones (50 cm x 10 cm)

(Lister, 1987). El área delimitada central de los cuatro brazos es de  $10 \text{ cm}^2$  (Fig. 2.3). Esta prueba está basada en el comportamiento exploratorio de los roedores en un nuevo ambiente que presenta dos zonas: una potencialmente aversiva (brazos abiertos) y otra segura (brazos cerrados). En su estado natural la rata elige estar cerca de superficies verticales, preferiblemente rincones y lugares con poca iluminación; los brazos abiertos y las alturas le causan aversión, lo que explica porque la rata permanece más en los brazos cerrados que en los brazos abiertos. Este conflicto es suprimido por elementos que producen un efecto ansiolítico, los cuales aumentan selectivamente la exploración en los brazos abiertos (Sakae y col., 2015). El experimento se realizó contando las veces que las ratas ingresan a los brazos cerrados y abiertos y registrando el tiempo de permanencia en los mismos, en un período total de 5 min. La base del laberinto fue limpiada con un paño humedecido con etanol al 10 % luego de cada observación.



**Fig. 2.3:** Dispositivo de plus maze



#### **2.4.5. Evaluación de la memoria de corta y larga duración. Prueba de evitamiento inhibitorio**

La memoria puede definirse como la preservación de la conducta aprendida en el tiempo (Heise GA., 1984). Experimentalmente, la memoria está indicada por la precisión de una respuesta después de un retraso (intervalo de retención), entre la ocasión del aprender, y la prueba para recordar. Entre los diferentes tipos de memoria, la memoria aversiva ha sido reconocida por diversos autores como un mecanismo adaptativo que almacena la información relevante para la supervivencia, ya que va a influir sobre futuras respuestas ante estímulos estresantes similares (LeDoux, 2000; McGaugh, 2000; Joëls y col., 2011; Schwabe y col., 2012). Esta memoria se ha estudiado en animales de experimentación a través de diferentes pruebas de conducta, entre ellas, la prueba de evitamiento inhibitorio, donde se evalúa los efectos del estrés sobre la memoria emocional (Izquierdo y Netto, 1985; Wilensky y col., 2000; McGaugh y col., 2002). El estado de alerta producido por la naturaleza aversiva de un shock eléctrico, conlleva el desarrollo de conductas adaptativas, dirigidas a la evitación del contexto en donde recibieron el shock (Roosendaal y McGaugh, 2011).

Para realizar esta prueba, las crías de 45 y 90 días utilizadas anteriormente, se colocaron en forma individual sobre una plataforma elevada y ubicada a una altura de 2.5 cm del piso, dentro del aparato de condicionamiento (evitación pasiva). Parte de la base del mismo también está constituida por barras de acero inoxidable (Fig. 2.4). Veinticuatro horas antes de realizar el entrenamiento, cada cría se colocó en la plataforma y se le permitió explorar libremente la caja durante 180 seg con el objetivo de que la misma se habitúe al nuevo entorno. Durante el entrenamiento, se midió el tiempo en el que las crías demoraron en descender con las cuatro patas desde la plataforma y en ese momento recibieron un shock eléctrico de 0.6 mA de intensidad durante 2 seg.

Las sesiones de prueba se realizaron a los 90 min, para evaluar la memoria de corta duración (MCD) y a las 24 h, para evaluar la memoria de larga duración (MLD). Luego del entrenamiento, se registraron nuevamente los tiempos de latencia de descenso, pero sin la aplicación del shock eléctrico, reflejando en dichas medidas la retención de dichas memorias, (Izquierdo y Medina, 1997; Pereira y col., 2001).



**Fig. 2.4:** Dispositivo utilizado para la evaluación de memoria

#### **2.4.6. Evaluación de la memoria de reconocimiento. Prueba de reconocimiento de objeto nuevo o “NOR Test”**

Este modelo está basado en la preferencia que manifiestan los roedores por explorar objetos novedosos en comparación con los objetos familiares, permitiendo la evaluación de la memoria episódica por medio de tareas de reconocimiento de objetos (“NOR Test”) (Lamprea y col., 2005).

El protocolo empleado se realizó de acuerdo con el diseño experimental establecido por Leger y col. (2013), con modificaciones menores (Barbieri y col. 2016; Gallegos y col., 2018). Para esta prueba se realizó otra exposición, obteniéndose nuevos grupos de animales expuestos y controles. Se utilizó un grupo de animales para evaluar este tipo de memoria a los 45 días, y otro grupo de animales para evaluar la memoria a los 90 días de edad.

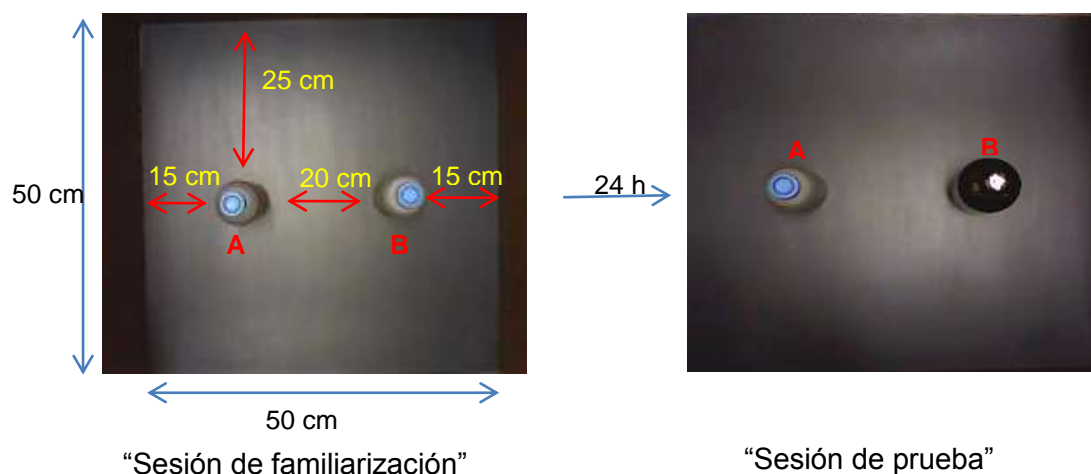
En una primera etapa del estudio experimental se colocaron dos botellas similares de plástico de 250 ml rellenas de arena y con sus tapas selladas, en dos extremos opuestos de un OF (Objeto A), a 15 cm de la pared lateral (Fig. 2.5). Luego se le permitió explorar a cada rata en el campo abierto durante 5 min, filmando un video por cada sesión. El criterio de exploración se definió como olfatear o tocar cada objeto con la nariz o las patas delanteras. Esta etapa está relacionada con la familiarización del animal con los objetos.

Transcurridas 24 h se procedió a realizar la segunda etapa, donde una de las botellas fue reemplazada por una botella de vidrio rellena con agua (Objeto B). Se dejó explorar nuevamente a la rata en el dispositivo durante 5 min, grabando la sesión. Esta etapa está asociada a la retención de la memoria del animal.

La preferencia de la rata por el nuevo objeto sobre el objeto familiar se midió con el programa de software automatizado desarrollado por Patel y col. (2014), utilizando el software MATLAB (MathWorks). La relación exploratoria expresada como porcentaje se determinó según la siguiente fórmula (Kubota y col., 2016):

$$\text{Exploración (\%)} = \frac{\text{Tiempo de exploración en objeto novedoso (seg.)}}{\text{Tiempo total de exploración en objeto familiar y novedoso (seg.)}} \times 100$$

Las diferencias significativas observadas entre las sesiones de familiarización y las sesiones de prueba corresponden a un comportamiento normal de los animales frente al objeto nuevo. La ausencia de diferencias entre dichas sesiones reflejan una alteración en la memoria de reconocimiento del animal.



**Fig. 2.5:** Prueba de reconocimiento de objetos (NOR Test). Esquema representativo que muestra las dimensiones y la distribución de los objetos en el OF en las etapas de familiarización y de prueba.

#### 2.4.7. Evaluación de la depresión. Prueba de nado forzado

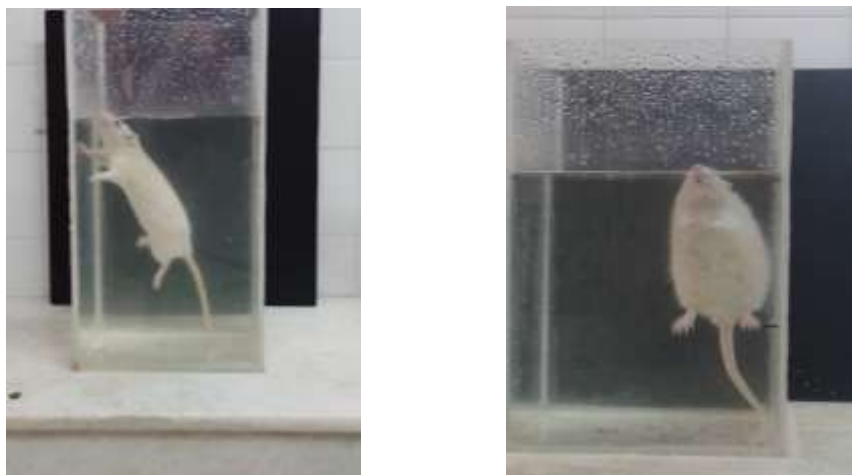
La prueba de nado forzado consiste en introducir a un animal (generalmente un roedor) en un recipiente con agua del que no puede escapar (Porsolt y col., 1977). El animal lucha por hacerlo, presentando una serie de conductas características como el nado, intentos de escalar por las paredes del recipiente, y alternando con periodos en los que se queda inmóvil.

Para ello, los animales de la prueba anterior fueron manipulados diariamente 5 días antes del experimento durante aproximadamente 2 min., utilizándose un recipiente acrílico transparente cuya dimensión fue 25 x 25 x 45 cm de altura. Se procedió al llenado de este dispositivo con agua de red a  $25 \pm 2$  °C, marcando el nivel de profundidad del agua de modo que el animal no pueda tocar el fondo del recipiente con sus patas traseras.

En una primera etapa de entrenamiento se colocó cada animal en un recipiente lleno de agua durante 10 min (Slattery y Cryan, 2012), después se

retiró y secó cuidadosamente con toallas para evitar la hipotermia. Finalmente se la devolvió a cada jaula. Cada animal fue observado y filmado en forma permanente mientras estuvo en el agua, cambiándose la misma después de cada sesión para evitar cualquier influencia o interferencia (Fig.2.6).

Transcurridas las veinticuatro horas, se realizó la etapa experimental, repitiéndose la misma operación del día anterior, pero colocando la rata en el contenedor durante 5 min y grabando la sesión en formato de video. Finalmente, se analizaron diferentes variables conductuales en cada una de ellas, registrándose el tiempo en el que la rata estaba "inmóvil" (el animal permanece flotando con ausencia de movimientos, manteniendo la nariz sobre el agua); el tiempo en estado de "lucha o escalada" (movimientos rápidos de las extremidades anteriores de modo que las patas delanteras agiten y salgan de la superficie del agua) y el tiempo de "nado" (movimiento de las extremidades anteriores o posteriores en forma de remo) (Yahav y col., 2015). La inmovilidad y disminución de nado o escalada observada en cada animal reflejaría un comportamiento depresivo.



**Fig. 2.6:** Imágenes fotográficas del dispositivo utilizado para realizar la prueba de nado forzado.

Todas las pruebas conductuales se realizaron en diferentes áreas adecuadas del Bioterio, previamente acondicionadas y en ausencia de ruidos, para evitar cualquier interferencia en el comportamiento y en los resultados obtenidos.

## **2.5. Determinaciones neuroquímicas**

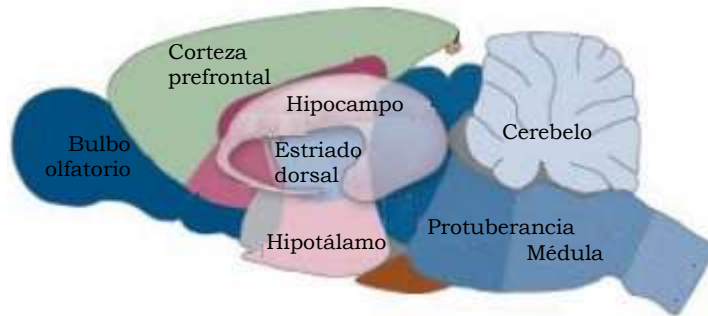
Para poder dilucidar los posibles mecanismos moleculares involucrados en los disturbios neuroconductuales observados previamente, realizamos distintos estudios bioquímicos en las áreas cerebrales más importantes que están involucradas. La elección de dichas estructuras se fundamenta en que las mismas ejercen control sobre diferentes funciones fisiológicas y conductuales, encontrándose involucradas en mecanismos que intervienen en la actividad locomotora y los movimientos (cuerpo estriado), la ansiedad y la depresión (corteza prefrontal) y la memoria (hipocampo) (Fig. 2.7 y Fig. 2.8).

### **2.5.1. Obtención de las áreas cerebrales**

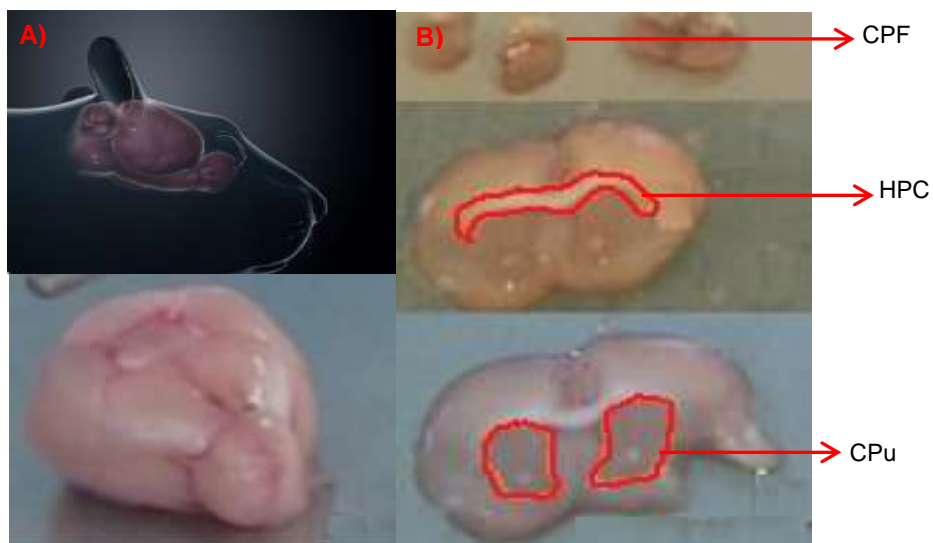
Las crías de 45 y 90 días fueron sacrificadas por decapitación (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011). Este procedimiento fue realizado por el veterinario responsable del Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia.

Luego se procedió con la extracción completa de los cerebros, enjuagando a cada uno con solución salina fría (PH 7,2). Posteriormente se realizaron las correspondientes disecciones, obteniendo las diferentes áreas cerebrales: corteza prefrontal (CPF), cuerpo estriado (CPu) e hipocampo (HPC), utilizando para ello una matriz acrílica, coronal para ratas (Stoelting Co, Illinois, EE.UU.). El análisis se realizó a partir de las secciones anteroposteriores (AP)

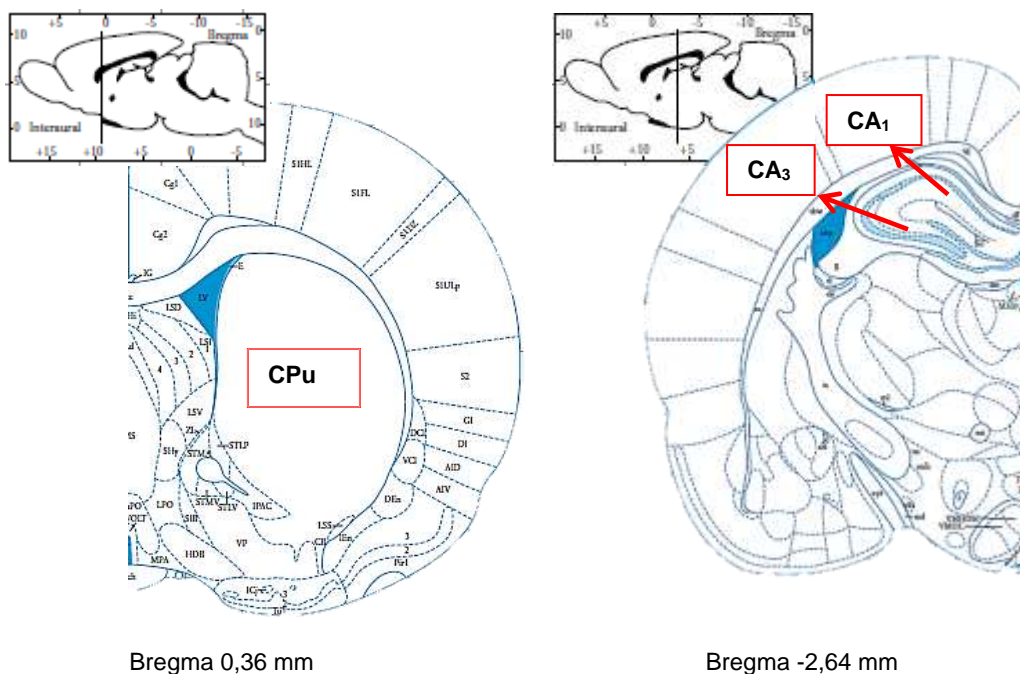
correspondientes a +0,12 mm a +0.36 mm para el CPu; -2,64 mm a -3,96 para las regiones C<sub>A1</sub> y C<sub>A3</sub> del HPC; y -3,16 mm a -3,28 para la CPF, respectivamente, en relación con el bregma (Paxinos y Watson, 2007) (Fig. 2.9).



**Fig. 2.7:** Esquema representativo de un corte cerebral transversal de rata.



**Fig. 2.8:** A) Imagen y fotografía de cerebro entero extraído de rata B) Cortes realizados de CPu, HPC y CPF adaptados de Spijker S. (2011).



**Fig. 2.9:** Diagramas representativos de las secciones coronales de las áreas cerebrales utilizadas para el análisis desde sección AP de +0,12 mm a +0,36 mm para CPU y -2,64 mm a -3,96 AP para HPC (regiones CA1 y CA3); en relación con bregma. Figura adaptada de Paxinos y Watson (2007).

Posteriormente, se homogeneizaron dichas áreas en tubos eppendorf con 10 volúmenes (1:10, p/v) de solución salina tamponada de fosfato (PBS; pH 7,4) enfriada con hielo. Luego se separó una alícuota del homogenado total de cada muestra para la determinación SH<sup>-</sup> y de proteínas, conservándola a -4°C. Finalmente se procedió a su centrifugación a 4000 rpm y los sobrenadantes resultantes se mantuvieron a 4°C hasta la determinación de las actividades enzimáticas y pruebas neuroquímicas..

### 2.5.2. Marcadores de estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una alteración en el equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y las defensas antioxidantes,



desempeñando un papel fundamental en los efectos neurotóxicos. Diferentes xenobióticos, entre ellos el As y el F, pueden inducir la formación de ROS, alterando los niveles de CAT y tioles totales.

### 2.5.2.1. Ensayo de catalasa

Entre los diferentes mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos que le permiten a la célula defenderse del daño provocado por el estrés oxidativo, la CAT es una de las principales enzimas involucradas. Su función es prevenir el daño oxidativo al interactuar directamente con las ROS y su determinación es utilizada como indicador de daño molecular de lípidos, proteínas y ADN, entre otros. Para ello, se midió la actividad de la CAT en distintas áreas cerebrales, según el procedimiento de Aebi (Aebi, 1984), con ligeras modificaciones. La reacción fue iniciada mediante la adición de 0.5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10% v/v en PBS) a la mezcla de reacción que contenía 100 ul de sobrenadante, 25 ul de Triton-X 100 (1/10) en PBS y 2.4 ml de PBS. La actividad enzimática se midió calculando la velocidad de degradación del peróxido de hidrógeno (sustrato de la enzima) durante 3 min a 240 nm, expresándose como la velocidad constante de una reacción de primer orden (k) relacionada con la cantidad de proteínas expresadas en mg. La fórmula utilizada para obtener los diferentes niveles de actividad fue la siguiente:

$$K = (2,3/\Delta t) (a/b) \log (A_{t_0}/A_{t_3})$$

donde:

$$\Delta t = t_3 - t_0 = 3 \text{ min}$$

$$a = \text{factor de dilución} = 25$$

$$A_{t_0} = \text{Abs tiempo 0}$$

$A_{13}$ =Abs tiempo a 3 min

Reemplazando en fórmula  $\longrightarrow k = (2.3/3)(25)\log(A_{t_0}/A_{t_3})$ :

$$k = 19.167 \cdot \log(A_{t_0}/A_{t_3}) = x/\text{min}$$

El resultado obtenido se lo dividió por el contenido de proteínas presentes en los 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante, obteniendo el valor final de la actividad de la enzima (k/mg prot.)

### 2.5.2.2. Determinación de tioles totales

Los tioles son compuestos que contienen un grupo funcional R-SH, confiriéndoles una alta reactividad. Como indicador de efecto protector en la homeostasis debido a su capacidad antioxidante, se determinó la cantidad de grupos tioles totales ( $\text{SH}^-$ ), utilizando el reactivo 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB). Éste reacciona con los grupos  $\text{SH}^-$  generando un derivado amarillo (ácido 3-tio-2-nitrobenzoico, TNB), el cual se mide espectrofotométricamente. La oxidación de los grupos  $\text{SH}^-$  libres de las proteínas conduce a la formación de enlaces bisulfuro, no pudiendo reaccionar con el DTNB, por consiguiente, el contenido de sulfhidrilos está inversamente relacionado con el daño oxidativo a las proteínas (Mazzola y col., 2016). La metodología empleada se realizó según el protocolo detallado por Aksenov y Markesbery (2001) con ligeras modificaciones. Para ello, se añadieron 30  $\mu\text{l}$  de homogenado total de cada área cerebral a 1 ml de PBS con EDTA 1 mM. La reacción se inició mediante la adición de 30  $\mu\text{l}$  de DTNB (10 mM en metanol) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se procedió a la centrifugación a 4000 rpm y se midieron las absorbancias de los sobrenadantes a 412 nm. El nivel de  $\text{SH}^-$  totales se determinó a partir de una curva estándar

preparada con diferentes concentraciones de GSH y fue expresada como  $\mu\text{mol TNB/mg}$  de proteína.

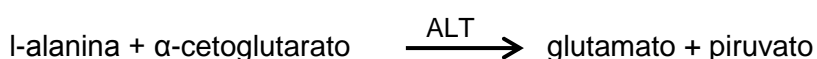
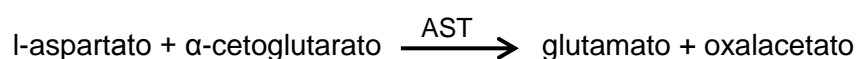
### 2.5.3. Evaluación de la vía glutamatérgica y colinérgica

#### 2.5.3.1 Evaluación del Glutamato

El Glu es el principal neurotransmisor excitatorio y juega un rol muy importante los procesos de memoria y aprendizaje. La entrada excesiva de este neurotransmisor al cerebro puede despolarizar a la neurona, dañándola. Una vez liberado este neurotransmisor en la hendidura sináptica, existen diversos mecanismos y vía enzimáticas que son activadas para mantener sus niveles en forma adecuada. Entre las enzimas relacionadas en su metabolismo se encuentran la ácido glutámico descarboxilasa (GAD), ALT (o glutamato-piruvato transaminasa, GPT) y AST (o glutamato-oxalacetato transaminasa, GOT) (OECD, 2016; Singh y col., 2019). Un aumento de la actividad enzimática de AST y ALT, podría conducir a niveles mayores de Glu, ocasionando daño celular y excitotoxicidad.

Para evaluar esta vía, se midieron las actividades de las enzimas AST y ALT, empleándose kits comerciales específicos y siguiendo las indicaciones establecidas por el fabricante (Wiener Lab., Rosario, Argentina)

Estas enzimas catalizan las siguientes reacciones:



El piruvato formado en ambas reacciones (en el caso de la AST, el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato), reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose, en medio alcalino, un compuesto coloreado que se mide a 505 nm.

**Reactivos:**

Reactivo A (para AST): solución con 100 mM de l-aspartato y 2 mM de  $\alpha$ -cetoglutarato en buffer fosfatos 100 mM, pH 7,4.

Reactivo A (para ALT): solución con 200 mM de dl-alanina y 2 mM de  $\alpha$ -cetoglutarato en buffer fosfatos 100 mM, pH 7,4.

Reactivo B: solución conteniendo 1 mmol de 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH) en ácido clorhídrico 1 mol/L.

Reactivo C: solución de hidróxido de sodio 4 mol/L.

**Técnica:**

	Blanco	Muestra
Reactivo A (AST o ALT)	0.25 ml	0.25 ml
Incubación de 2-3 min en baño de agua a 37°C		
Muestra		10 ul
Agua destilada	10 ul	
Luego se incubó 30 min agregándose:		
Reactivo B	0.25 ml	0.25 ml
Se incubó 10 min a 37 °C, agregándose:		
Reactivo C diluido	2.5 ml	2.5 ml

Luego de 2 min. se realizó la lectura de las absorbancias a 505 nm.

**Curva de calibración:** Se utilizó una solución testigo de piruvato de sodio 2 mmol/L, realizando la misma de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante del kit comercial

Las densidades ópticas del producto de las reacciones se midieron con un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1203, UV-VIS).

Los resultados de las actividades enzimáticas obtenidas se refirieron a la cantidad de proteínas presentes en cada muestra, expresándose en U/ $\mu$ g de proteínas.

### **2.5.3.2 Evaluación de la actividad colinérgica. Determinación de acetilcolinesterasa (AChE)**

La AChE es la enzima que cataliza la hidrólisis de la ACh, terminando así la acción del neurotransmisor liberada a la hendidura sináptica. La misma puede ser inhibida por distintos xenobióticos. Debido a su importancia para el funcionamiento del sistema nervioso y que su disminución puede deberse a daños en las neuronas colinérgicas o a los efectos nocivos inducidos por estrés oxidativo, se determinó su actividad en las áreas cerebrales aplicando el método de Ellman (Ellman y col., 1961). Una alícuota de cada sobrenadante fue incubada con yoduro de acetiltocolina (sustrato) y DTNB durante 10 minutos a 30 °C. La reacción enzimática fue detenida mediante la adición de una solución de eserina con una incubación a 0 °C durante 10 min. Cada actividad enzimática se calculó a partir de una curva estándar preparada con diferentes concentraciones de glutatión reducido, expresándose como  $\mu$ mol de tiocolina generada por minuto por miligramo de proteína. Las lecturas de las absorbancias se realizaron a 420 nm.

#### **2.5.4 Determinación de Fosfatasa alcalina (ALP)**

La fosfatasa alcalina (ALP) ejerce un rol importante en el desarrollo prenatal y en la maduración del SNC (Dreosti, 1983), particularmente en los procesos de diferenciación y comunicación neuronal (Marani, 1995). Una de sus isoenzimas, la fosfatasa alcalina tisular no específica (TNALP), es una isoenzima presente en el cerebro (Brun-Heath y col., 2011; Buchet y col., 2013) que escinde grupos fosfato presentes en nucleótidos y proteínas, proporcionándolos para diversas funciones celulares (Sharma y col., 2014; Akinrinade y col., 2015). La alteración de su actividad enzimática puede conducir a modificaciones en la homeostasis celular y en la síntesis de algunos neurotransmisores, como la serotonina y el GABA (Waymire y col., 1995; Narisawa y col., 2001).

En su cuantificación, esta enzima desdobla al fenilfosfato de sodio en medio alcalino tamponado con aminometil propanol (AMP). El fenol liberado se determina por reacción con 4-amino-antipirina y ferricianuro como agente oxidante. El color desarrollado es directamente proporcional a la actividad enzimática y se mide a 520 nm.

#### **Reactivos:**

Reactivo A: 4-aminoantipirina 29 mmol/L en solución de aminometil propanol 3 mol/L.

Reactivo B: fenilfosfato de sodio, 1,4 mmoles.

Reactivo C: ferricianuro de potasio, 10 mmol/L.

Solución Standard: solución de fenol equivalente a 200 UI/l.

**Técnica:**

	Blanco	Testigo	Muestra
Reactivo A	0.5 ml	0.5	0.5 ml
Se incubó 2-3 min en baño de agua a 37°C			
Muestra			50 ul
Testigo		50 ul	
Luego se incubó 10 min agregándose:			
Reactivo C	2.5 ml	2.5	2.5 ml

Finalmente se retiraron los tubos del baño y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 520 nm. La actividad enzimática se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

Fosfatasa alcalina (UI/l) = Factor x (Abs muestra – Abs blanco)

donde:

$$\text{Factor} = \frac{200 \text{ UI/l}}{(\text{Abs. Testigo} - \text{Abs. Blanco})}$$

**2.5.5. Determinación de proteínas totales**

La concentración de proteínas en los sobrenadantes se determinó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. El método se fundamenta en la unión del colorante Azul de Comassie (G-250) con las proteínas, causando un cambio en el máximo de absorción del mismo desde 465 a 595 nm. El tiempo de reacción es aproximadamente dos minutos, siendo el color estable durante una hora.

Reactivo de Bradford: 10 mg Azul de Coomassie G-250, 5 ml etanol 95%, 10 ml ácido fosfórico 85%. Enrasar con agua destilada hasta completar 100 ml.

**Técnica:**

	Blanco	Testigo BSA	Muestra
Reactivo (ml)	2.5	2.5	2.5
Agua destilada	5	-	-
BSA ( $\mu$ l)	-	5	-
Muestra	-	-	5

La curva de calibración se realizó a partir de una solución madre de 1 mg/ml de BSA. La cantidad de proteínas utilizadas en la curva fueron: 5, 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu$ g. Las absorbancias de las muestras se extrapolaron en la curva de calibración para obtener en términos de masa los  $\mu$ g de proteínas. Finalmente se refirieron a la cantidad de proteínas/alícuota de sobrenadante utilizado para las diferentes determinaciones.

**2.6 Análisis estadístico**

Los datos de los pesos corporales de las ratas madres con sus respectivas crías y los consumos de agua y alimento, se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de medidas repetidas y con pruebas de comparaciones múltiples *post-hoc* (DMS: Diferencias Mínimas Significativas de Fisher). Esta prueba es utilizada para detectar diferencias significativas de las medias observadas entre los grupos controles y experimentales. En los casos donde se detectaron interacciones entre los grupos y sexos, se analizaron los datos por separado utilizando ANOVA de una vía con la prueba DMS.

Los reflejos sensoriomotores se analizaron mediante ANOVA de dos vías (grupo x sexo), mientras que los resultados FOB se analizaron según los tipos de datos. Los datos continuos (que proporcionan datos de intervalo) se analizaron utilizando un ANOVA de dos vías seguido de comparaciones *post hoc* con DMS cuando se detectaron diferencias entre los grupos. Los datos ordinales o clasificados (rangos basados en una escala definida) se analizaron utilizando



el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y en caso de detectarse diferencias significativas, se realizaron comparaciones entre los grupos mediante la prueba de Mann Whitney-U (Markgraf y col., 2010). Para los datos descriptivos y binarios (la presencia o ausencia de un signo), cada grupo experimental se comparó con el grupo control utilizando una prueba de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ).

Los datos obtenidos en la evaluación de la actividad locomotora, se analizaron estadísticamente mediante la prueba de ANOVA de 2 vías, considerando el grupo y el sexo como factores principales de análisis y utilizando la prueba DMS para detectar diferencias entre los grupos. Los datos obtenidos en los 15 minutos totales se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de comparaciones *post hoc* utilizando la prueba de DSM. Para el análisis comparativo de los parámetros analizados cada 5 min, se utilizó una prueba ANOVA de medidas repetidas y con el fin de evaluar la habituación en cada período de 5 min y dentro de cada grupo, se utilizó una prueba T para muestras relacionadas.

Los datos obtenidos en la evaluación de la ansiedad, se analizaron estadísticamente mediante la prueba de ANOVA de dos vías, seguido de comparaciones *post hoc* utilizando la prueba DMS.

Para la evaluación de la memoria de corta y larga duración, y teniendo en cuenta que los tiempos de latencia no se corresponden con una distribución normal, los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba U de Mann-Whitney, para poder realizar la comparación entre los grupos. Este análisis se llevó a cabo considerando datos de sexos separados en cada sesión de la prueba de evitación inhibitoria (etapa de entrenamiento, 90 min y 24 h).

Para análisis comparativo en la prueba de memoria de reconocimiento de objetos (NOR), se realizó la prueba T para muestras relacionadas.

Los datos obtenidos en la prueba de nado forzado, se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de comparaciones *post hoc* utilizando la prueba de DSM.

Los datos obtenidos en las determinaciones enzimáticas, fueron analizados con ANOVA de dos vías, seguido de comparaciones *post hoc* utilizando la prueba de DMS.

En todas las pruebas estadísticas aplicadas, se consideraron como significativos los niveles inferiores a 0.05. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SPSS 19.0 de IBM (Chicago, IL) para Windows.

## **2.7 Ética**

La atención y manipulación de los animales se realizaron de acuerdo con la Guía internacional para el cuidado y uso de animales de laboratorio, aprobada y promulgada por el Instituto Nacional de Salud. El diseño experimental (077/2016) fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (CICUAE) del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia.

# RESULTADOS

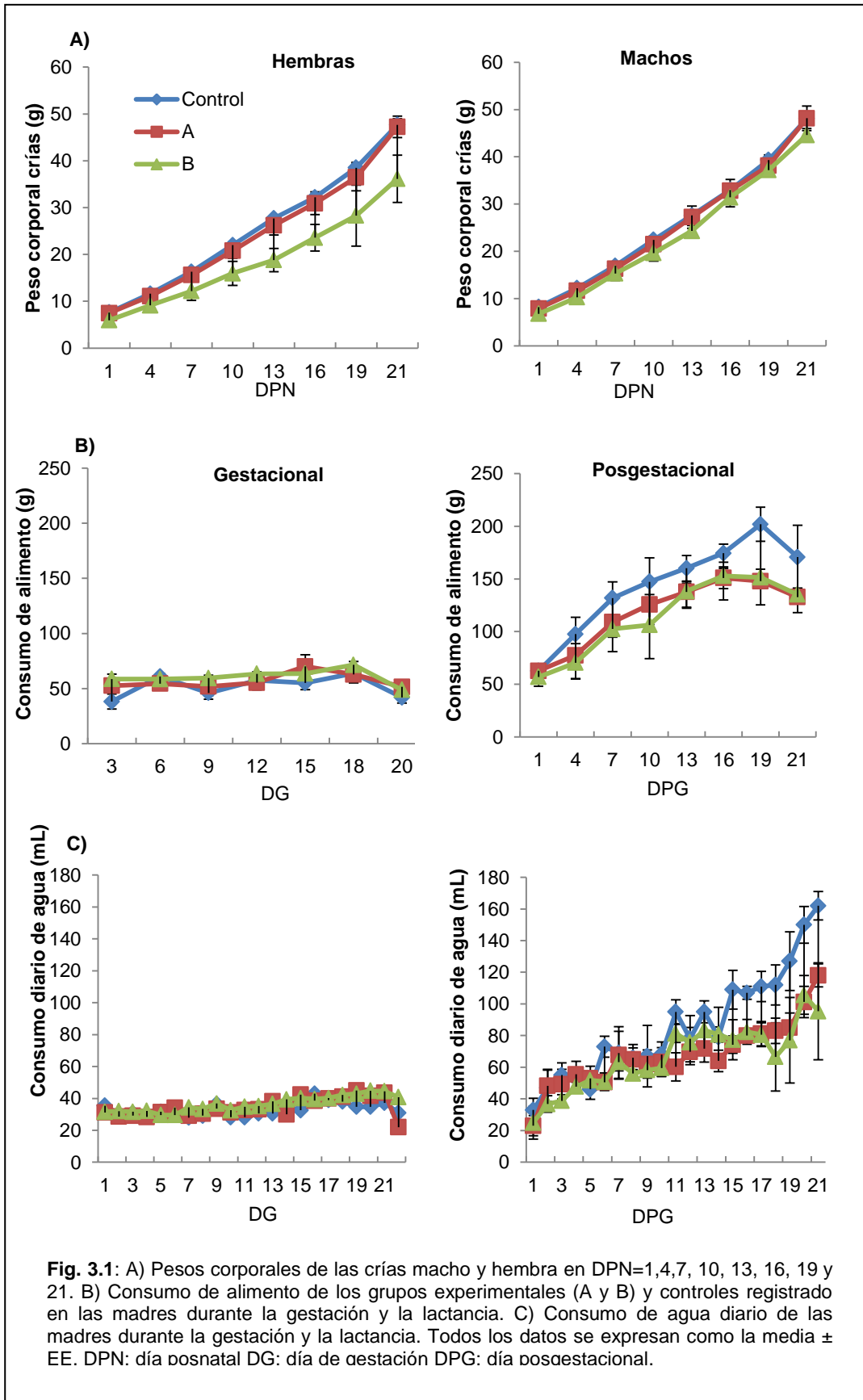
### **3. Resultados**

#### **3.1 Pesos corporales y consumos de agua y alimento**

La Tabla 3.1 muestra distintos parámetros obtenidos de las madres (ganancia de peso durante la gestación y duración de la misma) y sus crías (número total, número de hembras y machos, y peso corporal en los DPN 45 y 90). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal entre los distintos grupos de madres durante toda la gestación. No se evidenciaron diferencias significativas en el tiempo gestacional y en el número de crías obtenidas. Tampoco se observaron malformaciones teratogénicas visibles en ninguno de los grupos analizados. En la Fig. 3.1 se representa el aumento de peso corporal de las crías en los DPN 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 y 21, indicativos de la evolución de la preñez, del desarrollo y de madurez fetal (Fig. 3.1 A), y el consumo de alimento y agua de las madres durante la gestación y la lactancia (Fig. 3.1 B y Fig. 3.1 C).

