



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS  
POTOSÍ**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
FARMACOBIOLOGICAS**

**“PAPEL DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS  
P2X7 Y P2Y2 EN EL PROCESAMIENTO DE APP  
EN NEURONAS EN CULTIVO EXPUESTAS A  
ARSÉNICO”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS  
PRESENTA**

**MVZ. LAURA YIREHT MONTEJANO MEDINA**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. MARÍA GUADALUPE MARTEL GALLEGOS**

**CO-DIRECTOR**

**DR. SERGIO ZARAZÚA GUZMÁN**

**ASESORES**

**DRA. ELIZABETH REYNAGA HERNÁNDEZ**

**DR. ALDO AZMAR RODRÍGUEZ MENCHACA**

**San Luis Potosí, S.L.P.**

**Octubre 2020**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS  
POTOSÍ**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
FARMACOBIOLOGICAS**

**“PAPEL DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS  
P2X7 Y P2Y2 EN EL PROCESAMIENTO DE APP  
EN NEURONAS EN CULTIVO EXPUESTAS A  
ARSÉNICO”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS  
PRESENTA**

**MVZ. LAURA YIREHT MONTEJANO MEDINA**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. MARÍA GUADALUPE MARTEL GALLEGOS**

**SINODALES:**

**PRESIDENTE: DRA. MA. GUADALUPE MARTEL GALLEGOS** \_\_\_\_\_

**SECRETARIO: DR. SERGIO ZARAZÚA GUZMÁN** \_\_\_\_\_

**VOCAL: DRA. ELIZABETH REYNAGA HERNÁNDEZ** \_\_\_\_\_

**VOCAL: DR. ALDO AZMAR RODRÍGUEZ MENCHACA** \_\_\_\_\_

**San Luis Potosí, S.L.P.**

**Octubre 2020**

**ESTE PROYECTO SE REALIZÓ CON APOYO DE**

**CONACYT-CIENCIA BÁSICA 241009**

PROMEP Apoyo a la incorporación de NPTC UASLP-PTC-631

Fondo de Apoyo a la Investigación (FAI) C18-FAI-05-38.38

**REALIZADO EN:**

Laboratorio de Biomédicas en la Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Media

Laboratorio de Neurotoxicología de la Facultad de Ciencias Químicas

Laboratorio de Electrofisiología de la Facultad de Medicina

de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí



El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT registro 003382, Nivel En desarrollo.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 713293



Se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

Quiero dar las gracias a todas las personas que me han ayudado durante la realización de esta tesis, sin su apoyo este trabajo hubiese sido imposible.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. María Guadalupe Martel Gallegos y al Dr. Sergio Zarazúa Guzmán por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por su confianza ciega en mí desde el primer momento, por apoyarme durante esta etapa de mi vida académica, resolver mis dudas y motivarme para ser una mejor profesionista; pero sobre todo por ser el mejor ejemplo de constancia, dedicación y amor por la Ciencia.

También quiero agradecer al Dr. Aldo Azmar Rodríguez Menchaca y la Dra. Mayra Delgado Ramírez por brindarme todo su apoyo y enseñanzas, gracias por su asesoría en la realización de técnicas de cultivo celular y por hacerme sentir parte de su laboratorio. Todo lo que he aprendido de ustedes es parte de mi formación en este mundo de la investigación y por ello siempre les estaré agradecida.

A la Dra. Elizabeth Reynaga Hernández tengo que agradecerle todo lo que me ha enseñado en este camino, su inagotable fuente de ideas para mis experimentos y su paciencia en los momentos más difíciles. Admiro mucho su carrera tanto académica como profesional.

Al Departamento de Dermatología del Hospital Central Ignacio Morones Prieto por permitirme realizar mis ensayos de PCR en tiempo real y en especial a la Dra. Ana Karen González Palomo por estar siempre apoyándome, y animándome cuando un experimento no salía como esperábamos, además de brindarme parte de su inmenso conocimiento.

Al Dr. Francisco Pérez Vázquez por permitirme realizar mis ensayos de actividad enzimática en su laboratorio del Centro de Investigación Aplicada en Ambiente y Salud, Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y Tecnología.

A mis docentes de posgrado por tan excelentes cursos y todo lo aprendido.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

En primer lugar, deseo dar las gracias a Dios, por acompañarme en cada momento e iluminar con su luz cada uno de mis pasos, él me ha guiado hasta aquí y me ha permitido cumplir este sueño.

Sin ninguna duda, una de las mejores cosas de mi paso por esta Universidad ha sido poder conocer a los mejores compañeros que alguien pudiera desear. Le agradezco a todos mis amigos del laboratorio de Neurotoxicología, Janett, Alex, Agustín y Ángela por su apoyo y hacer de mi estancia en esta ciudad una gran experiencia. A mis compañeros de generación (Marijo, Eunice, Nancy, Waldo y Alan) por las horas de estudio y risas compartidas, a Rita y Belkis por tantos buenos ratos y risas aseguradas, trabajar a su lado es un lujo, y ser su amiga aún más. A todos mis amigos de Durango por estar siempre presentes aún en la distancia.

También quiero agradecer a todos mis maestros de la FMVZ-UJED, por enseñarme y motivarme para seguir estudiando cada día de mi vida, sin su confianza inicial y su entusiasmo esto no hubiera sido posible, en especial a la Dra. Erla Neus Molina Porras; ningún profesor ha conseguido marcarme ni motivarme tanto como ella, transmite entusiasmo en cada palabra. Gracias por confiar tanto en mí.

La parte fundamental de todo lo que hago y todo lo que soy es mi familia. Gracias mamá por TODO, por tus consejos, por soportar mis momentos de crisis y no dejarme rendirme; me has enseñado lo importante que es luchar por mis sueños, pero sobre todo por las personas a las que quieres. Sé que pase lo que pase, si estás tú conmigo, tiene solución. A mi abuelita por su apoyo incondicional y su confianza infinita.

## RESUMEN

El arsénico (As) es un metaloide tóxico que afecta al sistema nervioso central (SNC), la exposición crónica a este agente neurotóxico induce alteraciones bioquímicas, patológicas y clínicas similares a las presentadas en la Enfermedad de Alzheimer (EA), por ejemplo, la hiperfosforilación de la proteína tau y la sobretranscripción de la proteína precursora amiloide (APP), representando un probable factor de riesgo para el desarrollo de esta patología (Alarcón et al., 2014; Carroll et al., 2017; Gong & O'Bryant, 2010; Y. Li et al., 2017; Ríos et al., 2012). APP es procesada a través de dos vías en el SNC, la vía amiloidogénica y no amiloidogénica. La primera es mediada por la enzima  $\beta$ -secretasa favoreciendo la generación de péptidos  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), mientras que en la vía no amiloidogénica participa  $\alpha$ -secretasa, una enzima que previene la generación de  $A\beta$ , el principal componente de las placas seniles características de la EA (Bhadbhade & Cheng, 2012; Van der Kant & Goldstein, 2015). Se ha demostrado que los receptores purinérgicos P2X7 y P2Y2 modulan la actividad de  $\alpha$ -secretasa, la estimulación de P2X7 la inhibe, mientras que la de P2Y2 la activa (Erb et al., 2018; León-Otegui et al., 2011; Miras-Portugal et al., 2015). Resultados de nuestro grupo han demostrado tanto en un modelo *in vivo* como *in vitro* que la exposición a As incrementa la expresión de P2X7 y disminuye P2Y2, así mismo, la actividad de  $\alpha$ -secretasa disminuye. También se demostró que la exposición a As incrementa la producción de  $A\beta$  y la actividad de la enzima  $\beta$ -secretasa manera significativa en tejido cerebral de rata (Nino et al., 2018). Por lo anterior el presente proyecto tuvo como objetivo determinar si la actividad de  $\alpha$  y  $\beta$ -secretasas son dependientes de la señalización purinérgica en un modelo *in vitro* expuesto a As, además de elucidar si el As altera la expresión a nivel de mRNA de estos receptores. Para cumplir con ello, células N2a fueron expuestas a 10 $\mu$ M arsenito de sodio y 7.5 $\mu$ M DMA<sup>V</sup> por 24h, se realizaron extracciones de RNA para medir la expresión de los receptores a nivel de mRNA por RT-qPCR. Además, las células fueron estimuladas con BzATP en presencia y ausencia de inhibidores de P2X7, obteniéndose lisados celulares para la medir la actividad de  $\alpha$  y  $\beta$ -secretasas por ELISA. Como resultados se logró estandarizar las condiciones de cultivo e intoxicación y las condiciones de

amplificación de los oligonucleótidos diseñados para P2X7 y P2Y2 por PCR punto final, donde se observó una disminución de P2Y2 y un aumento de P2X7 mismo que fue corroborado por RT-qPCR. Además, se encontró que la activación del receptor P2X7 inhibe la actividad de  $\alpha$ -secretasa y media el aumento de la actividad de  $\beta$ -secretasa. Por tanto, se concluye que la exposición neuronal a As afecta la modulación de  $\alpha$  y  $\beta$ -secretasas a través de la alteración en la expresión de los receptores purinérgicos P2X7 y P2Y2, lo que posiblemente contribuye de manera similar con la neurodegeneración de la EA.

**Palabras clave:** Arsénico (As), Enfermedad de alzheimer (EA), Proteína Precursora Amiloide (APP),  $\alpha$ -secretasa,  $\beta$ -secretasa, Receptores Purinérgicos.

## ABSTRACT

Arsenic is a toxic metalloid that affects the central nervous system (CNS). Chronic exposure to this neurotoxic agent has been reported to induce biochemical, pathological, and clinical alterations similar to those caused by Alzheimer's Disease (EA), for example, the hyperphosphorylation of the tau protein and the over-transcription of the amyloid precursor protein (APP), representing a probable risk factor for the development of this pathology. APP is a transmembrane protein which is processed through two different pathways in the CNS: the amyloidogenic and non amyloidogenic. In the amyloidogenic pathway, the  $\beta$ -secretase enzyme induces the production of  $\beta$ -amiloide peptides ( $A\beta$ ), the main component of senile plaques characteristic of EA. The non-amyloidogenic, there is the participation of  $\alpha$ -secretase, an enzyme that inhibits the generation of  $A\beta$ . It has been shown that the purinergic receptors P2X7 and P2Y2 regulate the activity of  $\alpha$ -secretase, P2X7 stimulation inhibits it, while P2Y2 stimulation activates it. Results of our group have shown in an *in vivo* and *in vitro* model that exposure to As increases the expression of P2X7 and decreases P2Y2, likewise, the activity of  $\alpha$ -secretase decreases. As far as we know, there is no study evaluating the activity of these receptors in relation to As. Besides the mechanism for which As could be altering the expression of these receptors is not defined. Therefore, the main objective of the present work was to determine if the activity of  $\alpha$  and  $\beta$ -secretases are dependent on purinergic signaling in an *in vitro* model exposed to As, in addition to elucidating whether As alters the expression at the mRNA level of purinergic receptors.

**Keywords:** Arsenic (As), Alzheimer's disease (AD), Amyloid Precursor Protein (APP),  $\alpha$ -secretase,  $\beta$ -secretase, Purinergic Receptors.



# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Arsénico (As).....	3
2.2. Efectos del As en el Sistema Nervioso.....	4
2.3. Enfermedad de Alzheimer (EA).....	9
2.4. APP y su procesamiento.....	11
2.5. Receptores Purinérgicos.....	16
2.5.1. P2XRs.....	16
2.5.1.1. P2X7.....	17
2.5.1.1.1 PAPEL DE P2X7 EN LA EA.....	21
2.5.2. P2YRs.....	23
2.5.2.1. P2Y2.....	23
2.5.2.1.1. PAPEL DE P2Y2 EN LA EA.....	25
2.5.3. ANTECEDENTES INMEDIATOS.....	27
3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVOS.....	30
5.1. Objetivo General.....	30
5.2. Objetivos Específicos.....	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1. Cultivo Celular.....	31
6.2 Exposición del cultivo a medio de intoxicación.....	31
6.3. Análisis de la expresión de los receptores P2X7 y P2Y2 en células Neuro2a.....	32
6.3.1. Extracción y control de calidad de las muestras de RNA total.....	32
6.3.2. Retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
6.3.3. Amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real.....	33

<b>6.4. Actividad de <math>\alpha</math>-secretasa</b> .....	35
<b>6.5. Actividad de <math>\beta</math>-secretasa</b> .....	36
<b>6.6. Cuantificación de proteínas</b> .....	36
<b>6.7. Western Blot</b> .....	37
<b>6.8. Tinción con azul de Coomassie</b> .....	38
<b>7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	39
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	39
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	40
<b>12. ANEXOS</b> .....	59

## 1. INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es considerado como uno de los cinco elementos más tóxicos de la tierra, este metaloide se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre, existiendo en dos formas primarias: orgánica e inorgánica; siendo esta última la más tóxica. Una de las principales vías de exposición es el consumo de agua contaminada. En México, se estima que al menos 415 mil personas están crónicamente expuestas a altos niveles de As (Flora, 2018; Ortíz, 2016; RSA-CONICET, 2018) de acuerdo a la NOM-127-SSA el nivel máximo permitido es de 25  $\mu\text{g/L}$ . Dentro de los estados donde se ha encontrado mayor concentración de As, están San Luis Potosí y Durango. Se ha reportado que la exposición a As en agua provoca diversos efectos adversos para la salud humana, como cáncer de piel, hígado, riñón, próstata y vejiga; así como desórdenes cardiovasculares, neuropatías periféricas, cambios conductuales y déficits cognitivos en modelos animales (Calderón et al., 2001; Espino-Valdés et al., 2009; Flora, 2018; Mochizuki et al., 2019). Se ha sugerido que el As podría representar un probable factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, principalmente la enfermedad de Alzheimer (EA) ya que se ha reportado que induce la hiperfosforilación de la proteína tau y altera la expresión de la proteína precursora amiloide (APP) (Chandravanshi et al., 2019; Gong & O'Bryant, 2010; Zarazúa et al., 2011).

Una de las características patológicas de la EA es la formación de las placas seniles, las cuales se encuentran constituidas principalmente por el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) que deriva de la fragmentación de la APP por  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas a través de la vía amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica intervienen  $\alpha$ -y  $\gamma$ -secretasas, produciendo el fragmento soluble de APP (sAPP) (Blennow et al., 2006; Van der Kant & Goldstein, 2015). Recientemente, se ha demostrado que los receptores purinérgicos, principalmente P2X7 y P2Y2, modulan la actividad de  $\alpha$ -secretasa teniendo efectos opuestos. La activación de P2X7 da como resultado la inhibición de  $\alpha$ -secretasa, mientras que P2Y2 es un activador de la misma (León-Otegui et al., 2011; Miras-Portugal et al., 2015).

Resultados previos de nuestro grupo de investigación han demostrado tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, que la exposición a As conlleva a una mayor expresión de P2X7 y a la disminución de P2Y2. Así mismo, se encontró una menor actividad de  $\alpha$ -secretasa en los sistemas expuestos a As. Además de evaluar los efectos de la exposición crónica a 3 ppm As en agua de bebida, en ratas Wistar sobre la producción y eliminación de A $\beta$ , demostrando que la exposición a As incrementa la producción de A $\beta$  y la actividad de la enzima  $\beta$ -secretasa (BACE1) de manera significativa en tejido cerebral.

Hasta el momento no existe ningún estudio publicado en el cual se evalúe la actividad de estos receptores en relación con la exposición arsénico, además, no está definido el mecanismo por el que el As podría estar contribuyendo a la neurodegeneración relacionada con la EA y la señalización purinérgica. En consecuencia, en este trabajo se investigó si la actividad de  $\alpha$ - y  $\beta$ - secretasas son dependientes de la señalización purinérgica en un modelo *in vitro* expuesto a As, además si la alteración en la expresión de los receptores P2X7 y P2Y2 por este agente es a nivel transcripcional.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Arsénico (As)**

El As es un elemento ubicuo que en conjunto con Cd, Cr, Hg y Pb es considerado como uno de los 5 elementos más tóxicos de la tierra. Se encuentra ampliamente distribuido en el aire, suelo, alimentos marinos y agua, siendo, el consumo de agua contaminada una de las principales vías de exposición (Bundschuh et al., 2008; Flora, 2018). Se estima que al menos 140 millones de personas, en 50 países, consumen agua que contiene niveles de arsénico superiores al valor guía provisional de la Organización Mundial de Salud (OMS), que establece como límite una concentración de As en agua potable de 0.01mg/L (Bundschuh et al., 2008; Sayato, 1989; WHO, 2005). Medina et al., (2018) han reportado que al menos 4.5 millones de personas en América Latina están crónicamente expuestos a altos niveles de As (>50 µg/L).

En México, la normatividad establece un límite máximo de 0.025mg/L en agua potable y 0.01mg/L en agua envasada para consumo humano (NOM-127-SSA1-1994, modificación 2005; NOM-201-SSA1-2015), sin embargo, la población expuesta a beber agua con niveles de arsénico que pone en riesgo su salud asciende a más de 2 millones de habitantes, localizados principalmente en los estados de Chihuahua, Durango, Hidalgo y San Luis Potosí (Alarcón et al., 2014; Arreguín Cortés et al., 2010), en este último, se han reportado valores elevados de As en agua en el complejo hidráulico artesiano Matehuala-Cerrito Blanco, en el municipio de Rio Verde (Carrizales et al., 2006; Martínez-Villegas et al., 2013; Monroy Fernández et al., 2002), y en Morales dentro de la zona urbana de la Ciudad de San Luis Potosí (Calderón et al., 2001; Trejo-Acevedo et al., 2009).

Los compuestos de arsénico pueden ser orgánicos e inorgánicos, las especies inorgánicas son las más abundantes en la naturaleza y son las que dan lugar a las diferentes formas orgánicas a través de procesos de biotransformación. Una vez que el As ingresa al organismo por vía digestiva, respiratoria o tópica, sufre diversas modificaciones con la finalidad de inactivarlo y poder eliminarlo, esto principalmente mediante el proceso de metilación. El metabolismo del As implica su reducción a un

estado trivalente y la metilación oxidativa a un estado pentavalente. La metilación de cada átomo de As es regulada por las enzimas metil-transferasas y la donación del grupo metilo se realiza a partir de S-adenosilmetionina (SAM), consumiendo de 2 a 3 moléculas de glutatión reducido (GSH) y otros agentes reductores. Este proceso se lleva a cabo principalmente en el hígado, de ahí los metabolitos resultantes son distribuidos por todo el organismo, derivando en especies metiladas (Figura 1): ácido monometilarsónico ( $\text{MMA}^{\text{III}}$ ), ácido monometilarsínico ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ), ácido dimetilarsónico ( $\text{DMA}^{\text{III}}$ ), ácido dimetilarsínico ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) y óxido trimetilarsínico ( $\text{TMA}^{\text{V}}$ ). De ellos las especies trivalentes tiene una vida media corta, mientras que  $\text{DMA}^{\text{V}}$  se distribuye en la mayoría de los tejidos, especialmente en el tejido nervioso (Juárez-Reyes et al., 2009; Oyanedel Giaverini, 2015; Yang et al., 2012).

El arsénico puede causar efectos tóxicos en el organismo a través de diversos mecanismos, por ejemplo, interviene en los procesos celulares normales alterando vías metabólicas básicas, induce la reducción de grupos funcionales modificando la actividad de diversas enzimas y favorece un estado de estrés oxidativo, por lo que genera efectos celulares dañinos (Chandravanshi et al., 2018; Elio, 2009; Niño et al., 2018; Sattar et al., 2016; Yang et al., 2012). Además, se ha documentado que la exposición a As provoca diversos efectos adversos para la salud humana como cáncer de piel, hígado, riñón y vejiga; así como desórdenes cardiovasculares y neuropatías periféricas; además recientemente se le ha relacionado con desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Chandravanshi et al., 2014; Elio, 2009; Flora, 2018; Garza-Lombó et al., 2019; Mochizuki, 2019).

## **2.2. Efectos del As en el Sistema Nervioso**

Diversos estudios sugieren que el arsénico interactúa con el sistema nervioso tanto periférico (SNP) como central (SNC) en humanos y animales. En el SNP la exposición aguda a este agente puede provocar neuropatías periféricas y parestesia de extremidades distales; reportes histopatológicos de biopsias mostraron que la axonopatía y desmielinización son los principales cambios en nervios periféricos (Nava-Ruiz & Méndez-Armenta, 2011); mientras que una exposición crónica puede

llevar al desarrollo de encefalopatías y alteraciones en las funciones neurológicas (Mochizuki et al., 2019; Rodríguez et al., 2003).

Además de los efectos mencionados anteriormente, estudios realizados en animales sugieren que el As es capaz de atravesar la barrera placentaria y afectar la morfogénesis del tubo neural, así como la barrera hematoencefálica acumulándose en el parénquima cerebral (Moore et al., 2019; Santoyo Perez, 2006), sin embargo, el mecanismo responsable de estos efectos aún no ha sido elucidado. Pocos estudios sugieren vías de ingreso del As al SNC; entre estos destacan la propuesta de la acuagliceroporina AQP9 y el transportador de glucosa GLUT1 como principales mecanismos de transporte (Liu et al., 2002, 2006; Sattar et al., 2016; H. Wei et al., 2018).

Del mismo modo, se ha informado que la exposición humana a largo plazo a este metaloide se ha asociado con mayor vulnerabilidad a los efectos neurotóxicos del mismo, además del deterioro de la función ejecutiva y el control cognitivo de la conducta en niños y adultos. Wasserman et al., (2014) demostraron que la exposición a As a concentraciones de 142 y 190 mg/L en el agua potable se asoció con déficit cognitivo en niños de 6 a 10 años que viven en Bangladesh. Un estudio realizado por Rosado et al., (2007) reportó resultados similares en niños mexicanos con concentraciones de arsénico urinario superiores a 50 mg/g de creatinina, dando lugar a puntuaciones bajas en las pruebas que miden el razonamiento visual-espacial, el lenguaje y el vocabulario, la memoria, la inteligencia y las habilidades matemáticas en niños de 6 a 8 años. En otro estudio de cohorte realizado en Torreón, México, los investigadores informaron que los niños expuestos a As (6-7 años con 55 µg /L de arsénico urinario) obtuvieron puntajes más bajos en test de lenguaje. Además, observaron una asociación entre la exposición a As y el comportamiento hiperactivo (Roy et al., 2011). Resultados de Tsai et al., (2003) sugieren que la función neuroconductual en adolescentes puede verse afectada por la exposición infantil a As en agua, estableciendo que una exposición a largo plazo es acumulativa y que conlleva

a mayores daños de las funciones neurológicas (función cognitiva, alteraciones del lenguaje y déficit de atención).

La mayor parte de la investigación epidemiológica se ha centrado en niños, y los informes sobre el efecto de la exposición al arsénico en la cognición adulta son limitados. Sin embargo, una serie de estudios ha revelado recientemente una correlación significativa entre la exposición a As y una capacidad cognitiva deteriorada, particularmente relacionada con los síntomas de la enfermedad de Alzheimer (EA), por ejemplo, el proyecto FRONTIER, un estudio de cohorte realizado con la participación voluntaria de adultos y ancianos que residen en el oeste de Texas, en un área que contiene niveles de arsénico cercanos al estándar de la US EPA (por sus siglas en inglés, United States Environmental Protection Agency) en el agua subterránea (3-10 µg/L). En el cual la exposición crónica a largo plazo a bajos niveles de As en agua se correlacionó con puntajes bajos en las pruebas de cognición global, velocidad de procesamiento y memoria inmediata (O'Bryant et al., 2011)

A pesar del uso de diferentes condiciones experimentales, los estudios realizados en modelos animales han sido congruentes y respaldan la evidencia epidemiológica de la alteración cognitiva inducida por As. Especialmente aquellos estudios que evalúan las tareas dependientes del hipocampo; en roedores se ha demostrado que la exposición crónica y aguda al arsénico induce déficit del comportamiento, como problemas de memoria y aprendizaje espacial a corto y largo plazo (Tyler & Allan, 2014). Por ejemplo, la exposición a arsénico inorgánico (iAs) en agua que contiene 50 y 100 ppm o mg/L (concentraciones que son varias veces superiores a la recomendación de la OMS, 0.01mg/L) durante la gestación y en las primeras etapas del desarrollo en ratas, conduce a alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria en la descendencia adulta, lo que fue también asociado con el estrés oxidativo (Xi et al., 2009). En este sentido, también se encontraron resultados similares en el estudio realizado por Du et al., (2017) donde la exposición crónica de ratas Sprague-Dawley a 7.5 mM y 200 mM de trióxido de arsénico dañó las capacidades cognitivas y alteró la expresión de genes reguladores de la actividad neuronal (c-Fos, Arc, BDNF y Egr1). En otro estudio, la



exposición crónica de ratas a 100 mg/L de arsenito de sodio también resultó en problemas alteraciones del aprendizaje y memoria que también fueron acompañados por un aumento del estrés oxidativo y una disminución de los niveles de glutatión cerebral (Sharma & Sharma, 2013). Por lo tanto, esta evidencia sugiere que la exposición a diversas concentraciones de arsénico y sus metabolitos conduce a un deterioro cognitivo en los roedores.

Se han realizado investigaciones para identificar los mecanismos involucrados en la neurotoxicidad inducida por As, actualmente, los mecanismos descritos incluyen el estrés oxidativo y la disminución de los sistemas antioxidantes, inhibición de las enzimas y proteínas que contienen tiol, inducción de apoptosis, alteración de la señalización colinérgica, glutamatérgica, glucocorticoide, monoaminérgica, alteración de la biogénesis de monoaminas, cambios en los receptores de glutamato neuronales y transportadores en las células gliales, alteraciones de la transmisión sináptica, aumento de la fosforilación de la proteína tau y sobreexpresión de APP (Escudero-Lourdes, 2016; Hamadani et al., 2011; Nino et al., 2018; C. R. Tyler & Allan, 2014; Zarazúa et al., 2011)

El estrés oxidativo es actualmente el mecanismo más estudiado y aceptado para explicar la citotoxicidad del As (Ercal et al., 2001). Este proceso tiene lugar cuando ocurre una ruptura del equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y la respuesta de los sistemas de defensa antioxidantes (Mochizuki, 2019). Las ROS pueden causar daño al DNA actuando de manera directa y de manera indirecta afectando la apoptosis, las rutas de señalización y la proliferación celular, las especies reactivas del nitrógeno (RNS) como el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) también cumplen un rol importante en la generación del estrés oxidativo inducido por el As (Hei & Filipic, 2004; Hughes et al., 2011). En diversos estudios se ha visto que el As causa muerte celular por la inducción de la apoptosis en distintos tipos celulares (Shi et al., 2010; Singh et al., 2011). Los principales mecanismos por los cuales induce apoptosis incluyen la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), la disrupción del potencial de la membrana

mitocondrial, la inducción de caspasas y la activación de las vías de señalización de p53 y de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Bode & Dong, 2001; Pulido & Parrish, 2003). En un estudio realizado en ratas por Chandravanshi et al., (2018) al exponer a los animales a arsenito de sodio a dosis de 2 o 4 mg/kg (p.v.) durante 28 días dio como resultado un aumento de ROS, un estado de estrés oxidativo y un aumento de la apoptosis en la corteza frontal, hipocampo y cuerpo estriado en comparación con los controles. Li et al., (2017) mencionan que la exposición a este metaloide tiende a activar la ruta JNK/ErK, p38 MAPK y así es capaz de contribuir a la muerte neuronal.

En relación al impacto que puede tener la exposición a As sobre múltiples procesos neurobiológicos, incluyendo las rutas de señalización colinérgicas, glutamatérgicas y monoaminérgicas, se han realizado investigaciones donde los componentes de los receptores NMDA, específicamente NR2A, se redujeron después de tres meses de exposición al arsénico (2.72, 13.6, 68 mg/L de arsenito de sodio) en ratones. Además, estos ratones exhibieron cambios morfológicos en las neuronas del hipocampo, junto con edema capilar y morfología de células endoteliales vasculares irregulares (Luo et al., 2009). La exposición a concentraciones más bajas de arsénico (5 mg/kg de peso corporal) también inhibió la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en el cerebro y se asoció con un menor rendimiento en el aprendizaje operante (Nagaraja & Desiraju, 1994); otro estudio demostró que la actividad de AChE disminuyó con el aumento de las concentraciones de arsénico en ratas macho después de cinco días de exposición (Patlolla & Tchounwou, 2005). Estos estudios apoyan la hipótesis de que el arsénico podría ser un factor de riesgo en la etiología de la enfermedad de Alzheimer, ya que otras investigaciones confirman la reducción de AChE, junto con la degeneración de las neuronas colinérgicas en esta patología (Ferreira-vieira et al., 2016; Mufson et al., 2008). En relación a la Enfermedad de Alzheimer Gong & Bryant, (2010) realizaron una revisión en la cual muestran datos de que la exposición a As desencadena alteraciones bioquímicas, patológicas y clínicas similares a los cambios

presentados en esta enfermedad, representando, por lo tanto, un probable factor de riesgo para el desarrollo de esta patología.

### **2.3. Enfermedad de Alzheimer (EA)**

La demencia es un síndrome neurodegenerativo de causas diversas, que afecta principalmente a adultos mayores de 60 años, aunque en los últimos decenios el número de casos que inician antes se ha incrementado. La enfermedad Alzheimer (EA) es la más común de las demencias, representando del 60 a 80% del total de casos reportados (ANMM, 2017). En los últimos 15 años se han realizado varios estudios de base poblacional en México, que han permitido contar con estimaciones de la prevalencia de las personas afectadas por esta enfermedad, como la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2012) que estimó que la prevalencia de esta patología corresponde al 7.9%. Mientras que al analizar los datos sociodemográficos se encontró que la prevalencia por sexo, fue de 6.9% para hombres y 9.1% para mujeres; por grupos urbano y rural, las prevalencias fueron de 7.7% y de 9.4%, respectivamente; por último, de acuerdo con grupos de edad, las prevalencias reportadas fueron de 3.9% para los participantes de 60 a 69 años, de 8.9% para los de 70 a 79 años y de 19.2% para los de 80 años o más, todas ellas ajustadas por sexo, edad y escolaridad. Adicionalmente el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN, 2010) estimó que algún miembro de una de cada tres familias sufrirá esta enfermedad. Según la Asociación Nacional Mexicana de Medicina (2017) la EA representa actualmente una emergencia social y de salud debido que implica no solo la progresión clínica para el paciente, sino también consecuencias en el costo humano y económico. El costo de los cuidados a largo plazo, las hospitalizaciones recurrentes, además de los costos secundarios derivados por los cuidados, son solo algunos de los problemas socio-económicos que provoca esta patología (Alzheimer Association, 2016). Se ha calculado un costo anual per cápita en México de \$6,157 dólares para el cuidado de una persona con demencia. Por todo lo anterior la OMS reconoce a la EA como una prioridad de salud pública en su informe del año 2017.

La OMS (2017) define a esta patología como una enfermedad crónico-neurodegenerativa, progresiva, irreversible y de origen multifactorial; la manifestación clínica esencial y más temprana de la enfermedad es la alteración en la memoria, siendo la memoria episódica la más afectada, acompañada de alteraciones de la conducta, problemas de comunicación y razonamiento, a tal grado que se imposibilita el desarrollo de actividades cotidianas. Es importante señalar que el diagnóstico definitivo de esta enfermedad es *post mortem*.

Desde el punto de vista de la fisiopatología, a nivel macroscópico la enfermedad se caracteriza por una notable atrofia de la corteza cerebral, aumento del tamaño de los surcos, pérdida de sustancia gris, especialmente en la corteza entorrinal, amígdala e hipocampo, así como pérdida de sustancia blanca y mielina (Figura 2). A nivel microscópico se observa una significativa pérdida de sinapsis neuronales, neuritas distróficas colapsadas y morfológicamente alteradas; el hecho de que esta pérdida sináptica sea el rasgo de la EA que mejor se correlaciona con el declive cognitivo indica que es clave en la patogénesis de la enfermedad, así pues se puede considerar que la disfunción cognitiva de esta patología se debe principalmente a la interrupción de la red de conexiones entre algunas áreas clave del cerebro, como el sistema límbico y zonas específicas de la neocorteza, más que al daño neuronal concreto (Blennow et al., 2006; Palop, Jorge J. & Mucke, 2011). Por otro lado, a nivel histopatológico se caracteriza por la presencia de ovillos neurofibrilares (NFT) constituidos en su mayoría por la forma hiperfosforilada de la proteína tau y la aparición de placas seniles formadas principalmente por el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), derivado del fraccionamiento proteolítico secuencial de la proteína precursora amiloide (APP) (Álvarez et al., 2008; Blennow et al., 2006).