	<b>Grupo de control</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
	n = 8	n = 10	n = 9
<i>Peso corporal de las madres (g)</i>			
DG 0	276.3 ± 13.3	300.8 ± 28.7	299.8 ± 8.8
<i>Aumento de peso (g)</i>			
DG 0-3	17.7 ± 4.2	9.25 ± 4.1	13.8 ± 2.2
DG 3-6	9.3 ± 3.5	8.5 ± 1.7	5.4 ± 1.6
DG 6-9	6.7 ± 3.9	7.2 ± 1.2	5.4 ± 1.5
DG 9-12	15.3 ± 4.2	17.5 ± 2.7	17.2 ± 2.6
DG 12-15	14.7 ± 1.9	16.7 ± 4.9	13.4 ± 2.1
DG 15-18	32.7 ± 8.1	28.5 ± 2.4	25.2 ± 2.0
DG 18-20	25.3 ± 6.9	27.0 ± 2.7	25.4 ± 3.1
DG 0-20	122.3 ± 19.2	114.8 ± 8.0	105.8 ± 7.7
Período gestacional (días)	22.0 ± 0	22.0 ± 0	22.0 ± 0
<i>Número de crías</i>			
Hembras	4.3 ± 1.9	5.8 ± 1.0	4.2 ± 1.0
Machos	6.3 ± 0.7	3.7 ± 0.6	3.6 ± 0.9
Total	10.7 ± 2.3	9.5 ± 1.2	7.8 ± 1.3
<i>Peso DPN 45 (g)</i>			
Hembras	173.3 ± 9.1	161.6 ± 5.0	126.3 ± 7.4
Machos	198.8 ± 9.5	195.4 ± 3.9	173.6 ± 7.4
<i>Peso DPN 90 (g)</i>			
Hembras	280.3 ± 10.3	262.5 ± 7.6	272.5 ± 7.6
Machos	412.3 ± 18.7	408.2 ± 8.5	398.3 ± 7.7

Los valores son expresados como las medias ± EE.



No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los pesos de las crías expuestas en los DPN 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 y 21, en comparación con el grupo control (Fig. 3.1 A). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de alimento ni en la ingesta de agua durante la gestación y la lactancia en las madres expuestas a ambas combinaciones de iAs/F, en comparación con el grupo control (Fig. 3.1 B y 3.1 C).

Con respecto al consumo de agua y alimento, el aumento significativo observado en la etapa posnatal, es debido a que las madres necesitan ingerir mayor cantidad de agua para poder producir la leche materna, y adicionalmente, las crías comienzan a beber agua junto a sus madres hasta el día del destete.

Con respecto a las crías, existió un aumento paulatino de peso corporal en todos los animales, y no se observaron diferencias significativas de las crías expuestas con respecto a las controles (Tabla 3.1 y Fig. 3.1). Tampoco se observaron diferencias significativas en los consumos de alimento ni en la ingesta de agua durante la etapa gestacional en las madres (Domínguez y col., 2021).

## **Resumen**

La co-exposición a la combinación de iAs/F no produjo variaciones en el consumo de alimento ni agua de las madres durante el período gestacional. Tampoco provocó alteración en la duración de la gestación, en el número de crías, ni en su crecimiento. No se observaron efectos teratogénicos visibles en las crías co-expuestas.

## 3.2 Evaluaciones neuroconductuales

### 3.2.1. Reflejos sensoriomotores

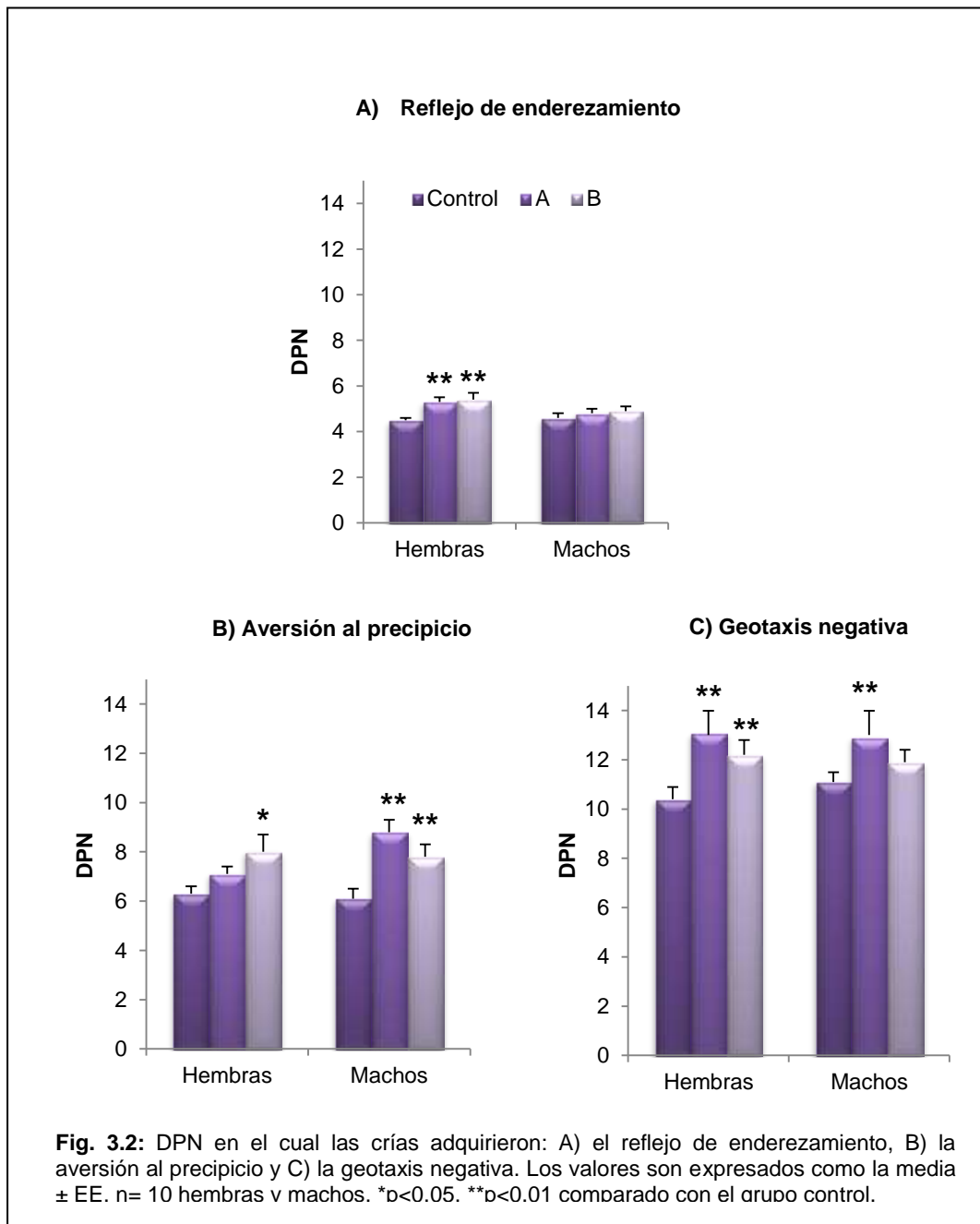
Luego de la exposición, y cuando las crías de ratas expuestas y controles cumplieron 3 días, se comenzaron los estudios para evaluar los reflejos sensoriomotores, hasta el DPN que lo adquirieron. Cuando se analizaron las pruebas de desarrollo sensoriales y motoras (Fig. 3.2), el ANOVA de dos vías detectó diferencias significativas entre los grupos en el reflejo de enderezamiento ( $F_{(2,54)}=4.91$ ,  $p<0.01$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron que la exposición durante la etapa gestacional y la lactancia produce un retraso significativo en el desarrollo del reflejo de enderezamiento en las crías hembra ( $p<0.01$ , en ambas combinaciones), mientras que no se observaron diferencias significativas en las crías macho (Fig. 3.2 A).

Cuando se analizó el reflejo de aversión al precipicio, el ANOVA de dos vías también detectó diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,54)}=10.02$ ,  $p<0.001$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron que la exposición a la combinación B retrasó el desarrollo de este reflejo en ratas hembra ( $p<0.05$ ).

Por otro lado, los machos expuestos a ambas combinaciones presentaron un retraso en la adquisición de la aversión al precipicio ( $p<0.01$ ) (Fig. 3.2 B).

En el análisis de datos del reflejo de geotaxis negativa mediante ANOVA de dos vías, se detectaron diferencias entre los grupos ( $F_{(2,54)}=9.91$ ,  $p<0.001$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron que las ratas hembra expuestas a ambas combinaciones tuvieron retraso en la maduración del reflejo ( $p<0.01$ ). En el caso de las crías macho, sólo los expuestos a la combinación A tuvieron un retraso en la adquisición de este reflejo ( $p<0.01$ ) (Fig. 3.2 C).





Respecto al tiempo de apertura de los ojos en las crías, el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,54)}=16.26$ ,  $p<0.001$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron que la exposición a ambas combinaciones de iAs/F produjo un retraso significativo en la apertura de los ojos en las crías de ambos sexos ( $p<0.01$  y  $p<0.05$  para hembras y machos, respectivamente, expuestos a la combinación A y  $p<0.001$  para hembras y machos expuestos a la combinación B) (Tabla 3.2).

Analizando la apertura de los canales auditivos, el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,54)}=34.09$ ,  $p<0.001$ ). Las comparaciones *post hoc* demostraron que la exposición de las crías macho y hembra a ambas combinaciones de iAs/F produjo un retraso significativo en la apertura de los mismos ( $p<0.001$ ).

Tabla 3.2: DPN en el cual las crías controles y experimentales abrieron los ojos y los canales auditivos.

	Control	A	B
<b>Apertura de ojos (días)</b>			
Hembras	13.2 ± 0.2	<b>14.4 ± 0.3**</b>	<b>14.6 ± 0.2***</b>
Machos	13.5 ± 0.2	<b>14.3 ± 0.4*</b>	<b>15.0 ± 0.2***</b>
<b>Apertura de oreja (días)</b>			
Hembras	11.2 ± 0.1	<b>13.2 ± 0.3***</b>	<b>12.9 ± 0.3***</b>
Machos	11.2 ± 0.1	<b>13.0 ± 0.3***</b>	<b>12.9 ± 0.3***</b>

Los valores son expresados como la media ± EE. n= 8-10 hembras y machos. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  comparado con el grupo control.

## Resumen

Las crías hembra co-expuestas a ambas combinaciones mostraron un retraso en el desarrollo del reflejo de enderezamiento. En el reflejo de aversión al precipicio, se observó un retraso en las crías hembra expuestas a la combinación B y en las crías macho expuestas a ambas combinaciones. Las crías hembra expuestas a ambas combinaciones y los machos expuestos

expuestos a la combinación A, demostraron un retraso en la maduración del reflejo de geotaxis. Se registró un significativo retraso en la apertura de ojos y canales auditivos en las crías de ambos sexos y en ambas combinaciones.

### **3.2.2. Batería de observaciones funcionales (BOF)**

Cuando las crías expuestas y controles cumplieron 45 días de edad, a un  $n=8$  se las evaluó integralmente, a través de una BOF. En la Tabla 3.3 se muestran los resultados obtenidos en esta prueba en las crías de 45 días de edad. Los parámetros analizados no mostraron diferencias significativas entre los grupos expuestos y los grupos controles.

A otro grupo de crías, se les realizó la BOF cuando fueron adultas. Los resultados obtenidos en las crías de 90 días de edad se muestran en la Tabla 3.4. Como se muestra en la tabla, en la respuesta del reflejo nociceptivo, se observaron diferencias significativas entre los grupos en las crías hembra ( $\chi^2_{(2)}=20.73$ ,  $p<0.001$ ) y machos ( $\chi^2_{(2)}=14.76$ ,  $p<0.001$ ). En los grupos tratados con ambas combinaciones se observó una menor respuesta al dolor en comparación con la del grupo control respectivo ( $p<0.01$ ). El resto de los parámetros analizados en la BOF no mostraron diferencias significativas entre los grupos analizados.

**Tabla 3.3:** Parámetros evaluados durante las sesiones de la BOF realizadas en crías hembra (♀), y machos (♂) de 45 días de los grupos controles y experimentales.

Parámetros	Control	A	B	Control	A	B
	♀			♂		
<b>En la caja</b>						
Postura normal del cuerpo (D)	100	100	100	100	100	100
Actividad (O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Párpados (O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Convulsiones (D)	0	0	0	0	0	0
Mordisqueo (D)	0	0	0	0	0	0
Vocalización (B)	0	0	0	0	0	0
<b>Fuera de la caja</b>						
Facilidad remoción (O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Reactividad a la manipulación(O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Salivación (O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Lagrimo (O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Apariencia del pelo normal (D)	100	100	100	100	100	100
Reflejo prensil (B)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Marcha normal (D)	100	100	100	100	100	100
Postura normal (D)	100	100	100	100	100	100
Estereotipías (D)	1	1	1	1	1	1
Movimientos inusuales (D)	1	1	1	1	1	1
Bolos fecales (C) (N°)	0.2±0.2	0.5±0.2	0.7±0.5	0.7±0.5	0.9±0.3	0.8±0.3
Manchas de orina (C) (N°)	0.4±0.3	0.6±0.4	0	0.4±0.3	0.6±0.3	0.4±0.3
Diarrea (B)	0	0	0	0	0	0
<b>Respuestas y reflejos</b>						
Respuesta auditiva (O)	2.10	2.05	2.00	2.00	2.00	2.10
Respuesta visual (O)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Respuesta táctil (O)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Respuesta al dolor (O)	2.05	2.25	2.25	1.90	2.10	2.20
Reflejo pupilar (B)	100	100	100	100	100	100
Reflejo palpebral (B)	100	100	100	100	100	100
Reflejo pinnal (B)	100	100	100	100	100	100
Reflejo flexor (B)	100	100	100	100	100	100
Reflejo extensor (B)	100	100	100	100	100	100
Reflejo del salto (B)	100	100	100	100	100	100
Reflejo propioceptivo (B)	100	100	100	100	100	100
Ext. miembros anteriores (B)	100	100	100	100	100	100
Ext. miembros posteriores (B)	100	100	100	100	100	100
Enderezamiento en superficie (O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Enderezamiento aéreo(O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Separación miembros posteriores al caer(C)(cm)	5.6±0.4	5.9±0.5	4.9±0.4	5.7±0.4	5.1±0.5	5.2±0.2

**Ref.:** Datos binarios (B) y descriptivos (D) expresados como porcentaje de incidencia (test de  $\chi^2$ ); datos ordinales (O) como el puntaje promedio de la escala utilizada (test de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney) y datos continuos (C) como valor promedio  $\pm$ EE. (ANOVA factorial).

**Tabla 3.4:** Parámetros evaluados durante las sesiones de la BOF realizadas en crías hembra (♀), y machos (♂) de 90 días de los grupos controles y experimentales.

Parámetros	Control	A	B	Control	A	B
	♀			♂		
<b>En la caja</b>						
Postura del cuerpo normal (D)	100	100	100	100	100	100
Actividad (O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Párpados (O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Convulsiones (D)	0	0	0	0	0	0
Mordisqueo (D)	0	0	0	0	0	0
Vocalización (B)	0	0	0	0	0	0
<b>Fuera de la caja</b>						
Facilidad de remoción(O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Reactividad a la manipulación(O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Salivación (O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Lagrimo (O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Apariencia del pelo normal (D)	100	100	100	100	100	100
Reflejo prensil (B)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Marcha normal (D)	100	100	100	100	100	100
Postura normal (D)	100	100	100	100	100	100
Estereotipias (D)	1	1	1	1	1	1
Movimientos inusuales (D)	1	1	1	1	1	1
Bolos fecales (C) (N°)	0.8±0.4	0.7±0.3	0.7±0.2	1.5±0.5	2.5±0.6	1.3±0.6
Manchas de orina (C) (N°)	0.2±0.1	0	0	2.3±0.4	1.5±0.4	2.0±0.6
Diarrea (B)	0	0	0	0	0	0
<b>Respuestas y reflejos</b>						
Respuesta auditiva (O)	2.00	2.13	2.00	2.00	2.00	2.00
Respuesta visual (O)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Respuesta táctil (O)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.92
Respuesta al dolor (O)	2.00	<b>1.30*</b>	<b>1.00*</b>	1.75	<b>1.15*</b>	<b>1.11*</b>
Reflejo pupilar (B)	100	100	100	100	100	100
Reflejo palpebral (B)	100	100	100	100	100	100
Reflejo pinnal (B)	100	100	100	100	100	100
Reflejo flexor (B)	100	100	100	100	100	100
Reflejo extensor (B)	100	100	100	100	100	100
Reflejo del salto (B)	100	100	100	100	100	100
Reflejo propioceptivo (B)	100	100	100	100	100	100
Ext. miembros anteriores (B)	100	100	100	100	100	100
Ext. miembros posteriores (B)	100	100	100	100	100	100
Enderezam. en superficie (O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Enderezamiento aéreo (O)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Separación miembros posteriores al caer(C)(cm)	5.8±0.3	4.3±0.4	5.1±0.4	5.6±0.4	5.4±0.3	6.4±0.5

**Ref.:** Datos binarios (B) y descriptivos (D) expresados como porcentaje de incidencia (test de  $\chi^2$ ); datos ordinales (O) como el puntaje promedio de la escala utilizada (test de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney) y datos continuos (C) como valor promedio  $\pm$ EE. (ANOVA factorial). \*p<0.01 con respecto al grupo control

## Resumen

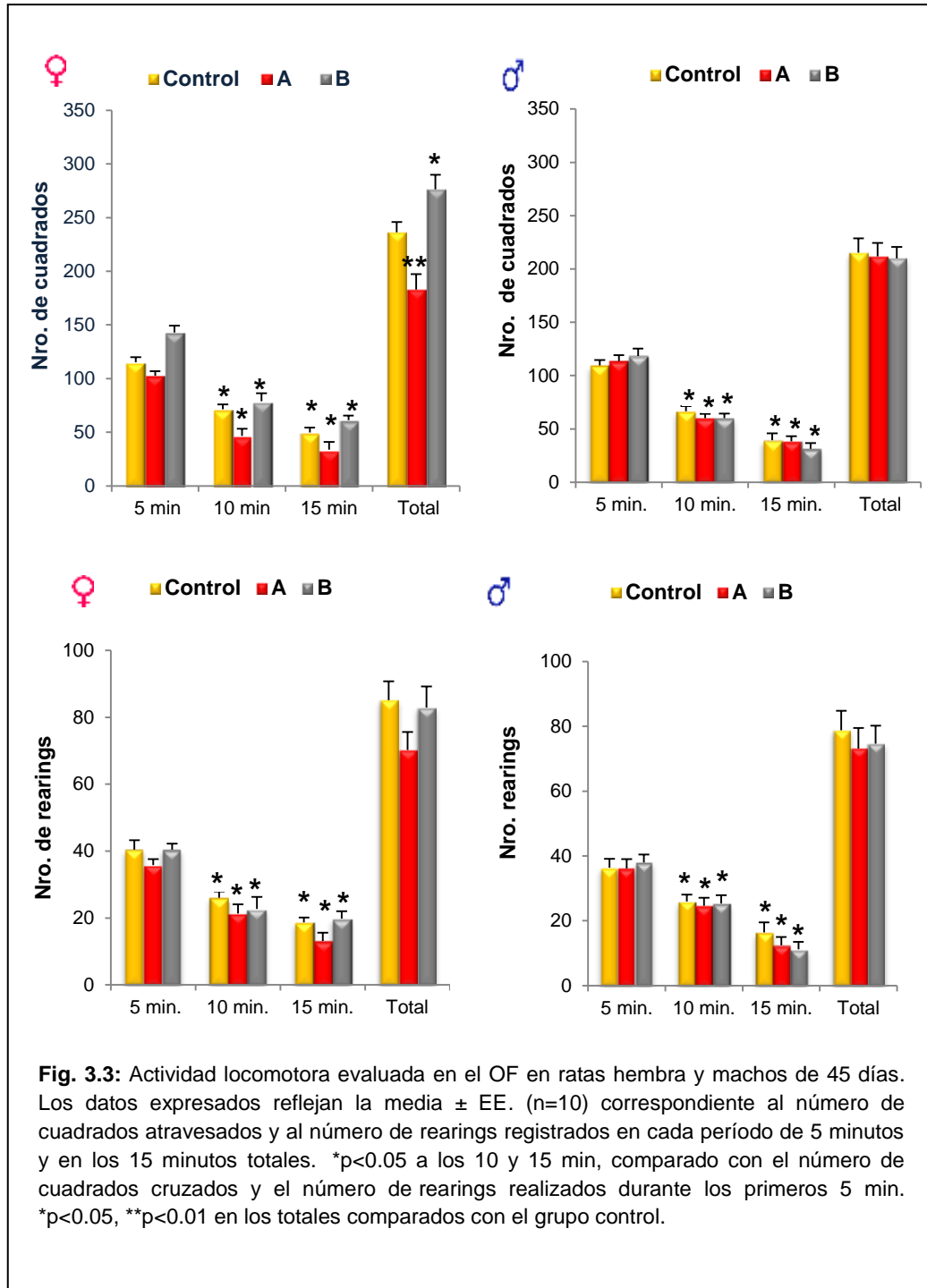
En las crías de 90 días co-expuestas a ambas combinaciones, se observó una disminución significativa en la respuesta del reflejo nociceptivo en ambos sexos.

### 3.2.3. Evaluación de la actividad locomotora

Las mismas ratas de 45 días, evaluadas anteriormente, se sometieron a la prueba del campo abierto. Analizando el número de cuadrados atravesados por las crías de 45 días de edad durante los 15 min totales en el OF, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,54)}=6.71$ ,  $p<0.005$ ) e interacción entre grupo\*sexo ( $F_{(2,54)}=7.13$ ,  $p<0.005$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron que las ratas hembra expuestas a la combinación A exhibieron una disminución significativa de la cantidad de cuadrados cruzados en comparación con el grupo control ( $p<0.01$ ), mientras que las hembras expuestas a la combinación B mostraron un incremento significativo en los cuadrados cruzados en comparación con el grupo control ( $p<0.05$ ). En los resultados correspondientes a las crías macho no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de cuadrados atravesados en los 15 min totales, respecto al grupo de las crías control. Cuando se analizó el número de cuadrados cruzados por las crías en cada período de 5 minutos, el ANOVA de medidas repetidas mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,54)}=9.956$ ,  $p <0.001$ ). Todos los grupos mostraron una mayor actividad locomotora durante el primer período de 5 minutos que luego fue disminuyendo significativamente en el segundo y tercer período, indicando que todos los animales se habituaron al campo abierto ( $p<0.05$  para todas las comparaciones) (Fig. 3.3).

Respecto al número de rearings (otro parámetro de actividad locomotora), en los 15 min totales, el ANOVA de dos vías no mostró diferencias significativas entre los grupos y entre los sexos, en comparación con el grupo control. Cuando se analizó el número de rearings realizados por las crías en cada período de 5 minutos, el ANOVA de medidas repetidas mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,54)}=721,79$ ,  $p < 0.001$ ). Todos los grupos mostraron un mayor número de rearings durante el primer período de 5 minutos que luego fue disminuyendo significativamente en el segundo y tercer período, indicando que todos los animales se habituaron al campo abierto ( $p < 0.05$  para todas las comparaciones) (Fig. 3.3).

El número de groomings y cantidad de bolos fecales, considerados como parámetros de emocionalidad, no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los experimentales (datos no mostrados).



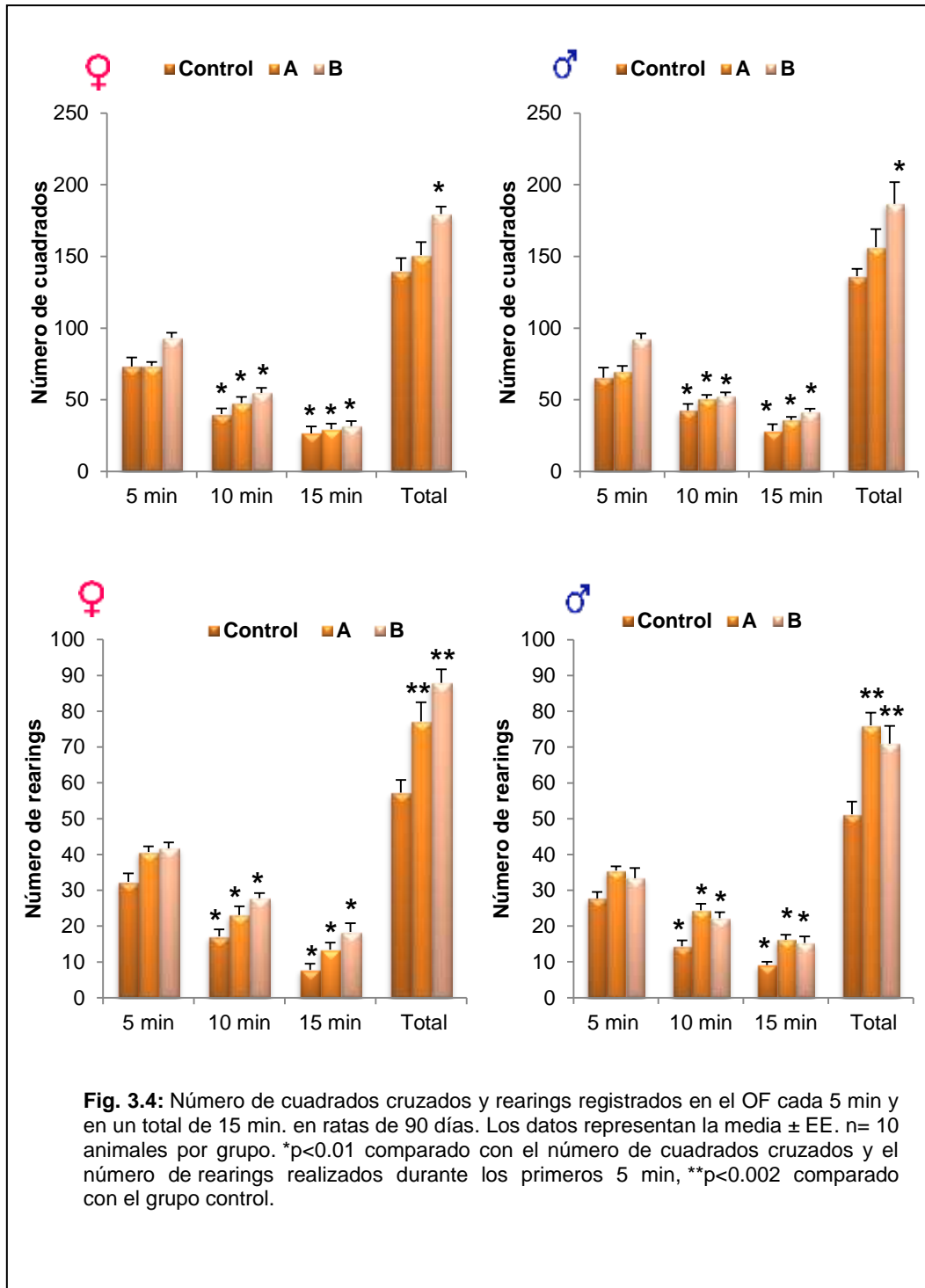
**Fig. 3.3:** Actividad locomotora evaluada en el OF en ratas hembra y machos de 45 días. Los datos expresados reflejan la media  $\pm$  EE. (n=10) correspondiente al número de cuadrados atravesados y al número de rearings registrados en cada período de 5 minutos y en los 15 minutos totales. \*p<0.05 a los 10 y 15 min, comparado con el número de cuadrados cruzados y el número de rearings realizados durante los primeros 5 min. \*p<0.05, \*\*p<0.01 en los totales comparados con el grupo control.



Las mismas crías adultas evaluadas en la BOF, fueron utilizadas para realizar la prueba de campo abierto. Analizando el número de cuadrados atravesados por las ratas de 90 días de edad durante los 15 min totales en el OF, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,54)}=9.956$ ,  $p<0.001$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron que las ratas de ambos sexos expuestas a la combinación B mostraron un aumento significativo en los cuadrados cruzados en comparación con el grupo control, indicando un aumento en la actividad locomotora horizontal ( $p<0.002$ ) (Fig. 3.4). Cuando se comparó el número de cuadrados cruzados en cada período de 5 minutos, el ANOVA de medidas repetidas mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,54)}=200.56$ ,  $p<0.001$ ). Todos los grupos mostraron una mayor actividad locomotora durante el primer período de 5 minutos que luego fue disminuyendo significativamente en el segundo y en el tercer período ( $p<0.01$  para todas las comparaciones).

En cuanto al número de rearings, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,54)}=21.55$ ,  $p<0.001$ ) y entre sexos ( $F_{(1,54)}=5.487$ ,  $p<0.02$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron que las crías expuestas a ambas combinaciones exhibieron un aumento significativo en el número de rearings en comparación con el grupo control ( $p<0.002$  para ambas combinaciones y sexos). También se analizó el número de rearings en períodos de 5 min para evaluar la habituación. El ANOVA de medidas repetidas mostró diferencias significativas dentro del grupo ( $F_{(2,54)}=333.54$   $p<0.001$ ). Todos los grupos mostraron un mayor número de rearings durante el primer período de 5 min, con una disminución en el segundo y tercer período ( $p<0.01$  para todas las comparaciones) (Fig. 3.4).

El número de groomings y cantidad de bolos fecales, no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos experimentales (datos no mostrados).



## Resumen

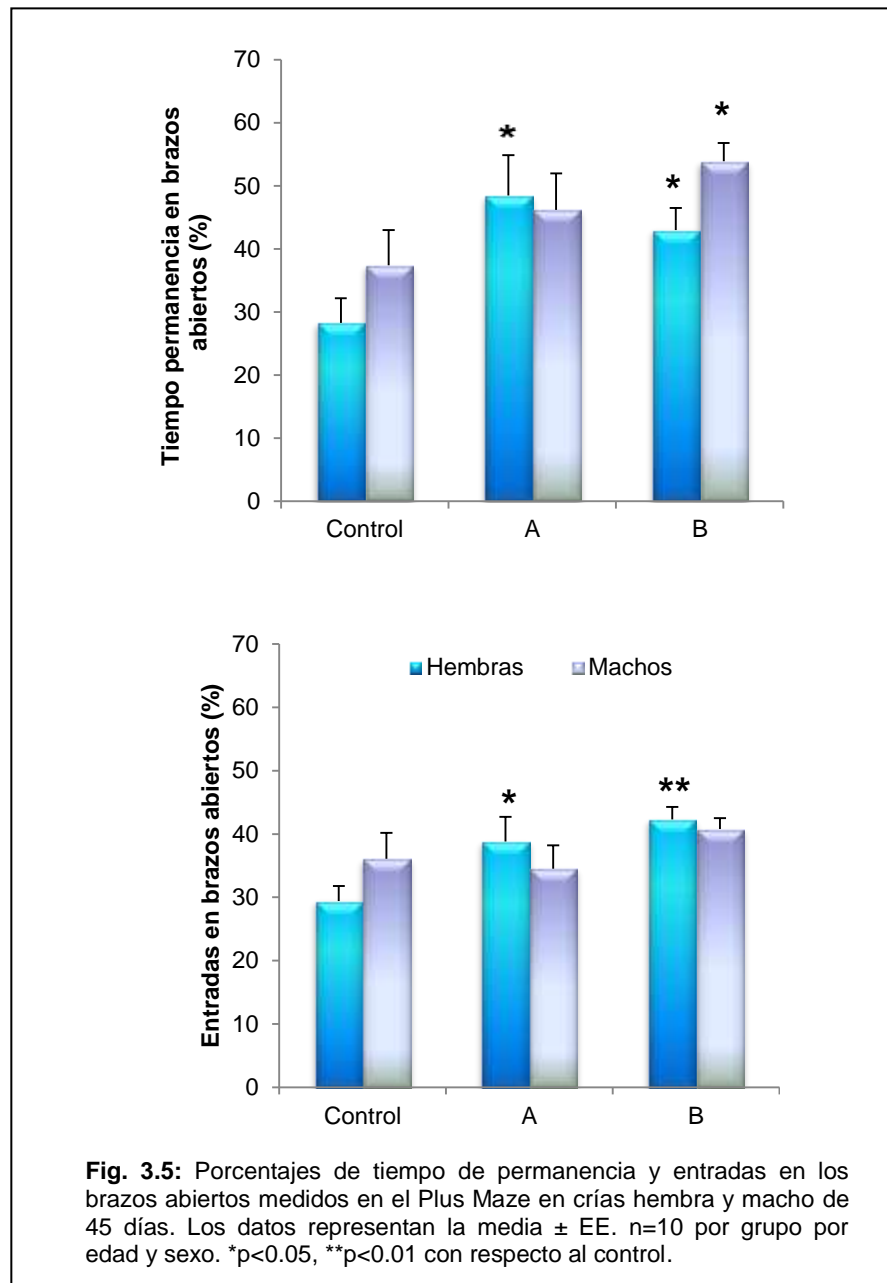
Las crías hembra de 45 días de edad co-expuestas a la combinación A, evidenciaron una disminución en la actividad locomotora, mientras que las expuestas a la combinación B, mostraron un efecto contrario, con un aumento en la actividad. En las crías de 90 días, la co-exposición a la combinación B produjo un aumento en la actividad locomotora horizontal en ambos sexos. Con respecto a la actividad locomotora vertical en estas crías expuestas a ambas combinaciones, se observó un aumento en número de rearings en ambos sexos.

### 3.2.4. Evaluación de la ansiedad

En las crías de 45 días de edad, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,54)}=5.473$ ,  $p<0.01$ ) en el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos. Las comparaciones *post hoc* mostraron que las crías hembra expuestas a ambas combinaciones, permanecieron más tiempo en los brazos abiertos en comparación con el grupo control ( $p<0.05$ ). En cambio, solo los machos expuestos a la combinación B permanecieron más tiempo en los brazos abiertos en comparación con el grupo control ( $p<0.05$ ) (Fig. 3.5).