## 2.4. APP y su procesamiento

El gen que codifica para APP se localiza en humanos en el cromosoma 21. El procesamiento transcripcional alternativo del producto de dicho gen conduce a la generación de múltiples isoformas de la proteína APP, siendo las tres principales APP695, APP751 y APP770 (de 695, 751 y 770 aminoácidos, respectivamente), las últimas dos se expresan en la mayoría de los tejidos, mientras que APP695 es la principal isoforma cerebral, expresada predominantemente en neuronas (Müller et al., 2017; Zhang et al., 2011). En los mamíferos, la APP pertenece a una familia que incluye a la APP-like protein 1 (APLP1) y la APP-like protein 2 (APLP2), todas ellas son proteínas transmembrana de paso único tipo I, con un gran dominio extracelular (dominios conservados E1 y E2) y una cola citoplasmática corta, el dominio A $\beta$  se encuentra únicamente en la proteína APP. En el SNC la APP juega un papel importante en la migración celular, el crecimiento de neuritas, sinaptogénesis, tráfico axonal de proteínas, transducción de señales transmembrana, adhesión celular y el metabolismo de calcio (Van der Kant & Goldstein, 2015). Existen estudios que demuestran que los niveles de proteína y de mRNA de las isoformas APP695 y APP770 se encuentran elevados en cerebros de pacientes con Alzheimer y se asocian a un aumento en los depósitos de A $\beta$  (Menéndez-González et al., 2005)

La APP es sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso y glicosilada en el aparato de Golgi, para posteriormente pasar a la región trans-Golgi desde donde se transporta en vesículas secretoras a lo largo del axón hasta la terminal presináptica, insertándose en la superficie celular. Una vez en la membrana APP puede ser sometida a un procesamiento complejo por secretasas canónicas, así como por vías no canónicas recientemente implicadas dando lugar a una multitud de fragmentos biológicamente activos con funciones que aún se están estudiando, o puede ser reinternalizada por una vía de degradación endosomal/lisosomal (Müller et al., 2017; Sisodia, 1992).

Existen 2 vías de procesamiento de la proteína APP (Figura 3), la vía amiloidogénica y no amiloidogénica. La primera está mediada por  $\beta$ -secretasa (BACE1/ BACE2), una aspartil proteasa integral de la membrana, presente principalmente en las neuronas,

también llamada memapsina2 o Asp2, que libera un fragmento APP soluble ( $\beta$ -sAPP) y el fragmento terminal  $\beta$ -CTF, este último es escindido por un complejo de proteasas intramembranal que consta de cuatro componentes: presenilina 1 y 2 (PS1y2), nicastrina, PEN-2, y APH-1 denominado  $\gamma$ -secretasa, liberando el dominio intracelular de APP (AICD) y péptidos  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) de 40 a 49 aminoácidos. Siendo el péptido  $A\beta_{42}$  el más neurotóxico ya que tiene mayor capacidad de agregación, por lo cual es el principal componente de las placas seniles en la EA (Adeniji et al., 2017; Müller et al., 2017)

Por otro lado, la vía no amiloidogénica (Figura 3) se lleva a cabo por  $\alpha$ -secretasa (ADAM10), una desintegrina y metaloproteinasa transmembranal que escinde en el dominio  $A\beta$  entre Lys16-Leu17, generando el fragmento soluble de APP (sAPP $\alpha$ ) y el fragmento terminal  $\alpha$ -CTF (C83) que, a su vez, es escindido por el complejo  $\gamma$ -secretasa liberando el péptido P3. Este último fragmento se degrada rápidamente y se cree que no posee ninguna función importante (Blennow et al., 2006; Lichtenthaler, 2012).

El principal interés de esta actividad enzimática en la EA consiste en su papel en el procesamiento no amiloidogénico de APP ya que, al competir con la enzima  $\beta$ -secretasa por el sustrato,  $\alpha$ -secretasa es capaz de disminuir la síntesis y acumulación de  $A\beta$ ; esto unido a los efectos neuroprotectores observados en su producto (sAPP $\alpha$ ), ha llevado a considerar que la activación de ADAM10 puede ser una posible vía terapéutica para la EA (Marr, 2016; Yuan et al., 2017).

Se han descrito diversos factores que regulan la actividad de  $\beta$ -secretasa, a nivel transcripcional uno de los más importantes es Sp1, el estudio realizado por Christensen et al., (2004) demostró que un aumento inducido de este factor de transcripción facilitó la expresión del gen BACE 1 y se relacionó con un aumento en la biogénesis de  $A\beta$ . Por el contrario, se ha sugerido que NF- $\kappa$ B actúa como un represor de la transcripción de BACE-1 en cultivos neuronales diferenciados y cultivos gliales no activados (Lahiri et al., 2006), En contraste, Chen et al., (2012) encontraron que tanto los niveles de BACE1 como de NF- $\kappa$ B p65 aumentaron significativamente en los

cerebros de pacientes con EA, y que la expresión de NF- $\kappa$ B p65 dio como resultado un aumento de la actividad del promotor BACE1 y su transcripción, conduciendo a la escisión de APP por  $\beta$ -secretasa. Por otra parte, hay evidencia para apoyar la idea de que los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) inhiben la activación transcripcional de BACE1 (Vassar, 2014).

La regulación positiva transcripcional y traslacional de BACE1 también puede desencadenarse por estrés celular y especialmente oxidativo, tanto el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como el 4-Hidroxinonal (HNE) son mediadores probables de este efecto (J. Tan et al., 2016). Recientemente se descubrió que la sobreexpresión de p25, el activador de la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5), da como resultado una inducción doble de los niveles de A $\beta$  (Song et al., 2015), en este estudio, la sobreexpresión de p25 en ratones transgénicos condujo a la hiperfosforilación de STAT3 que a su vez afectó la actividad del promotor BACE1. Como consecuencia, se pudieron observar niveles incrementados de mRNA y proteína de BACE1 en estos animales transgénicos. Estos hallazgos parecen ser particularmente interesantes, ya que los ovillos neurofibrilares, un sello distintivo patológico de EA, están compuestos de proteína tau hiperfosforilada, que es fosforilada por la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) y CDK5. Por lo tanto, CDK5 y BACE1 parecen estar involucrado en ambos aspectos neuropatológicos de la EA, la acumulación de placas amiloides y en la formación de ovillos neurofibrilares.

La actividad de  $\alpha$ -secretasa se encuentra estrechamente regulada a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional. Hasta la fecha, los mecanismos de control celular de la escisión mediada por ADAM10 todavía no están completamente claros, pero estudios recientes han revelado diversas vías involucradas en su regulación (Hsia et al., 2019; Yuan et al., 2017).

Existen diversos factores de transcripción que controlan la expresión de  $\alpha$ -secretasa, la región promotora de esta enzima contiene sitios de unión para SP1 y USF (Upstream Stimulatory Factor), XBP-1 (X-box binding protein 1), así como un elemento sensible al ácido retinoico (Wetzel et al., 2017). Donmez et al., (2010) han informado que SIRT1,

una desacetilasa dependiente de NAD que tiene propiedades antienviejamiento y de protección contra el estrés *in vivo*, redujo la producción de A $\beta$  y promovió la expresión del gen ADAM10 a través de la coactivación de RAR (receptor del ácido retinoico). Otros ejemplos de regulación positiva están a cargo del ácido retinoico (RA), los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR $\alpha$ ), XBP-1 y, la activación de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR) promoviendo la transcripción de  $\alpha$ -secretasa y conduciendo a mayores niveles de sAPP $\alpha$  y menor generación de A $\beta$  (Spilman et al., 2015; View & Tang, 2020; Yuan et al., 2017).

A nivel de traducción, la expresión de  $\alpha$ -secretasa puede ser inhibida a través de la región 5' no traducida (5'-UTR) (Yuan et al., 2017), o de una secuencia de reconocimiento de microRNAs en la región 3'-UTR del mRNA de ADAM10 (Wetzel et al., 2017). Los miRNAs 144,451,103,107 y 1306 son capaces de inhibir la expresión de esta enzima (Augustin et al., 2012; Cheng et al., 2013). Múltiples mecanismos controlan la escisión mediada por ADAM10 a nivel postraduccional, incluida la activación de ciertos receptores, un grupo heterogéneo de moléculas, el tráfico intracelular de ADAM10 y la endocitosis (Hsia et al., 2019).

Además, se ha demostrado que  $\alpha$ -secretasa puede ser regulada por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) entre los cuales se encuentran los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs), receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) y receptores 5-hidroxitriptamina (5-HT), una vez estimulados ejercen sus múltiples funciones a través de vías de señalización, dando lugar a la activación (Sushma & Mondal, 2019; Thathiah & Strooper, 2011). Se ha propuesto que la exposición a agentes neurotóxicos como el arsénico disminuye la expresión génica de los receptores mGluR (Jiang et al., 2014) y 5-HTR en hipocampo y corteza cerebral (Chang et al., 2015; Vijayakaran et al., 2014).

Diferentes estudios que utilizan modelos tanto *in vitro* como *in vivo* postulan que los receptores purinérgicos pueden estar implicados en el procesamiento de APP (Erb et al., 2018; Francistiová et al., 2020), específicamente P2X7 y P2Y2 a través de la regulación de la actividad de  $\alpha$ -secretasa (Cieślak & Wojtczak, 2018; Vincent, 2016).



Se demostró que la activación de P2X7 afecta la actividad de PKC, MAPKs o GSK3 (Ortega et al., 2010), que a su vez modulan el procesamiento de APP y la producción de A $\beta$ , además, la inhibición de P2X7 dio como resultado una mayor actividad de  $\alpha$ -secretasa a través de la inhibición de la actividad de GSK-3 $\beta$ . En el 2011, *León-Otegui et al.*, demostraron que la activación farmacológica de P2X7 conduce a la reducción de actividad de  $\alpha$ -secretasa, mientras que el activar el receptor P2Y2 resulta en un incremento de la actividad de la misma en células de neuroblastoma de ratón (N2a). También se ha reportado que la actividad de  $\alpha$ -secretasa aumenta con la activación del receptor P2Y2 en presencia de calcio extracelular (Vincent, 2016). Martin et al.,(2019) evaluaron en un modelo animal de la EA (APPPS1) cómo la supresión de la expresión de P2X7 afectaba la formación de placas amiloides (menos depósitos A $\beta$ ) y también disminuyó el deterioro cognitivo.

## **2.5. Receptores Purinérgicos**

Los receptores purinérgicos son una familia de proteínas que se activan por ATP/ADP (P2) o adenosina (P1/A). La familia de P2 se divide en dos subfamilias en función de su estructura molecular y de los mecanismos de transducción de la señal acoplados a su activación: P2X y P2Y. Los receptores de P2X (P2XRs) o receptores inotrópicos y los receptores P2Y (P2YRs), que son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Gq, Gs o Gi) (Abbracchio et al., 2008).

### **2.5.1. P2XRs**

Los P2XRs son una familia de canales iónicos activados por ligandos permeables a cationes y aniones como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup> y Cl<sup>-</sup>. Se han caracterizado 7 subtipos (P2X1-P2X7) los cuales se ensamblan en trímeros (homotrímeros y heterotrímeros) (North, 2002; Vial et al., 2004). Las subunidades de las proteínas P2X van desde 384 (P2X4) a 595 (P2X7) aminoácidos de longitud. Cada subunidad posee dos dominios transmembranales (TM1 y TM2), regiones N- y C- terminal intracelulares, las cuales contienen motivos consenso para proteínas cinasas, y un asa extracelular con puentes disulfuro y 2 a 6 sitios consenso de N-glicosilación, esenciales para su tráfico. Existe una secuencia estrecha formada por regiones adyacentes TM1 y TM2 las cuales se presume forman el sitio de unión al ATP (Burnstock, 2007). La principal consecuencia de la activación de los receptores P2X es un incremento transitorio en la concentración intracelular de calcio libre, que despolariza la membrana. Esto induce la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que se suma a la entrada de calcio a través del propio canal P2X. El incremento del calcio citosólico dispara posteriormente una serie de eventos intracelulares como activación o inhibición de proteínas quinasas, entre las que se encuentran la calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII) (Diaz-Hernandez et al., 2004, 2006; León et al., 2006), MAP quinasas (MAPK), proteína quinasa C (PKC) (Erb et al., 2006) o glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) (Díaz-Hernandez et al., 2008; R Gomez-Villafuertes et al., 2009; Ortega et al., 2009); así como la liberación vesicular de neurotransmisores como acetilcolina (Diaz-Hernandez et al., 2002), glutamato (Gualix et al., 2003) o GABA (Rosa Gomez-Villafuertes et al., 2001). Los receptores

P2X participan en la regulación de varios procesos fisiológicos, incluyendo la sensación de dolor, liberación de neurotransmisores y la neuroinflamación. La expresión de estos receptores en el SNC varía con el tipo celular y la región del cerebro (Burnstock & Verkhratsky, 2010; Khakh & North, 2006).

#### **2.5.1.1. P2X7**

En particular, el receptor P2X7 se distribuye ampliamente en el SNC expresándose en neuronas, astrocitos y microglía (Godoy et al., 2019). Se distingue del resto de receptores P2X por su largo extremo C-terminal (aproximadamente 120 aminoácidos) que contiene un dominio hidrofóbico adicional (residuos 510-530) y por su baja sensibilidad al ATP (North, 2002), por lo tanto, se requieren altas concentraciones de ATP extracelular ( $>0.1\text{mM}$ ) para su activación (G. Weisman et al., 2012). Además, P2X7 también puede ser estimulado por Benzoil-benzoil ATP (BzATP), siendo éste un agonista significativamente más potente ( $EC_{50}$  20  $\mu\text{M}$ ) que el ATP (Young et al., 2006). Es importante destacar que la afinidad de los receptores P2X por los diferentes agonistas o antagonistas puede variar entre las distintas especies (Donnelly-Roberts et al., 2009). Los antagonistas de los receptores P2X más ampliamente utilizados, como la suramina, bloquean al receptor P2X7 con baja afinidad y de forma no competitiva (Jacobson et al., 2002). El Brilliant Blue G (BBG) es un antagonista más potente y selectivo sobre el receptor P2X7, sobre todo en rata ( $IC_{50}$  10-15 nM) y en ratón ( $IC_{50}$  100 nM), mientras que en humano su efectividad es mucho menor ( $IC_{50} \geq 10 \mu\text{M}$ ) (Gever et al., 2006; Jiang et al., 2000; Geoffrey Burnstock, 2018; Godoy et al., 2019). En 2006, Abbot Laboratories describió dos nuevos antagonistas selectivos y competitivos de P2X7, el derivado de cianoguanidina disustituido (A74000376), y la tetrazolilmetilpiridina disustituida (A43807977), este último es eficaz en el rango nanomolar medio a alto y aproximadamente tres veces más potente en el ser humano que en el homólogo de rata, con poca o ninguna actividad en otros subtipos de receptores P2X probados. A74000376 es más potente que A43807977 en ambas especies, aproximadamente 10 veces en la rata y 3 veces en los receptores P2X7 humanos (Syed & Kennedy, 2012). Un estudio reciente informó que ambos también son activos, aunque a concentraciones ligeramente más altas en ratones (Donnelly-Roberts et al., 2009). Tras una breve exposición al agonista (menor a 10

segundos) se produce una apertura rápida y reversible del receptor P2X7 que desencadena una serie de respuestas celulares como la activación de la caspasa-1, la liberación de interleucina1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), la proliferación celular o la apoptosis, dependiendo del tipo celular en el que se encuentre (Donnelly-Roberts & Jarvis, 2007; Ferrari et al., 2006; Kahlenberg & Dubyak, 2004; North, 2002; Verhoef et al., 2003).

P2X7 es el receptor P2X que menos se desensibiliza y se puede mantener activado en presencia de ATP o BzATP durante minutos (North, 2002). Además, las activaciones de larga duración a veces van acompañadas de incrementos en la amplitud de la corriente (North, 2002; Zarrinmayeh, 2020). La activación de los receptores P2X7, y la consecuente entrada de calcio al interior celular, también se ha asociado con otras vías de señalización en las que participan la fosfolipasa D (PLD), NF- $\kappa$ B, GSK-3 y las MAPKs principalmente ERK1/2 (Aga et al., 2002; Diaz-Hernandez et al., 2012; Martel-Gallegos et al., 2013; M<sup>a</sup> Teresa Miras-Portugal et al., 2019; Ortega et al., 2010). Participa en numerosos procesos fisiológicos incluyendo la liberación de neurotransmisores como el glutamato o el GABA a través de señalización intercelular. En condiciones fisiopatológicas estimula la inflamación pulmonar, inflamación de glándulas salivales y la neuroinflamación, de manera que contribuye al desarrollo de patologías del SNC como la neurodegeneración, la isquemia, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple y la enfermedad de Alzheimer (Burnstock, 2015, 2016). Para poder comprender el papel tanto fisiológico como patológico del receptor P2X7 en el funcionamiento del organismo es importante conocer cómo se regula su expresión, el gen P2X7 de ratón se ubica en el cromosoma 5, mientras que el humano se encuentra en el cromosoma 12 (12q24.31) con la región promotora situada a 2 kilobases (kb) del extremo 5' del gen (Virgilio et al., 2017), se ha postulado que la expresión de este receptor puede encontrarse regulada por hipermetilación de las islas CpG que flanquean las regiones *enhancers* situadas muy por debajo del promotor activo. De hecho, se han identificado 9 sitios CpG que funcionan como elementos *cis* inhibidores y tres sitios que se encuentran hipermetilados en epitelio cervical *in vitro* e *in vivo* (Zhou et al., 2009,2011). Sin embargo, la hipermetilación del promotor P2X7

ha sido poco analizada, y se necesitan más estudios para comprender la regulación transcripcional a través de la metilación de P2X7 en condiciones neurológicas (Jimenez-Mateos et al., 2019).

El factor de transcripción, que se ha estudiado más ampliamente como potencial regulador transcripcional de P2X7, es la proteína Sp1, que pertenece a una familia de factores de transcripción que contiene más de 20 miembros identificados en mamíferos y se ha descrito que reconoce y se une a secuencias ricas en GC, incluyendo cajas GC, cajas CACCC (también llamadas cajas GT) y elementos de transcripción básicos (Black et al., 2001). Sp1 se expresa altamente en el cerebro y su actividad no está regulada por la expresión, sino por modificaciones postranscripcionales (Tan & Khachigian, 2009). Según García-Huerta et al., (2012) la región promotora del gen P2X7r de ratón carece de cajas TATA y CAAT y contiene siete motivos putativos para Sp1 con al menos dos de ellos completamente funcionales y conservados entre especies, usando experimentos de interferencia y sobreexpresión, demostraron que Sp1 regula al alza el mRNA P2X7 endógeno y los niveles de proteína en las células de neuroblastoma N2a, además de que la inhibición de la activación transcripcional mediada por Sp1 por la mitramicina A redujo los niveles endógenos del receptor P2X7 en cultivos primarios de neuronas corticales y astrocitos. Más recientemente, Engel et al., (2017) corroboran estos datos en un modelo *in vivo* de ratones con estado epiléptico.

También se ha reportado que la región 3'-UTR de P2X7 presenta múltiples sitios de unión para diversos microRNAs, incluidos los de mayor expresión cerebral como lo son miR-124-3p, miR-22-3p, miR-150-5p y miR-125-5p (Jimenez-Mateos et al., 2019). Datos recientes han identificado al microRNA-22-3p como un potente represor postranscripcional de la expresión de P2X7 en un modelo *in vivo*, en este estudio la inhibición de el microRNA-22 resultó en una mayor expresión de P2X7, mientras que al suministrar este microRNA en el cerebro se redujeron los niveles de expresión de este receptor (Jimenez-Mateos et al., 2015).

A la fecha se han identificado 8 procesamientos alternativos y numerosos polimorfismos del receptor P2X7 (Benzaquen et al., 2019; Feng et al., 2006; Ferrari et

al., 2006). En el gen P2X7 humano se han descrito más de 815 polimorfismos de nucleótido único (SNPs), pero sólo a algunos de ellos se les ha atribuido pérdida o ganancia de función del receptor (Roger et al., 2010; Stokes et al., 2010; Sun et al., 2010; J. X. Xu et al., 2012). Dentro de la región promotora se han identificado 5 SNPs, pero hasta la fecha ninguno de ellos se ha asociado con un fenotipo específico de respuesta (De Marchi et al., 2016; Li et al., 2002) y aunque la mayoría de estas variantes no son funcionales por sí mismas, su presencia junto con otras subunidades puede alterar la función de otros receptores o dar lugar a un fenotipo diferente (Benzaquen et al., 2019; Feng et al., 2006).

Además, se han identificado diez diferentes variantes de splicing de P2X7 humano (cuya nomenclatura asignada va de P2X7RA a J), siendo P2X7RA el receptor de longitud completa bien caracterizado (Cheewatrakoolpong et al., 2015; Virgilio et al., 2017), las variantes -C, -E y -G, codifican proteínas muy cortas y se supone que no pueden formar un receptor de canal. Por el contrario, se ha descrito que las variantes -B y -J se expresan en condiciones normales y/o patológicas e interfieren con las respuestas biológicas inducidas por P2X7. La variante P2X7RB se expresa en casi todos los tejidos, particularmente en células del sistema inmune y el sistema nervioso (Benzaquen et al., 2019), la función de esta variante fue probada en células HEK293 transfectadas, lo que reveló una sensibilidad reducida a BzATP (500  $\mu$ M) y una modificación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{EC}_{50}$  aumentada aproximadamente 5 veces). La importancia de esta variante radica en que se ha observado una gran expresión de la misma, aún mayor a la variante base (P2X7RA) (Adinolfi et al., 2010).