Respecto al porcentaje de entradas en los brazos abiertos, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,54)}=3.87$ ,  $p<0.05$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron que las crías hembra expuestas a ambas combinaciones de iAs/F exhibieron un aumento significativo en el porcentaje de entradas en los brazos abiertos, en comparación con el grupo control ( $p<0.05$  y  $p<0.01$ , para la combinación A y B, respectivamente). Los machos expuestos a

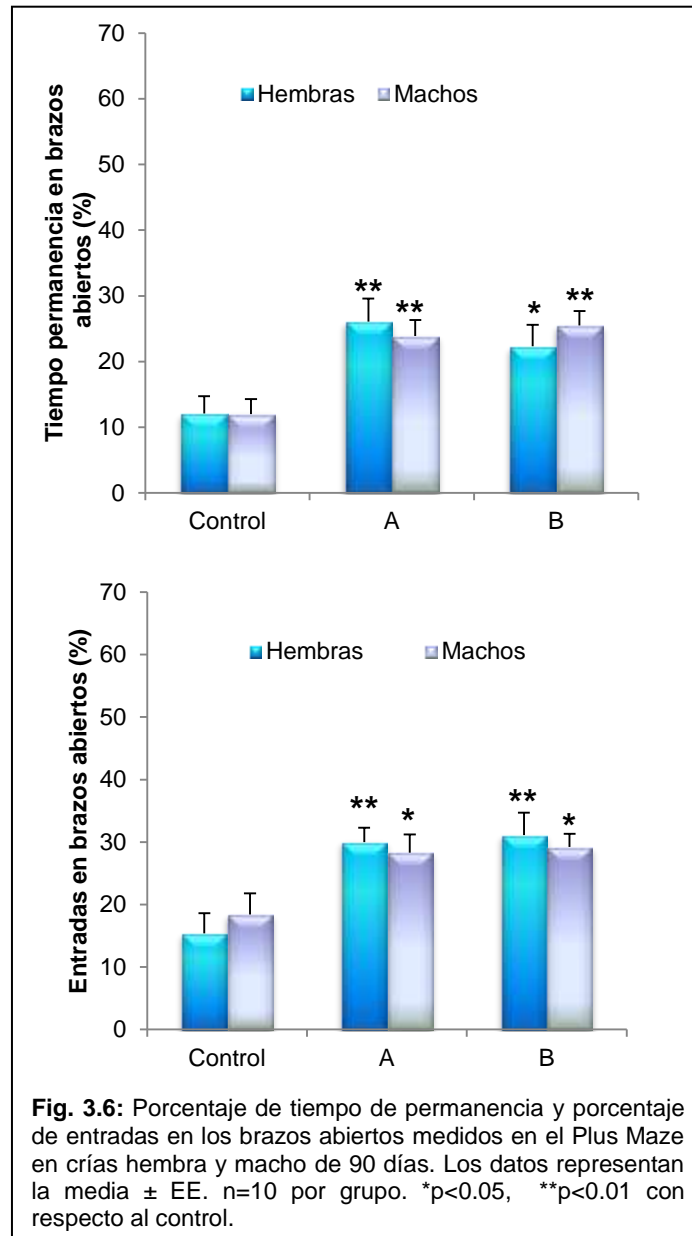
ambas combinaciones no mostraron diferencias significativas con respecto al control en el porcentaje de entradas a los brazos abiertos (Fig. 3.5).



**Fig. 3.5:** Porcentajes de tiempo de permanencia y entradas en los brazos abiertos medidos en el Plus Maze en crías hembra y macho de 45 días. Los datos representan la media  $\pm$  EE. n=10 por grupo por edad y sexo. \*p<0.05, \*\*p<0.01 con respecto al control.

En las crías de 90 días de edad, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,54)}=12.857$ ,  $p<0.001$ ) en el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos. Las comparaciones *post hoc* mostraron que las crías de ambos sexos expuestas a las combinaciones A y B permanecieron más tiempo en los brazos abiertos en comparación con el grupo control ( $p<0.01$  y  $p<0.05$  para las combinaciones A y B, respectivamente, en las hembras, y  $p<0.01$  para las combinaciones A y B en los machos) (Fig. 3.6).

Respecto al porcentaje de entradas en los brazos abiertos, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,54)}=12.169$ ,  $p<0.001$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron que las crías de ambos sexos expuestas a las combinaciones A y B exhibieron un aumento significativo en el porcentaje de entradas en los brazos abiertos, en comparación con el grupo control ( $p<0.01$  y  $p<0.05$ , para hembras y machos, respectivamente) (Fig. 3.6).



## Resumen

Nuestros resultados mostraron que la co-exposición a ambas combinaciones de iAs/F, provocó en las crías hembra de 45 días, un aumento en la permanencia y en las entradas a los brazos abiertos, mientras que en los machos expuestos a la combinación B, sólo se observó un aumento en la permanencia en dichos brazos. En el caso de las crías adultas expuestas a

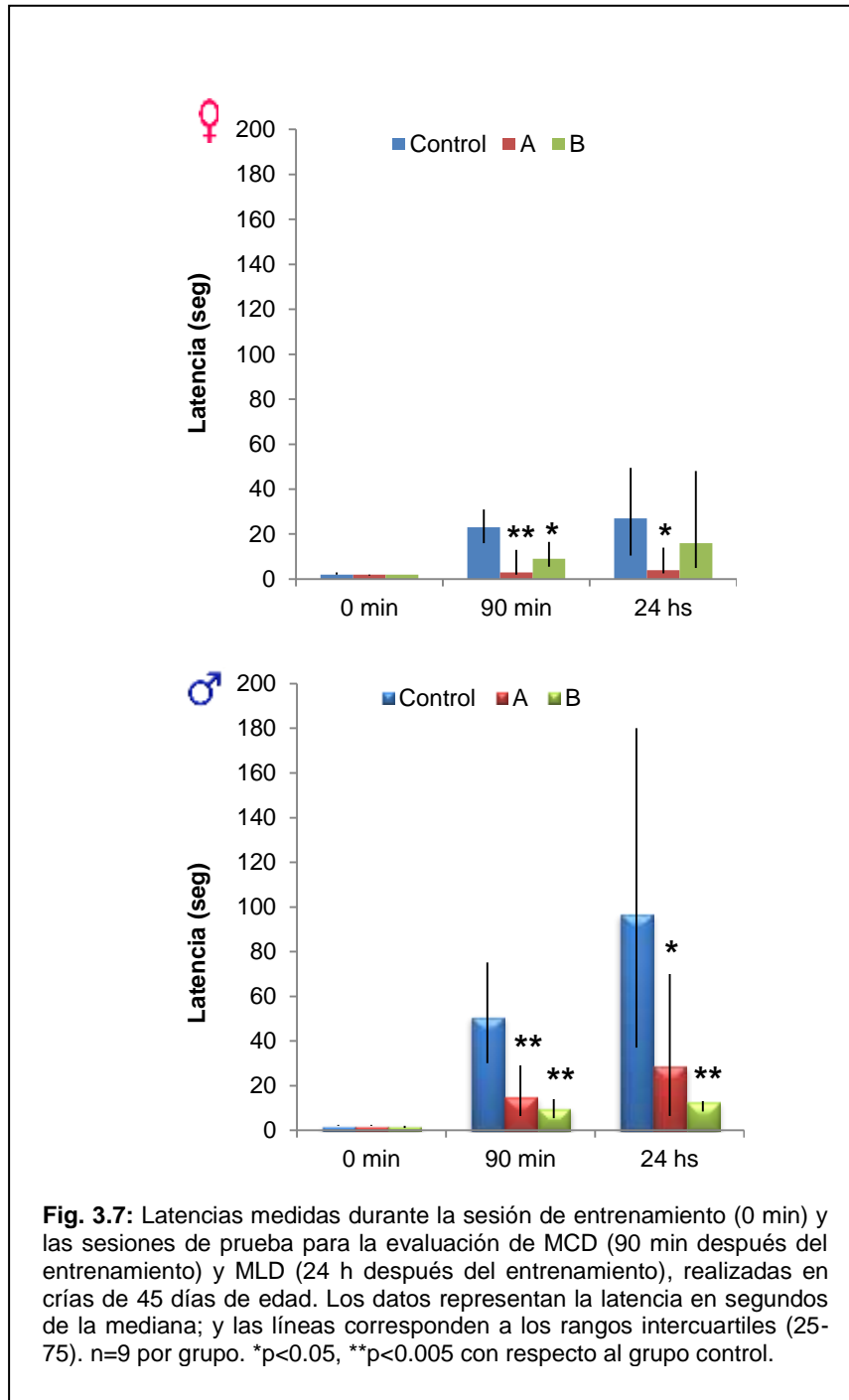
ambas combinaciones, se registró un aumento en la permanencia y en las entradas a los brazos abiertos en ambos sexos.

### 3.2.5. Evaluación de la memoria de corta y larga duración

Los resultados obtenidos en las pruebas no paramétricas, mostraron una diferencia significativa en las crías hembra de 45 días en la retención de la MCD y MLD ( $\chi^2_{(2)}=10.1$ ,  $p < 0.01$ ) y ( $\chi^2_{(2)}=6.0$ ,  $p < 0.05$ ), respectivamente.

En las hembras expuestas a ambas combinaciones se puede observar una disminución significativa en la latencia para bajar de la plataforma a los 90 min después del choque eléctrico (MCD), con respecto al grupo control ( $p < 0.005$  y  $p < 0.05$ , para A y B respectivamente). Por otra parte, sólo se observó una disminución significativa en la latencia a las 24 h posteriores al shock eléctrico (MLD) en las crías expuestas a la combinación A ( $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias significativas en las latencias a las 24 hs de las hembras expuestas a la combinación B (Fig. 3.7).

Los resultados obtenidos en las crías macho de 45 días, mostraron diferencias significativas en las latencias a los 90 min y 24 h posteriores al choque eléctrico ( $\chi^2_{(2)}=13.98$ ,  $p < 0.001$ ) y ( $\chi^2_{(2)}=13.92$ ,  $p < 0.001$ ), respectivamente. En las comparaciones *post hoc*, se observó una disminución significativa en las latencias a los 90 min y a las 24 h en ambas combinaciones, con respecto al grupo control ( $p < 0.005$  para ambas combinaciones a los 90 min,  $p < 0.05$  para la combinación A y  $p < 0.005$  para la combinación B, respectivamente, a las 24 h (Fig. 3.7).

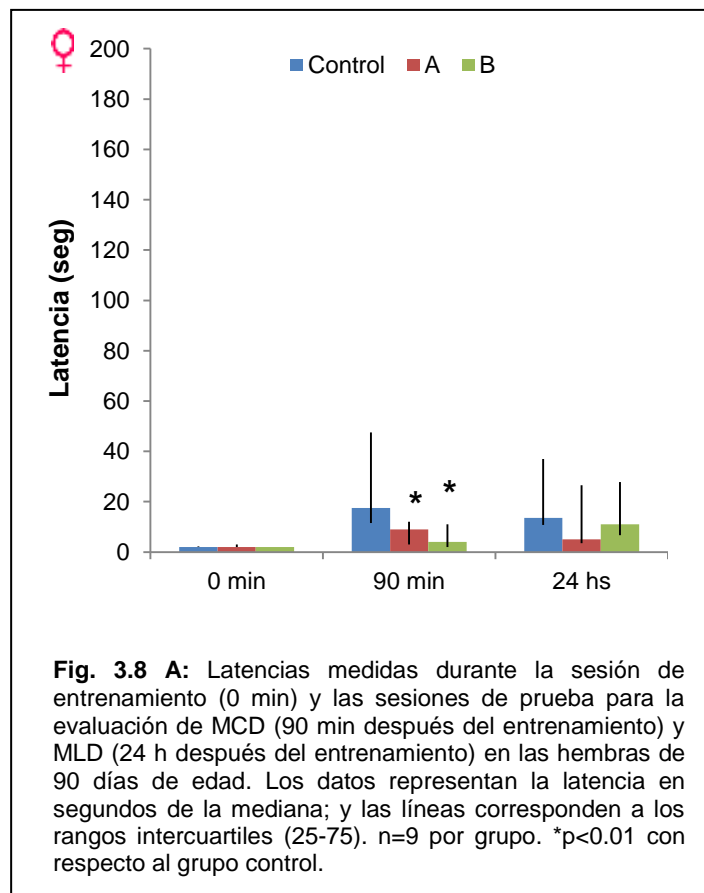


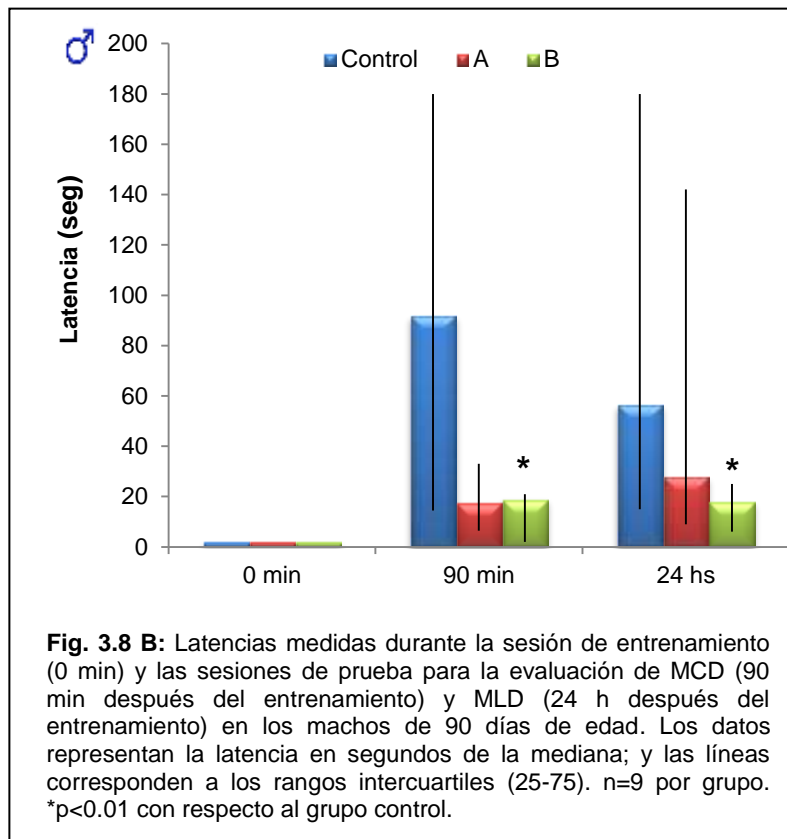
Los resultados obtenidos en las pruebas no paramétricas en las crías hembra de 90 días, mostraron diferencias significativas en las latencias a los 90 min después del shock eléctrico ( $\chi^2_{(2)}=12.3$ ,  $p<0.01$ ). Se evidenció una disminución significativa en las crías expuestas a ambas combinaciones en la



latencia para bajar de la plataforma a los 90 min, con respecto al grupo control ( $p < 0.01$ ). Por otra parte, no se observó una variación estadística significativa en las latencias a las 24 h en ninguno de los grupos tratados con respecto al grupo control (Fig. 3.8 A).

Los resultados de las pruebas no paramétricas obtenidos en los machos de 90 días, mostraron diferencias significativas entre las latencias registradas a los 90 min y a las 24 h ( $\chi^2_{(2)} = 5.85$ ,  $p < 0.001$ ) y ( $\chi^2_{(2)} = 13.92$ ,  $p < 0.001$ ), respectivamente.). Como se puede observar en la Fig. 3.8 B, se registró una disminución significativa en los tiempos de latencia registrados a los 90 min y a las 24 h, sólo en las crías macho expuestas a la combinación B, con respecto al grupo control ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3.8 B).





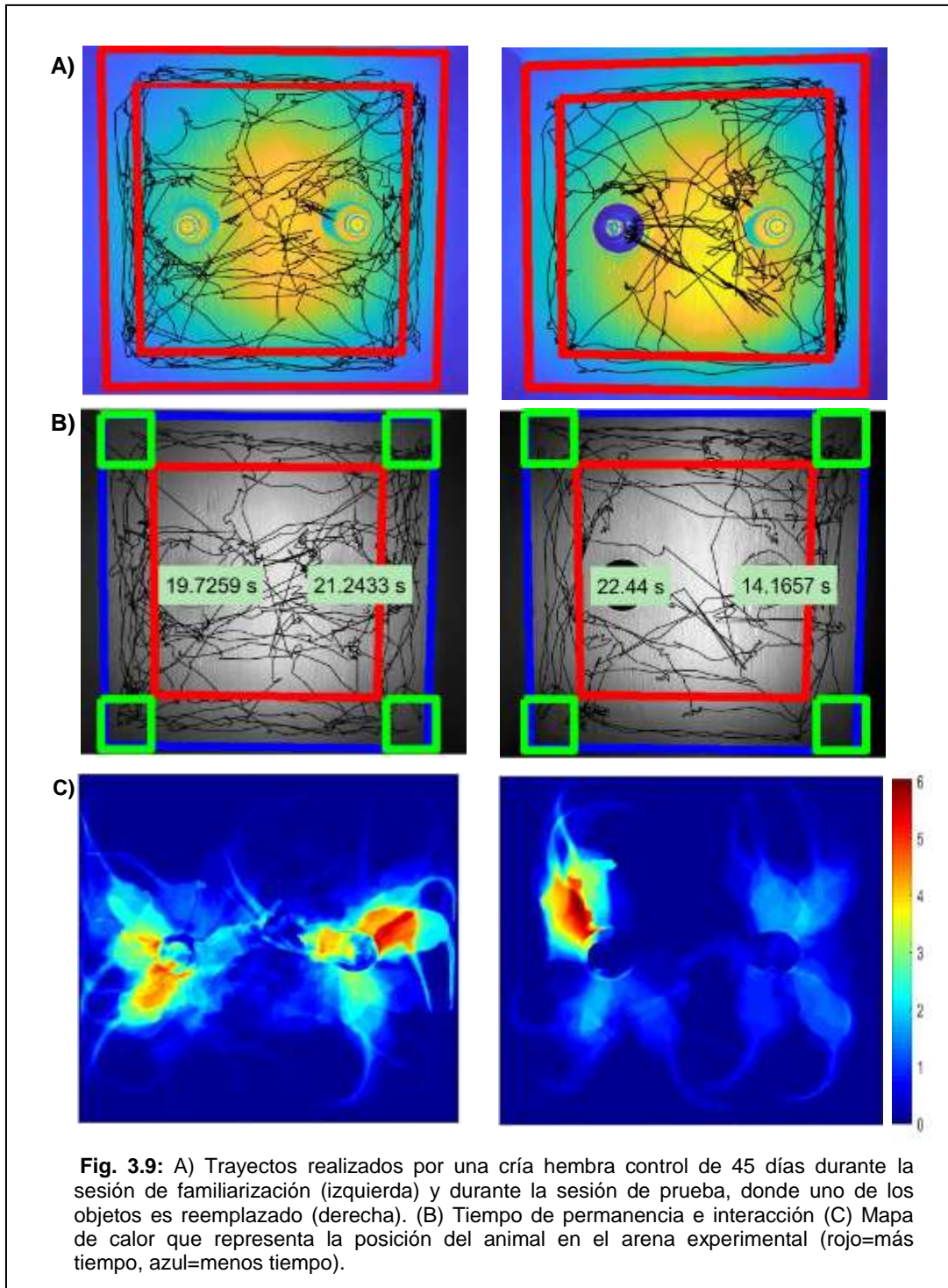
## Resumen

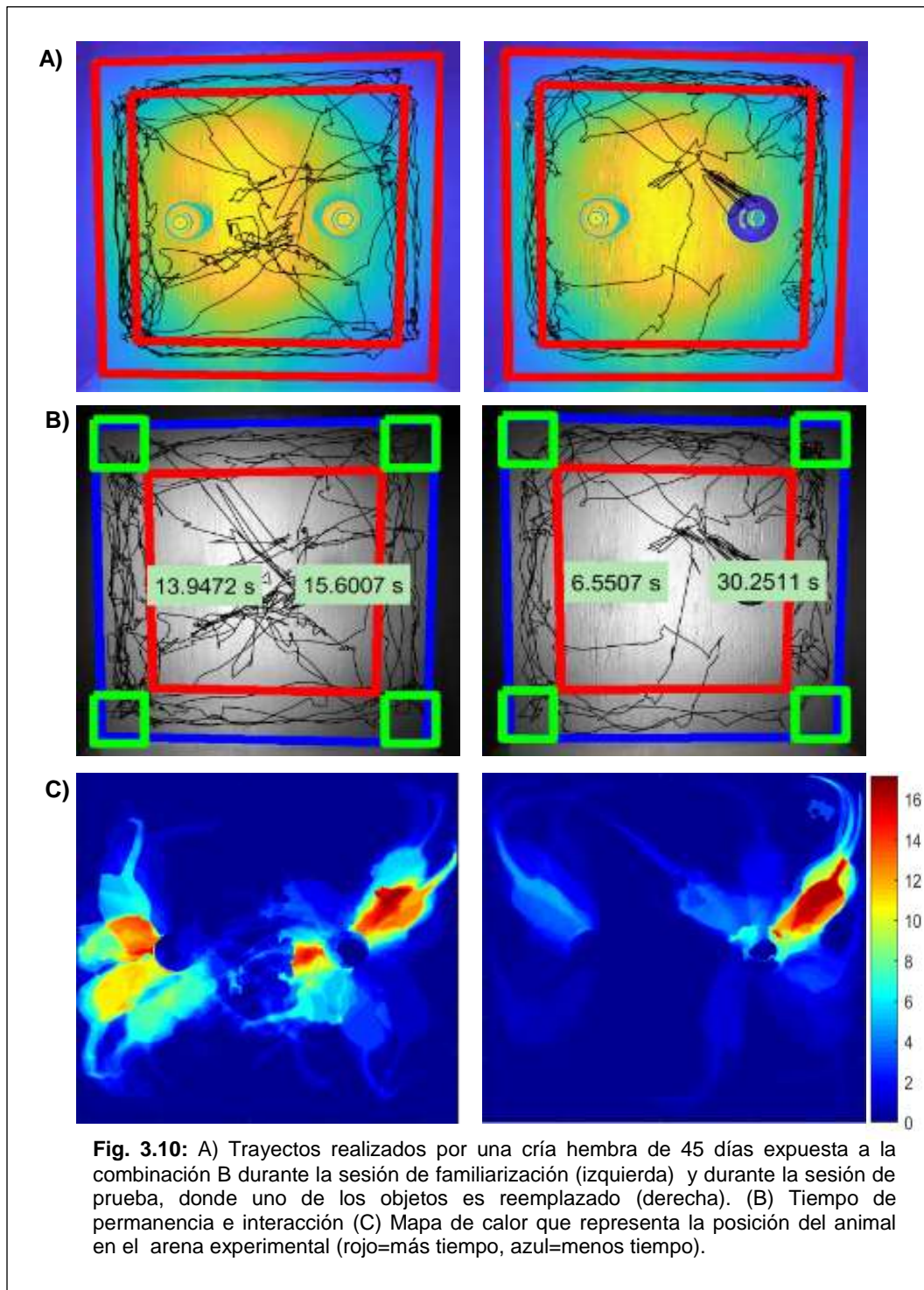
Las crías hembra y macho de 45 días expuestas a ambas combinaciones, mostraron una pérdida en la retención de la MCD y de la MLD. En el caso de las crías hembra de 90 días, la co-exposición a las combinaciones A y B, produjo un deterioro en la retención de la MCD, sin alterar la MLD. Los machos de 90 días expuestos a la combinación B tuvieron una menor retención de la MCD y de la MLD.

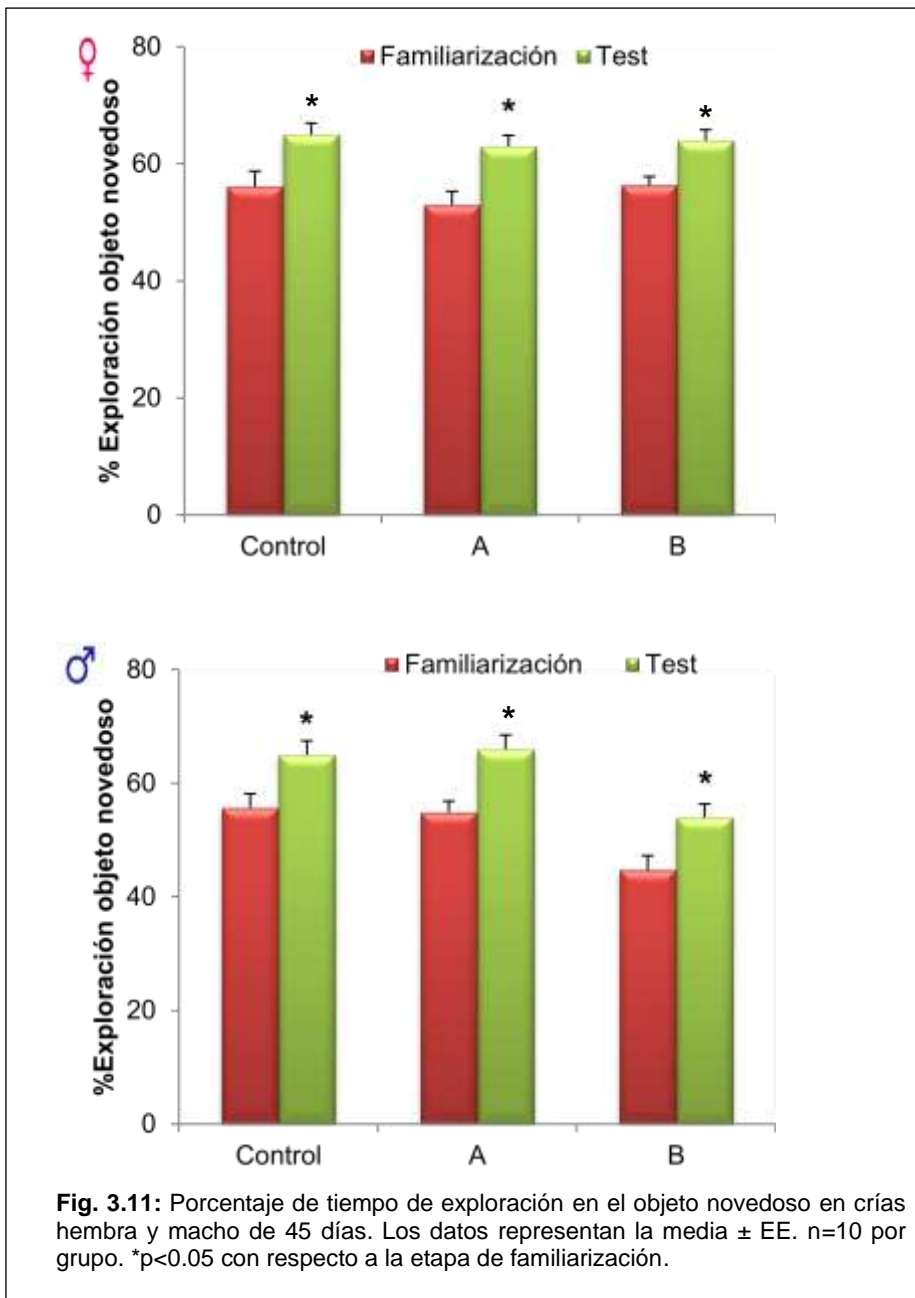
### 3.2.6. Evaluación de memoria de reconocimiento

Con respecto al análisis estadístico realizado en las crías de 45 días de edad, los resultados estadísticos obtenidos en la Prueba T para los diferentes grupos y sexos, evidenciaron un aumento en el porcentaje de exploración, en

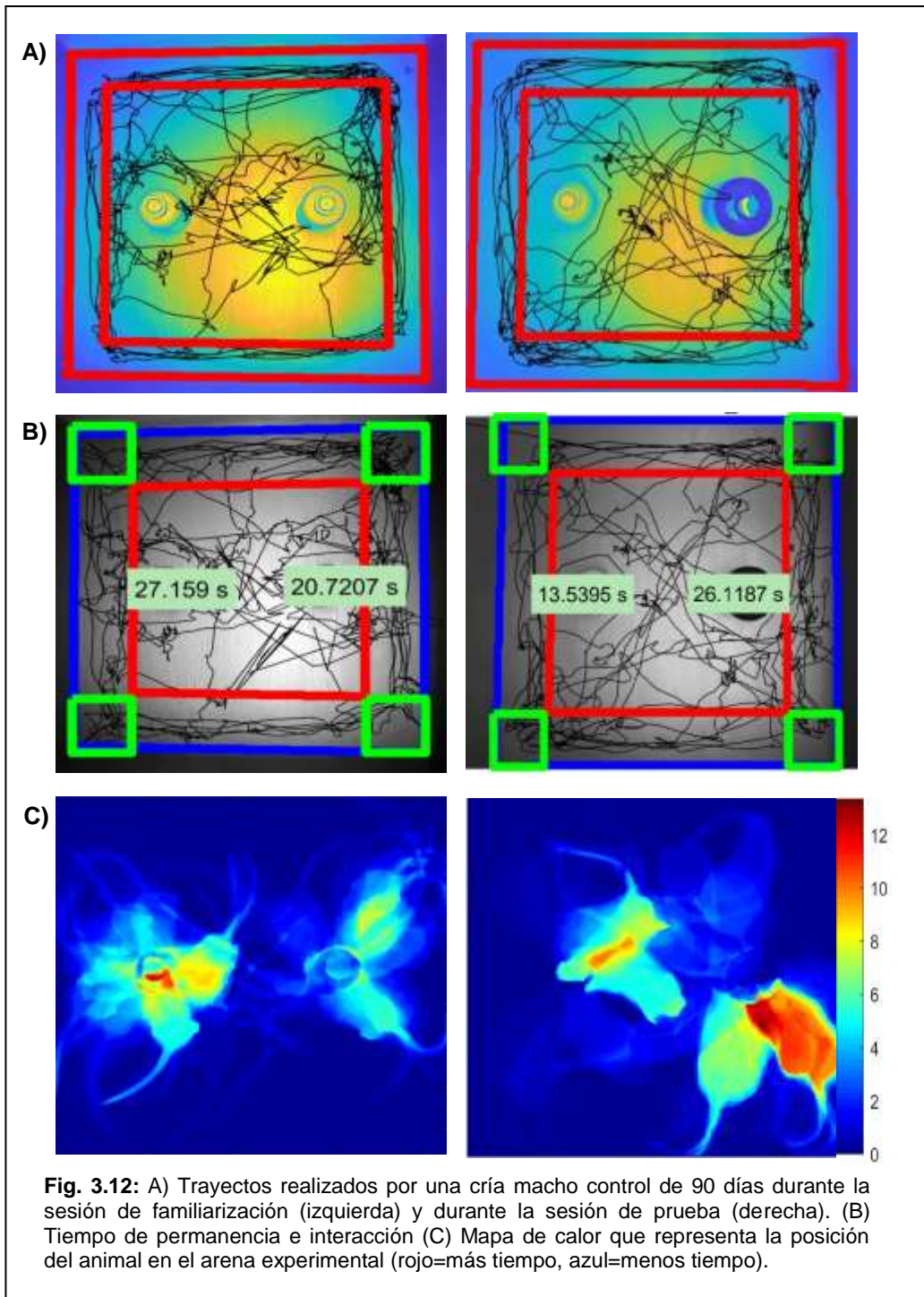
comparación con la etapa de familiarización de cada uno ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3.9, 3.10 y 3.11).

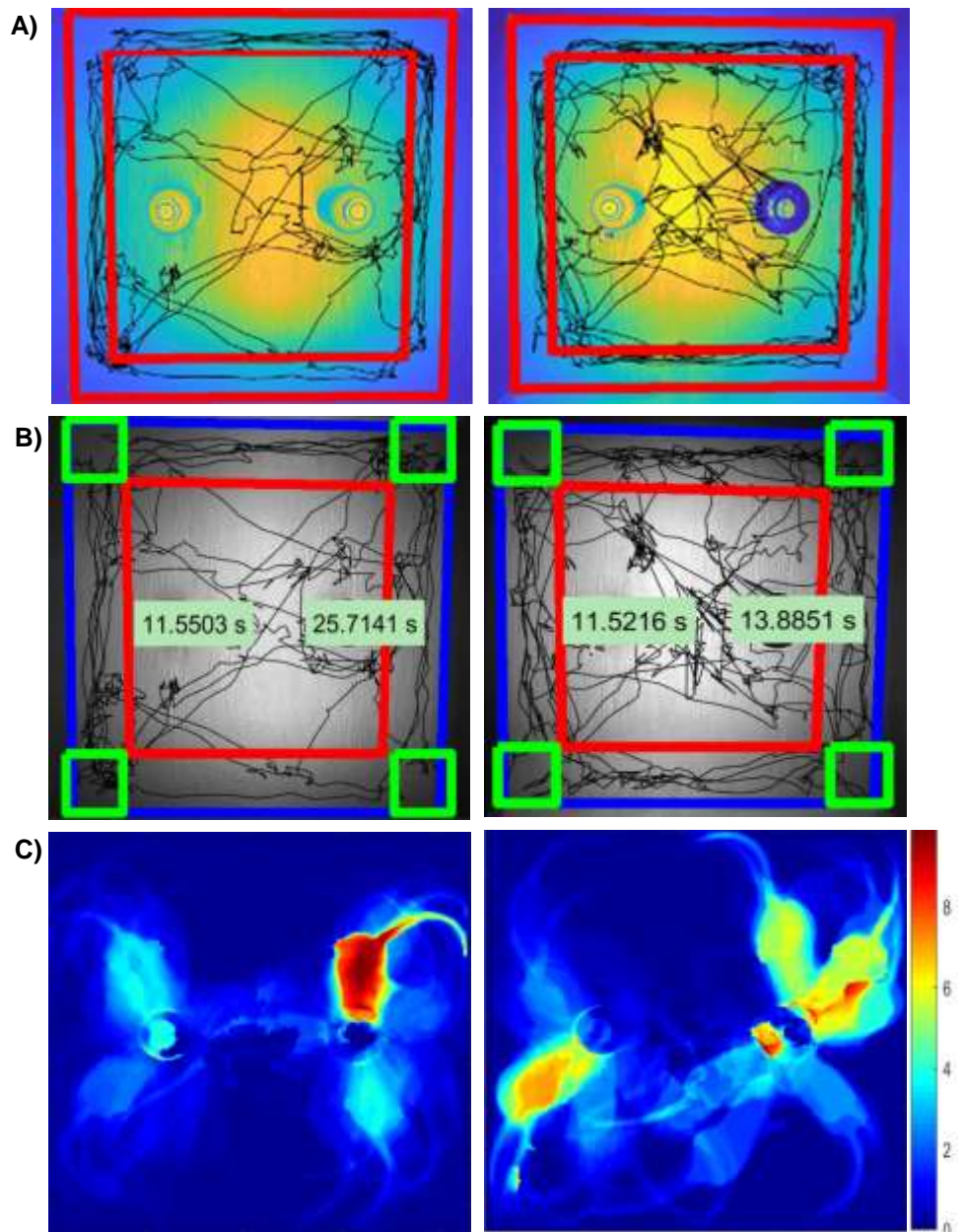




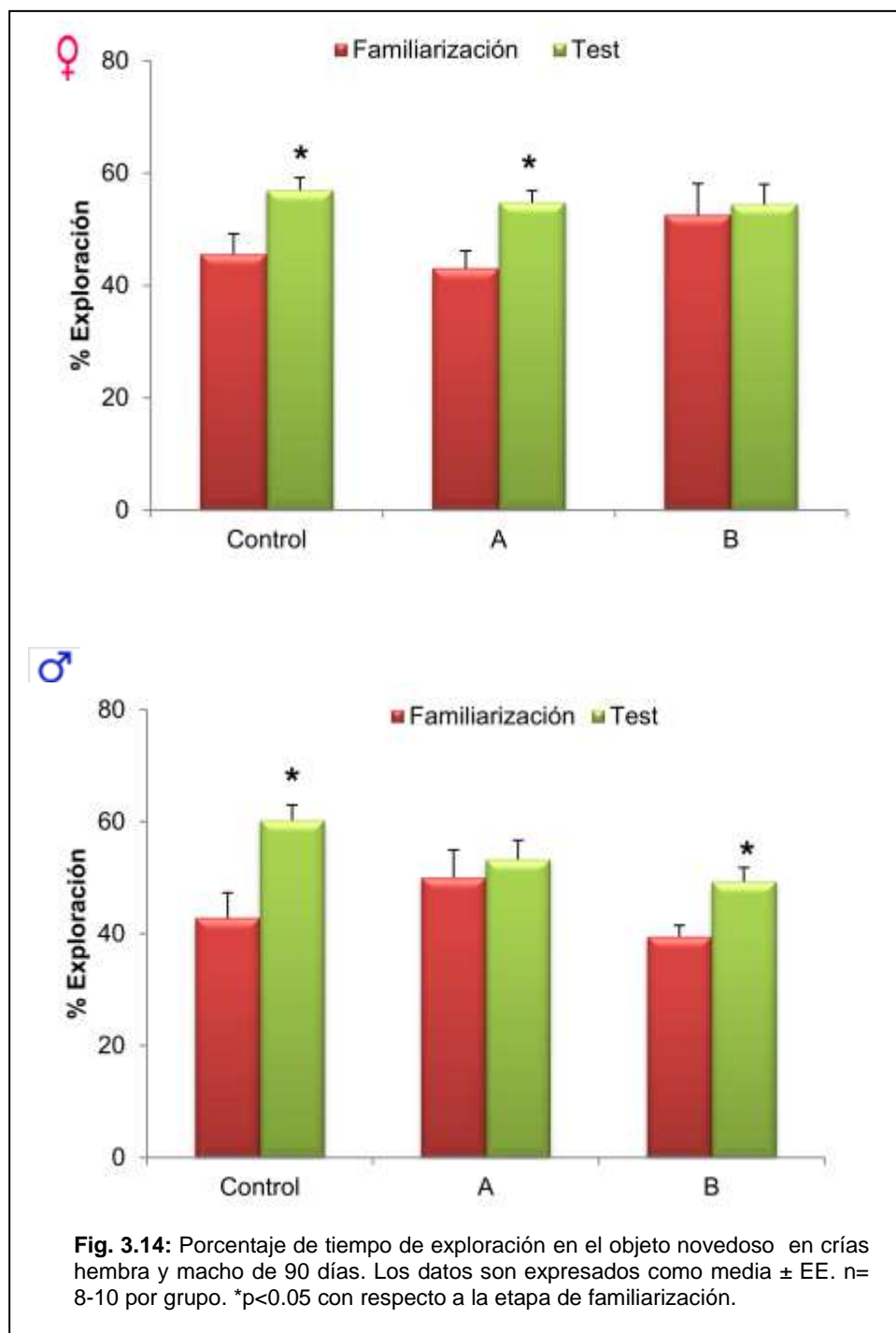


Con respecto al análisis estadístico realizado en las crías de 90 días de edad, los resultados estadísticos obtenidos en la Prueba T, evidenciaron un aumento en el porcentaje de exploración de los grupos controles de ambos sexos, en las hembras expuestas a la combinación A y en los machos expuestos a la combinación B, en comparación con la sesión de familiarización ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3.12, 3.13 y 3.14).