### **2.5.1.1.1 PAPEL DE P2X7 EN LA EA**

Diferentes estudios que utilizan modelos tanto *in vitro* como *in vivo* postulan que los receptores purinérgicos pueden estar implicados en el desarrollo y la progresión de la EA, específicamente el receptor P2X7 (Erb et al., 2018; Francistiová et al., 2020). Se ha descrito ampliamente que este receptor participa en diferentes procesos inflamatorios (Di Virgilio et al., 2017), cuando el proceso inflamatorio se prolonga, se convierte en un mecanismo neurodegenerativo resultante de la activación prolongada de los astrocitos y la microglía en respuesta al estrés oxidativo, el cual además se ha postulado como un elemento clave para el desarrollo de la EA (Franke et al., 2012; Kinney et al., 2018). La microglía tras su activación a través de la estimulación del receptor P2X7, es capaz de liberar TNF- $\alpha$ , ATP e IL-1 $\beta$ , esta última es una citocina capaz de regular la expresión de muchos mediadores proinflamatorios en el cerebro de pacientes con EA, aumentar el procesamiento de la APP, así como de fosforilar la proteína tau, que normalmente juega un papel importante en el ensamblaje de los monómeros de tubulina en microtúbulos para formar la red de microtúbulos neuronal, los cuales contribuyen al mantenimiento de la forma celular y sirven como vía de transporte a través de los axones, la forma hiperfosforilada, es el constituyente mayoritario de los ovillos neurofibrilares (NFTs) descritos en la enfermedad de Alzheimer, el desplazamiento y sustitución en el citoesqueleto normal por NFTs de tau hiperfosforilada, hace que se depositen acúmulos de A $\beta$  en el espacio extracelular y el parénquima cerebral, lo que puede contribuir al daño de las neuronas (Erb et al., 2019; Kanellopoulos & Delarasse, 2019; Kong et al., 2005; Lara et al., 2020; Sanz et al., 2009). En pacientes afectados por Alzheimer, así como en modelos de ratones transgénicos empleados en el estudio de esta enfermedad, se ha encontrado que la expresión del receptor P2X7 en cerebro se encuentra incrementada alrededor de las placas amiloides y localizada en la microglía activada y en astrocitos (McLarnon et al., 2006; Parvathenani et al., 2003; Woods et al., 2016). Los receptores P2X7, además, median la producción de peróxido de hidrógeno en microglía, contribuyendo así a la neurodegeneración que sucede en un modelo animal de esta enfermedad (McLarnon et al., 2006; Parvathenani et al., 2003). Estudios *in vitro* han demostrado que la

inhibición del receptor P2X7 aumenta la actividad del enzima  $\alpha$ -secretasa mediante la inhibición de GSK-3. Además, la inhibición in vivo del receptor P2X7 en ratones transgénicos que contienen una mutación en la proteína precursora amiloide (APP) humana reduce significativamente el número de placas amiloides en el hipocampo, al disminuir la actividad de la GSK-3 y favorecer el procesamiento proteolítico de la APP por la  $\alpha$ -secretasa (Diaz-Hernandez et al., 2012).

Las propiedades del receptor P2X7 pueden ser empleadas en terapias nuevas, donde la administración de un antagonista puede prevenir los efectos adversos causados por una neuroinflamación crónica, así como por la actividad patológica en células neuronales y giales (Heppner et al., 2015), por ejemplo, el antagonismo de P2X7 puede resultar en el bloqueo de la apoptosis mediada por este, ya que previamente se ha demostrado que la activación neuronal de P2X7 por ATP o BzATP induce apoptosis mediada por caspasa y FAS (Kong et al., 2005; Gandelman et al., 2013). Ryu y McLarnon (2008) observaron la actividad neuroprotectora y la inhibición de la respuesta inflamatoria tras la administración de BBG, uno de los antagonistas del receptor P2X7. La administración de BBG conllevó una expresión disminuida de este receptor en la superficie de las neuronas de rata, gliosis atenuada y una menor filtración en la barrera hematoencefálica, lo cual había sido inducido por la administración previa de A $\beta$ . Además, se demostró que el antagonismo neuronal de P2X7 era terapéutico en un modelo de ratón transgénico J20 hAPP de EA, donde la administración sistémica de BBG evitó la formación de placas de A $\beta$  (Diaz-Hernandez et al., 2012). Recientemente, se ha descrito que en los ratones transgénicos APPPS1, la deficiencia de P2X7 reduce el deterioro cognitivo y el número de placas A $\beta$  (Martin et al., 2019). Todos los datos anteriores sugieren que la desregulación de la señalización de P2X7 puede ser uno de los factores que promueven el procesamiento de APP en la EA.



## **2.5.2. P2YRs**

Los receptores P2Y (P2YRs), son una familia de receptores metabotrópicos que se encuentran acoplados a proteínas G (Gq, Gs o Gi), por lo que poseen la topología característica de estos, siete segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados por tres asas extracelulares y tres intracelulares. El extremo N-terminal se orienta hacia el espacio extracelular, mientras que el extremo C-terminal posee una orientación intracelular. Esta familia de receptores consta de ocho subtipos diferentes P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11-14 y su longitud varía de 328 a 377 aminoácidos. Tienen distintos perfiles farmacológicos en su respuesta a los agonistas endógenos, incluyendo ATP, UTP, UDP y UDP-glucosa (Burnstock, 2006; Von Kügelgen & Hoffmann, 2016).

Los receptores P2Y se expresan a lo largo de todo el organismo, mediando o modulando numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, entre ellos la inflamación, el crecimiento celular y la trombosis. Además, en el SNC, los receptores P2Y se expresan en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía llevando a cabo funciones fisiológicas en la neurotransmisión, la neurogénesis y la comunicación celular glial-neuronal (Fields & Burnstock, 2006; Puchałowicz et al., 2014). Los receptores P2Y están igualmente acoplados a la modulación de canales iónicos, como los canales dependientes de voltaje de  $Ca^{2+}$  o  $K^+$ , los receptores NMDA de glutamato, los propios receptores P2X y los receptores de vanilloides (Lechner y Boehm, 2004; Abbracchio et al., 2006). Se ha demostrado que la activación de estos receptores genera respuestas neuroprotectoras haciéndolos nuevas dianas en el tratamiento de patologías del SNC, incluyendo la EA (Weisman, et al., 2012; Miras-Portugal et al., 2019).

### **2.5.2.1. P2Y2**

El receptor P2Y2 se expresa principalmente en células epiteliales, endoteliales, células de músculo liso, leucocitos, cardiomiocitos y osteoblastos (Burnstock & Knight, 2004). También ha sido identificado en células derivadas del SNC y SNP incluyendo células de Schwann, neuronas corticales, oligodendrocitos, astrocitos corticales, células de

astrocitoma y líneas celulares de astrocitos inmortalizados (Weisman et al., 2012; Boeynaems et al., 2012).

Este receptor posee unas características estructurales especiales que le permiten interactuar tanto con integrinas como con otros receptores, lo cual hace que esté implicado en numerosos fenómenos fisiológicos y patológicos (G. Weisman et al., 2012). Estructuralmente, el receptor P2Y2 presenta siete dominios transmembrana, con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo intracelular. En su primer bucle extracelular presenta un dominio Arg-Gly-Asp (RGD) que permite su unión a integrinas  $\alpha\beta3/\beta5$ . Esta unión permite que el receptor presente un estado de alta afinidad hacia el ligando (Weisman et al 2005). Por otro lado, en su extremo C-terminal y en el tercer bucle extracelular presenta secuencias de Ser/Thr que pueden ser dianas para quinasas asociadas a GPCR y a PKC. También presenta dominios ricos en prolina (motivos PXXP, donde P corresponde a Prolina y X a cualquier aminoácido) de homología SH3 en el extremo C-terminal que intervienen en la transactivación de las vías de señalización activadas por receptores de factores de crecimiento (Weisman et al 2005), y en la unión a proteínas Src y PI3K (Weisman et al., 2012).

Se ha descrito que el receptor P2Y2 está acoplado a la activación de PLC a través de la proteína  $G_{\alpha q/11}$ , mediando la producción de Inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG), dos segundos mensajeros en la liberación de calcio desde reservorios intracelulares y en la activación de PKC encargada de modular la síntesis y/o liberación de ácido araquidónico (AA), prostaglandinas y óxido nítrico (NO) (Abbracchio et al., 2008; Burnstock & Abbracchio, 2006; G. Weisman et al., 2012).

Los receptores P2Y2 son activados completamente por cantidades equivalentes de ATP y UTP ( $EC_{50}$  0.5-3  $\mu M$ ) (G. Weisman et al., 2012), mientras que el ADP y el UDP han mostrado ser agonistas mucho menos efectivos (von Kügelgen, 2019). ATP- $\gamma$ -S y UTP- $\gamma$ -S son agonistas sintéticos y han demostrado ser más potentes para la activación del receptor P2Y2 ( $EC_{50}$  0.5-0.83  $\mu M$ ) que sus análogos endógenos, sin embargo el agonista selectivo MRS2698 se ha postulado como el más efectivo para la activación de este receptor ( $EC_{50}$  of 0.008  $\mu M$ ) (King & Townsend-Nicholson, 2003; P. Xu et al., 2018). Asimismo, ensayos de expresión heteróloga han demostrado que el

receptor P2Y2 murino y de rata puede ser estimulado por BzATP (Erb et al., 1993; Wildman et al., 2003). Además de los nucleótidos trifosfato, el receptor P2Y2 puede ser activado también por dinucleótidos tetrafosfato, como el Ap4A o el Up4U (P. Xu et al., 2018). Mientras que la suramina y PPADS actúan como antagonistas competitivos de los receptores P2Y2 de rata, ratón y humanos, sin embargo no son selectivos (King & Townsend-Nicholson, 2003; P. Xu et al., 2018). Se ha demostrado que el compuesto 1-amino-4- (2-metoxifenil)-2 sulfoantraquinona (PSB716) es un potente antagonista de P2Y2 con un valor IC<sub>50</sub> en el rango micromolar bajo y recientemente se está probando la efectividad del compuesto AR-C118925 como antagonista más selectivo para el receptor P2Y2 tanto de humano como de ratón (Kindon et al., 2017; Rafehi et al., 2016).

La activación de receptores P2Y2 provoca una multitud de respuestas celulares en diversos tejidos. Específicamente, en el sistema nervioso central inducen la proliferación de astrocitos dependiente de ERK en varias situaciones, incluyendo lesiones y trauma (Weisman et al., 2012). Camden et al., (2005) postulan que un aumento en la expresión neuronal de P2Y2 cumple con funciones neuroprotectoras pudiendo ser una posible diana farmacológica para enfermedades neurodegenerativas (Weisman et al., 2012).

#### **2.5.2.1.1. PAPEL DE P2Y2 EN LA EA**

En particular, el receptor P2Y2 se encuentra implicado en la regulación del procesamiento de APP, principalmente a través de la activación de la vía no amiloidogénica (Erb et al., 2015). De acuerdo con Camden et al., (2005) la activación del receptor P2Y2 expresado en células de astrocitoma humano 1321N1 aumentó la liberación de sAPP $\alpha$ . En estudios previos realizados en tejido cerebral de pacientes con EA se encontró que la expresión de P2Y2 se redujo selectivamente en la corteza occipital, al compararlas con muestras de controles sanos, mientras que la expresión de los receptores P2Y4 y P2Y6 permanece sin cambios (Lai et al., 2008). En modelos animales de EA se ha observado una regulación positiva de P2Y2 en etapas tempranas de la enfermedad, sin embargo, con la progresión de la enfermedad

disminuye la expresión de P2Y2 guardando una correlación con el incremento de los depósitos de A $\beta$  en corteza cerebral e hipocampo (Ajit et al., 2014). Lo anterior sugiere que la neuroprotección dada por P2Y2 se pierde en etapas posteriores de la EA. Kim et al., (2012) reportaron que en células microgliales primarias de ratón, la activación de los receptores P2Y2 por UTP induce la captación y degradación de A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

Los receptores neuronales P2Y2 también participan en la fosforilación de una proteína del citoesqueleto, la cefalina, que lleva finalmente a estabilizar el crecimiento de neuritas y de espinas dendríticas. Este es otro mecanismo neuroprotector más, en el que participa este receptor, en el curso de la enfermedad de Alzheimer (Franke et al., 2011). Esto indica que los receptores P2Y2 pueden formar parte de mecanismos de neuroprotección y que constituyen una posible diana terapéutica que puede prevenir la muerte neuronal en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

### 2.5.3. ANTECEDENTES INMEDIATOS

Recientemente, se ha demostrado que los receptores purinérgicos, principalmente P2X7 y P2Y2, modulan la actividad de  $\alpha$ -secretasa teniendo efectos opuestos. La activación de P2X7 da como resultado la inhibición de  $\alpha$ -secretasa, mientras que P2Y2 es un activador de la misma (Miras-Portugal et al., 2015). Nuestro grupo evaluó los efectos de la exposición crónica a 3 ppm As en agua de bebida, en ratas Wistar sobre la producción y eliminación de A $\beta$ , demostrando que la exposición a As incrementa la producción de A $\beta$ , la actividad de la enzima BACE1 y la expresión de APP de manera significativa en tejido cerebral (Nino et al., 2018). En relación con lo anterior, algunos de los estudios sugieren que el arsénico puede tener un papel en la etiología de la EA, Zarazúa et al., (2011) publicaron un estudio en el que se realizó la exposición de cultivos neuronales primarios derivados de ratones transgénicos Tg2576 a arsenito de sodio y DMA<sup>V</sup>, estos ratones sobreexpresan APP, por lo que se consideran como un buen modelo de desarrollo temprano de la EA; en este estudio se observó que el As altera el procesamiento de APP incrementando los niveles de A $\beta$  y se sugiere que podría disminuir la actividad de  $\alpha$ -secretasa.

Así también resultados de Barrón-López, 2018 (Tesis de Maestría) demuestran que la actividad enzimática de  $\alpha$ -secretasa disminuye en un 10 % en ratas expuestas a 3 ppm As en comparación con el grupo control, siendo estadísticamente significativo (Figura 4A). Además de manera preliminar demuestra, que en este modelo *in vivo* de exposición los receptores P2X7 y P2Y2 se encuentran alterados en el lisado cerebral total (Figura 4B y C). Adicionalmente también se demostró en un modelo *in vitro*, que la exposición a arsénico conlleva a una mayor expresión de P2X7 y la disminución de P2Y2 a nivel de proteína (Figura 5A y B), lo cual también se corroboró por PCR punto final (Figura 6; Tesis en Proceso Santiago-Nava). Adicionalmente, se encontró una menor actividad de  $\alpha$ -secretasa en los sistemas expuestos a As (Figura 5C).

En este sentido, ya que los receptores purinérgicos están involucrados en numerosos procesos neurológicos, y con base en los últimos resultados obtenidos en colaboración, el presente proyecto tendrá como propósito entender los mecanismos

que conllevan a la neurodegeneración inducida por As, por lo que se plantea evaluar la expresión y función de P2X7 y P2Y2 al exponer cultivos neuronales a arsénico y evaluar la actividad de  $\alpha$  y  $\beta$ -secretasas sobre el procesamiento de APP cuando el receptor P2X7 es activado. Hasta el momento no existe un estudio en la cual se evalúe la actividad de estos receptores en relación con este agente neurotóxico, así también no existe evidencia sobre la modulación y mecanismos del As sobre los receptores purinérgicos y su papel en el procesamiento de APP en la neurodegeneración asociada a la EA.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Como se ha comentado previamente, la exposición a As se produce principalmente a través de agua contaminada. Estudios recientes señalan al As como un factor de riesgo en el desarrollo de la EA. Adicionalmente, en los últimos años se ha demostrado la participación de los receptores purinérgicos en la patología de EA a través de la modulación de la enzima  $\alpha$ -secretasa encargada del procesamiento no amiloidogénico de la APP e induciendo neuroinflamación. Resultados previos de nuestro grupo de investigación (Barrón-López, 2018, Tesis de Maestría) demuestran que los receptores P2X7 y P2Y2 se encuentran alterados en modelos de investigación del sistema nervioso *in vivo* e *in vitro* expuestos a As. Hasta el momento no existe ningún estudio publicado en la cual se evalúe la actividad de estos receptores en relación con este agente, además no está definido el mecanismo por el que el arsénico podría estar contribuyendo en la neurodegeneración relacionada con la EA, por lo que se propone que uno de ellos podría ser a través de la alteración en la expresión de los receptores purinérgicos. Sin embargo, poco es lo que se sabe sobre el posible papel estos receptores en el procesamiento proteolítico de la proteína APP, por lo que resulta de interés investigar los efectos de la exposición a arsénico sobre la expresión y función de los receptores purinérgicos P2X7 y P2Y2 en un cultivo neuronal, así como si la actividad de  $\alpha$  y  $\beta$ -secretasas es dependiente de estos receptores.

## 4. HIPÓTESIS

La exposición a arsénico afecta la modulación de  $\alpha$  y  $\beta$ -secretasas a través de la alteración en la expresión de los receptores purinérgicos P2X7 y P2Y2 en cultivos neuronales, lo que contribuye con la neurodegeneración de la Enfermedad de Alzheimer.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

Determinar si la actividad de  $\alpha$  y  $\beta$ -secretasas es dependiente de la señalización purinérgica en un modelo *in vitro* expuesto a arsénico, además de elucidar el mecanismo por el cual este agente altera la expresión de los receptores purinérgicos contribuyendo a la neurodegeneración relacionada con la EA.

### 5.2. Objetivos Específicos

Determinar cuantitativamente la expresión a nivel de mRNA de los receptores P2X7 y P2Y2 en células Neuro2a expuestas a As.

Evaluar la actividad de  $\alpha$ -secretasa al estimular y/o inhibir los receptores purinérgicos en neuronas con y sin exposición a As.

Evaluar la actividad de  $\beta$ -secretasa al estimular y/o inhibir los receptores purinérgicos en neuronas con y sin exposición a As.

Detectar el fragmento C83 en neuronas con y sin exposición a As y al estimular y/o inhibir los receptores purinérgicos.



## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Cultivo Celular**

Se utilizó la línea celular de neuroblastoma de ratón Neuro 2a (N2a) obtenida de *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, USA). Esta línea celular proviene de células de neuroblastoma cerebral de ratón albino y se caracteriza por tener un crecimiento adherente y una morfología neuronal ameboide. Se seleccionó esta línea debido a su amplia versatilidad, además que ha sido utilizada para estudios de vías de señalización y procesos de diferenciación neuronal, adicionalmente se ha utilizado como modelo para estudiar la EA ya que expresa de manera endógena APP y además expresa los receptores P2X7 y P2Y2 (León-Otegui et al., 2011; M. Teresa Miras-Portugal et al., 2015). Las células se cultivaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 10%, 3.5 g de glucosa, 1% de antibiótico/antimicótico y L-glutamina (200 mM), en una incubadora de atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> al 5% y a una temperatura constante de 37°C. El reemplazo de medio se hizo cada 2-3 días, para el mantenimiento de la línea se realizaron pases cada siete días utilizando solución salina balanceada de Hank's (HBSS) para levantar las células de los platos de cultivo (60mm Cell culture Dish) y tras recoger las células y centrifugar, se sembraron en pases 1:6-1:12 según las necesidades al alcanzar una confluencia del 90%.

### **6.2 Exposición del cultivo a medio de intoxicación**

Las células destinadas para cada grupo (control, arsenito de sodio y DMA<sup>V</sup>) se observaron constantemente, al alcanzar una confluencia del 85 % se expusieron a los medios de intoxicación respectivos, al grupo control solo se le realizó un cambio de medio y se añadió el vehículo de los compuestos de arsénico, mientras que los grupos expuestos a NaAsO<sub>2</sub> y DMA<sup>V</sup> fueron incubados en presencia de 10 µM NaAsO<sub>2</sub> y 7.5 µM DMA<sup>V</sup> respectivamente durante 24 horas a 37°C. Las concentraciones utilizadas se basaron en el protocolo descrito previamente por Barrón-López, 2018 (Tesis de Maestría), donde se estableció la concentración del compuesto en los medios de intoxicación y el tiempo de exposición en la línea celular N2a de acuerdo con los

criterios de la normatividad internacional ISO 10993-5:2009 (Ensayos de citotoxicidad *in vitro*) donde se estipula un 80% de viabilidad celular para realizar ensayos de citotoxicidad.

Al cumplir el periodo de exposición se realizó la colecta y se destinaron las células a extracción de proteínas, extracción de RNA o fueron estimuladas con BzATP en presencia y ausencia de inhibidores para P2X7.

### **6.3. Análisis de la expresión de los receptores P2X7 y P2Y2 en células Neuro2a**

Los análisis de expresión génica se llevaron a cabo mediante cuantificación de los transcritos expresados realizando análisis de RT-PCR en tiempo real.

#### **6.3.1. Extracción y control de calidad de las muestras de RNA total**

La extracción de RNA total a partir del cultivo celular N2a con y sin exposición a NaAsO<sub>2</sub> y DMA<sup>V</sup>, se realizó siguiendo el protocolo descrito en el kit comercial TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) cuyo fundamento está basado en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que permite la obtención de moléculas de RNA de tamaño variado. El reactivo de TRIzol mantiene la integridad del RNA al inhibir eficientemente la actividad RNAasa al momento de romper y homogenizar las células. Después de homogenizar la muestra, se añadió cloroformo, lo que permite la separación de una fase acuosa superior (conteniendo el RNA), una fase intermedia (contiene DNA), y una fase inferior orgánica (conteniendo proteínas). Tras la separación de la fase acuosa a un nuevo tubo, el RNA se precipitó de la fase acuosa empleando isopropanol. Posteriormente se procedió a analizar la calidad del RNA total obtenido.

La concentración de RNA en las muestras extraídas se determinó mediante un espectrofotómetro UV-Visible, cuantificando la absorbancia a 260 nm. El grado de pureza del RNA se estimó a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra medida a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) el cual, para una disolución de RNA puro, debe tener un valor igual o muy próximo a 2, lo que se obtuvo. El factor de conversión utilizado fue de 40 µg mL<sup>-1</sup>. Posteriormente se realizó una corrida electroforética con

las muestras para analizar la integridad del RNA, observando una relación 2:1 entre el rRNA 28S y 18S.

### **6.3.2. Retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de 4 µg de RNA total extraído de las células N2a con y sin exposición se realizó utilizando el kit GoScript™ Reverse Transcription System (A5000 Promega©, Madison, W. USA). La reacción se desarrolló durante 5 minutos a 70 °C para desnaturalizar, posteriormente se detuvo y se añadió el RT-Mix, se reanudó a 25 °C por 5 minutos para el alineamiento, se procedió a 42 °C por 1 hora para extensión, seguida de una incubación a 70 °C durante 15 minutos con el fin de inactivar la transcriptasa inversa. Posteriormente se cuantificó el cDNA obtenido mediante un espectrofotómetro UV-Visible.

### **6.3.3. Amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real**

Esta técnica permite evaluar si el efecto que ejerce el As sobre la expresión de los receptores es a nivel transcripcional, al cuantificar la expresión de un determinado gen o genes en una muestra de DNA, se basa en la relación directa que existe entre la cantidad de DNA molde inicial y el producto que se amplifica a partir del mismo. De esta forma a mayor cantidad de DNA molde, más temprana será la aparición del producto amplificado. El seguimiento del proceso de amplificación se llevó a cabo mediante SYBR Green, que mediante fluorescencia permite cuantificar los productos que se van sintetizando durante el transcurso de la reacción.