**Fig. 3.13:** A) Trayectos realizados por una cría macho de 90 días expuesta a la combinación B durante la sesión de familiarización (izquierda) y durante la sesión de prueba, donde uno de los objetos es reemplazado (derecha). (B) Tiempo de permanencia e interacción (C) Mapa de calor que representa la posición del animal en el arena experimental (rojo=más tiempo, azul=menos tiempo).



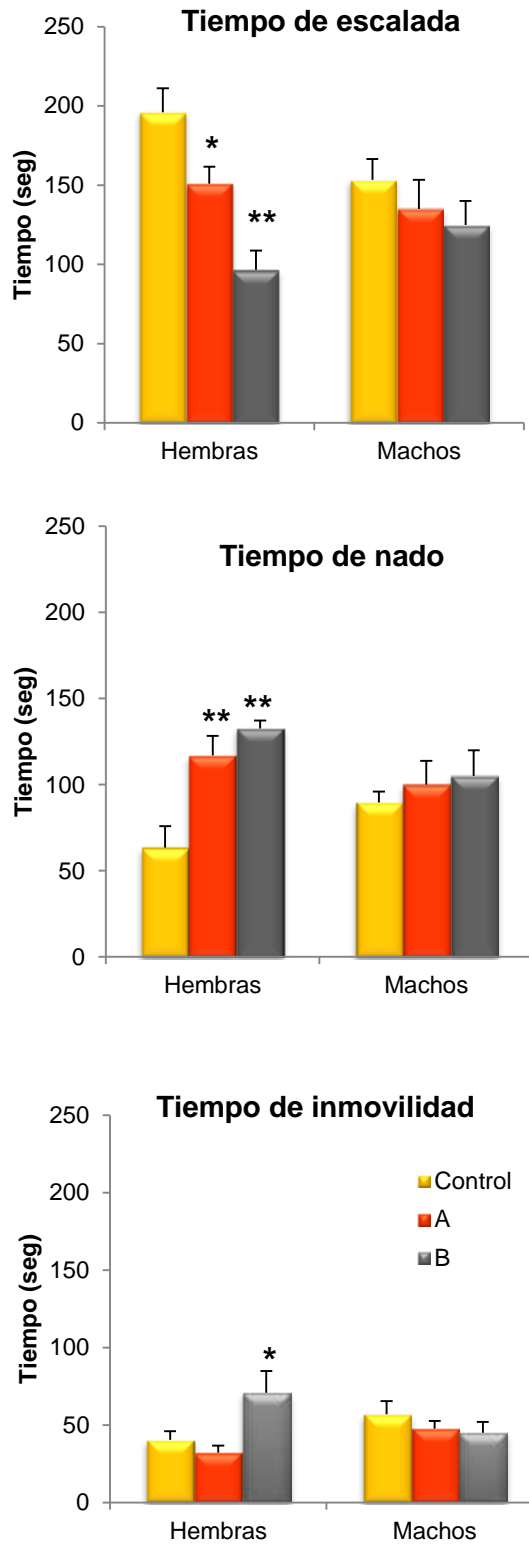


## Resumen

Nuestros resultados demostraron que en las hembras de 90 días co-expuestas a la combinación B y en los machos co-expuestos a combinación A, el porcentaje de exploración de la sesión de prueba no difirió significativamente con respecto al porcentaje registrado en la sesión de familiarización.

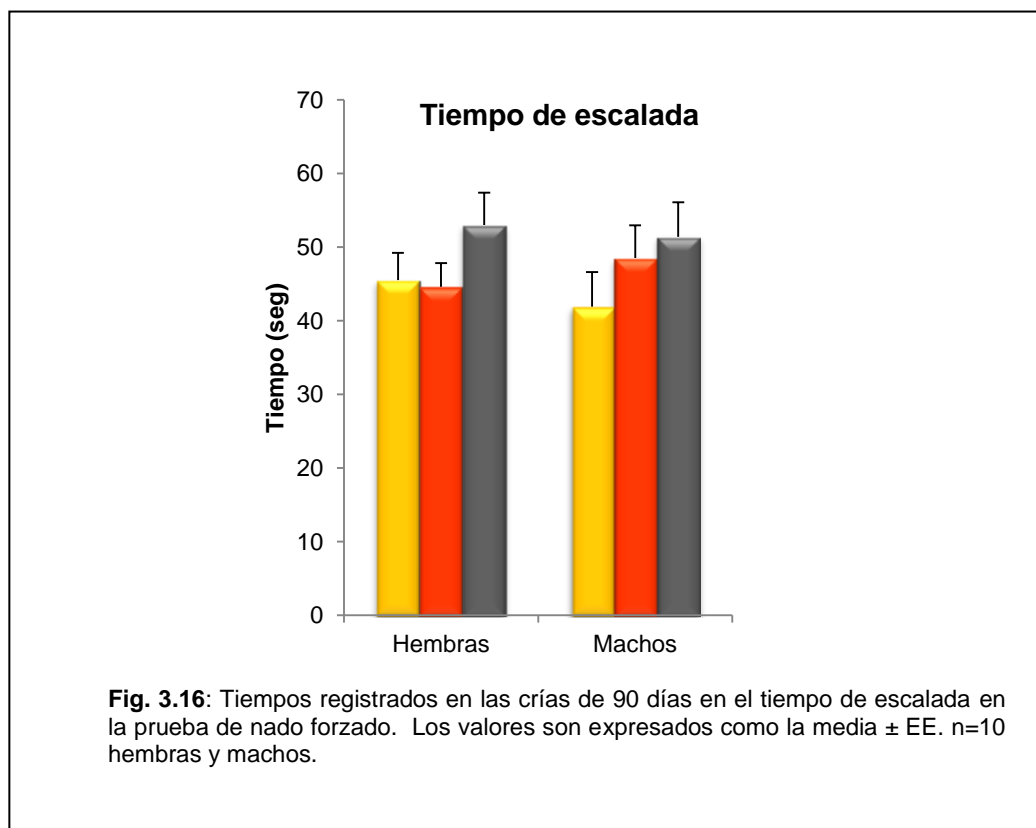
### 3.2.7. Evaluación de la depresión

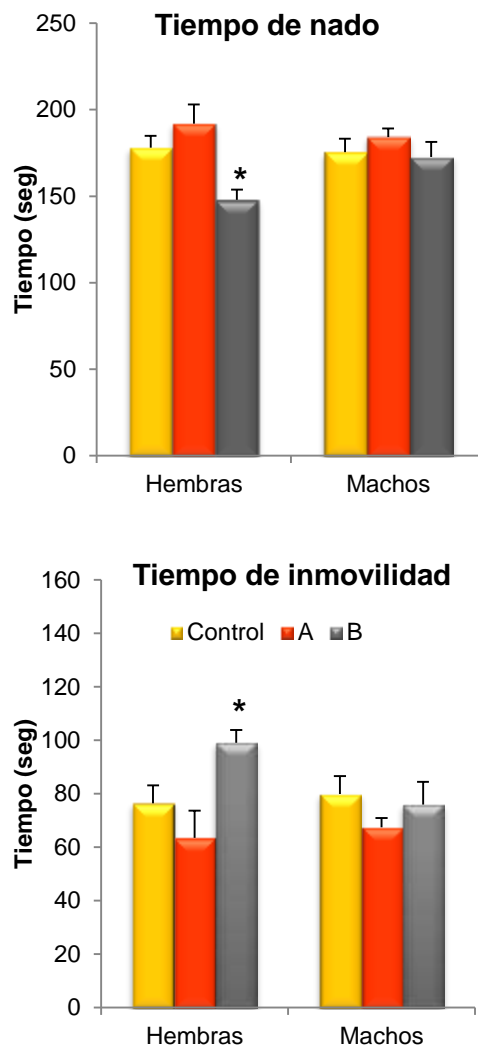
Los resultados obtenidos en las crías de 45 días obtenidos en el ANOVA de dos vías indicaron diferencias significativas entre los grupos, en el tiempo de escalada ( $F_{(2,44)}=14,836$ ,  $p<0.001$ ) y entre los sexos ( $F_{(1,44)}=5.014$ ,  $p<0.05$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron que las crías hembra expuestas a ambas combinaciones, presentaron una disminución significativa en los tiempos de escalada en comparación con el grupo de control ( $p<0.05$  con la combinación A y  $p<0.001$  con la combinación B). Con respecto al tiempo de nado, el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,44)}=18.138$ ,  $p<0.001$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron que las crías hembra expuestas a ambas combinaciones, presentaron un aumento significativo en los tiempos de nado, en comparación con el grupo de control ( $p<0.001$ ). Cuando evaluamos el tiempo de inmovilidad, el ANOVA de dos vías mostró que existen diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,44)}=6.478$ ,  $p<0.01$ ). Las comparaciones *post hoc* evidenciaron que las crías hembra expuestas a la combinación B, presentaron un aumento significativo en el tiempo de inmovilidad, en comparación con el grupo de control ( $p<0.05$ ) (Fig.3.15).



**Fig. 3.15:** Tiempos registrados en las crías de 45 días en los parámetros evaluados en la prueba de nado forzado. Los valores son expresados como la media  $\pm$  EE. n=7-10 hembras y machos. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  comparado con el grupo control.

Los resultados de las crías adultas de 90 días obtenidos en el ANOVA de dos vías indicaron que existen diferencias significativas entre los grupos en el tiempo de nado y el tiempo de inmovilidad ( $F_{(2,54)}=5.183$ ,  $p<0.01$  y  $F_{(2,54)}=4.02$ ,  $p<0.05$ ), respectivamente. Las comparaciones *post hoc* mostraron que las crías hembra expuestas a la combinación B, presentaron una disminución significativa en los tiempos de nado, y un aumento en los tiempos de inmovilidad en comparación con el grupo de control ( $p<0.05$ ). Con respecto al tiempo de lucha o escalada, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos expuestos con respecto al grupo control. En el caso de los machos, no se observaron diferencias significativas en los tiempos de lucha, de nado y en el tiempo de inmovilidad en las crías expuestas a las combinaciones A y B. (Fig. 3.16 y 3.17).





**Fig. 3.17:** Tiempos registrados en las crías de 90 días en los tiempos de nado e inmovilidad evaluados en la prueba de nado forzado. Los valores son expresados como la media  $\pm$  EE. n=10 hembras y machos. \*p<0.05 comparados con los grupos controles.

## Resumen

Las crías hembra de 45 días co-expuestas a ambas combinaciones, demostraron una disminución significativa en los tiempos de escalada, con un aumento significativo en los tiempos de nado e inmovilidad. Con respecto a los animales de 90 días, las crías hembra expuestas a la combinación B, registraron una disminución en el tiempo de nado y un aumento en el tiempo de inmovilidad.

### 3.3. Determinaciones neuroquímicas

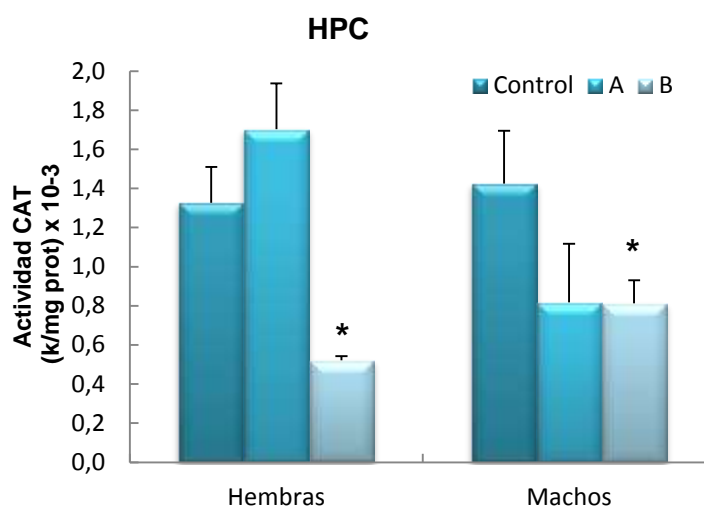
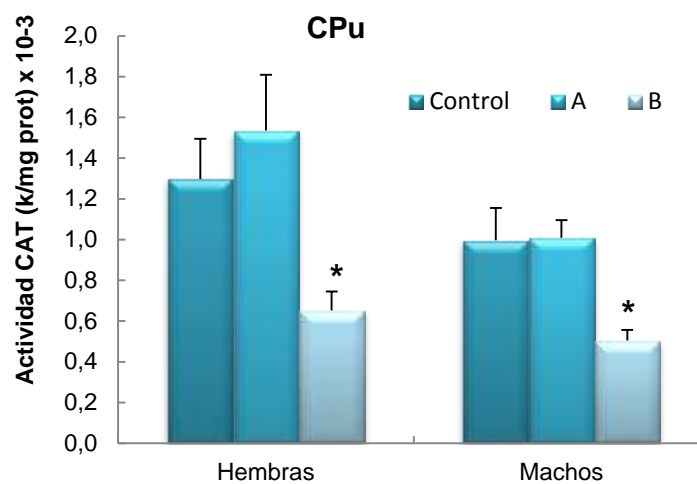
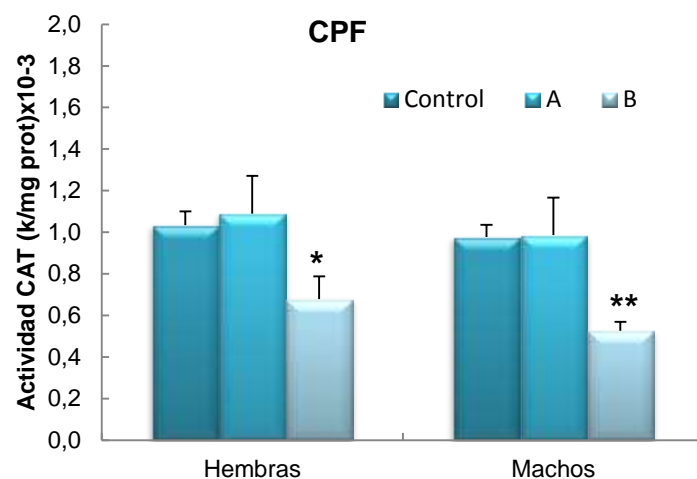
#### 3.3.1. Marcadores de estrés oxidativo

##### 3.3.1.1. Ensayo de catalasa (CAT)

El ANOVA de dos vías del ensayo de CAT en la CPF en ratas de 45 días de edad, mostró diferencias significativa entre los grupos ( $F_{(2,24)}=9.342$ ,  $p<0.001$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa de la actividad de CAT en la corteza de las crías hembra y macho expuestas a la combinación B, con respecto al grupo control ( $p<0.05$  y  $p <0.01$  respectivamente) (Fig. 3.18).

Al evaluar los resultados estadísticos del ensayo de CAT en el CPu, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,24)}=7.734$ ,  $p<0.01$ ) y entre los sexos ( $F_{(1,24)}=4.956$ ,  $p<0.05$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa de la actividad de CAT en las crías hembra y macho expuestos a la combinación B ( $p<0.05$ ) (Fig. 3.18).

Con respecto a lo que sucede en el HPC, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,24)}=5.568$   $p<0.01$ ) e interacción grupo \*sexo ( $F_{(2,24)}=3.753$ ,  $p<0.05$ ). Las comparaciones *post hoc* evidenciaron en las hembras y los machos una disminución significativa de la actividad de CAT en las crías expuestas a la combinación B, en comparación al grupo control ( $p<0.05$ ) (Fig. 3.18).

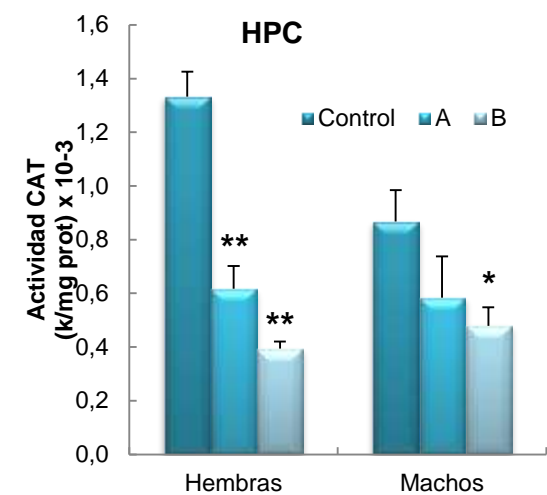
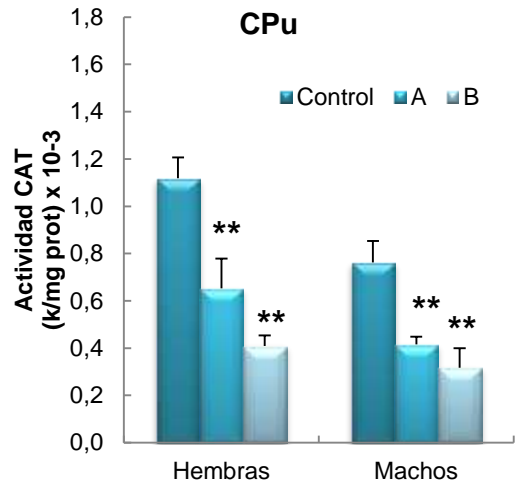
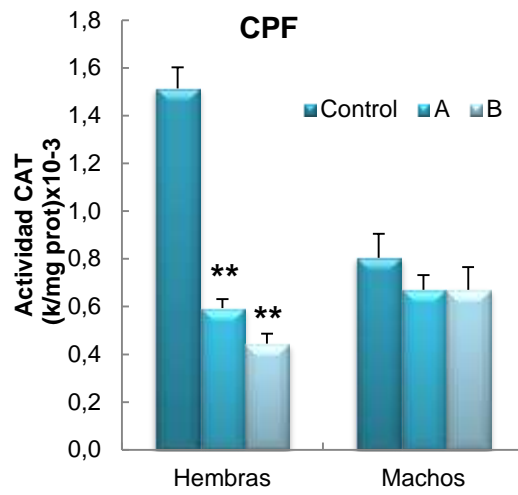


**Fig. 3.18:** Actividades de CAT en las áreas cerebrales de ambos sexos de ratas de 45 días. Los valores se muestran como las medias  $\pm$  EE. n=5. \*p<0.05, \*\*p<0.01 en comparación con el grupo de control.

En crías de 90 días, analizando los datos de CAT de la CPF, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,24)}=43.0$ ,  $p<0.001$ ), sexos ( $F_{(1,24)}=7.25$ ,  $p<0.05$ ) e interacción grupo\*sexo ( $F_{(1,24)}=21.44$ ,  $p<0.001$ ). Las comparaciones *post hoc* evidenciaron una disminución significativa de la actividad de CAT en dicha área en las crías hembra expuestas a ambas combinaciones, con respecto al grupo control ( $p<0.001$ ) (Fig. 3.18). No se observaron diferencias significativas en los machos expuestos a las combinaciones evaluadas.

El ANOVA de dos vías realizado sobre los resultados obtenidos en el CPu, mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,24)}=26.45$   $p<0.001$ ) y sexos ( $F_{(1,24)}=12.086$ ,  $p <0.01$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa de la actividad de CAT en las crías de ambos sexos expuestas a ambas combinaciones ( $p<0.01$ ) (Fig. 3.19).

Al evaluar los resultados en el HPC, observamos que el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,24)}=26.93$ ,  $p<0.001$ ) e interacción entre grupo\*sexo ( $F_{(2,24)}=12.086$ ,  $p<0.05$ ). Las comparaciones *post hoc* exhibieron una disminución significativa de la actividad de CAT en las crías hembra expuestas a ambas combinaciones ( $p<0.001$ ). En los machos, se observó una disminución significativa de la actividad de CAT sólo en las crías expuestas a la combinación B ( $p<0.05$ ) (Fig. 3.19).



**Fig. 3.19:** Actividades de CAT en las áreas cerebrales de ambos sexos de ratas de 90 días. Los valores se muestran como las medias  $\pm$  EE. n= 5. \*p<0.05, \*\*p<0.01 en comparación con el grupo de control.

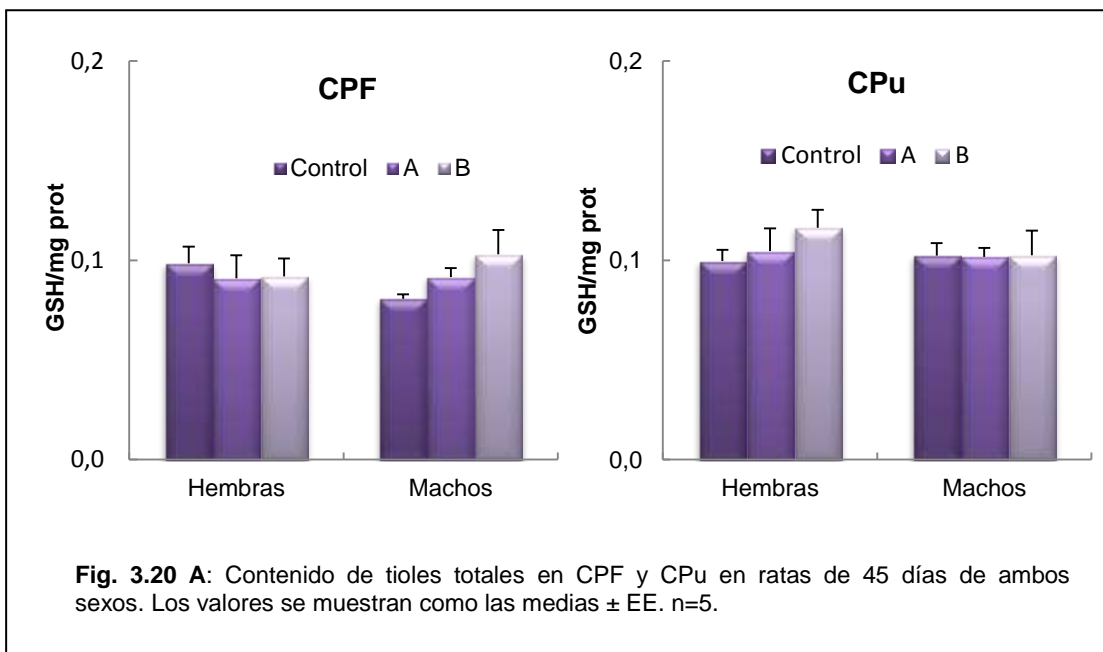


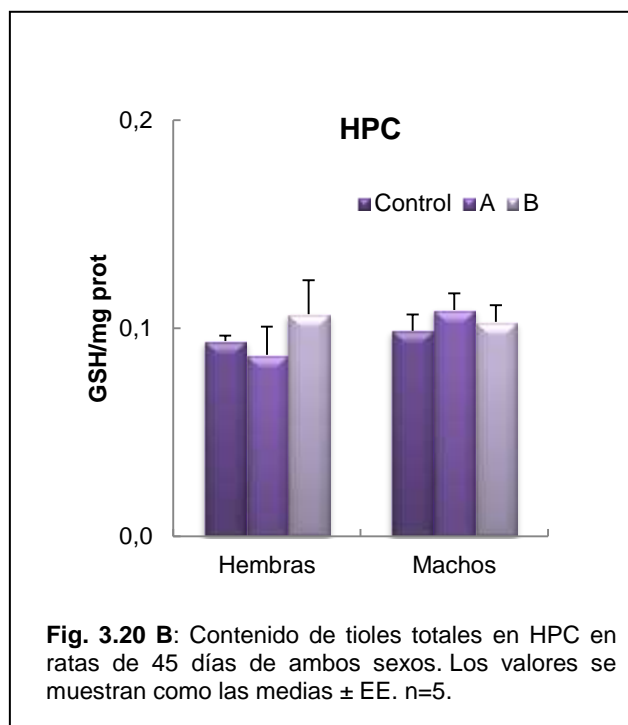
## Resumen

Nuestros resultados demostraron que las crías de 45 días de ambos sexos expuestas a la combinación B, registraron una disminución de la actividad de CAT en las tres áreas cerebrales estudiadas. En el caso de las crías de 90 días, este mismo efecto en las crías hembra expuestas a ambas combinaciones y en las tres áreas. En el caso de los machos adultos, se observaron diferencias en los niveles de CAT en las distintas áreas cerebrales. En los expuestos a ambas combinaciones la actividad de la CAT disminuyó en el CPu, y en los expuestos a la combinación B disminuyó en HPC.

### 3.3.1.2. Determinación de tioles totales

Al evaluar los resultados estadísticos obtenidos en las diferentes áreas de las crías de 45 días, se demostró que el ANOVA de dos vías no reveló diferencias significativas entre los grupos y entre los sexos (Fig.3.20 A y 3.20 B).

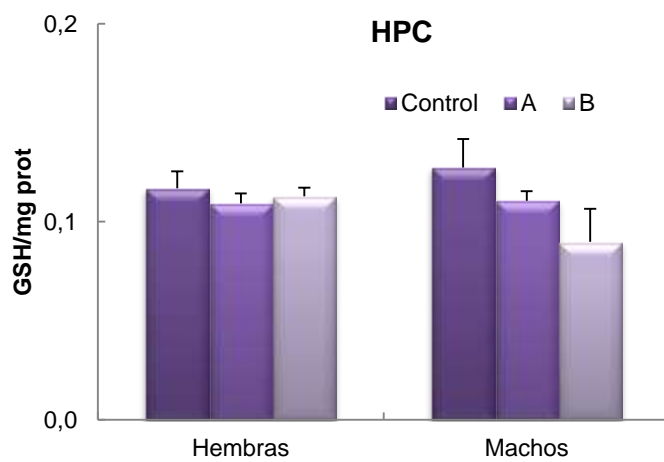
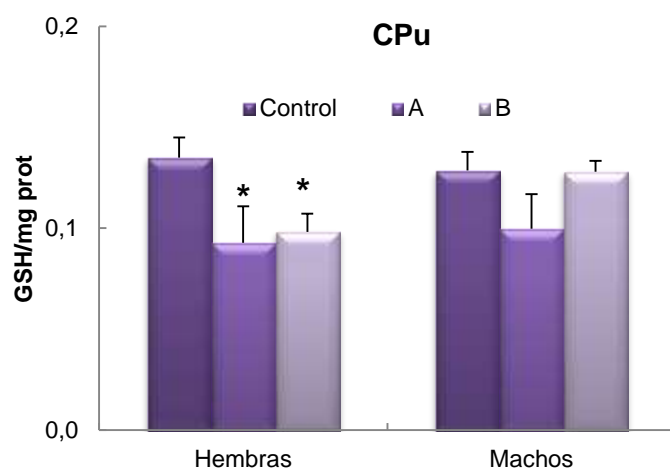
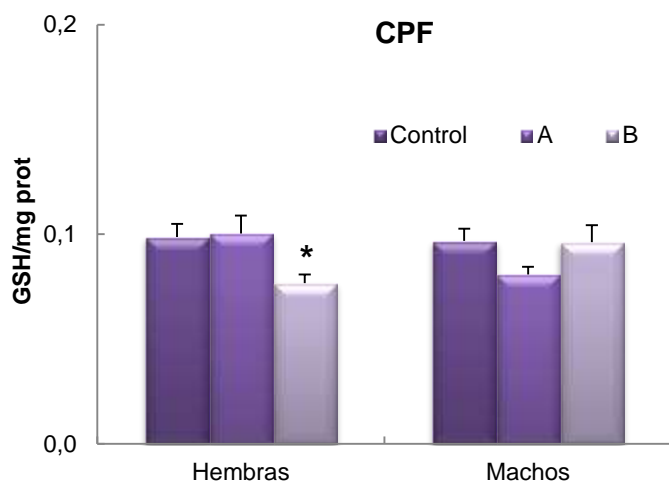




Analizando los datos de SH<sup>-</sup> en la CPF de los animales de 90 días, el ANOVA de dos vías mostró interacción entre grupo\*sexo ( $F_{(2,29)}=4.788$ ,  $p<0.05$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa en la cantidad de SH<sup>-</sup> en las crías hembra expuestas a la combinación B, con respecto al grupo control ( $p<0.05$ ) (Fig. 3.21).

Al evaluar los resultados obtenidos en el CPu, el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,24)}=3.991$ ,  $p<0.01$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa en la cantidad de SH<sup>-</sup> en las hembras expuestas a ambas combinaciones ( $p <0.05$ ), con respecto al grupo control (Fig. 3.21).

En cuanto a la los niveles de SH<sup>-</sup> en el HPC, el ANOVA de dos vías no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos y sexos (Fig. 3.21).



**Fig. 3.21:** Contenido de tioles totales en las áreas cerebrales de ambos sexos de ratas de 90 días. Los valores se muestran como las medias  $\pm$  EE. n=5. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo control.

## Resumen

Se evidenció una disminución en el contenido de SH<sup>-</sup> en la CPF en las crías hembra de 90 días expuestas a la combinación B. En el CPu, esta disminución se registró en las hembras expuestas a ambas combinaciones.

### 3.3.2. Evaluación de la vía glutamatérgica y colinérgica

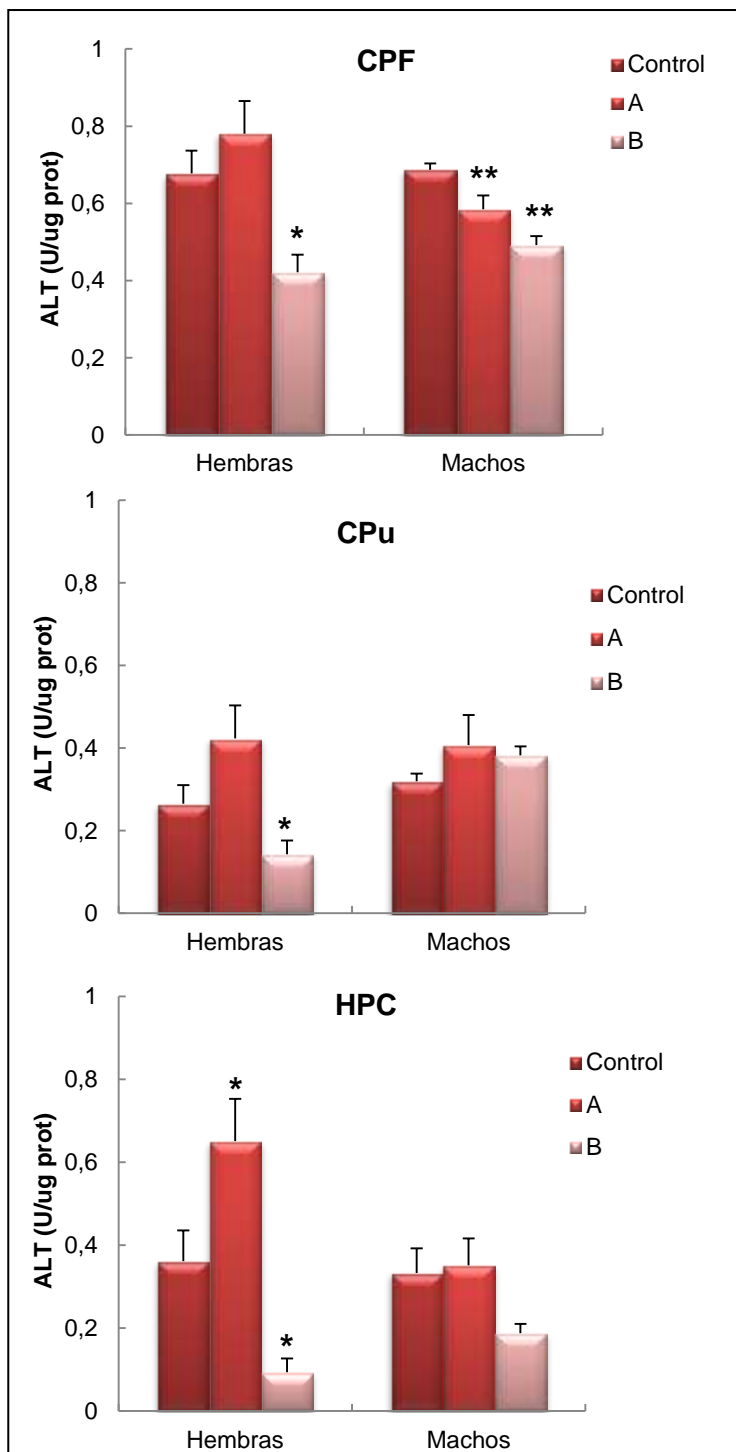
#### 3.3.2.1. Evaluación de la neurotransmisión glutamatérgica

En las crías de 45 días de edad, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,24)}=11.463$ ,  $p<0.001$ ) en los niveles de ALT medidos en la CPF. Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa en las crías hembra expuestas a la combinación B, en comparación con el grupo control ( $p<0.05$ ). En el caso de los machos, en dichas comparaciones se observó una disminución significativa en los machos expuestos a ambas combinaciones, en comparación con el grupo control ( $p<0.01$ ) (Fig. 3.22)

En el CPu, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre sexos ( $F_{(1,26)}=4,81$ ,  $p<0.05$ ) en los niveles de ALT. Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa en las crías hembra expuestas a la combinación B, en comparación con el grupo control ( $p<0.05$ ).

En el HPC, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,24)}=11.442$ ,  $p<0.001$ ) e interacción grupo\*sexo ( $F_{(2,24)}=3.599$ ,  $p<0.05$ ) en los niveles de esta enzima. Las comparaciones *post hoc* mostraron un aumento significativo de la actividad de la enzima en las crías hembra expuestas a la combinación A y una disminución significativa de actividad en las crías

expuestas a la combinación B, en comparación con el grupo control ( $p < 0.05$ ). En el caso de los machos, no se observaron diferencias significativas en la actividad de ALT entre las crías expuestas a ambas combinaciones, con respecto al grupo control (Fig. 3.22).

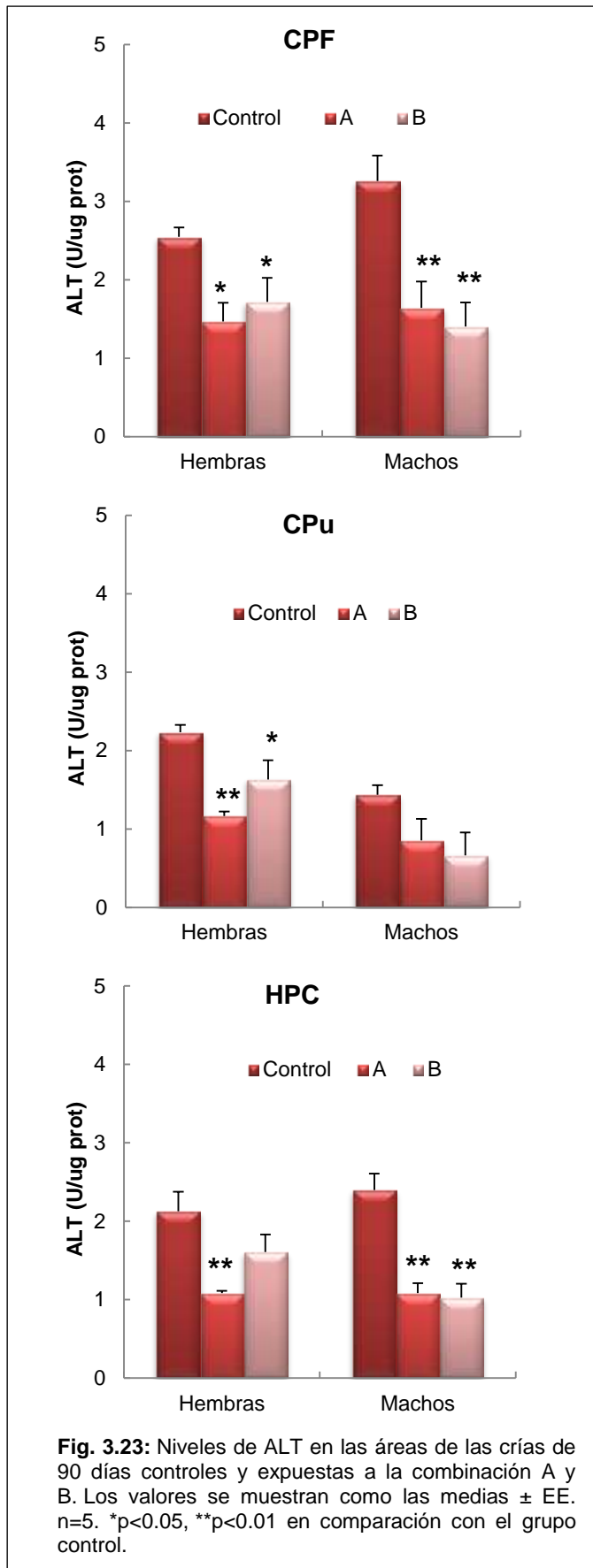


**Fig. 3.22:** Niveles de ALT en las diferentes áreas de las crías de 45 días controles y expuestas a la combinación A y B. Los valores se muestran como las medias  $\pm$  EE.  $n=5$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  en comparación con el grupo control.

En las ratas de 90 días de edad, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,24)}=13.311$ ,  $p<0.001$ ) en los niveles de ALT medidos en la CPF. Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa en las crías de ambos sexos y expuestas a ambas combinaciones, en comparación con el grupo control ( $p<0.05$  en las hembras,  $p<0.01$  en los machos).

En el CPu, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,24)}=8,442$ ,  $p<0.001$ ) y sexos ( $F_{(1,24)}=15.949$ ,  $p<0.001$ ) en los niveles de ALT. Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa en las crías hembra expuesta a las combinaciones A y B en comparación con el grupo control ( $p<0.01$  para la combinación A y  $p<0.05$  para la combinación B). No se observaron diferencias significativas en los niveles de ALT en el CPu de los machos tratados, con respecto al grupo control. Aunque sugiere una disminución en dichos niveles, ésta no es significativa.

En el HPC, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,24)}=14.66$ ,  $p<0.001$ ) en los niveles de esta enzima. Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa de la actividad enzimática en las crías hembra expuestas a la combinación A, en comparación con el grupo control ( $p<0.01$ ). En el caso de los machos, se observó una disminución significativa de la actividad en las crías expuestas a ambas combinaciones, con respecto al grupo control ( $p<0.01$ ) (Fig. 3.23).

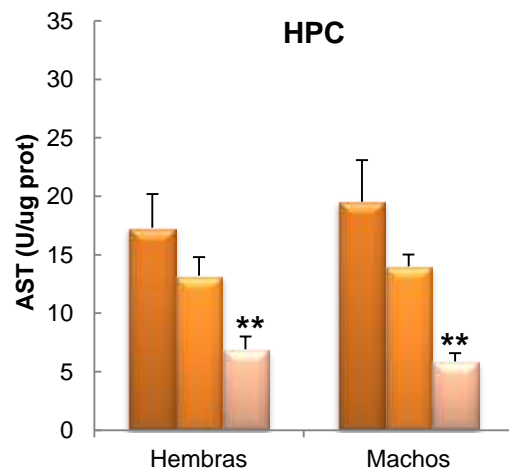
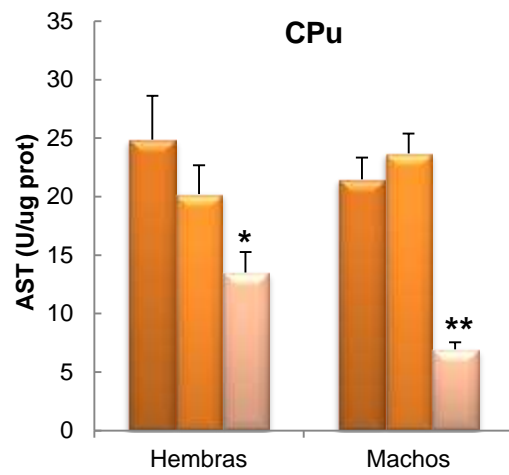
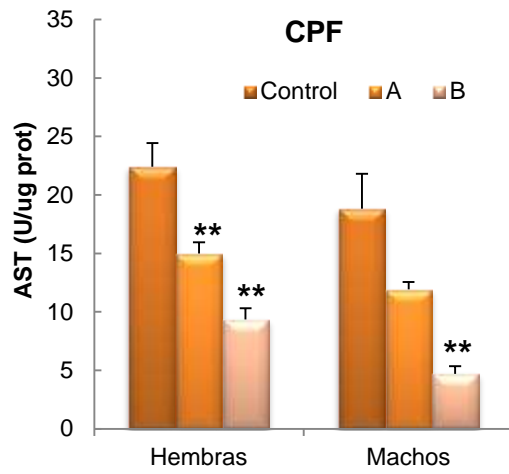


Con respecto a la actividad enzimática de la AST en las crías de 45 días de edad, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,24)}=21.952$ ,  $p<0.001$ ) y entre sexos ( $F_{(1,24)}=4.479$ ,  $p<0.05$ ) en la CPF. Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa en las crías hembra expuestas a ambas combinaciones, en comparación con el grupo control ( $p <0.01$ ). En el caso de los machos, en dichas comparaciones se observó una disminución significativa en los machos expuestos a la combinación B, en comparación con el grupo control ( $p <0.01$ ).

En el el CPu, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,24)}=17.895$ ,  $p<0.001$ ) en los niveles de AST. Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa en dichos niveles, en las crías de ambos sexos expuestas a la combinación B, en comparación con el grupo control ( $p<0.05$  en las hembras y  $p<0.01$  en los machos).

En el HPC, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,24)}=11.18$ ,  $p<0.001$ ) en los niveles de esta enzima. Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa de la actividad en las crías de ambos sexos expuestas a la combinación B, en comparación con el grupo control ( $p<0.01$ ) (Fig. 3.24).





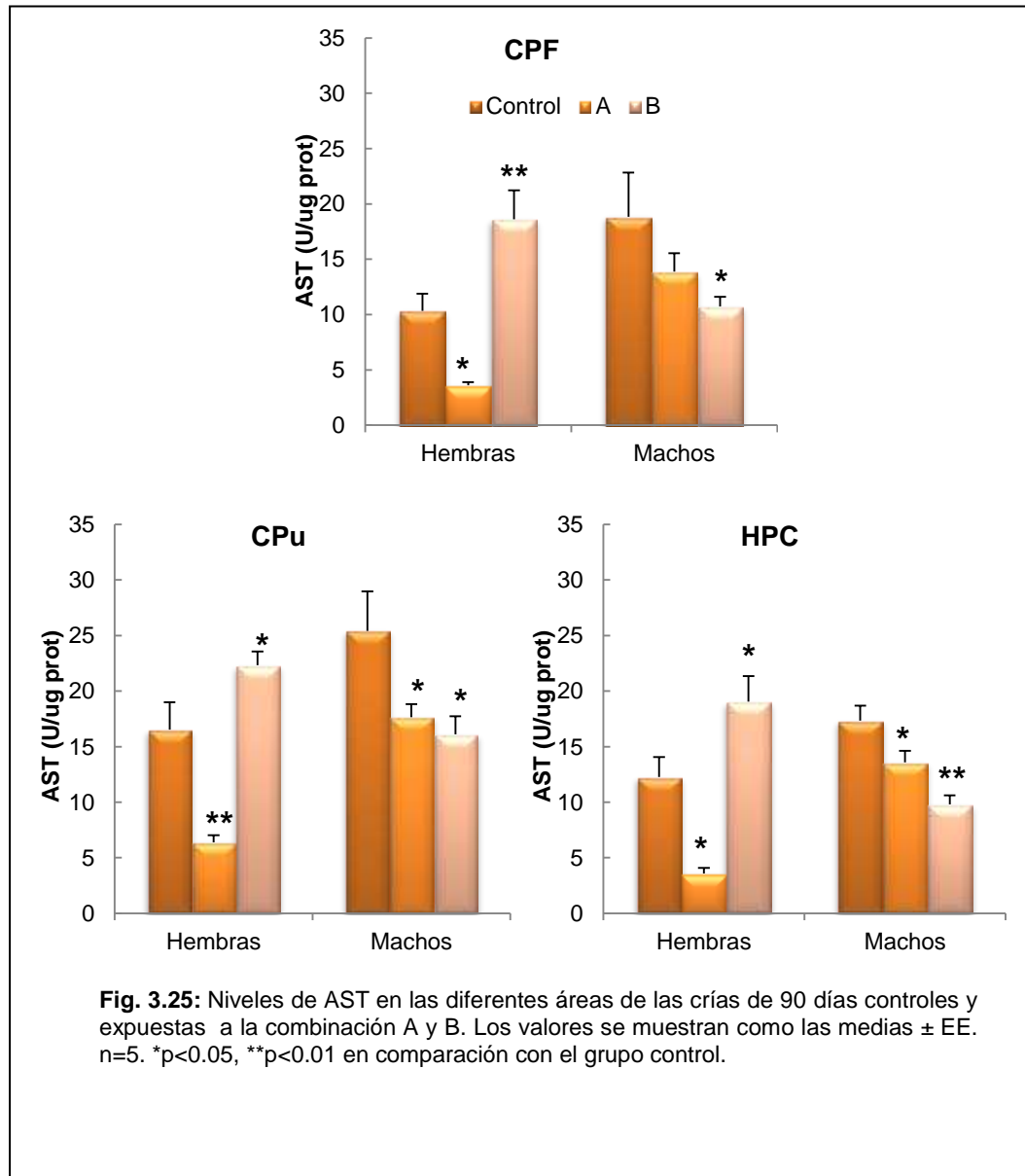
**Fig. 3.24:** Niveles de AST en las diferentes áreas de las crías de 45 días controles y expuestas a la combinación A y B. Los valores se muestran como las medias  $\pm$  EE. n=5. \*p<0.05, \*\*p<0.01 en comparación con el grupo control.

Con respecto a los resultados obtenidos en los animales de 90 días en los niveles de AST en la CPF, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,24)}=3.999$ ,  $p<0.05$ ) e interacción entre grupo\*sexo ( $F_{(2,24)}=9.767$ ,  $p<0.001$ ). En las comparaciones *post hoc* se observó una disminución significativa en la actividad enzimática de AST en las crías hembra expuestas a la combinación A ( $p<0.05$ ) y un aumento significativo de actividad con la combinación B ( $p<0.01$ ), en comparación con el grupo control. En los machos expuestos, se observó una disminución significativa en los niveles de AST en los animales expuestos a la combinación B, en comparación con el grupo control ( $p<0.05$ ) (Fig. 3.25).

Analizando los datos obtenidos del CPU, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas en la actividad de esta enzima entre grupos ( $F_{(2,24)}=7.638$ ,  $p<0.002$ ), sexos ( $F_{(1,24)}=5.909$ ,  $p<0.02$ ) e interacción entre grupo\*sexo ( $F_{(2,24)}=8.588$ ,  $p<0.001$ ). En las comparaciones *post hoc* se observó una disminución significativa en las crías hembra expuestas a la combinación A ( $p<0.01$ ) y un aumento significativo en las expuestas a la combinación B ( $p<0.05$ ), en comparación con el grupo control. Por el contrario, los machos expuestos a ambas combinaciones de iAs/F mostraron una disminución significativa en los niveles de AST en esta área, en comparación con el grupo control ( $p<0.05$ ).

En el HPC, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,24)}=5.105$ ,  $p<0.05$ ) e interacción grupo\*sexo ( $F_{(2,24)}=11.596$ ,  $p<0.001$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron también un efecto bifásico en las crías hembra expuestas a ambas combinaciones. Se observó una disminución significativa de la actividad de la enzima con la combinación A ( $p<0.05$ ) y un aumento significativo en la actividad en las crías expuestas a la combinación B

( $p < 0.05$ ), en comparación con el grupo control. Por el contrario, las crías macho expuestas a ambas combinaciones mostraron una disminución significativa en los niveles de AST, en comparación con el grupo control ( $p < 0.05$  con la combinación A y  $p < 0.01$  con la combinación B) (Fig. 3.25).



## **Resumen**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las crías de 45 días co-expuestas a iAs/F, se observó una disminución en la actividad de AST en las tres áreas, principalmente en las crías expuestas a la combinación B. Los niveles de ALT medidos en la CPF disminuyeron en las hembras co-expuestas a la combinación B y en el caso de los machos, este efecto se observó con ambas combinaciones. En el CPu, la actividad de esta enzima disminuyó en las crías hembra expuestas a la combinación B y en el HPC, se observó un aumento de la actividad en las crías expuestas a la combinación A y una disminución de actividad en las expuestas a la combinación B.

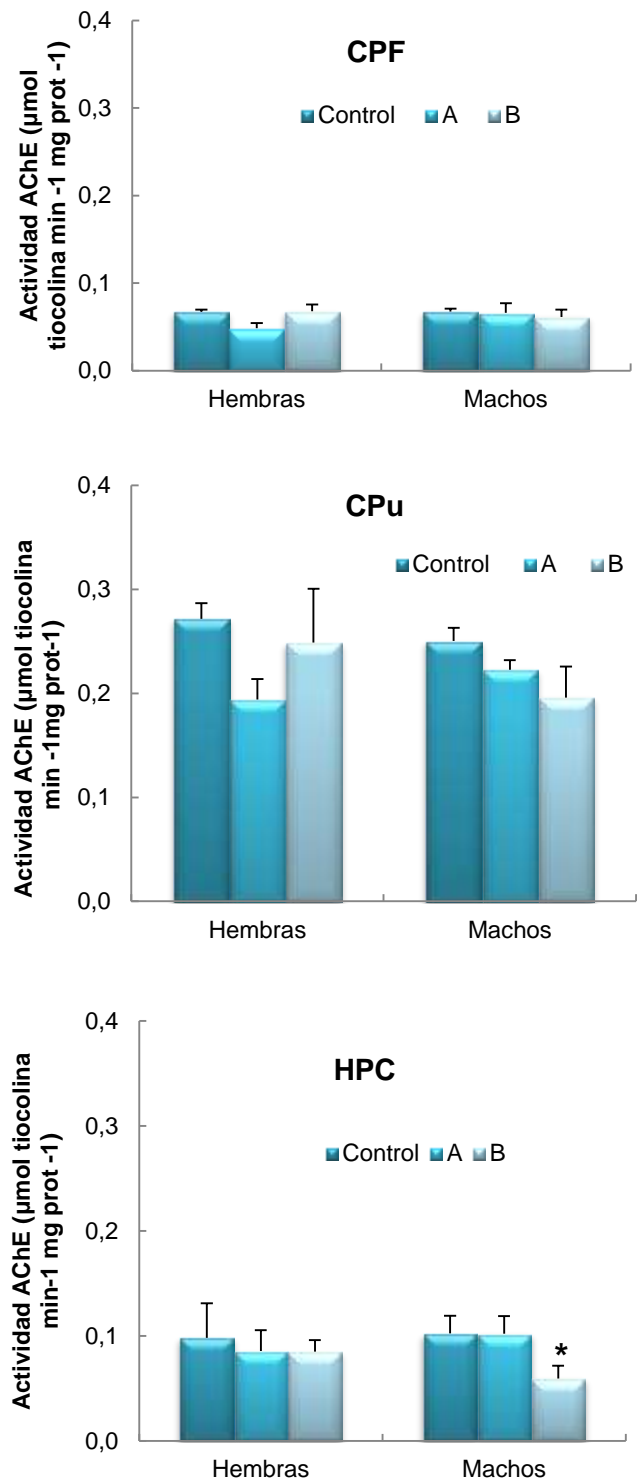
En las crías de 90 días de edad, los niveles de ALT medidos en la CPF y en el CPu disminuyeron en las crías hembra expuestas a ambas combinaciones, y en el HPC, se registró una disminución de la actividad en las crías expuestas a la combinación A, en ambos sexos. Adicionalmente, se observó una disminución de la actividad de AST en CPF, CPu e HPC en las crías macho y en las hembras expuestas a la combinación A y un aumento en la actividad en las crías hembra expuestas a la combinación B.

### **3.3.2.2. Evaluación de la actividad colinérgica**

#### **Determinación de acetilcolinesterasa (AChE)**

Al realizar el análisis de los resultados en las crías de 45 días, mediante un ANOVA de dos vías, no se observaron cambios significativos en los niveles de la enzima en la CPF y en el CPu (Fig. 3.26) entre los grupos y sexos.

Con respecto al HPC, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,24)}=7.052$ ,  $p<0.01$ ) e interacción grupo\*sexo ( $F_{(2,24)}=3.793$ ,  $p<0.05$ ). Las comparaciones post hoc mostraron una disminución significativa en la actividad de AChE en los machos expuestos a la combinación B ( $p<0.001$ ) (Fig. 3.26).

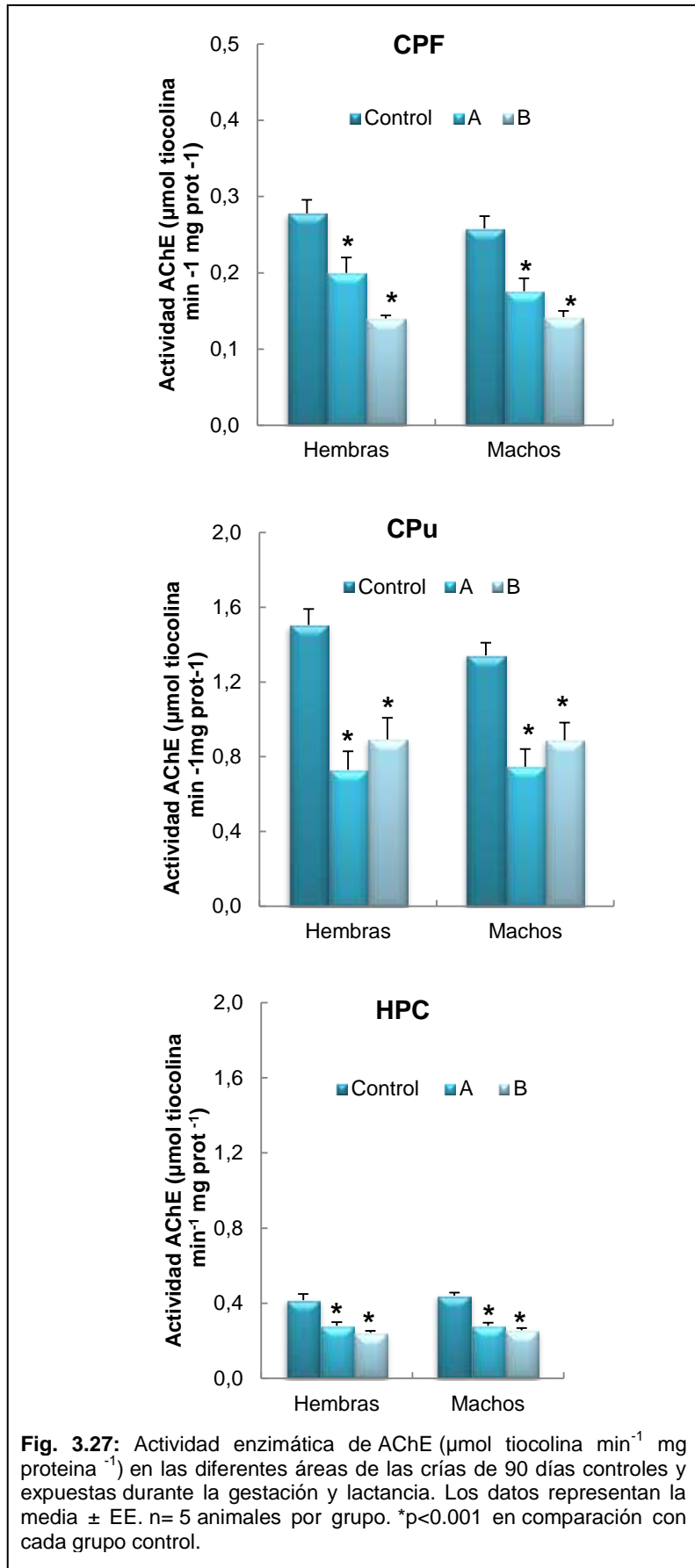


**Fig. 3.26:** Actividad enzimática de AChE ( $\mu\text{mol}$  tiocolina  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg}$  proteína $^{-1}$ ) en las diferentes áreas de las crías de 45 días controles y expuestas durante la gestación y lactancia. Los datos representan la media  $\pm$  EE.  $n=5$  animales por grupo. \* $p<0.001$  en comparación con el grupo control.

En las crías de 90 días de edad, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos en la CPF ( $F_{(2,24)}=39.41$ ,  $p<0.001$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa en la actividad de AChE en las crías de ambos sexos expuestas a ambas combinaciones ( $p<0.001$ ), en comparación con el grupo control (Fig. 3.27).

En el CPu, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,24)}=21.99$ ,  $p<0.001$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa en la actividad de AChE en las crías de ambos sexos expuestas a ambas combinaciones ( $p<0.001$ ).

Con respecto al HPC, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,24)}=38.73$ ,  $p<0.001$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa en la actividad de AChE en esta área en las crías de ambos sexos expuestas a ambas combinaciones, en comparación con el grupo control ( $p<0.001$ ) (Fig. 3.27).





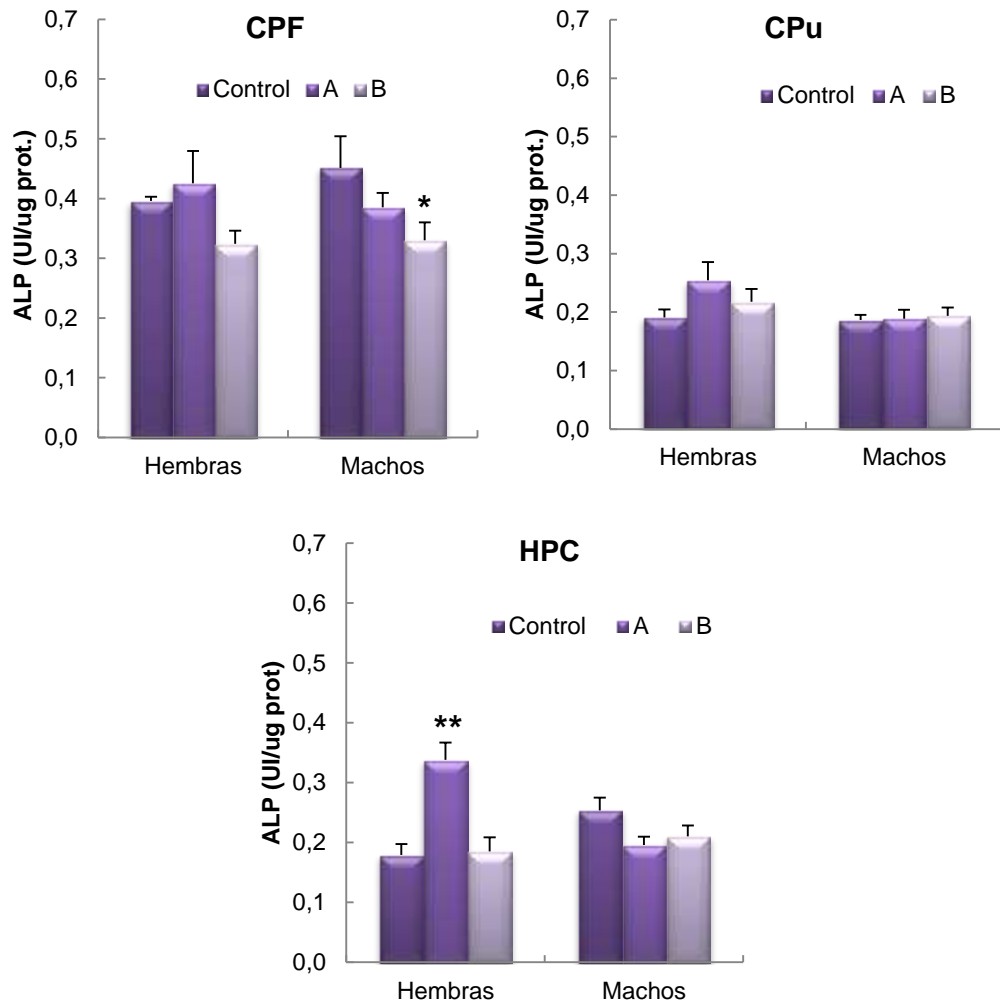
## Resumen

Los machos de 45 días que fueron co-expuestos a la combinación B mostraron una disminución de la actividad de la AChE en el HPC. La co-exposición a iAs/F produjo en las crías adultas de ambos sexos, una disminución en la actividad de esta enzima en las tres áreas estudiadas.

### 3.3.2.3. Determinación de Fosfatasa Alcalina

Al realizar el análisis de los resultados en la CPF de las crías de 45 días, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,24)}=3.863$ ,  $p<0.05$ ) en la actividad de la ALP. Las comparaciones *post hoc* mostraron una disminución significativa en la actividad de la enzima en los machos expuestos a la combinación B ( $p<0.05$ ), con respecto al grupo control (Fig. 3.28).

En el CPu, el ANOVA de dos vías no evidenció diferencias significativas entre los grupos y entre los sexos. Con respecto al HPC, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,24)}=5.198$ ,  $p<0.01$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron un aumento significativo en la actividad de la ALP en las hembras expuestas a la combinación A ( $p<0.001$ ) (Fig. 3.28).

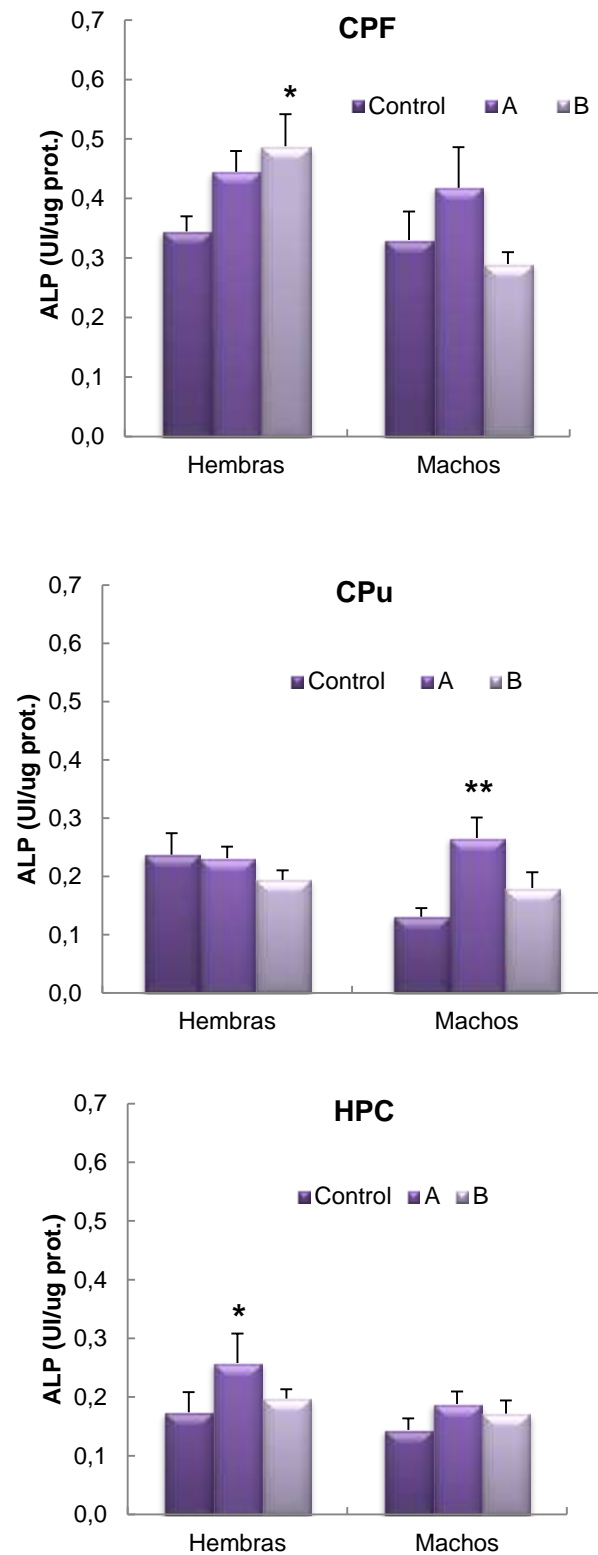


**Fig. 3.28:** Actividad enzimática de ALP (UI/ug prot.) en las áreas cerebrales de las crías de 45 días. Los datos representan la media  $\pm$  EE. n= 5 animales por grupo. \*p<0.05, \*\*p<0.001 en comparación con el grupo de control.

En las crías de 90 días de edad, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los sexos en la CPF ( $F_{(1,24)}=4.61$ ,  $p<0.05$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron un aumento significativo en la actividad de ALP en las hembras expuestas a la combinación B ( $p<0.05$ ) (Fig. 3.29).

En el CPu, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,24)}=3.706$ ,  $p<0.05$ ) e interacción grupo\*sexo ( $F_{(2,24)}=3.596$ ,  $p<0.05$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron un aumento significativo en la actividad de la enzima en los machos expuestos a la combinación A ( $p<0.01$ ).

Con respecto al HPC, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(2,24)}=3.410$ ,  $p<0.05$ ) y entre los sexos ( $F_{(1,24)}=4.322$ ,  $p<0.05$ ). Las comparaciones *post hoc* mostraron un aumento significativo en la actividad de la enzima en las hembras expuestas a la combinación A ( $p<0.05$ ) (Fig. 3.29).



**Fig. 3.29:** Actividad enzimática de ALP (UI/ug prot.) en las áreas cerebrales de las crías de 90 días. Los datos representan la media  $\pm$  EE. n= 5 animales por grupo. \*p<0.05, \*\*p<0.01 en comparación con el grupo control.

## **Resumen**

En las crías jóvenes, la co-exposición a la combinación A produjo en las hembras, un aumento en la actividad de la ALP en el HPC y en los machos expuestos a la combinación B, una disminución de la actividad de esta enzima en la CPF.

En las crías adultas, la co-exposición a la combinación A produjo en las hembras, un aumento en la actividad de esta enzima en el HPC y en las crías hembra expuestas a la combinación B, este efecto se observó en la CPF. Las crías macho expuestas a la combinación A registraron un aumento de la actividad de la ALP sólo en el CPu.

# DISCUSSION

A lo largo de este trabajo se evaluaron los efectos neurotóxicos provocados por la co-exposición de iAs/F en crías de ratas expuestas durante la gestación y la lactancia a través del agua de consumo. Previamente, en nuestro laboratorio estudiamos los efectos individuales de concentraciones bajas de iAs o F, expuestas durante un período crítico del desarrollo que es la gestación y la lactancia. Las concentraciones elegidas fueron 5 y 10 veces mayores a las permitidas por la OMS, es decir: 0.05 y 0.10 mg/L de iAs y de 5 y 10 mg/L de F, respectivamente, y están presentes en distintos cursos hídricos de nuestro país. Debido a que existe escasa información bibliográfica de lo que ocurre con estos elementos cuando son expuestos en forma conjunta y a bajas concentraciones en el agua de bebida, en este trabajo de tesis realizamos una comparación exhaustiva con los datos previos, de exposiciones individuales de estos elementos publicados en revistas internacionales de alto nivel. Utilizamos las siguientes combinaciones: Combinación A: 0.05 + 5 mg/L de iAs y F, respectivamente y Combinación B: 0.10 + 10 mg/L de iAs y F, respectivamente. La importancia en la elección de estas concentraciones en el agua de bebida radica en que muchas personas están expuestas a estos niveles e incluso mayores. Incluso en varias provincias de Argentina, se permiten niveles de iAs de 0.05 mg/L debido a la imposible remoción en el ambiente de dicho elemento. Debido a ello, nuestros resultados pueden ser importantes para el desarrollo de políticas públicas que establezcan niveles seguros de estos elementos en el agua de bebida.

Expusimos a ratas Wistar preñadas a las combinaciones A y B durante toda la gestación y la lactancia, debido a que esta etapa es de gran vulnerabilidad a los efectos tóxicos y a las lesiones irreversibles que pueden ocurrir y observarse en forma tardía, por ejemplo en la vida adulta. A lo largo de

la exposición, evaluamos distintos parámetros en las madres como es el peso corporal, el consumo de agua y el consumo de alimento.

La variación de estos parámetros con respecto a las madres controles, son considerados como indicadores de toxicidad sistémica, y también evidencian diversos disturbios en los mecanismos metabólicos, hormonales y homeostáticos del organismo como consecuencia de la exposición (Everds y col., 2013). Nuestros resultados demostraron que la co-exposición a la combinación de iAs/F no produce variaciones en el consumo de alimento ni de agua en las madres durante el período gestacional. No se observaron alteraciones en la duración de la gestación, en el número de crías, en el crecimiento, ni efectos teratogénicos visibles en las mismas. Los aumentos observados en los pesos corporales de las madres y crías, así como en el consumo de agua y alimento, corresponden a un proceso normal atribuido a las etapas de gestación y crecimiento. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio evidenciaron que la exposición individual a iAs o F realizados durante el período prenatal y la lactancia no produce efectos significativos sobre estos parámetros (Gumilar y col., 2015; Bartos y col., 2015). Por lo tanto, la co-exposición a iAs/F no produce efectos nuevos, tardíos ni diferentes en comparación a los resultados obtenidos por la exposición individual a estos elementos.

En relación al desarrollo sensitivo y la actividad motora, se demostró que ambos son regulados por el sistema vestibular y el cerebelo (Kreider y Blumberg, 2005). Cualquier alteración observada en los reflejos sensoriomotores puede ser considerada como una insuficiente maduración a nivel del SNC. Nuestros resultados demostraron que las crías hembra co-expuestas a ambas combinaciones, mostraron un retraso en el desarrollo del reflejo de enderezamiento. En el reflejo de aversión al precipicio, se observó un retraso en la adquisición de este reflejo en las crías hembra expuestas a la combinación B y



en las crías macho expuestas a ambas combinaciones. Con respecto al desarrollo del reflejo de geotaxis negativa, se registró un retraso en la maduración en las crías hembra expuestas a ambas combinaciones y en los machos expuestos a la combinación A. Finalmente, se registró un retraso significativo en la apertura de los ojos y de los canales auditivos en las crías expuestas a ambas combinaciones y de ambos sexos.

Diferentes trabajos de investigación hacen referencia al efecto producido por algunos metales sobre los niveles de testosterona libre y estradiol, influyendo sobre el desarrollo cerebral, el comportamiento y manifestando diferencias entre los sexos (Rutter y col., 2003; Nagata y col., 2005; De Craemer y col., 2017). Por otro lado, las alteraciones observadas en estos reflejos podrían ser la consecuencia de un daño primario en la mielinización neuronal (Wu y col., 2008).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio en ratas expuestas a bajas concentraciones de F durante la gestación y la lactancia, señalaron que este elemento no afecta el desarrollo sensoriomotor de las crías de ambos sexos (Bartos y col., 2015). Por el contrario, la exposición temprana a iAs, afecta el desarrollo sensoriomotor de las crías hembra, retrasando el reflejo de enderezamiento y la aversión al precipicio. En el caso de los machos, se observó una alteración en la aversión al precipicio en los expuestos a 0.10 mg/L de iAs. Con respecto al reflejo de geotaxis negativa, sólo los machos expuestos a esta concentración, mostraron un retraso en la adquisición de dicho reflejo (Gumilar y col., 2015). También se demostró que la exposición a F afecta significativamente el tiempo de apertura de ojos en las crías (Bartos y col., 2015), mientras que iAs, no tiene efecto sobre la apertura de ojos ni de canales auditivos. Por lo tanto:

- ✓ La co-exposición temprana a iAs/F produce nuevas alteraciones en el desarrollo sensoriomotor de las crías, que no son observadas en la exposición individual de estos elementos.

- ✓ El F podría estar actuando como potenciador del iAs cuando se encuentran en conjunto, incrementando la sensibilidad de las crías macho, retrasando la maduración del reflejo de aversión al precipicio.
- ✓ La co-exposición a iAs/F incrementaría la sensibilidad de las hembras provocando un retraso en la maduración del reflejo de geotaxis negativa.
- ✓ La co-exposición temprana a iAs/F provoca un retraso significativo en la apertura de los ojos y de los canales auditivos de las crías de ambos sexos, sugiriendo una asincronía de los procesos madurativos en el desarrollo posnatal.

Como se mencionó anteriormente, la BOF es utilizada para evaluar diferentes aspectos de la funcionalidad del sistema nervioso a nivel neuromuscular, sensorial y autonómico. Nuestros resultados demostraron que las crías de 90 días y de ambos sexos que fueron co-expuestas a ambas combinaciones de iAs/F, registraron una disminución significativa en la respuesta nociceptiva, indicando así un posible efecto analgésico. En investigaciones previas, demostramos que la exposición a 0.10 mg/L de iAs durante la gestación y la lactancia, disminuye significativamente el reflejo nociceptivo en las crías adultas de ambos sexos (Gumilar y col., 2015). Por su parte, la exposición a F en las mismas condiciones, no produjo cambios en ninguno de los parámetros evaluados en la BOF (Bartos y col., 2015).

Si bien no se han encontrado referencias bibliográficas que relacionen la exposición al iAs y/o F con la respuesta al dolor, está documentado que el CPu dorsal forma parte de los ganglios basales, un conjunto de estructuras cerebrales que controlan los movimientos voluntarios, los motores y las funciones somatosensoriales (Albin y col., 1989; Chudler, 1998). El CPu dorsal es activado por estímulos nociceptivos (Schneider y Lidsky, 1981; Coghill y col., 2003) y una

estimulación eléctrica o química inhibe el dolor (Gear y Levine, 2009; Barceló y col., 2012; Nakamura y col., 2013). A su vez, el CPu se caracteriza por su elevada concentración de opiáceos y cannabinoides endógenos (Van Waes y col., 2012). Nuestros resultados muestran además, que en esta área cerebral se produce un desbalance en los sistemas de neurotransmisión y un aumento de los niveles de estrés oxidativo, pudiendo afectar las vías que modulan el dolor.

Otros estudios *in vitro* han sugerido que el iAs modula la actividad de los macrófagos produciendo una sobreexpresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y un aumento de la concentración de prostaglandina E2 (PGE2) en las células endoteliales y que estos efectos podrían conducir a alteraciones en las respuestas inflamatorias y dolorosas *in vivo* (Tsai y col., 2002). Evidencias en experimentos *in vivo* con altas concentraciones de iAs administradas de forma aguda en ratones, demostraron que el iAs por sí solo no produce dolor ni inflamación significativa (Aguirre-Bañuelos y col., 2004). Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios que relacionen la exposición a iAs durante la gestación y la lactancia con la inflamación tisular y con el dolor. Por lo tanto:

- ✓ La co-exposición a ambas combinaciones de iAs/F produce un efecto analgésico en las crías de 90 días de ambos sexos.
- ✓ El F cuando se encuentra asociado al iAs, potenciaría el efecto analgésico en las crías de 90 días, observándose una disminución de la respuesta nociceptiva en crías de ambos sexos expuestas a ambas combinaciones.

En relación a la prueba de campo abierto, la misma es una evaluación mediante la cual múltiples conductas naturales de las ratas son observadas simultáneamente en una caja o arena novedosa para el animal. En esta tesis, evaluamos la actividad locomotora horizontal y vertical, la emocionalidad y la habituación de las ratas a un nuevo ambiente. Nuestros resultados demostraron

que las crías hembra de 45 días de edad co-expuestas a la combinación A, registraron una disminución en el número de cuadrados atravesados, mientras que en las crías hembra expuestas a la combinación B, se observó un efecto opuesto.

En las crías de 90 días, la co-exposición a la combinación B produjo un aumento en el número de cuadrados atravesados en ambos sexos.

Con respecto a la actividad locomotora vertical, se observó que las crías de 90 días y de ambos sexos co-expuestas a ambas combinaciones, registraron un aumento en número de rearings.

Al analizar la habituación en cada período de 5 min en los diferentes grupos, sexos y edades, se observó una disminución paulatina tanto el número de cuadrados atravesados como el número de rearings, confirmando que la combinación a ambas concentraciones no afectaron a la misma. Como se mencionó anteriormente, las mezclas pueden interactuar en el organismo de tal forma que la toxicidad combinada sea más grave o diferente a la toxicidad individual (Calderon y col., 2003).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, no evidenciaron alteraciones en la actividad locomotora en las crías de 45 días cuando las mismas fueron expuestas durante la etapa prenatal y la lactancia a iAs o F en forma individual (Bartos y col., 2015). Sin embargo, en las crías hembra adultas de 90 días expuestas a 0.05 y 0.10 mg/L de iAs y los machos expuestos a 0.10 mg/L iAs durante el desarrollo, presentaron una disminución en la actividad locomotora (Gumilar y col., 2015). Con respecto al F, se observó una disminución de la actividad locomotora en las crías adultas de ambos sexos expuestas a 5 y 10 mg/L F durante el desarrollo y la lactancia (Bartos y col., 2015).

Por lo tanto:

- ✓ La co-exposición produce en las crías hembra de 45 días un efecto bifásico sobre la actividad locomotora, observándose una disminución de actividad en las crías expuestas a la combinación A, y un aumento en la actividad en las crías expuestas a la combinación B.
- ✓ Este efecto bifásico observado en las crías de 45 días es un efecto nuevo, ya que no se registró en las exposiciones individuales de estos elementos.
- ✓ La co-exposición produce un aumento en la actividad locomotora de las crías de 90 días de ambos sexos y que fueron expuestas a ambas combinaciones.
- ✓ La co-exposición a ambas combinaciones produce en las crías de 90 días y de ambos sexos un efecto antagónico, observándose un aumento en la actividad locomotora y una disminución de dicha actividad ante la exposición individual a ambos elementos.

Como mencionamos anteriormente, para evaluar el comportamiento de la ansiedad se utilizó el dispositivo de plus maze o laberinto en cruz elevado. En esta prueba, el aumento del tiempo de permanencia y del número de entradas en los brazos abiertos, que son aversivos a la conducta normal de la rata, se relacionan con una disminución de la ansiedad o un efecto ansiolítico (Pellow y col., 1985). Nuestros resultados demostraron que la co-exposición a ambas combinaciones de iAs/F utilizadas, provocó en las crías hembras de 45 días un aumento de permanencia en los brazos abiertos. En las crías adultas, el aumento de permanencia en los brazos abiertos se observó en ambos sexos y combinaciones, indicando un efecto ansiolítico. Las diferencias entre los sexos en este aspecto no fue sorprendente, ya que existe un consenso general según el cual las ratas hembra son más sensibles a los efectos tóxicos de los productos

químicos que los machos (Grad y col., 1988; Mugford y Kedderis, 1988). Por otro lado, se observó en modelos animales de ansiedad y depresión, que el desarrollo de dimorfismos sexuales en el comportamiento y la función cognitiva, depende principalmente de la acción de las hormonas gonadales (Palanza P., 2001).

Evaluaciones previas realizadas en crías hembra de 45 días cuyas madres fueron expuestas prenatalmente a iAs o F en forma individual (0.10 mg/L iAs y 10 mg/L F), también demostraron este efecto. En el caso de las crías de 90 días, se observó este efecto en ambos sexos expuestos a ambas concentraciones de iAs (0.05 y 0.10 mg/L iAs) y F (5 y 10 mg/L F) (Bartos y col., 2015). Por lo tanto:

- ✓ La co-exposición durante etapas tempranas del desarrollo induce en la crías hembra de 45 días un efecto ansiolítico en crías expuestas a ambas combinaciones. Considerando que este efecto se observa solo con la dosis más elevada de As y F administrada en forma individual, la combinación produciría un mayor efecto. En el caso de las crías de 90 días de edad, este efecto se observa en crías de ambos sexos expuestas a ambas combinaciones.

En relación a la evaluación de la memoria, se conoce que la función del HPC es fundamental en la formación de distintos tipos de memoria, y algunas de las pruebas utilizadas para evaluarla (evitamiento inhibitorio y pruebas de laberinto), han contribuido en gran medida al conocimiento del proceso de consolidación. (Izquierdo y col., 1997; Izquierdo y col., 2002; McGaugh J., 2013). En la prueba de evitamiento inhibitorio, durante la sesión de entrenamiento, los roedores asocian el descenso de una plataforma con un estímulo incondicionado. La respuesta condicionada es evitar bajar de dicha plataforma (Gold, 1986; Vianna y col., 2001; Cammarota y col., 2005). El miedo aprendido

puede ser provocado por la exposición a señales o contextos ambientales que previamente se asociaron con un estímulo aversivo (Gross y Canteras, 2012). El condicionamiento del miedo a los estímulos aversivos requiere de la participación de la amígdala, el HPC (Burwell y col., 2004; Johansen y col., 2010) y la CPF (Cenquizca y Swanson, 2007; Corcoran y Quirk, 2007). Mientras que el HPC y la amígdala desempeñan un importante rol en la consolidación de la memoria, la corteza entorrinal es aparentemente crítica para su almacenamiento (Olton y Papas, 1979; Izquierdo y col., 1992; McGaugh, 2002; Farioli-Vecchioli y col., 2008).

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que las crías de 45 días expuestas a ambas combinaciones, registraron una pérdida en la retención de la MCD y de la MLD en ambos sexos. En el caso de las crías hembra de 90 días, la co-exposición a ambas combinaciones produce un deterioro en la retención de la MCD, sin observarse alteraciones en la MLD. Con respecto a los machos de 90 días, se observó que los animales expuestos a la combinación B tuvieron una menor retención de la MCD y MLD.

En estudios previos donde se evaluó la MCD y la MLD en crías macho de 45 días expuestos individualmente a 0.10 mg/L de iAs o 10 mg/L de F, se demostró que no existen alteraciones en las MCD y MLD (Bartos y col., 2019). Por el contrario, las crías hembra de 45 días expuestas a 5 y 10 mg/L de F, registraron una pérdida en la retención de la MCD y de la MLD. En el caso de las crías hembra de 90 días expuestas individualmente a 0.10 mg/L iAs o 10 mg/L F, se observó una disminución de la retención de la MLD. La MCD no fue afectada por dicha exposición, siendo las crías macho más resistentes a este efecto (Mónaco y col., 2018; Bartos y col., 2018). Por lo tanto:

- ✓ La co-exposición a ambas combinaciones de iAs/F produce en las crías de 45 días una disminución de la retención en las MCD y MLD en ambos sexos.
- ✓ Las crías macho de 45 días evidenciaron este nuevo efecto, el cual no fue observado en las exposiciones individuales de estos elementos.
- ✓ La co-exposición a ambas combinaciones de iAs/F provoca en las crías de 90 días, un deterioro en la retención de la MCD en ambos sexos, efecto no observado en la exposición individual de estos elementos.
- ✓ La co-exposición a iAs/F no altera la retención en la MLD en las crías hembra de 90 días. Por el contrario, la exposición individual con la dosis alta de As o F si afecta la retención de la MLD.
- ✓ La co-exposición a iAs/F produce alteraciones en la MCD y en la MLD en los machos de 90 días expuestos a la combinación B. Estos efectos no son observados en la exposición individual a ambos elementos.

En relación a la evaluación en roedores respecto a otros tipos de memoria, se han desarrollado varias pruebas para estudiar el aprendizaje y la memoria dependientes del HPC (Brown y col., 2000; Barker y col., 2011). Ellas pueden subdividirse en tareas que requieren un estímulo con valencia emocional para provocar un cambio en el comportamiento y tareas que se basan en la preferencia de los roedores para investigar nuevos estímulos (Savage y Ma, 2015). Particularmente, la memoria de reconocimiento de objetos parece depender de varias regiones del cerebro, y la participación del HPC es controvertida. Diversos estudios informaron que las lesiones o la inactivación del HPC no afectan la preferencia de los animales por los objetos nuevos (Oliveira y col., 2010; Vogel-Ciernia y Wood, 2014; Hattiangady y col., 2014), mientras que otros demostraron lo contrario (Cohen y col., 2013; Cohen y Stackman, 2014).



Aún así, esta prueba sigue siendo de uso común para evaluar la función general de la memoria en roedores y se observa que normalmente, el roedor pasa más tiempo explorando el objeto novedoso en comparación con el objeto que le es familiar (Grayson y col., 2015). Cualquier diferencia significativa observada entre la sesión de familiarización y la sesión de prueba corresponde a un comportamiento normal del animal frente al objeto nuevo, demostrando que no hay alteración en la memoria de reconocimiento. Los resultados obtenidos en las crías hembra y machos de 45 días co-expuestos a ambas combinaciones, demostraron un mayor tiempo de exploración en el objeto nuevo. Con respecto a las crías de 90 días de edad, se registró que las hembras expuestas a la combinación B y los machos expuestos a la combinación A, el porcentaje de exploración de la sesión de prueba fue similar al porcentaje registrado en la sesión de familiarización. Esto significa que las crías han perdido la capacidad de discriminar entre el objeto novedoso y el familiar, reflejando una alteración en dicha memoria.

Resultados preliminares de nuestro laboratorio y realizados en crías adultas macho expuestas a F durante la gestación y la lactancia, no registraron alteraciones en la evaluación de la memoria de reconocimiento. Un estudio realizado en crías de ratones expuestos perinatalmente a 50 ppb (0.005 mg/L) de iAs a través del agua de bebida, sugirió déficits de aprendizaje y memoria (Martínez-Finley y col., 2009). Otro antecedente demostró que las ratas hembra que fueron tratadas con 5.0 mg/kg NaF durante el desarrollo, reflejaron un deterioro en el aprendizaje y en este tipo de memoria (Bera y col., 2007). Por lo tanto:

- ✓ La co-exposición a iAs/F altera la memoria episódica de reconocimiento de las crías hembra de 90 días expuestas a la combinación B y de los machos expuestos a la combinación A.

- ✓ La co-exposición produce una alteración de la memoria de reconocimiento en forma tardía, ya que se manifiesta sólo en las crías de 90 días co-expuestas.

Con respecto a la prueba de nado forzado, se ha observado que ratas que presentan un mayor tiempo de inmovilidad o un menor tiempo de escalada, se relacionan con un aumento de la depresión (Naudon y Jay, 2005; Rock y col., 2013). Al evaluar el estado depresivo de las crías co-expuestas a iAs/F, los resultados obtenidos en la prueba de nado forzado, demostraron que las crías hembra de 45 días expuestas a ambas combinaciones, presentaron una disminución significativa en los tiempos de escalada, con un aumento en los tiempos de nado e inmovilidad y en las crías de 90 días, sólo las hembras expuestas a la combinación B registraron una disminución en los tiempos de nado y un aumento en los tiempos de inmovilidad. Resultados preliminares realizados en nuestro laboratorio muestran que las hembras de 90 días expuestas prenatalmente a iAs, presentan una disminución significativa del tiempo de nado y un incremento del tiempo de inmovilidad. En otros resultados preliminares obtenidos como consecuencia de la exposición al F, se observó una disminución significativa en los tiempos de nado y un aumento significativo en el tiempo de inmovilidad en las crías de ambos sexos de 90 días expuestas. Por ello:

- ✓ La co-exposición produce en las crías hembra de 45 y 90 días expuestas a la combinación B, un aumento en el tiempo de inmovilidad, siendo este comportamiento compatible con el estado depresivo. El mismo efecto se observó en las hembras de 90 días expuestas en forma individual a cada elemento.

- ✓ Las crías macho de 45 y 90 días de edad co-expuestas a ambas combinaciones no registran alteraciones en ninguno de los parámetros evaluados. Por el contrario, la exposición a F provocó una disminución en los tiempos de nado y un aumento en la inmovilidad en los machos de 90 días.

Para tratar de dilucidar los mecanismos involucradas en las distintas alteraciones neuroconductuales observadas, evaluamos distintos parámetros bioquímicos en CPF, CPu e HPC. Se ha demostrado que cualquier alteración producida en las defensas antioxidantes, podría causar, entre otras cosas, alteraciones a nivel transcripcional en los sistemas de neurotransmisión (Bardullas y col., 2009; Xi y col., 2010). En relación a los mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos, nuestros resultados demostraron que la co-exposición a la combinación B produce en las crías de 45 días de ambos sexos, una disminución de la actividad de CAT en las tres áreas estudiadas. En las crías hembra de 90 días expuestas a ambas combinaciones, esta disminución se observó en las tres áreas analizadas. En el caso de los machos expuestos a ambas combinaciones, se registró una disminución de la actividad de CAT en el CPu. En el HPC, este efecto sólo se observó en las crías expuestas a la combinación B.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la exposición individual a F durante el desarrollo, induce una disminución significativa del sistema antioxidante en CPF, CPu e HPC en las crías macho y hembra de 45 y 90 días (Bartos y col., 2019; Bartos y col., 2022). Además, se observó el mismo efecto en ratas adultas que fueron expuestas a iAs durante la gestación y la lactancia (Mónaco y col., 2018). Otra investigación realizada en

ratones demostró que la exposición individual o combinada de estos elementos conduce a un incremento de las ROS en sangre, hígado y cerebro. También se observó un aumento en las TBARS acompañado de la disminución de las actividades de CAT (Flora y col., 2012).

Con respecto a los compuestos antioxidantes que eliminan los radicales libres y los marcadores de oxidación de proteínas, en particular el contenido de SH<sup>-</sup>, nuestros resultados realizados en crías de 90 días evidenciaron una disminución en el contenido de SH<sup>-</sup> en la CPF en las hembras expuestas a la combinación B. En el CPu, este efecto se registró en las crías hembra expuestas a ambas combinaciones.

Estudios previos demostraron que la exposición a F durante las primeras etapas del desarrollo produce una disminución de SH<sup>-</sup> en CPF y CP en las ratas hembra adultas, y en el caso de los machos adultos este efecto se observó también en el HPC, evidenciando un daño oxidativo en el SNC (Bartos y col., 2022). En el caso de exposición individual a iAs, resultados preliminares realizados en nuestro laboratorio revelaron que las crías expuestas no registraron alteraciones en el contenido de SH<sup>-</sup> en las áreas analizadas. Por ello:

- ✓ La co-exposición a la combinación B de iAs/F, induce una disminución de la actividad enzimática de CAT en las crías de 45 días, en ambos sexos en las áreas analizadas. Este efecto es similar al observado en la exposición individual de F.
- ✓ La co-exposición a iAs/F disminuye la actividad enzimática de CAT de las crías hembra adultas expuestas a ambas combinaciones en las 3 áreas estudiadas.
- ✓ En los machos adultos, se observó una disminución de CAT en CPu e HPC, siendo este efecto similar al observado en la exposición individual a

iAs o F. Sin embargo, la disminución de la CAT observada en la CPF con la exposición individual a estos elementos, no se observa con la coexposición.

- ✓ La co-exposición a ambas combinaciones de iAs/F produce en las crías hembra de 90 días una disminución de SH<sup>-</sup> en el CPu y en la CPF este efecto se observa sólo con la combinación B. Este efecto es similar al observado con la exposición individual al F.
- ✓ La modificaciones observadas en los niveles de CAT y SH<sup>-</sup> producirían un desequilibrio en el sistema antioxidante y en la homeostasis, con formación de ROS en distintas áreas cerebrales.
- ✓ El daño oxidativo provocado podría afectar la CPF y el CPu, y como consecuencia, alterar los mecanismos implicados en la modulación de la ansiedad, el comportamiento de tipo depresivo, la actividad locomotora y la respuesta nociceptiva.
- ✓ El aumento del estrés oxidativo en el HPC alteraría diferentes tipos de memorias (MCD, MLD y memoria de reconocimiento).

En cuanto al sistema glutamatérgico, comentamos previamente que la AST y la ALT, son algunas de las enzimas que están involucradas en el metabolismo del Glu. Se ha demostrado que la reducción de sus actividades puede afectar los niveles de este neurotransmisor (Mathews y col., 2000; Desai y Desai, 2008). Como se mencionó anteriormente, el Glu es uno de los principales neurotransmisores excitatorios del SNC (Erecinska y Silver, 1990), y una vez liberado a la hendidura sináptica, debe eliminarse rápidamente (Daikhin y Yudkoff, 2000). El exceso de Glu puede producir excitotoxicidad, con daño y destrucción neuronal debido a la sobreactivación de sus receptores (Leibowitz y

col., 2012). Los receptores de Glu desempeñan un papel fundamental en la regulación de la transmisión sináptica (Balschun y col., 1999; Mukherjee y col., 2013). Así mismo, los receptores NMDA, son importantes para desencadenar la plasticidad relacionada con el aprendizaje. Se ha sugerido que la activación del receptor NMDA es necesaria para la potenciación de la memoria a largo plazo en el HPC (Izquierdo, 1994).

Para evaluar esta vía cuantificamos los niveles de la AST y la ALT en la CPF, CPu e HPC de las crías de ratas que fueron co-expuestas. Nuestros resultados mostraron que las crías de ambos sexos de 45 días co-expuestas a la combinación B, poseen una disminución en la actividad de AST en las áreas analizadas. Con respecto a las crías macho de 90 días expuestas a ambas combinaciones de iAs/F, se observó una disminución en la actividad de AST en las tres áreas estudiadas. Por el contrario, las crías hembra registraron una relación no lineal entre dosis y respuesta, observándose una disminución de la actividad de AST en las expuestas a la combinación A y aumento de la actividad en las expuestas a la combinación B. Varios investigadores enumeran las relaciones no lineales en los estudios neuroconductuales como estudios neuroquímicos (Bardullas y col., 2009).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio evidenciaron que las crías adultas expuestas a iAs presentaron una disminución en la actividad de AST en las distintas áreas cerebrales (Mónaco y col., 2018). Además, se demostró que las crías de 45 y 90 días expuestas a 5 y 10 mg/L de F, registraron una disminución en la actividad de AST en CPF, CPu e HPC y en ambos sexos (Bartos y col., 2019; Bartos y col., 2022).

Con respecto a la ALT, los resultados obtenidos en el HPC de las crías hembra de 45 días, evidenciaron un aumento de la actividad enzimática en las crías expuestas a la combinación A y una disminución de actividad en las

hembras expuestas a la combinación B. En CPF y CPu también se observó disminución de la actividad de ALT en las hembras expuestas a la combinación B y disminución en CPF en los machos expuestos a ambas combinaciones. En las crías hembra de 90 días de edad, en general, se observó una inhibición en los niveles enzimáticos de ALT en crías expuestas a ambas combinaciones y en las tres áreas analizadas, mientras que en los machos se observó dicho efecto en CPF e HPC. Estudios previos demostraron que las crías hembra de 90 días expuestas a iAs no presentaron alteraciones en su actividad en CPF, CPu e HPC (Mónaco y col., 2018). Además, se demostró que las crías macho de 45 días expuestas a 5 mg/L F, presentaron una disminución en la actividad de ALT en la CPF, CPu e HPC, sin observarse alteraciones cuando se utilizó una concentración de 10 mg/L. En el caso de las hembras, se observó una disminución de la actividad en CPF e HPC con ambas concentraciones (Bartos y col., 2019). Estudios posteriores realizados en crías macho de 90 días, evidenciaron un efecto opuesto, no observándose alteración de la actividad en las crías expuestas a 5 mg/L, y una disminución de actividad de ALT en las tres áreas cerebrales en los machos expuestos a 10 mg/L de F. Estudios previos realizados en hembras adultas expuestas a F y a esta concentración, revelaron una disminución de la actividad de ALT en HPC, sin observarse alteraciones en la CPF ni en el CPu (Bartos y col., 2022).

Los astrocitos juegan un papel fundamental al eliminar el Glu de la hendidura sináptica, metabolizándolo a glutamina. La glutamina, aminoácido no excitatorio, se libera de estas células y luego es transferida nuevamente a las neuronas para convertirse nuevamente en Glu (Danbolt, 2001). Alternativamente, el Glu podría oxidarse a  $\alpha$ -cetoglutarato por las transaminasas AST y ALT (Daikhin y Yudkoff, 2000; Matthews y col., 2000). Seguir una vía u otra dependerá de la concentración de Glu extracelular. A bajas concentraciones se favorece la vía de

la glutamina sintetasa, pero cuando la concentración externa de Glu es alta, se reclutan procesos oxidativos para prevenir el daño excitotóxico (McKenna y col., 1996; Torres y col., 2013). La excitotoxicidad del Glu es uno de los principales factores para la generación de ROS en el cerebro (Bai y col., 2016; Vishnoi y col., 2016; Cattani y col., 2017), encontrándose también involucrado en algunos trastornos relacionados con los estados de ánimo (Morimoto y col., 2004; Heja y col., 2006). Se ha implicado al Glu en el trastorno por déficit de atención/hiperactividad (TDAH). Los estudios de imágenes de niños y adultos con TDAH revelaron niveles elevados de Glu/glutamina en el CPu y en la CPF (Moore y col., 2006, 2007; Dramsdahl y col., 2011). Por lo tanto:

- ✓ La co-exposición a iAs/F induce diversas alteraciones en las actividades enzimáticas de las AST y ALT en las crías jóvenes y adultas, dependiendo del sexo, la edad, el área cerebral y la combinación utilizada.
- ✓ La co-exposición produce en las crías hembra de 90 días un nuevo efecto antagónico en la actividad enzimática de la AST, observándose una disminución de actividad en las crías expuestas a la combinación A y un aumento de actividad en las crías expuestas a la combinación B. Este efecto es de carácter tardío, manifestándose en las tres áreas cerebrales analizadas.
- ✓ La co-exposición produce un nuevo efecto bifásico en la actividad enzimática de la ALT en el HPC de las crías hembra de 45 días co-expuestas, cuya respuesta va a depender de la combinación utilizada.
- ✓ La co-exposición provoca un nuevo efecto en las crías de 90 días expuestas a la combinación A en ambos sexos, disminuyendo la actividad enzimática de la ALT en las tres áreas cerebrales evaluadas, efecto no observado por la exposición individual a ambos elementos.



- ✓ La hiperactividad observada en la prueba de OF en las crías adultas podría ser en parte al aumento de los niveles de Glu en el área del CPu.
- ✓ Las alteraciones observadas en las actividades de las AST y ALT podrían contribuir a la modificación de los niveles de Glu, provocando cambios en la ansiedad, la memoria y la actividad locomotora descritas previamente.

En relación al sistema colinérgico del cerebro, el mismo se encuentra involucrado en diversos procesos importantes, entre ellos la atención, el aprendizaje, el procesamiento de la memoria y el ciclo de vigilia-sueño (Inglis y col., 2001; Picciotto y col., 2012). También es conocida la participación de la ACh en la regulación del comportamiento motor en condiciones normales y en algunas patologías (Shapovalova, 2003; Sil'kis, 2004; Sergutina y Rakhmanova, 2014). La AChE, por su parte, termina la transmisión en las sinapsis colinérgicas al hidrolizar rápidamente la ACh a ácido acético y colina en la hendidura sináptica (Thapa y col., 2017). Su inactivación puede conducir a la acumulación de ACh, activando los receptores muscarínicos (mAChR) y nicotínicos (nAChR), provocando excitabilidad celular. La alteración en la actividad de AChE se ha asociado con problemas cognitivos y déficits neuroconductuales observados en pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Anand y Singh, 2013). La inhibición crónica de la actividad también podría conducir a un exceso de ACh en las sinapsis colinérgicas, con el consiguiente daño excitotóxico y degeneración del sistema colinérgico (Zaganas y col., 2013).

El CPu es una de las áreas del cerebro con una alta concentración de ACh y de sus enzimas asociadas (Vathana y col., 2014). La hiperactividad se asocia con una desregulación de la función de ACh tanto en la CPF como en el CPu (Viggiano, 2008). Los ganglios basales tienen un papel ampliamente conocido en la función motora, y parte del mecanismo subyacente a esto implica

una estrecha interacción entre la ACh estriatal y la DA (Di Chiara y col., 1994). Los receptores muscarínicos median diversas funciones colinérgicas del sistema nervioso central, incluida la locomoción (Takamatsu y col., 2006). De hecho, m1 mAChR se expresa abundantemente en el CPu (Hersch y col., 1994), y podría desempeñar un papel importante en la regulación de la función locomotora extrapiramidal (Levey y col., 1991). La deficiencia de m1 mAChR conduce a una transmisión dopaminérgica estriatal elevada y aumenta significativamente la actividad locomotora (Gerber y col., 2001). Por su parte, los nAChR y mAChR están presentes también en el HPC, participando en diversos mecanismos de aprendizaje y memoria (Myhrer T., 2003; Lana y col., 2013; Dennis y col., 2016).

Nuestros resultados demostraron que las crías macho de 45 días que fueron co-expuestas a la combinación B registraron una disminución en la actividad de la AChE sólo en el HPC. En el caso de las crías adultas, esta alteración se registró en crías expuestas a ambas combinaciones y sexos, en las áreas cerebrales analizadas.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se observó que las crías macho de 90 días cuyas madres fueron expuestas a 10 mg/L F, presentaron un incremento en la actividad de AChE sólo en la CPF, sin demostrar alteraciones en el CPu y el HPC, mientras que en las crías macho de 90 días expuestas a 5 mg/L F, la actividad disminuyó significativamente en el CPu y el HPC, sugiriendo un efecto paradójico de dosis-respuesta del F sobre esta enzima (Bartos y col., 2022). En estudios preliminares se observaron efectos similares en las hembras de 90 días expuestas a ambas concentraciones de F. Datos de otros autores demostraron que en grupos de ratas macho expuestas a F durante las primeras etapas del desarrollo y crecimiento, una disminución de la actividad de AChE en la corteza cerebral, el HPC e hipotálamo (Kinawy, 2019).

En el caso de las iAs, estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que las crías hembra de 90 días expuestas a 0.10 mg/L iAs registraron una disminución de actividad enzimática de AChE en CPF, CPu e HPC. Con respecto a los machos, sólo las crías expuestas a 0.05 mg/L iAs mostraron una disminución de la actividad de AChE en el HPC (datos sin publicar). Con respecto a los receptores, se observó una disminución significativa en la expresión de la subunidad  $\alpha 7$ -nAChR a nivel de ARNm en el HPC de las crías hembra adultas que fueron expuestas a iAs durante las etapas de gestación y lactancia (Mónaco y col., 2018). Otros estudios demostraron que los receptores mAChR y nicotínicos nAChR pueden alterarse ante la exposición a iAs o F, provocando una disminución de la respuesta colinérgica del sistema nervioso (Dong y col., 2015; Chandravanshi y col., 2019). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos como consecuencia de la co-exposición a iAs/F en las crías de 45 y 90 días de edad, podemos concluir que:

- ✓ La co-exposición a la combinación B de iAs/F, produce una alteración en la actividad enzimática de la AChE en el HPC de las crías macho de 45 días. Este efecto podría ser en parte responsable de las alteraciones observadas en las MCD y MLD.
- ✓ La co-exposición a ambas combinaciones de iAs/F provoca una disminución en la actividad de la AChE en las crías de 90 días, en ambos sexos en las áreas estudiadas.
- ✓ La co-exposición a la combinación B, induce en las crías macho adultas la aparición de un nuevo efecto, observándose una disminución en actividad de AChE en las áreas analizadas. Este efecto no fue observado en la exposición individual de estos elementos.
- ✓ La co-exposición provoca un efecto tardío con respecto a la inhibición enzimática, observándose de manera global en las crías adultas.

- ✓ La inhibición enzimática de la AChE produciría un aumento de los niveles de ACh en el CPu. Esto podría estar regulando negativamente la expresión de m1-AChR, aumentar la transmisión colinérgica y, en consecuencia, alterar la actividad locomotora en las crías expuestas.
- ✓ La disminución de la actividad enzimática de la AChE, junto con los desequilibrios observados en el estrés oxidativo, podrían ser los responsables o contribuirían a las alteraciones observadas en los reflejos sensoriomotores, en la regulación de la actividad locomotora, en la ansiedad y en los diferentes tipos de memoria.

Como se mencionó anteriormente, la TNALP es una isoenzima de la ALP que se encuentra asociada al normal desarrollo y funcionamiento del cerebro, formando parte del metabolismo de algunos neurotransmisores (Brun-Heath y col., 2011). Adicionalmente, se investigó su relación con algunos trastornos neurológicos, como la epilepsia y diversas anomalías morfológicas cerebrales (Vardy y col., 2012; Cruz y col., 2017).

Nuestros resultados mostraron que las crías hembra de 45 días expuestas a la combinación A, registraron un aumento en la actividad de ALP en el HPC, mientras que en los machos expuestos a la combinación B, se observó una disminución de la actividad enzimática sólo en la CPF. Por otra parte, los resultados obtenidos en las crías hembra de 90 días expuestas a la combinación A, demostraron un aumento en la actividad en el HPC, y en las expuestas a la combinación B, este efecto se registró en la CPF. En el caso de los machos, este efecto sólo se observó en el CPu de las crías expuestas a la combinación A. En una investigación previa también realizada en nuestro laboratorio, se observó que las crías de 90 días expuestas a 0.10 mg/L iAs, registraron una disminución en la actividad de ALP sólo en el CPu de las hembras, sin observarse

alteraciones en los machos. En el caso de la exposición individual a F, se observó un aumento significativo en la actividad de ALP en el CPu y en la CPF de los machos adultos expuestos a la concentración A y B respectivamente, sin observarse alteración de la actividad de las crías hembra en ninguna de las combinaciones ni áreas analizadas (Bartos y col., 2022). Otros estudios demostraron que ratones expuestos a F con 20 mg de F/kg por vía intraperitoneal durante 14 días, revelaron un incremento en la actividad de ALP en el cerebro (Reddy y col., 2009). Por lo tanto:

- ✓ La co-exposición produce un nuevo efecto en las hembras adultas, observándose un aumento en la actividad enzimática de la ALP en el HPC de las crías expuestas a la combinación A, y un aumento de actividad en la CPF en las expuestas a la combinación B. En el caso de los machos, el efecto fue similar al observado en la exposición individual de estos elementos.
- ✓ El incremento en la actividad de ALP podría deberse a la alta demanda de grupos fosfato necesarios para la reparación del ADN y la síntesis de proteínas, alteraciones que podrían ser producidas por la co-exposición de iAs y F.

# CONCLUSION

Algunos estudios mencionados en la introducción del presente trabajo, señalan diferentes efectos que provocan el iAs y el F sobre la salud humana. Existe escasa bibliografía respecto a los posibles efectos e interacciones que estos elementos pueden ocasionar en las personas cuando se consumen de manera conjunta en el agua de perforación, en períodos críticos del desarrollo y cuando están presentes a bajas concentraciones. Por lo tanto, en este trabajo evaluamos el efecto neurotóxico que provoca la exposición durante el desarrollo de concentraciones bajas de iAs/F, en crías de ratas jóvenes y adultas de ambos sexos. En esta evaluación, pudimos observar la aparición de efectos sinérgicos, antagónicos o nuevos efectos, como así también dilucidar los posibles mecanismos moleculares involucrados en la neurotoxicidad producida. Nuestros resultados mostraron que si bien las combinaciones evaluadas no causaron letalidad en las crías ni alteraciones visibles en el crecimiento, se observaron efectos diferentes a los producidos por la exposición individual a ambos elementos. Los mismos dependen de la edad y sexo de las crías, y de las concentraciones utilizadas. Observamos que la co-exposición al iAs/F durante las etapas de gestación y lactancia provocó en las crías un retraso en los reflejos sensoriomotores y una disminución de la respuesta del reflejo nociceptivo. La combinación afectó la actividad locomotora de las crías, produciendo un efecto bifásico en las crías jóvenes y un aumento de la actividad en las crías adultas. Por otro lado, la co-exposición indujo en las crías de ambos sexos, un efecto ansiolítico, y además las crías hembra manifestaron un comportamiento compatible con el estado depresivo. La combinación iAs/F provocó una disminución en la retención de las memorias de corto y largo plazo, y alteraciones en la memoria de reconocimiento en las crías adultas.

Está demostrado que las áreas cerebrales estudiadas son fundamentales en la regulación de la locomoción, la ansiedad, la depresión y la memoria, y que sus funciones reguladoras suelen superponerse. Los cambios neuroconductuales observados como consecuencia de la co-exposición podrían explicarse, en parte, por la disminución del sistema antioxidante en las distintas áreas cerebrales y las diversas alteraciones en la actividad enzimática de las transaminasas (AST y ALT), AChE y ALP, que conducen a una desregulación de los sistemas de neurotransmisión. Los posibles mecanismos por el cual se observaron las alteraciones en la memoria en las crías pueden deberse a diversos eventos que pueden ocurrir en el HPC: disminución de la expresión de  $\alpha 7$ -nAChR, aumento de los niveles de Glu que producen excitotoxicidad y disminución de los niveles de enzimas antioxidantes. Las alteraciones neuroquímicas observadas en la CPF y el CPu podrían explicar los disturbios locomotores, el efecto ansiolítico y el estado depresivo. La neurotoxicidad del desarrollo ante la co-exposición a iAs/F sigue estando sujeta a una gran diversidad y complejidad de mecanismos moleculares involucrados en la toxicidad. En los últimos años, se ha demostrado que el iAs y el F podrían producir modificaciones epigenéticas que producen diferentes efectos adversos sobre la salud humana (Bjorklund y col., 2018; Daiwile y col., 2019). Los componentes epigenéticos juegan un papel crucial en la regulación de la expresión génica, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Los cambios en las modificaciones postraduccionales de las histonas, los patrones de metilación del ADN y los microARN se han observado repetidamente después de la exposición a iAs y F en estudios con animales y humanos. Estas modificaciones pueden alterar la homeostasis neuronal, dando como resultado la modulación de vías de neurotransmisión que regulan los efectos neuroconductuales inducidos por iAs/F. Los resultados obtenidos en esta tesis pueden ser de utilidad a los organismos responsables, para poder realizar no sólo una adecuada evaluación del riesgo de exposición a estos elementos, sino aplicar las medidas preventivas para evitar dicha exposición en etapas críticas



del desarrollo (gestación y la lactancia), y establecer niveles máximos permitidos de iAs y F en aguas de consumo, garantizando la seguridad y protección de la salud de las personas.

# **BIBLIOGRAFIA**

- Adebayo, O. L., Shallie, P. D., Salau, B. A., Ajani, E. O., & Adenuga, G. A. (2013). Comparative study on the influence of fluoride on lipid peroxidation and antioxidants levels in the different brain regions of well-fed and protein undernourished rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 27(4), 370-374.
- Aebi H (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 105, 121-126.
- Aguirre-Banuelos P, Escudero-Lourdes C, Carrizales L, Diaz-Barriga F, Perez-Urizar J. Effect of acute exposure to arsenic on formalin induced nociception and tramadol-mediated antinociception in mice. *Proc West Pharmacol Soc* 2004;47:113–6.
- Ahmad, S., Kitchin, K. T., & Cullen, W. R. (2000). Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 382(2), 195-202.
- Ailani, V., Gupta, R. C., Gupta, S. K., & Gupta, K. (2009). Oxidative stress in cases of chronic fluoride intoxication. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 24(4), 426-429.
- Akinrinade, ID, Memudu, AE, & Ogundele, OM. (2015). El fluoruro y el aluminio alteran la morfología neuronal, las funciones de transporte, la colinesterasa, las actividades lisosomales y del ciclo celular. *Fisiopatología.: Off. J. Int. Soc. Fisiopatología*. 22 (2), 105–115.
- Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R. (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 302(2-3), 141-145.
- Alarcón-Herrera, M. T., Bundschuh, J., Nath, B., Nicolli, H. B., Gutierrez, M., Reyes Gomez, V. M., & Sracek, O. (2013). Co-occurrence of arsenic and fluoride in groundwater of semi-arid regions in Latin America: Genesis,

mobility and remediation. *Journal of Hazardous Materials*, 262, 960–969.

Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.08.005>

- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in neurosciences*, 12(10), 366-375.
- Anand, P., Singh, B., 2013. Synthesis and evaluation of substituted 4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl phenyl carbamates as potent acetylcholinesterase inhibitors and anti-amnestic agents. *Med. Chem.* 9 (5), 694–702.
- Anderson, L.M., Diwan, B.A., Fear, N.T., & Roman, E. (2000). Critical windows of exposure for children's health: cancer in human epidemiological studies and neoplasms in experimental animal models. *Environ. Health Perspect.* 108 (Suppl 3), 573–594.
- ATSDR (2003). Agency for toxic substances and disease registry; toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine. US Department of Health and Human Services. Public Health Service, Atlanta, GA. Recuperado de: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp11.pdf>.
- Bai, X., Zhang, C., Chen, A., Liu, W., Li, J., Sun, Q., & Wang, H. (2016). Protective Effect of Edaravone on Glutamate-Induced Neurotoxicity in Spiral Ganglion Neurons. *Neural plasticity*, 2016, 4034218. <https://doi.org/10.1155/2016/4034218>
- Balschun D, Manahan-Vaughan D, Wagner T, Behnisch T, Reymann KG, et al. (1999). A specific role for group I mGluRs in hippocampal LTP and hippocampus-dependent spatial learning. *Learn. Mem.* 6: 138–152.
- Banala, R. R., Karnati, P. R. (2015). Vitamin A deficiency: An oxidative stress marker in sodium fluoride (NaF) induced oxidative damage in developing rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 47, 298-303.

- Barbieri M, Ossato A, Canazza I, Trapella C, Borelli AC, Beggiato S, Rimondo C, Serpelloni G, Ferraro L, & Marti M. (2016). Synthetic cannabinoid JWH-018 and its halogenated derivatives JWH-018-Cl and JWH-018-Br impair novel object recognition in mice: behavioral, electrophysiological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology* 109:254–269. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.06.027>
- Barcelo, A.C., Filippini, B., & Pazo, J.H. (2012). The striatum and pain modulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32 (1), 1–12.
- Bardullas, U., Limón-Pacheco, J. H., Giordano, M., Carrizales, L., Mendoza-Trejo, M. S., & Rodríguez, V. M. (2009). Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 239(2), 169-177.
- Barker, G. R., & Warburton, E. C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory?. *Journal of Neuroscience*, 31(29), 10721-10731.
- Bartos, M., Gumilar, F., Baier, C. J., Dominguez, S., Bras, C., Cancela, L. M., Minetti, A., & Gallegos, C. E. (2022). Rat developmental fluoride exposure affects retention memory, leads to a depressive-like behavior, and induces biochemical changes in offspring rat brains. *Neurotoxicology*, 93, 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.10.006>
- Bartos, M., Gumilar, F., Bras, C., Gallegos, C.E., Giannuzzi, L., Cancela, L.M., & Minetti, A. (2015). Neurobehavioural effects of exposure to fluoride in the earliest stages of rat development. *Physiol. Behav.* 147, 205–212.
- Bartos, M., Gumilar, F., Gallegos, C. E., Bras, C., Dominguez, S., Mónaco, N., ... & Minetti, A. (2018). Alterations in the memory of rat offspring exposed to

- low levels of fluoride during gestation and lactation: Involvement of the  $\alpha 7$  nicotinic receptor and oxidative stress. *Reproductive Toxicology*, 81, 108-114.
- Bartos, M., Gumilar, F., Gallegos, C. E., Bras, C., Dominguez, S., Cancela, L. M., & Minetti, A. (2019). Effects of perinatal fluoride exposure on short-and long-term memory, brain antioxidant status, and glutamate metabolism of young rat pups. *International Journal of Toxicology*, 38(5), 405-414.
  - Baykov, A. A., Cooperman, B. S., Goldman, A., & Lahti, R. (1999). Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. *Inorganic polyphosphates*, 127-150.
  - Bera, I., Sabatini, R., Auteri, P., Flace, P., Sisto, G., Montagnani, M., & Cagiano, R. (2007). Neurofunctional effects of developmental sodium fluoride exposure in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 11(4), 211.
  - Bhatnagar, M., Rao, P., Jain, S., & Bhatnagar, R. (2002). Neurotoxicity of fluoride: neurodegeneration in hippocampus of female mice. *Indian J. Exp. boil.* 40:546-554.
  - Bhatnagar, M., Rao, P., Saxena, A., Bhatnagar, R., Meena, P., Barbar, S., & Vimal, S. (2006). Biochemical changes in brain and other tissues of young adult female mice from fluoride in their drinking water. *Fluoride*, 39(4), 280-284.
  - Bianchin, M. M., Spanis, C. W., Roesler, R., McGaugh, J. L., & Izquierdo, I. (2000). (+/-)-Alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine, a metabotropic glutamate receptor blocker, impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats when infused into the basolateral nucleus of the amygdala. *Brain research*, 852(2), 436–443. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)02220-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02220-9)

- Bikashvili, T., Lordkipanidze, T., Gogichaishvili, N., & Pochkhidze, N. (2017). Effect of arsenic exposure on behavior of rats of various age groups. *Georgian Medical News*, (264), 119-126.
- Bind R.H., Minney S.M., Rosenfeld S.J., & Hallock R.M. (2013). The role of pheromonal responses in rodent behavior: future directions for the development of laboratory protocols. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 52: 124–129.
- Bjorklund, G., Aaseth, J., Chirumbolo, S., Urbina, M.A., Uddin, R., 2018. Effects of arsenic toxicity beyond epigenetic modifications. *Environ. Geochem. Health* 40 (3), 955–965.
- Blaylock R.L. Excitotoxicity: a possible central mechanism in fluoride neurotoxicity. *Fluoride* 2004; 37(4): 301-14.
- Bolla-Wilson, K., & Bleecker, M. L. (1987). Neuropsychological impairment following inorganic arsenic exposure. *Journal of occupational medicine: official publication of the Industrial Medical Association*, 29(6), 500-503.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brenes, J.C.; Padilla, M.; Fornaguera, J., 2009. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behavioural Brain Research* 197, 125-137
- Brown, R. E., Stanford, L., & Schellinck, H. M. (2000). Developing standardized behavioral tests for knockout and mutant mice. *ILAR journal*, 41(3), 163-174.
- Brun-Heath, I., Ermonval, M., Chabrol, E., Xiao, J., Palkovits, M., Lyck, R., ... & Fonta, C. (2011). Differential expression of the bone and the liver tissue

- non-specific alkaline phosphatase isoforms in brain tissues. *Cell and tissue research*, 343(3), 521-536.
- Burwell, R. D., Saddoris, M. P., Bucci, D. J., & Wiig, K. A. (2004). Corticohippocampal contributions to spatial and contextual learning. *Journal of Neuroscience*, 24(15), 3826-3836.
  - Buzalaf, M. A. R. (Ed.). (2011). *Fluoride and the oral environment* (Vol. 22). Karger Medical and Scientific Publishers.
  - Calatayud M., Devesa V., & Vélez D. (2013). Differential toxicity and gene expression in Caco-2 cells exposed to arsenic species. *Toxicology Letters*, 218(1): 70-80.
  - Calatayud, M., Barrios, J. A., Vélez, D., & Devesa, V. (2012). *In vitro* study of transporters involved in intestinal absorption of inorganic arsenic. *Chemical Research in Toxicology*, 25(2), 446–453. Recuperado de: <https://doi.org/10.1021/tx200491f>
  - Calderón, J., Ortiz-Pérez, D., Yáñez, L., & Díaz-Barriga, F. (2003). Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(1), 93-103.
  - Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Barros, D. M., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2005). Retrieval and the extinction of memory. *Cellular and molecular neurobiology*, 25, 465-474.
  - Carton, R. J., & Park, A. (2006). Review of the 2006 United States National Research Council report: fluoride in drinking water. *Fluoride*, 39(3), 163-72.
  - Castro-Coronel, Y., Del Razo, L. M., Huerta, M., Hernandez-Lopez, A., Ortega, A., & López-Bayghen, E. (2011). Arsenite exposure downregulates EAAT1/GLAST transporter expression in glial cells. *Toxicological Sciences*, 122(2), 539-550.



- Cattani, D., Cesconetto, P. A., Tavares, M. K., Parisotto, E. B., De Oliveira, P. A., Rieg, C. E. H., Leite, M. C., Prediger, R. D. S., Wendt, N. C., Razzera, G., Filho, D. W., & Zamoner, A. (2017). Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *Toxicology*, *387*, 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.001>
- Cenquizca, L. A., & Swanson, L. W. (2007). Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain research reviews*, *56*(1), 1-26.
- Chandravanshi, L. P., Gupta, R., & Shukla, R. K. (2019). Arsenic-induced neurotoxicity by dysfunctioning cholinergic and dopaminergic system in brain of developing rats. *Biological trace element research*, *189*(1), 118-133.
- Chauhan, S. S., Mahmood, A., Ojha, S. (2013). Ethanol and age enhances fluoride toxicity through oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in rat intestine. *Molecular and cellular biochemistry*, *384*(1), 251-262.
- Chen, J., Shan, K. R., Long, Y. G., Wang, Y. N., Nordberg, A., & Guan, Z. Z. (2003). Selective decreases of nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells exposed to fluoride. *Toxicology*, *183*(1-3), 235-242.
- Chirumari, K., & Reddy, P. K. (2007). Dose-dependent effects of fluoride on neurochemical milieu in the hippocampus and neocortex of rat brain. *Fluoride*, *40*(2), 101-110.
- Choi, A. L., Sun, G., Zhang, Y., & Grandjean, P. (2012). Developmental fluoride neurotoxicity: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, *120*(10), 1362–1368. Recuperado de: <https://doi.org/10.1289/ehp.1104912>

- Chouhan, S., & Flora, S. J. S. (2010). Arsenic and fluoride: two major ground water pollutants.
- Chudler, E. H. (1998). Response properties of neurons in the caudate–putamen and globus pallidus to noxious and non-noxious thermal stimulation in anesthetized rats. *Brain research*, 812(1-2), 283-288.
- Código Alimentario Argentino. (2021). Artículo 982 - (Resolución Conjunta SCS y SAByDR N° 22/2021). Bebidas hídricas, aguas y aguas gasificadas. Capítulo XII.
- Coghill, R. C., McHaffie, J. G., & Yen, Y. F. (2003). Neural correlates of interindividual differences in the subjective experience of pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8538-8542.
- Cohen, S. J., & Stackman, R. W., Jr (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural brain research*, 285, 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002>
- Cohen, S. J., Munchow, A. H., Rios, L. M., Zhang, G., Asgeirsdóttir, H. N., & Stackman, R. W., Jr (2013). The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Current biology : CB*, 23(17), 1685–1690. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.002>
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11(3), 315-335.
- Corcoran, K. A., & Quirk, G. J. (2007). Recalling safety: cooperative functions of the ventromedial prefrontal cortex and the hippocampus in extinction. *CNS spectrums*, 12(3), 200-206.
- Cruz, T., Gleizes, M., Balayssac, S., Mornet, E., Marsal, G., Millán, J. L., ... & Fonta, C. (2017). Identification of altered brain metabolites associated with

TNAP activity in a mouse model of hypophosphatasia using untargeted NMR-based metabolomics analysis. *Journal of neurochemistry*, 140(6), 919-940.

- Daikhin, Y., & Yudkoff, M. (2000). Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *The Journal of nutrition*, 130(4), 1026S-1031S.
- Daiwile, A.P., Tarale, P., Sivanesan, S., Naoghare, P.K., Bafana, A., Parmar, D., Kannan, K., 2019. Role of fluoride induced epigenetic alterations in the development of skeletal fluorosis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 169, 410–417.
- Dangleben N.L., Skibola C.F., & Smith M.T. (2013). Arsenic immunotoxicity: a review. *Environ. Health.* 12(1):73.
- Dasarathy, S., Das, T. K., Gupta, I. P., Susheela, A. K., & Tandon, R. K. (1996). Gastrointestinal manifestations in patients with skeletal fluorosis. *Journal of gastroenterology*, 31(3), 333-337.
- De Craemer, S., Croes, K., Van Larebeke, N., De Henauw, S., Schoeters, G., Govarts, E., ... & Baeyens, W. (2017). Metals, hormones and sexual maturation in Flemish adolescents in three cross-sectional studies (2002–2015). *Environment international*, 102, 190-199.
- Del Razo, L. M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderón-Aranda, E. S., Manno, M., & Albores, A. (2001). Stress proteins induced by arsenic. *Toxicology and applied pharmacology*, 177(2), 132-148.
- Dennis, S.H., Pasqui, F., Colvin, E.M., Sanger, H., Mogg, A.J., Felder, C.C., Broad, L.M., Fitzjohn, S.M., Isaac, J.T., Mellor, J.R., 2016. Activation of muscarinic M1 acetylcholine receptors induces long-term potentiation in the hippocampus. *Cereb. Cortex* 26 (1), 414–426.

- Desai, S. N., & Desai, P. V. (2008). Aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities of rat brain during crush syndrome. *Neuroscience letters*, *447*(1), 58-61.
- Di Chiara, G., Morelli, M., & Consolo, S. (1994). Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends in neurosciences*, *17*(6), 228–233. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90005-1)
- Dominguez, S., Lencinas, I., Bartos, M., Gallegos, C., Bras, C., Mónaco, N., & Gumilar, F. (2021). Neurobehavioral and neurochemical effects in rats offspring co-exposed to arsenic and fluoride during development. *NeuroToxicology*, *84*, 30-40.
- Dong, Y. T., Wang, Y., Wei, N., Zhang, Q. F., & Guan, Z. Z. (2015). Deficit in learning and memory of rats with chronic fluorosis correlates with the decreased expressions of M1 and M3 muscarinic acetylcholine receptors. *Archives of toxicology*, *89*(11), 1981-1991.
- Dopp, E., Hartmann, L. M., Florea, A. M., Von Recklinghausen, U., Pieper, R., Shokouhi, B., ... & Obe, G. (2004). Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology and applied pharmacology*, *201*(2), 156-165.
- Dramsdahl, M., Erslund, L., Plessen, K. J., Haavik, J., Hugdahl, K., & Specht, K. (2011). Adults with attention-deficit/hyperactivity disorder - a brain magnetic resonance spectroscopy study. *Frontiers in psychiatry*, *2*, 65. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2011.00065>
- Dreosti, I.E. (1983). Zinc and the central nervous system. *Neurobiol. Trace Elem.* *2*, 135\_/162.

- Dutta, J. (2013). Fluoride, arsenic and other heavy metals contamination of drinking water in the tea garden belt of Sonitpur district, Assam, India. *International Journal of Chem. Tech. Research*, 5(5), 2614–2622.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Erecińska, M., & Silver, I. A. (1990). Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Progress in neurobiology*, 35(4), 245–296. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(90\)90013-7](https://doi.org/10.1016/0301-0082(90)90013-7)
- Espósito, M. E., Sequeira, M. E., Paoloni, J. D., Blanco, M. D. C., & Amiotti, N. (2013). High fluorine and other associated trace elements in waters from the south of the Pampean plain. *Phyton (Buenos Aires)*, 82(1), 35-44.
- Everds, N. E., Snyder, P. W., Bailey, K. L., Bolon, B., Creasy, D. M., Foley, G. L., Rosol, T. J., & Sellers, T. (2013). Interpreting stress responses during routine toxicity studies: a review of the biology, impact, and assessment. *Toxicologic pathology*, 41(4), 560–614. Recuperado de: <https://doi.org/10.1177/0192623312466452>
- Farioli-Vecchioli, S., Sarauili, D., Costanzi, M., Pacioni, S., Cinà, I., Aceti, M., Micheli, L., Bacci, A., Cestari, V., & Tirone, F. (2008). The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. *PLoS biology*, 6(10), e246. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060246>
- Ferreira, M. K. M., Aragão, W. A. B., Bittencourt, L. O., Puty, B., Dionizio, A., & de Souza, M. P. C., Lima, R. R. (2021). Fluoride exposure during pregnancy and lactation triggers oxidative stress and molecular changes in hippocampus of offspring rats. *Ecotoxicology and environmental safety*, 208, 111437.

- Flora, S. J. (1999). Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of n-acetylcysteine and meso 2, 3-dimercaptosuccinic acid in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 26(11), 865-869.
- Flora, S. J. (2011). Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2), 257-281.
- Flora, S. J. S., Bhadauria, S., Kannan, G. M., & Singh, N. (2007). Arsenic induced oxidative stress and the role of antioxidant supplementation during chelation: a review. *Journal of Environmental Biology*, 28(2), 333–347.
- Flora, S. J., Mittal, M., Pachauri, V., & Dwivedi, N. (2012). A possible mechanism for combined arsenic and fluoride induced cellular and DNA damage in mice. *Metallomics*, 4(1), 78-90.
- Flora, S.J., Mittal M., & Mishra D. (2009). Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines and DNA damage in mouse brain. *J. Neurol Sci.* 285(1–2):198–205.
- Forman, H. J. (2016). Redox signaling: an evolution from free radicals to aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 97, 398-407.
- Gallegos, C. E., Baier, C. J., Bartos, M., Bras, C., Domínguez, S., Mónaco, N., ... & Minetti, A. (2018). Perinatal glyphosate-based herbicide exposure in rats alters brain antioxidant status, glutamate and acetylcholine metabolism and affects recognition memory. *Neurotoxicity Research*, 34(3), 363-374.
- Gao, Q., Liu, Y. J., & Guan, Z. Z. (2009). Decreased learning and memory ability in rats with fluorosis: increased oxidative stress and reduced cholinesterase activity in the brain. *Fluoride*, 42(4), 277.

- García-Montalvo, E. A., Reyes-Pérez, H., & Del Razo, L. M. (2009). Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress. *Toxicology*, 263 (2-3), 75-83.
- Gardiner, I. M., & De Belleruche, J. (1990). Modulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid release in cerebral cortex by fluoride, phorbol ester, and phosphodiesterase inhibitors: differential sensitivity of acetylcholine release to fluoride and K<sup>+</sup> channel blockers. *Journal of neurochemistry*, 54(4), 1130-1135.
- Gear, R.W. & Levine, J.D. (2009). Rostral ventral medulla cholinergic mechanism in pain induced analgesia. *Neurosci. Lett.* 464 (3), 170–172.
- Gold, P. E. (1986). The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral & Neural Biology*.
- Gomez Caminero, A., Howe, P.D., Hughes, M., Kenyon, E., Lewis, D.R., & Moore, M.; Ng, J. (2001). *Arsénico y compuestos de arsénico*. Organización Mundial de la Salud.
- González-Horta, C., Ballinas-Casarrubias, L., Sánchez-Ramírez, B., Ishida, M. C., Barrera-Hernández, A., Gutiérrez-Torres, D., ... & Del Razo, L. M. (2015). A concurrent exposure to arsenic and fluoride from drinking water in Chihuahua, Mexico. *International journal of environmental research and public health*, 12(5), 4587-4601.
- Goschorska, M., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Metryka, E., Skórka-Majewicz, M., & Chlubek, D. (2018). Potential role of fluoride in the etiopathogenesis of Alzheimer's disease. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3965.
- Grad, S. C., & Chengelis, C. P. (1988). *Acute Toxicology Testing Perspective and Horizons*.

- Grandjean, P. & Landrigan, P. J. (2014). Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The Lancet Neurology*, 13(3), 330–338. doi:10.1016/s1474-4422(13)70278-3
- Grandjean, P., Weihe, P., Debes, F., Choi, A.L., & Budtz-Jorgensen, E. (2014). Neurotoxicity from prenatal and posnatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.* 43, 39–44
- Grayson, B., Leger, M., Piercy, C., Adamson, L., Harte, M., & Neill, J. C. (2015). Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents. *Behavioural brain research*, 285, 176-193.
- Gross, C. T., & Canteras, N. S. (2012). The many paths to fear. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(9), 651-658.
- Gui C.Z., Ran L.Y., Li J.P., & Guan Z.Z. (2010). Changes of learning and memory ability and brain nicotinic receptors of rat offspring with coal burning fluorosis. *Neurotoxicol. and Teratol.*, 32: 536–541.
- Gumilar, F., Lencinas, I., Bras, C., Giannuzzi, L., & Minetti, A. (2015). Locomotor activity and sensory-motor developmental alterations in rat offspring exposed to arsenic prenatally and via lactation. *Neurotoxicol. Teratol.* 49, 1–9.
- Guth, S., Hüser, S., Roth, A., Degen, G., Diel, P., Edlund, K., ... & Hengstler, J. G. (2020). Toxicity of fluoride: critical evaluation of evidence for human developmental neurotoxicity in epidemiological studies, animal experiments and *in vitro* analyses. *Archives of toxicology*, 94(5), 1375-1415.
- Hall, A. H. (2002). Chronic arsenic poisoning. *Toxicology Letters*, 128(1-3), 69-72.



- Hall, M. N., & Gamble, M. V. (2012). Nutritional manipulation of one-carbon metabolism: effects on arsenic methylation and toxicity. *Journal of toxicology*, 2012.
- Hattiangady, B., Mishra, V., Kodali, M., Shuai, B., Rao, X., & Shetty, A. K. (2014). Object location and object recognition memory impairments, motivation deficits and depression in a model of Gulf War illness. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 78. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00078>
- He, L. F., & Chen, J. G. (2006). DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosal cells and hepatocytes. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12(7), 1144.
- Heise G.A. (1984). Behavioral methods for measuring effects of drugs on learning and memory in animals. *Med Res Rev.* 4, 535–558.
- Heja, L., Karacs, K., & Kardos, J. (2006). Role for GABA and Glu plasma membrane transporters in the interplay of inhibitory and excitatory neurotransmission. *Curr. Top. Med. Chem.* 6 (10), 989–995.
- Hübler, N., Gottschling, B., Jacobs, M., von Landenberg, F., & Hewicker-Trautwein, M. (2005). Functional observational battery and motor activity in rats after single administration of two NHE 1 inhibitors. *Toxicology and applied pharmacology*, 208(3), 266-276.
- Hughes M.F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.*; 133(1):1-16.
- Hughes M.F., Beck B.D., Chen Y., Lewis A.S., & Thomas D.J. (2011). Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol. Sci.*; 123(2):305-32.
- Hunt, K. M., Srivastava, R. K., Elmets, C. A., & Athar, M. (2014). The mechanistic basis of arsenicosis: pathogenesis of skin cancer. *Cancer letters*, 354(2), 211-219.

- Huo, T. G., Li, W. K., Zhang, Y. H., Yuan, J., Gao, L. Y., Yuan, Y., & Sun, G. F. (2014). Excitotoxicity induced by realgar in the rat hippocampus: the involvement of learning memory injury, dysfunction of glutamate metabolism and NMDA receptors. *Molecular Neurobiology*, 51(3), 980-994.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2012). Arsenic and arsenic compounds. In *Arsenic, Metals, Fibres and Dusts*. International Agency for Research on Cancer.
- Inglis, W. L., Olmstead, M. C., & Robbins, T. W. (2001). Selective deficits in attentional performance on the 5-choice serial reaction time task following pedunculopontine tegmental nucleus lesions. *Behavioural brain research*, 123(2), 117–131. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00181-4](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00181-4)
- Izquierdo I. (1994). Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8(14), 1139–1145.
- Izquierdo, I., & Netto, C. A. (1985). Factors that influence test session performance measured 0, 3, or 6 h after inhibitory avoidance training. *Behavioral and neural biology*, 43(3), 260–273. [https://doi.org/10.1016/s0163-1047\(85\)91606-1](https://doi.org/10.1016/s0163-1047(85)91606-1)
- Izquierdo, I., da Cunha, C., Rosat, R., Jerusalinsky, D., Ferreira, M. B., & Medina, J. H. (1992). Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behavioral and neural biology*, 58(1), 16–26. [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(92\)90847-w](https://doi.org/10.1016/0163-1047(92)90847-w)
- Izquierdo, I., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Szapiro, G., Coitinho, A. S., ... & Medina, J. H. (2002). Memory retrieval and its lasting consequences. *Neurotoxicity research*, 4, 573-593.

- Izquierdo, Y., & Medina J. Formación de la memoria: la secuencia de eventos bioquímicos en el hipocampo y su conexión con la actividad en otras estructuras cerebrales, *Neurobiol. Learn. Mem.* 68 (3) (1997) 285 - 316.
- Jadhav, S. V., Bringas, E., Yadav, G. D., Rathod, V. K., Ortiz, I., & Marathe, K. V. (2015). Arsenic and fluoride contaminated groundwaters: a review of current technologies for contaminants removal. *Journal of Environmental Management*, 162, 306-325.
- Jiang, S., Su, J., Yao, S., Zhang, Y., Cao, F., Wang, F., ... & Xi, S. (2014). Fluoride and arsenic exposure impairs learning and memory and decreases mGluR5 expression in the hippocampus and cortex in rats. *PLoS One*, 9(4), e96041.
- Johansen, J. P., Tarpley, J. W., LeDoux, J. E., & Blair, H. T. (2010). Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. *Nature neuroscience*, 13(8), 979-986.
- Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., & Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology*, 31(2), 95-107.
- Kajander, T., Kellosalo, J., & Goldman, A. (2013). Inorganic pyrophosphatases: one substrate, three mechanisms. *FEBS letters*, 587(13), 1863-1869.
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of neuroscience methods*, 143(2), 169-177.
- Kim, Y. J., & Kim, J. M. (2015). Arsenic toxicity in male reproduction and development. *Development & reproduction*, 19(4), 167.

- Kinawy, A. A. (2019). The potential roles of aluminum chloride and sodium fluoride on the neurotoxicity of the cerebral cortex, hippocampus, and hypothalamus of male rat offspring. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 80(1), 1-9.
- Kobayashi, H., Yuyama, A., Ishihara, M., & Matsusaka, N. (1987). Effects of arsenic on cholinergic parameters in brain *in vitro*. *Neuropharmacology*, 26(12), 1707-1713.
- Kobayashi, H., Yuyama, A., Tokonabe, Y., & Matsusaka, N. (1982). Reversible effects of monothiol (D-penicillamine) and dithiol (dimercaptosuccinic acid) chelating compounds on methylmercury-inhibited choline acetyltransferase activity and high affinity choline uptake. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 32(4), 655-663.
- Kohn, D. F., & Clifford, C. B. (2002). Biology and diseases of rats. *Laboratory animal medicine*, 121.
- Kreider, J. C., & Blumberg, M. S. (2005). Geotaxis and beyond: commentary on Motz and Alberts. *Neurotoxicology and teratology*, 27(4), 535-538
- Kubota, T., Matsumoto, H., & Kirino, Y. (2016). Ameliorative effect of membrane-associated estrogen receptor G protein coupled receptor 30 activation on object recognition memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of pharmacological sciences*, 131(3), 219-222.
- Laloux, C., Mairesse, J., Van Camp, G., Giovine, A., Branchi, I., Bouret, S., ... & Maccari, S. (2012). Anxiety-like behaviour and associated neurochemical and endocrinological alterations in male pups exposed to prenatal stress. *Psychoneuroendocrinology*, 37(10), 1646-1658.

- Lamprea, N., López, J., Mora, L., López, C., Múnera, A., & Lamprea, M. (2005). Efectos de la administración sistémica de escopolamina en una tarea de reconocimiento de objetos. *Iatreia*, 18(4-S).
- Lana, D., Cerbai, F., Di Russo, J., Boscaro, F., Giannetti, A., Petkova-Kirova, P., & Giovannini, M. G. (2013). Hippocampal long term memory: Effect of the cholinergic system on local protein synthesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 106, 246–257.
- LeDoux J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual review of neuroscience*, 23, 155–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>
- Leger M., Quiedeville A., Bouet V., Haelewyn B., Boulouard M., Schumann-Bard P., & Freret T. (2013) Object recognition test in mice. *Nat Protoc* 8:2531–2537. Recuperado de: <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>
- Leibowitz, A., Boyko, M., Shapira, Y., & Zlotnik, A. (2012). Blood glutamate scavenging: insight into neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.* 13 (8), 10041–10066.
- Li Y, Wang M, Piao F, & Wang X. (2012). Subchronic exposure to arsenic inhibits spermatogenesis and downregulates the expression of ddx3y in testis and epididymis of mice. *Toxicol. Sci.*; 128:482–9.
- Li Y., Zhang Y., Gao Y., Zhang W., Cui X., Liu J., & Wei Y. (2018). Arsenic Induces Thioredoxin 1 and Apoptosis in Human Liver HHL-5 Cells. *Biol. Trace Elem Res.*; 181(2):234-241.
- Li, X., Zhang, J., Niu, R., Manthari, R. K., Yang, K., & Wang, J. (2019). Effect of fluoride exposure on anxiety-and depression-like behavior in mouse. *Chemosphere*, 215, 454-460.
- Li, Y., Heerema, N. A., Dunipace, A. J., & Stookey, G. K. (1987). Genotoxic effects of fluoride evaluated by sister-chromatid exchange. *Mutation Research*

*Letters*, 192(3), 191–201. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(87\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0165-7992(87)90055-8)

- Lindberg, A. L., Goessler, W., Gurzau, E., Koppova, K., Rudnai, P., Kumar, R., ... & Vahter, M. (2006). Arsenic exposure in Hungary, Romania and Slovakia. *Journal of Environmental Monitoring*, 8(1), 203-208.
- Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92(2), 180-185.
- Liu, F., Ma, J., Zhang, H., Liu, P., Liu, Y. P., Xing, B., & Dang, Y. H. (2014). Fluoride exposure during development affects both cognition and emotion in mice. *Physiology & behavior*, 124, 1-7.
- Long, Y. G., Wang, Y. N., Chen, J., Jiang, S. F., Nordberg, A., & Guan, Z. Z. (2002). Chronic fluoride toxicity decreases the number of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. *Neurotoxicology and teratology*, 24(6), 751-757.
- Lu, T. H., Tseng, T. J., Su, C. C., Tang, F. C., Yen, C. C., Liu, Y. Y., ... & Chen, Y. W. (2014). Arsenic induces reactive oxygen species-caused neuronal cell apoptosis through JNK/ERK-mediated mitochondria-dependent and GRP 78/CHOP-regulated pathways. *Toxicology letters*, 224(1), 130-140.
- Luo, J.H., Qiu, Z.Q., Shu, W.Q., Zhang, Y.Y., Zhang, L., & Chen, J.A. (2009). Effects of arsenic exposure from drinking water on spatial memory, ultra-structures and NMDAR gene expression of hippocampus in rats. *Toxicol. Lett.* 184 (2), 121–125.
- Maekawa, F., Tsuboi, T., Oya, M., Aung, K. H., Tsukahara, S., Pellerin, L., & Nohara, K. (2013). Effects of sodium arsenite on neurite outgrowth and glutamate AMPA receptor expression in mouse cortical neurons. *Neurotoxicology*, 37, 197-206.

- Maimanee, T. A., Brain, P. F., & Zari, T. A. (2003). Dietary fats influence 'open-field' behaviour of male and female laboratory mice. *Laboratory animals*, 37(3), 222-232.
- Marani, E. (1995). Simultaneous demonstration of CD15 and alkaline phosphatase activity in cryostat sections of rat fetuses: a detail technical description for the developing brain. *Eur. J. Morphol.* 33 (2), 137-147.
- Markgraf, C.G., Cirino, M., & Meredith, J. (2010). Comparisons of methods for analysis of functional observational battery (FOB) data. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 62, 89-94.
- Martínez, L., Jiménez, V., García-Sepúlveda, C., Ceballos, F., Delgado, J. M., Niño-Moreno, P., ... & Jiménez-Capdeville, M. E. (2011). Impact of early developmental arsenic exposure on promoter CpG-island methylation of genes involved in neuronal plasticity. *Neurochemistry international*, 58(5), 574-581.
- Martinez-Finley EJ, Ali AM, Allan AM. Learning deficits in C57BL/6 J mice following perinatal arsenic exposure: consequence of lower corticosterone receptor levels? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2009;94(2):271–7.
- Matthews, C.C., Zielke, H.R., Wollack, J.B., & Fishman, P.S. (2000). Enzymatic degradation protects neurons from glutamate excitotoxicity. *J. Neurochem.* 75 (3), 1045–1052.
- Mazzola, P. N., Bruinenberg, V., Anjema, K., Vliet, D. V., Dutra-Filho, C. S., Spronsen, F. J. V., & Zee, E. A. (2015). Voluntary exercise prevents oxidative stress in the brain of phenylketonuria mice. In *JIMD Reports, Volume 27* (pp. 69-77). Springer, Berlin, Heidelberg.

- McGaugh J. L. (2002). Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends in neurosciences*, 25(9), 456. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02211-7](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02211-7)
- McGaugh J. L. (2002). Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends in neurosciences*, 25(9), 456. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02211-7](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02211-7)
- McGaugh, J. L. (2013). Making lasting memories: Remembering the significant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (supplement\_2), 10402-10407.
- McKenna, M. C., Sonnewald, U., Huang, X., Stevenson, J., & Zielke, H. R. (1996). Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *Journal of neurochemistry*, 66(1), 386–393. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66010386.x>
- Mejia JJ, Diaz-Barriga F, Calderon J, Rios C, Jimenez-Capdeville ME. Effects of lead-arsenic combined exposure on central monoaminergic systems. *Neurotoxicol Teratol* 1997;19:489e97.
- Mittal, M., & Flora, S. J. S. (2006). Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. *Chemico-biological Interactions*, 162(2), 128-139.
- Molina, J. C., Hoffmann, H., Spear, L. P., & Spear, N. E. (1987). Sensorimotor maturation and alcohol responsiveness in rats prenatally exposed to alcohol during gestational day 8. *Neurotoxicology and teratology*, 9(2), 121-128.
- Mónaco, N. M., Bartos, M., Dominguez, S., Gallegos, C., Bras, C., del Carmen Esandi, M., ... & Gumilar, F. (2018). Low arsenic concentrations impair



- memory in rat offspring exposed during pregnancy and lactation: Role of  $\alpha 7$  nicotinic receptor, glutamate and oxidative stress. *NeuroToxicology*, 67, 37-45.
- Mondal, P., Shaw, P., Bandyopadhyay, A., Bhowmik, A. D., Chakraborty, A., Sudarshan, M., & Chattopadhyay, A. (2019). Mixture effect of arsenic and fluoride at environmentally relevant concentrations in zebrafish (*Danio rerio*) liver: Expression pattern of Nrf2 and related xenobiotic metabolizing enzymes. *Aquatic Toxicology*, 213, 105219.
  - Moore, C. M., Biederman, J., Wozniak, J., Mick, E., Aleari, M., Wardrop, M., Dougherty, M., Harpold, T., Hammerness, P., Randall, E., & Renshaw, P. F. (2006). Differences in brain chemistry in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder with and without comorbid bipolar disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *The American journal of psychiatry*, 163(2), 316–318. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.2.316>
  - Moore, C. M., Biederman, J., Wozniak, J., Mick, E., Aleari, M., Wardrop, M., Dougherty, M., Harpold, T., Hammerness, P., Randall, E., Lyoo, I. K., & Renshaw, P. F. (2007). Mania, glutamate/glutamine and risperidone in pediatric bipolar disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy study of the anterior cingulate cortex. *Journal of affective disorders*, 99(1-3), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2006.08.023>
  - Morimoto, K., Fahnestock, M., & Racine, R.J. (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog. Neurobiol.* 73 (1), 1–60.
  - Morton, W. E., & Caron, G. A. (1989). Encephalopathy: an uncommon manifestation of workplace arsenic poisoning?. *American Journal of Industrial Medicine*, 15(1), 1-5.

- Moser, V. C., & Ross, J. F. (1996). US EPA/AIHC training video and reference manual for a functional observational battery. *US Environmental Protection Agency, Washington, DC.*
- Mugford, C. A., & Kedderis, G. L. (1998). Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug metabolism reviews*, 30(3), 441-498.
- Mukherjee S. & Manahan-Vaughan D. (2013). Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. *Neuropharmacology* 66: 65–81.
- Murphy, A. J., & Coll, R. J. (1992). Fluoride is a slow, tight-binding inhibitor of the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 267(8), 5229-5235.
- Myhrer, T., 2003. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 41 (2-3), 268–287
- Nagaraja, T. N., & Desiraju, T. (1994). Effects on operant learning and brain acetylcholine esterase activity in rats following chronic inorganic arsenic intake. *Human & Experimental Toxicology*, 13(5), 353-356.
- Nagata, C., Nagao, Y., Shibuya, C., Kashiki, Y., & Shimizu, H., (2005). Urinary cadmium and serum levels of estrogens and androgens in postmenopausal Japanese women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14 (3), 705–708.
- Nakamura, Y., Izumi, H., Shimizu, T., Hisaoka-Nakashima, K., Morioka, N., & Nakata, Y. (2013). Volume transmission of substance P in striatum induced by intraplantar formalin injection attenuates nociceptive responses via activation of the neurokinin 1 receptor. *J. Pharmacol. Sci.* 121 (4), 257–271.
- Narisawa, S., Wennberg, C., & Luis Millán, J. (2001). Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple

abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *The Journal of pathology*, 193(1), 125-133.

- National Research Council. (2010). Guide for the care and use of laboratory animals.
- Naudon, L., & Jay, T. M. (2005). Opposite behaviours in the forced swimming test are linked to differences in spatial working memory performances in the rat. *Neuroscience*, 130(2), 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.09.009>
- Nelson-Mora, J., Escobar, M. L., Rodríguez-Durán, L., Massieu, L., Montiel, T., Rodríguez, V. M., & Gonsebatt, M. E. (2018). Gestational exposure to inorganic arsenic (iAs3+) alters glutamate disposition in the mouse hippocampus and ionotropic glutamate receptor expression leading to memory impairment. *Archives of Toxicology*, 92(3), 1037-1048.
- Nicolli, H. B., Bundschuh, J., Blanco, M. D. C., Tujchneider, O. C., Panarello, H. O., Dapeña, C., & Rusansky, J. E. (2012). Arsenic and associated trace-elements in groundwater from the Chaco-Pampean plain, Argentina: results from 100 years of research. *Science of the total Environment*, 429, 36-56.
- Niu R, Sun Z, Cheng Z, Li Z, & Wang J. (2009). Decreased learning ability and low hippocampus glutamate in offspring rats exposed to fluoride and lead. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*; 28 (2):254-8.
- NRC, U. (2006). Fluoride in drinking water. A scientific review of EPA's standards. *National Research Council, Committee on Fluoride in Drinking Water. Measures of Exposure to Fluoride in the United States. The National Academies Press, Washington, DC.*
- OECD (2016), *Test No. 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guidelines

for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. Recuperado de: <https://doi.org/10.1787/9789264264403-en>.

- Oliveira, A. M., Hawk, J. D., Abel, T., & Havekes, R. (2010). Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 17(3), 155–160. <https://doi.org/10.1101/lm.1625310>
- Olsen, L. F., Issinger, O. G., & Guerra, B. (2013). The Yin and Yang of redox regulation. *Redox Report*, 18(6), 245-252.
- Olton, D. S., & Papas, B. C. (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17(6), 669–682. [https://doi.org/10.1016/0028-3932\(79\)90042-3](https://doi.org/10.1016/0028-3932(79)90042-3)
- OMS. 2017. Guía para la calidad y consumo de agua.
- Pain, G. N. (2017). Pain in the Gut Fluoride Damage to the Gastrointestinal Tract.
- Palanza, P. (2001). Animal models of anxiety and depression: how are females different?. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 219-233.
- Patel T.P., Gullotti D.M., Hernandez P., O'Brien W.T., Capehart B.P., Morrison B., Bass C., Eberwine J.E., Abel T., & Meaney D.F. (2014). An opensource toolbox for automated phenotyping of mice in behavioral tasks. *Front Behav Neurosci*. 8:349. Recuperado de: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00349>
- Patel, M. (2016). Targeting oxidative stress in central nervous system disorders. *Trends in pharmacological sciences*, 37(9), 768-778.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates. 6P th P ed.

- Pellow, S. (1985). Chopin P., File S. E., Briley, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14, 149-167.
- Pereira M: Memory impairment induced by sodium fluoride is associated with changes in brain monoamine levels. *Neurotox Res* 2011; 19(1): 55-62.
- Pereira, P., Ardenghi, P., De Souza, M. M., Choi, H., Moletta, B., & Izquierdo, I. (2001). Effects of infusions of the tyrosine kinase inhibitor radicicol into the hippocampus on short-and long-term memory of the inhibitory avoidance task. *Behavioural Pharmacology*, 12(4), 299-302.
- Petrick, J. S., Jagadish, B., Mash, E. A., & Aposhian, H. V. (2001). Monomethylarsonous acid (MMAIII) and arsenite: LD50 in hamsters and *in vitro* inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chemical research in toxicology*, 14(6), 651-656.
- Picciotto, M.R., Higley, M.J., Mineur, Y.S., 2012. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76 (1), 116–129.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730–732. <https://doi.org/10.1038/266730a0>
- Prakash, C., Soni, M., & Kumar, V. (2015). Biochemical and molecular alterations following arsenic-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in rat brain. *Biological Trace Element Research*, 167(1), 121-129.
- Prakash, C., Soni, M., & Kumar, V. (2016). Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in arsenic neurotoxicity: a review. *Journal of Applied Toxicology*, 36(2), 179-188.

- Prystupa, J. (2011). Fluorine-A current literature review. An NRC and ATSDR based review of safety standards for exposure to fluorine and fluorides. *Toxicology mechanisms and methods*, 21(2), 103-170.
- Ramos-Chávez, L. A., Rendón-López, C. R., Zepeda, A., Silva-Adaya, D., Del Razo, L. M., & Gonsebatt, M. E. (2015). Neurological effects of inorganic arsenic exposure: altered cysteine/glutamate transport, NMDA expression and spatial memory impairment. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 21.
- Rao, M. V., Tiwari, H. (2006). Amelioration by melatonin of chromosomal anomalies induced by arsenic and/or fluoride in human blood lymphocyte cultures. *Fluoride*, 39(4), 255.
- Reddy, G. B., Khandare, A. L., Reddy, P. Y., Rao, G. S., Balakrishna, N., & Srivalli, I. (2003). Antioxidant defense system and lipid peroxidation in patients with skeletal fluorosis and in fluoride-intoxicated rabbits. *Toxicological Sciences*, 72(2), 363-368.
- Reddy, K. P., Sailaja, G., & Krishnaiah, C. (2009). Protective effects of selenium on fluoride induced alterations in certain enzymes in brain of mice. *Journal of Environmental Biology*, 30(5), 859.
- Rock, P. L., Roiser, J. P., Riedel, W. J., & Blackwell, A. D. (2014). Cognitive impairment in depression: a systematic review and meta-analysis. *Psychological medicine*, 44(10), 2029–2040. <https://doi.org/10.1017/S0033291713002535>
- Rodriguez K.F., Ungewitter E.K., Crespo Mejias Y., Liu C., Nicol B., Kissling G.E., & Yao H.H. (2016). Effects of in utero exposure to arsenic during the second half of gestation on reproductive end points and metabolic parameters in female CD-1 mice. *Environ. Health Perspect.*; 124:336-343.

- Rodríguez, V. M., Carrizales, L., Jimenez Capdeville, M. E., Dufour, L., & Giordano, M. (2001). The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat. *Brain Research Bulletin*, 55(2), 301-308.
- Rodríguez, V. M., Carrizales, L., Mendoza, M. S., Fajardo, O. R., & Giordano, M. (2002). Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *Neurotoxicology and Teratology*, 24(6), 743-750.
- Rodríguez, V. M., Del Razo, L. M., Limón-Pacheco, J. H., Giordano, M., Sánchez-Peña, L. C., Uribe-Querol, E., ... & Gonsebatt, M. E. (2005). Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicological Sciences*, 84(1), 157-166.
- Rodríguez, V. M., Jiménez-Capdeville, M. E., & Giordano, M. (2003). The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicology Letters*, 145(1), 1-18.
- Rodríguez, V. M., Limón-Pacheco, J. H., Carrizales, L., Mendoza-Trejo, M. S., & Giordano, M. (2010). Chronic exposure to low levels of inorganic arsenic causes alterations in locomotor activity and in the expression of dopaminergic and antioxidant systems in the albino rat. *Neurotoxicology and Teratology*, 32(6), 640-647.
- Rodríguez-Barranco, M., Lacasaña, M., Aguilar-Garduño, C., Alguacil, J., Gil, F., González-Alzaga, B., & Rojas-García, A. (2013). Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children: a systematic review and meta-analysis. *Science of the total environment*, 454, 562-577.
- Rojas D, Rager J.E., Smeester L., Bailey K.A., Drobna Z., Rubio-Andrade M., Styblo M., Garcia-Vargas G., & Fry R.C. (2015). *Toxicol. Sci.* 143:97–106

- Ronchetti, S. A. (2014). *Efectos del arsénico sobre la adenohipófisis. Mecanismos de acción* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (2011). Memory modulation. *Behavioral neuroscience*, 125(6), 797–824. <https://doi.org/10.1037/a0026187>
- Rosso, J. J., Troncoso, J. J., & Fernández Cirelli, A. (2011). Geographic distribution of arsenic and trace metals in lotic ecosystems of the Pampa Plain, Argentina. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 86(1), 129-132.
- Rovet, J. F. (2014). The role of thyroid hormones for brain development and cognitive function. *Paediatric Thyroidology*, 26, 26-43.
- Rutter, M., Caspi, A., & Moffitt, T.E., (2003). Using sex differences in psychopathology to study causal mechanisms: unifying issues and research strategies. *J. Child Psychol. Psychiatry* 44 (8), 1092–1115
- Sakae, D. Y., Sakae, T. M., Paschoalini, M. A., & Faria, M. S. (2015). Relative luminosity in the plus maze upon the exploratory behaviour of female Wistar rats. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 73, 601-606.
- Salgado-Bustamante, M., Ortiz-Pérez, M. D., Calderón-Aranda, E., Estrada-Capetillo, L., Niño-Moreno, P., González-Amaro, R., & Portales-Pérez, D. (2010). Pattern of expression of apoptosis and inflammatory genes in humans exposed to arsenic and/or fluoride. *Science of the total environment*, 408(4), 760-767.
- Salim, S. (2017). Oxidative stress and the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 360 (1), 201-205.



- Samad, N., Rao, T., Bhatti, S. A., & Imran, I. (2021). Inhibitory effects of selenium on arsenic-induced anxiety-/depression-like behavior and memory impairment. *Biological Trace Element Research*, 200(2), 689-698.
- Sánchez Peña, L. C., Petrosyan, P., Morales, M., González, N. B., Gutiérrez-Ospina, G., Del Razo, L. M., & Gonsebatt, M. E. (2010). Arsenic species, AS3MT amount, and AS3MT gen expression in different brain regions of mouse exposed to arsenite. *Environmental Research*, 110(5), 428-434.
- Sárközi, K., Horváth, E., Vezér, T., Papp, A., & Paulik, E. (2015). Behavioral and general effects of subacute oral arsenic exposure in rats with and without fluoride. *International Journal of Environmental Health Research*, 25(4), 418-431.
- Savage, S., Ma, D. (2015) Animal behavior testing: memory. *British Journal of Anaesthesia*. 113 (1), 6-9
- Scheff, S. W., Price, D. A., Hicks, R. R., Baldwin, S. A., Robinson, S., & Brackney, C. (2005). Synaptogenesis in the hippocampal CA1 field following traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, 22(7), 719-732.
- Schneider, J.S., & Lidsky, T.I. (1981). Processing of somatosensory information in striatum of behaving cats. *J. Neurophysiol.* 45 (5), 841–851.
- Schwabe, L., Joëls, M., Roozendaal, B., Wolf, O. T., & Oitzl, M. S. (2012). Stress effects on memory: an update and integration. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 36(7), 1740–1749. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.002>
- Sergutina, A.V., Rakhmanova, V.I., 2014. Brain acetylcholinesterase activity in Wistar and August rats with low and high motor activity (a cytochemical study). *Bull. Exp. Biol. Med.* 157 (4), 450–453.

- Shalini, B., & Sharma, J. D. (2015). Beneficial effects of emblica officinalis on fluoride-induced toxicity on brain biochemical indexes and learning-memory in rats. *Toxicology International*, 22(1), 35–39.
- Shapovalova, K.B. (2003). *Advances in Functional Neurochemistry*, 231–244.
- Sharma, D., Singh, A., Verma, K., Paliwal, S., Sharma, S., & Dwivedi, J. (2017). Fluoride: a review of pre-clinical and clinical studies. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56, 297-313.
- Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014). Alkaline phosphatase: an overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(3), 269-278.
- Shen S., Li X.F., Cullen W.R., Weinfeld M., & Le X.C. (2013). Arsenic Binding to Proteins. *Chem. Rev.*, 113:7769-7792.
- Shila, S., Kokilavani, V., Subathra, M., & Panneerselvam, C. (2005). Brain regional responses in antioxidant system to  $\alpha$ -lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology*, 210(1), 25-36.
- Sil'kis I. G. (2004). A possible mechanism of participation of dopaminergic cells and striatal cholinergic interneurons in the conditioned selection of motor activity]. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I P Pavlova* 54 (6), 734–749.
- Singh A.P., Goel R.K., & Kaur T. (2011). Mechanisms Pertaining to Arsenic Toxicity. *Toxicol. Int.*; 18(2):87–93.
- Singh R., Banerjee C., Ray A., Rajamani P., Mazumder S. (2016). Fluoride-induced head kidney macrophage cell apoptosis involves activation of the CaMKII $\beta$ -ERK 1/2-caspase-8 axis: the role of superoxide in initiating the apoptotic cascade. *Toxicology Research* 5(2):1477-1489
- Singh, R. S., Singh, T., & Singh, A. K. (2019). Enzymes as Diagnostic Tools. "Advances in Enzyme Technology".

- Singh, V., Gera, R., Kushwaha, R., Sharma, A. K., Patnaik, S., & Ghosh, D. (2016). Hijacking microglial glutathione by inorganic arsenic impels bystander death of immature neurons through extracellular cystine/glutamate imbalance. *Scientific Reports*, 6(1), 1-17.
- Slattery, D. A., & Cryan, J. F. (2012). Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature protocols*, 7(6), 1009-1014.
- Spak, C. J., Sjöstedt, S., Eleborg, L., Veress, B., Perbeck, L., & Ekstrand, J. (1989). Tissue response of gastric mucosa after ingestion of fluoride. *BMJ: British Medical Journal*, 298(6689), 1686.
- Spijker, S. (2011). In *Neuroproteomics* 13–26.
- Spittle, B. (2020). Reviews of developmental fluoride neurotoxicity by Grandjean and Guth et al. *Fluoride*, 53(2), 204–219.
- Srivastava, S., & Flora, S. J. S. (2020). Fluoride in drinking water and skeletal fluorosis: a review of the global impact. *Current environmental health reports*, 7(2), 140-146.
- Strunecka, A., & Strunecky, O. (2020). Mechanisms of fluoride toxicity: from enzymes to underlying integrative networks. *Applied Sciences*, 10(20), 7100.
- Strunecka, A., Patocka, J., Blaylock, R. L., & Chinoy, N. J. (2007). Fluoride interactions: from molecules to disease. *Current Signal Transduction Therapy*, 2(3), 190-213.
- Styblo, M., Del Razo, L. M., LeCluyse, E. L., Hamilton, G. A., Wang, C., Cullen, W. R., & Thomas, D. J. (1999). Metabolism of arsenic in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Chemical research in toxicology*, 12(7), 560-565.
- Styblo, M., Del Razo, L. M., Vega, L., Germolec, D. R., LeCluyse, E. L., Hamilton, G. A., ... & Thomas, D. J. (2000). Comparative toxicity of trivalent

and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Archives of toxicology*, 74(6), 289-299.

- Sun, Z., Zhang, Y., Xue, X., Niu, R., & Wang, J. (2018). Maternal fluoride exposure during gestation and lactation decreased learning and memory ability, and glutamate receptor mRNA expressions of mouse pups. *Human & Experimental Toxicology*, 37(1), 87-93.
- Tadanobu, I., Zhang, Y. F., Shigeo, M., Hiroko, S., Hiromichi, N., Hiroki, M., & Eiichi, A. (1990). The effect of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice. *Toxicology Letters*, 54(2-3), 345-353.
- Thapa, S., Lv, M., & Xu, H. (2017). Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 17(17), 1665–1676. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170120153930>
- Thiel, C. M., Müller, C. P., Huston, J. P., & Schwarting, R. K. W. (1999). High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*, 93(1), 243-251.
- Thomas, D. J., Styblo, M., & Lin, S. (2001). The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicology and applied pharmacology*, 176(2), 127-144.
- Till, C., Green, R., Flora, D., Hornung, R., Martinez-Mier, E. A., Blazer, M., & Lanphear, B. (2020). Fluoride exposure from infant formula and child IQ in a Canadian birth cohort. *Environment international*, 134, 105315.
- Torres, F. V., Hansen, F., & Locks-Coelho, L. D. (2013). Increase of extracellular glutamate concentration increases its oxidation and diminishes glucose oxidation in isolated mouse hippocampus: reversible by TFB-

TBOA. *Journal of neuroscience research*, 91(8), 1059–1065.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.23187>

- Tripathi, N., Kannan, G. M., Pant, B. P., Jaiswal, D. K., Malhotra, P. R., & Flora, S. J. S. (1997). Arsenic-induced changes in certain neurotransmitter levels and their recoveries following chelation in rat whole brain. *Toxicology Letters*, 92(3), 201-208.
- Tsai SH, Liang YC, Chen L, Ho FM, Hsieh MS, Lin JK. Arsenite stimulates cyclooxygenase-2 expression through activating I $\kappa$ B kinase and nuclear factor  $\kappa$ B in primary and ECV304 endothelial cells. *J Cell Biochem* 2002;84:750–8.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1998). Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.6200. *Neurotoxicity Screening Battery*.
- Vahidnia, A., Van der Voet, G. B., & De Wolff, F. A. (2007). Arsenic neurotoxicity—a review. *Human & experimental toxicology*, 26(10), 823-832.
- Van Waes, V., Beverley, J.A., Siman, H., Tseng, K.Y., & Steiner, H., (2012). CB1 cannabinoid receptor expression in the striatum: association with corticostriatal circuits and developmental regulation. *Front. Pharmacol.* 3, 21.
- Vani, M. L., & Reddy, K. P. (2000). Effects of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscle of mice. *Fluoride*, 33(1), 17-26.
- Vardy, E. R., Kellett, K. A., Cocklin, S. L., & Hooper, N. M. (2012). Alkaline phosphatase is increased in both brain and plasma in Alzheimer's disease. *Neurodegenerative Diseases*, 9(1), 31-37.
- Varner JA, Jensen KF, Horvath W, Isaacson RL. Chronic administration of aluminum-fluoride or sodium-fluoride to rats in drinking water: alterations in neuronal and cerebrovascular integrity. *Brain Res.* 1998 Feb 16;784(1-2):284-98. doi: 10.1016/s0006-8993(97)01336-x. PMID: 9518651.

- Varol, E., Icli, A., Aksoy, F., Bas, H. A., Sutcu, R., Ersoy, I. H., & Ozaydin, M. (2013). Evaluation of total oxidative status and total antioxidant capacity in patients with endemic fluorosis. *Toxicology and industrial health*, 29(2), 175-180.
- Vathana, T., Nijhuis, T. H., Friedrich, P. F., Bishop, A. T., & Shin, A. Y. (2014). An experimental study to determine and correlate choline acetyltransferase assay with functional muscle testing after nerve injury. *Journal of neurosurgery*, 120(5), 1125–1130. <https://doi.org/10.3171/2014.1.JNS122241>
- Vianna, M. R., Szapiro, G., McGaugh, J. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2001). Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12251-12254.
- Viggiano D. (2008). The hyperactive syndrome: metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. *Behavioural brain research*, 194(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.06.033>
- Villa, A., Anabalon, M., Zohouri, V., Maguire, A., Franco, A. M., & Rugg-Gunn, A. (2010). Relationships between fluoride intake, urinary fluoride excretion and fluoride retention in children and adults: an analysis of available data. *Caries Research*, 44(1), 60-68.
- Villaamil Lepori, E. C., (2015). Hidroarsenicismo crónico regional endémico en Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.*, 49(1): 83-104.
- Vishnoi, S., Raisuddin, S., & Parvez, S. (2016). Glutamate Excitotoxicity and Oxidative Stress in Epilepsy: Modulatory Role of Melatonin. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the*

*International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 35(4), 365–374. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2016016399>

- Vogel-Ciernia, A., & Wood, M. A. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Current protocols in neuroscience*, 69, 8.31.1–8.31.17. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0831s69>
- Waugh, D. T. (2019). Fluoride exposure induces inhibition of sodium-and potassium-activated adenosine triphosphatase (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase) enzyme activity: Molecular mechanisms and implications for public health. *International journal of environmental research and public health*, 16(8), 1427.
- Waymire, K. G., Mahuren, J. D., Jaje, J. M., Guilarte, T. R., Coburn, S. P., & MacGregor, G. R. (1995). Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nature genetics*, 11(1), 45-51.
- Wei, M., Arnold, L., Cano, M., & Cohen, S. M. (2005). Effects of co-administration of antioxidants and arsenicals on the rat urinary bladder epithelium. *Toxicological Sciences*, 83(2), 237-245.
- Wilensky, A. E., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2000). *The Amygdala Modulates Memory Consolidation of Fear-Motivated Inhibitory Avoidance Learning But Not Classical Fear Conditioning*. *The Journal of Neuroscience*, 20(18), 7059–7066. doi:10.1523/jneurosci.20-18-07059.2000
- Wu C.X., Gu X.L., Ge Y.M., Zhang J.H., & Wang J.D. (2006). Effects of high fluoride and arsenic on brain biochemical indexes and learning-memory in rats. *Fluoride* 39: 274-279.
- Wu, L.L., Zhang, L., Shao, J., Qin, Y.F., Yang, R.W., & Zhao, Z.Y. (2008). Effect of perinatal iron deficiency on myelination and associated behaviors in rat pups. *Behav. Brain Res.* 188 (2), 263–270.

- Xi, S., Jin, Y., Lv, X., & Sun, G., (2010). Distribution and speciation of arsenic by transplacental and early life exposure to inorganic arsenic in offspring rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 134 (1), 84–97.
- Yahav, R., Franko, M., Huly, A., & Doron, R. (2015). The forced-swim test as a model of depression-like behaviour. *Journal of Visualized Experiments*, 97.
- Yang, H., Bain, R., Bartram, J., Gundry, S., Pedley, S., & Wright, J. (2013). Water safety and inequality in access to drinking-water between rich and poor households. *Environmental science & technology*, 47(3), 1222-1230.
- Zaganas, I., Kapetanaki, S., Mastorodemos, V., Kanavouras, K., Colosio, C., Wilks, M. F., & Tsatsakis, A. M. (2013). Linking pesticide exposure and dementia: what is the evidence?. *Toxicology*, 307, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.02.002>
- Zamora, P. L., Rockenbauer, A., & Villamena, F. A. (2014). Radical model of arsenic (III) toxicity: theoretical and EPR spin trapping studies. *Chemical Research in Toxicology*, 27(5), 765-774.
- Zhang, J., Liu, X., Zhao, L., Hu, S., Li, S., & Piao, F. (2013). Subchronic exposure to arsenic disturbed the biogenic amine neurotransmitter level and the mRNA expression of synthetase in mice brains. *Neuroscience*, 241, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.03.014>
- Zhang, Z., Shen, X., & Xu, X. (2001). Effects of selenium on the damage of learning-memory ability of mice induced by fluoride. *Wei sheng yan jiu= Journal of hygiene research*, 30(3), 144-146.
- Zhao, F., Liao, Y., Jin, Y., Li, G., Lv, X., & Sun, G. (2012). Effects of arsenite on glutamate metabolism in primary cultured astrocytes. *Toxicology in Vitro*, 26(1), 24-31.



- Zhou, M., Kindt, M., Joëls, M., & Krugers, H. J. (2011). Blocking mineralocorticoid receptors prior to retrieval reduces contextual fear memory in mice. *PloS one*, 6(10), e26220.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026220>

### Artículos publicados en revistas científicas

Las publicaciones derivadas del presente trabajo de tesis fueron:

- Bartos, M., Gumilar, F., Baier, C. J., **Dominguez, S.**, Bras, C., Cancela, L. M., ... & Gallegos, C. E. (2022) “*Rat developmental fluoride exposure affects retention memory, leads to a depressive-like behavior, and induces biochemical changes in offspring rat brains*”. *Neurotoxicology*, 93, 222-232. DOI: 10.1016/j.neuro.2022.10.006
- **Dominguez, S.**, Lencinas, I., Bartos, M., Gallegos, C., Bras, C., Mónaco, N., ... & Gumilar, F. (2021). Neurobehavioral and neurochemical effects in rats offspring co-exposed to arsenic and fluoride during development. *NeuroToxicology*, 84, 30-40.
- Bartos, M., Gumilar, F., Gallegos, C. E., Bras, C., **Dominguez, S.**, Cancela, L. M., & Minetti, A. (2019). Effects of perinatal fluoride exposure on short-and long-term memory, brain antioxidant status, and glutamate metabolism of young rat pups. *International Journal of Toxicology*, 38(5), 405-414.
- Bartos, M., Gumilar, F., Gallegos, C. E., Bras, C., **Dominguez, S.**, Mónaco, N., ... & Minetti, A. (2018). Alterations in the memory of rat offspring exposed to low levels of fluoride during gestation and lactation:

Involvement of the  $\alpha 7$  nicotinic receptor and oxidative stress. *Reproductive Toxicology*, 81, 108-114.

- Mónaco, N. M., Bartos, M., **Dominguez, S.**, Gallegos, C., Bras, C., del Carmen Esandi, M., ... & Gumilar, F. (2018). Low arsenic concentrations impair memory in rat offspring exposed during pregnancy and lactation: Role of  $\alpha 7$  nicotinic receptor, glutamate and oxidative stress. *NeuroToxicology*, 67, 37-45.

### **Presentaciones a Congresos, Simposios y Jornadas**

Durante el transcurso de la realización del presente trabajo, se realizaron las siguientes presentaciones en reuniones científicas de carácter nacional:

- “*Alteraciones neuroquímicas y de la memoria en ratas adultas co-expuestas a arsénico y flúor durante la gestación y la lactancia*”. **Dominguez, Sergio**; Lencinas, Ileana; Bartos, Mariana; Gallegos, Cristina; Bras, Cristina L.; Minetti, Alejandra; Gumilar, Fernanda. XXXIX Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología. III Jornadas Iberoamericanas de Toxicología. Buenos Aires, Argentina. 21-23 de Septiembre de 2022.
- “*Efectos neurotóxicos en crías de ratas expuestas durante la etapa perinatal a concentraciones de flúor encontradas en acuíferos de la Región Chaco Pampeana*”. Bartos, Mariana; Gumilar, Fernanda; Gallegos, Cristina; Baier, Javier; Bras, Cristina; **Dominguez, Sergio**; Cancela, Liliana; Minetti, Alejandra. XXII Congreso Argentino de Toxicología. XXXVII Jornadas Argentinas Interdisciplinarias de Toxicología. Buenos Aires, Argentina. 24 y 25 de Septiembre de 2021.
- “*Efecto sobre la ansiedad en ratas co-expuestas a arsénico y flúor durante la gestación y la lactancia*”. **Dominguez, Sergio**; Lencinas, Ileana; Bartos, Mariana; Gallegos, Cristina; Mónaco, Nina; Bras, Cristina;

Minetti, Alejandra; Gumilar, Fernanda. XXXVII Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología. I Jornada Virtual Iberoamericana: La Toxicología transitando los tiempos de pandemia". 16-18 de Septiembre de 2020.

- *“La exposición de Arsénico durante el desarrollo produce depresión en ratas adultas”*. Mónaco, Nina; **Dominguez, Sergio**; Lencinas, Ileana B.; Bartos, Mariana; Gallegos, Cristina; Bras, Cristina; Minetti, Alejandra; Gumilar, Fernanda. XXXVII Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología. I Jornada Virtual Iberoamericana: La Toxicología transitando los tiempos de pandemia". 16-18 de Septiembre de 2020.
- *“La co-exposición de Arsénico y Flúor durante el desarrollo afecta la memoria de ratas jóvenes”* **Dominguez, Sergio**; Lencinas, Ileana B.; Bartos, Mariana; Gallegos, Cristina; Bras, Cristina; Mónaco, Nina; Minetti, Alejandra; Gumilar, Fernanda. XXI Congreso Argentino de Toxicología. Buenos Aires, Argentina. 18-20 de Septiembre de 2019.
- *“La co-exposición de Arsénico y Flúor durante el desarrollo afecta la ansiedad en ratas”*. **Domínguez S.**; Lencinas, I.; Bartos, M.; Gallegos. C.; Bras C.; Mónaco, N.; Minetti, A. Gumilar F. XXXVI Jornadas Argentinas Interdisciplinarias de Toxicología. Córdoba, Argentina. 19-21 de Setiembre. Año 2018.
- *“La exposición a bajas concentraciones de flúor durante la gestación y la lactancia altera la memoria, el sistema antioxidante y los niveles de transaminasas en los cerebros de las crías de ratas”* . Bartos, M.; Gumilar F.; Gallegos. C.E.; Bras C.; **Domínguez S.**; Lencinas, I.; Cancela L.; Minetti, A. XXXVI Jornadas Argentinas Interdisciplinarias de Toxicología. Córdoba, Argentina. 19-21 de Setiembre. Año 2018.
- *“La co-exposición de As/F durante la gestación y la lactancia provoca alteración de la actividad locomotora en ratas”*. **Domínguez S.**; Bartos, M.; Gallegos. C., Bras C.; Mónaco N.; Minetti, A., Gumilar F. XX Congreso Argentino de Toxicología-XXXV Jornadas Argentinas

Interdisciplinarias de Toxicología. Santa Fe, Argentina. 20 al 22 de Setiembre. Año 2017.

- *“La co-exposición de As/F durante períodos críticos del desarrollo provoca un retraso madurativo en ratas”*. **Domínguez S.**; Bartos, M.; Gallegos. C., Bras C.; Mónaco N.; Minetti, A., Gumilar F. VI Congreso Bianual PROIMCA. IV - Congreso Bianual PRODECA. Bahía Blanca, Argentina. 6 al 8 de Setiembre. Año 2017.
- *“Efecto modulador del arsénico sobre el sistema inmune en ratas expuestas durante la gestación y lactancia”*. Lencinas, I; **Domínguez S.**; Minetti, A., Gumilar F.; Prat M.I. VI Congreso Bianual PROIMCA. IV - Congreso Bianual PRODECA. Bahía Blanca, Argentina. 6 al 8 de Setiembre. Año 2017.
- *“Disfunciones oxidativas en cerebro de crías de ratas expuestas a flúor durante la gestación y la lactancia”*. Bartos, M.; Gumilar F.; Gallegos. C.E.; Bras C.; **Domínguez S.**; Mónaco N.; Cancela L. VI Congreso Bianual PROIMCA. IV - Congreso Bianual PRODECA. Bahía Blanca, Argentina. 6 al 8 de Setiembre. Año 2017.
- *“El estrés oxidativo como posible vía de neurotoxicidad producida por la exposición a Flúor durante la gestación y la lactancia”*. Bartos, M, Gumilar F., Gallegos. C Bras C. **Domínguez S.**; Mónaco N, Cancela, L.; Minetti, A. XXXIV Jornadas Argentinas Interdisciplinarias de Toxicología. Córdoba, Argentina. 21 al 24 de Setiembre. Año 2016.