Los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo a partir una dilución de las muestras de cDNA obtenidas previamente, utilizando el kit Maxima™ SYBR™ Green/ROX 2X (Thermo Scientific™, Waltham, MA USA). Se utilizaron los oligonucleótidos diseñados para los receptores P2X7, P2Y2 y β-actina (Tabla 1).

Para el ensayo de amplificación se utilizaron tiras de tubos para PCR con lámina de sellado, se preparó un Master Mix conteniendo 12.5 µL de 2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR, se añadieron los primers a una concentración de 0.3 µM cada uno,

100 ng de cDNA y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L.

El protocolo a seguir fue un precalentamiento a 95 °C por 5 minutos, luego 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, una temperatura de alineamiento por 30 segundos y una extensión de 72°C por 30 segundos. Como parte de la estandarización del protocolo de qPCR, se realizó una curva de disociación, esto a través de incrementar la temperatura desde 60 °C hasta 95 °C, a una velocidad de 0.1 °C/s, donde se obtuvo la mejor  $T_m$  para cada uno de los primers utilizados.

La cuantificación de los niveles de expresión de genes P2X7 y P2Y2 se realizó mediante la normalización con el control endógeno. Como control interno de amplificación se analizó la expresión del gen constitutivo  $\beta$ -actina en todas las muestras obtenidas. La expresión normalizada se calculó de genes individuales de la siguiente manera:  $2^{-\Delta^{P2X7 \text{ o } P2Y2}} / 2^{-\Delta^{\beta\text{-actina}}}$ .

#### **6.4. Actividad de $\alpha$ -secretasa**

Para la realización de este ensayo se sembraron 2 cajas de 6 mm de cultivo celular, tras la exposición de los cultivos a As y DMA<sup>V</sup> durante el tiempo antes descrito, se levantaron las células, se realizó la exposición respectiva a los antagonistas y agonistas para los receptores P2X7 durante 15 min a 37°C (Grupo sin estímulo, expuesto a BzATP 300  $\mu$ M, A43807977 10  $\mu$ M y A74003 10  $\mu$ M). Después se obtuvieron los lisados celulares y se realizó la cuantificación de proteína de cada muestra mediante el ensayo BCA Protein Assay Kit (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX USA).

La actividad de  $\alpha$ -secretasa se determinó mediante el kit comercial SensoLyte 520 TACE ( $\alpha$ -Secretase) Activity Assay Kit (AnaSpec, Fremont, CAL USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. El sustrato es un péptido de transferencia de energía de resonancia fluorescente (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) que contiene un grupo aceptor de fluorescencia (QXL-520) y un grupo donador de fluorescencia (5-FAM), así  $\alpha$ -secretasa al actuar corta su sustrato, partiendo la estructura química en dos partes, y al alejarse el fluoróforo de su quencher, se puede detectar emisión de luz si el fluoróforo es excitado a una determinada longitud de onda (Figura 7).

El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente, se realizó una curva de calibración con diluciones en serie a concentraciones de 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12  $\mu$ M a base del estándar de referencia 5-FAM (todo lo anterior se realizó protegiendo los reactivos de la luz), además de realizar pruebas por duplicado para determinar las concentraciones a utilizar de los lisados celulares, probándose 100, 50, 12.5 y 1  $\mu$ g , se obtuvo mejor señal de fluorescencia al utilizar 12.5  $\mu$ g por lo que se optó en establecer esta para el estudio. La reacción se inició con la adición de 50  $\mu$ L del sustrato TACE en las placas multipocillos de fondo oscuro, posteriormente se realizó una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. La fluorescencia se midió utilizando un lector de fluorescencia para placas multipocillo Synergy <sup>TM</sup> H1 (BioTek, Winooski VT USA). Las  $\lambda$  de excitación y de emisión fueron 490 y 520 nm, respectivamente.

### **6.5. Actividad de $\beta$ -secretasa**

La determinación de la actividad de  $\beta$ -secretasa (BACE) se obtuvo mediante el Kit comercial SensoLyte® 520  $\beta$ -Secretase Assay Kit (AnaSpec, Fremont, CAL USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Este ensayo se basa en la escisión en Leu-Asp de un péptido específico de  $\beta$ -secretasa para dar lugar finalmente a una señal fluorescente. La intensidad de la señal fluorimétrica es proporcional al grado de hidrólisis del sustrato peptídico, y, por tanto, a la actividad enzimática  $\beta$ -secretasa. Para ello se utilizaron 12.5  $\mu$ g de proteína del lisado celular tras su exposición al tratamiento y su activación e inhibición con respectivos agonistas y antagonistas del receptor P2X7. El ensayo de actividad enzimática se lleva a cabo en ausencia (reacción de control), y en presencia del compuesto a ensayar, en un determinado rango de concentraciones. Para cada uno de los compuestos en estudio se determinó su valor de fluorescencia emitida en ausencia del enzima, valor que se sustrajo a la señal de fluorescencia emitida de la reacción en presencia de enzima. La fluorescencia se midió tras la incubación a 37 °C durante 1 hora, utilizando un lector de fluorescencia para placas multipocillo Synergy™ H1 (BioTek, Winooski VT USA) a una excitación de 490 nm y emisión de 520 nm.

### **6.6. Cuantificación de proteínas**

La extracción de proteínas totales se hizo a partir de cultivos de células N2a, las cuales fueron expuestas a 10  $\mu$ M de NaAsO<sub>2</sub> y 7.5  $\mu$ M de DMA<sup>v</sup> durante 24 horas a 37°C, se destinaron 6X10<sup>6</sup> células por cada condición (control, NaAsO<sub>2</sub>, DMA<sup>v</sup>). Una vez realizado el tratamiento, el medio de cultivo se retiró en su totalidad y se realizaron 2 lavados con tampón fosfato salino (PBS) a 4 °C, las células se recogieron con HBSS y se colocaron en tubos de 1.5 mL para posteriormente centrifugarse a 2000 x g a 4 °C, se decantó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en buffer de lisis a 4 °C conteniendo (en M):1 de HEPES, 5 de NaCl, 0.5 de EDTA, 2 de MgCl<sub>2</sub>, Tritón™ X-100 al 0.5 % (v/v) e inhibidores de proteasas, posteriormente se incubó durante 30 minutos a 4 °C y se utilizó un homogenizador mecánico, después se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 10 000 x g a 4 °C para recoger el sobrenadante que contenía el

extracto total de proteínas. La concentración de proteína se determinó por el método colorimétrico del ácido bicinónico (BCA; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX USA), se calculó interpolando los valores de absorbancia medidos a 570 nm en una recta, usando como solución patrón albúmina sérica bovina (BSA) con un rango de 0-1500 µg/mL. Se empleo una dilución 1:10 de las muestras en buffer de lisis, se colocaron 25 µL de lo anterior en una placa de 96 pocillos y se añadieron 200 µL de reactivo de trabajo BCA, obteniendo un volumen final por pozo de 225 µL en una relación 1:8 muestra/reactivo tal como lo indicaba el protocolo del proveedor. Una vez conocidas las concentraciones de proteínas presentes en cada una de las muestras se realizaron los cálculos necesarios para cargar la misma cantidad de proteína en cada uno de los pozos del gel de electroforesis.

### **6.7. Western Blot**

Como primer paso se colocó en tubos de 1.5 mL, el volumen correspondiente a la mezcla de la cantidad de muestra deseada (40-60 µg de proteínas) con el buffer de carga (Laemmli 2X) cuya composición es la siguiente: glicerol 20 % (v/v), Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 10% 0.14M, β-mercaptoetanol 2 % (v/v), azul de bromofenol 0.03 mM. En estas condiciones las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 minutos en un termobloque, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), uno de los pozos del gel se reservó para el marcador de peso molecular Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad, Hércules CAL, USA). La electroforesis se desarrolló en el equipo Mini-PROTEAN® Tetra handcast Systems a un voltaje de 80 mV por 20 minutos para alineación y 120 o 200 mV para separación por 1 hora y 15 minutos. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas en condiciones húmedas a membranas Immobilon®-P PVDF 0.2 µm (Millipore Corporation, Burlington MA USA) previamente activadas en metanol durante 10 minutos e hidratadas hasta su uso con buffer de corrida, utilizando el sistema mini-Trans Blot de BioRad, a una intensidad constante de 90 mA por 1 hora y 15 minutos. La composición del buffer de transferencia fue la siguiente: glicina 192 mM, Tris 25 mM y metanol 20 % (v/v), pH 8.3. Finalizada la transferencia, los geles se tiñeron

durante 60 minutos con azul de Coomasie, que se une a las proteínas para comprobar la efectividad de la transferencia. A continuación, las membranas se incubaron en agitación durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente con la solución de bloqueo, leche en polvo al 5 % (Bio-Rad) en TBST 0.1 %, posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno, en seguida las membranas se incubaron con el anticuerpo primario respectivo ( $\beta$ -actina, APP o c83) preparado en TBST 0.1 %, durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con solución TBST 0.1 % y se incubaron con el anticuerpo secundario ligado a peroxidasa de la especie correspondiente (Santa Cruz Biotechnology) en función del anticuerpo primario utilizado, durante 2 horas en agitación. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados de 10 minutos con solución TBST 0.1 % y finalmente el revelado de las proteínas de interés se llevó a cabo por quimioluminiscencia con un kit de sustrato de inmunotransferencia (Western Blotting) de ECL Pierce™, este reactivo contiene luminol, que es sustrato para la peroxidasa, y que al oxidarse genera una señal luminiscente que fue detectada mediante la exposición autorradiográfica a diferentes tiempos.

Las imágenes fueron digitalizadas y se realizó un análisis densitométrico utilizando el software ImageJ version 1.53c (NIH, EUA). Los datos fueron normalizados utilizando los valores de  $\beta$ -actina como control.

#### **6.8. Tinción con azul de Coomassie**

Los geles se sumergieron en solución de tinción de azul de Coomassie compuesta por metanol 50%, ácido acético 10% y azul brillante de Coomassie G-250 al 0.1% durante toda la noche y se mantuvo en agitación constante, al día siguiente se destiñeron mediante tres lavados de 10 minutos cada uno con solución de desteñido (metanol 40%, ácido acético 10%) en agitador orbital hasta observar el fondo claro de los geles, libres de tinción de fondo y se lavaron varias veces con agua Milli-Q hasta que los geles estuvieron libres de metanol.



## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tipo de diseño experimental corresponde a un diseño con posprueba y grupo control. Para el análisis estadístico primero se analizaron los requisitos de parametricidad. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk mediante el paquete estadístico JMP Statistical Discovery versión 11 (©SAS Institute Inc., Cary NC USA), para probar que los datos siguieran una distribución normal.

En caso que los datos resultaran ser no paramétricos se analizaron las medianas mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Post hoc Dunn's), para ello se utilizó el programa GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, Ca, EUA) y los datos se expresaron como mediana  $\pm$  intervalo intercuartílico (mediana  $\pm$  IQR). Los valores de significancia establecidos fueron: **P<0.001, diferencia extremadamente significativa (\*\*\*)**; **P<0.01 diferencia significativa (\*\*)**.

## 10. CONCLUSIONES

El presente estudio representa la primera evidencia de los efectos de la exposición a arsénico en la actividad de  $\alpha$  y  $\beta$ -secretasas en un modelo *in vitro* a través de la alteración en la expresión de los receptores purinérgicos P2X7 y P2Y2, apoyando la hipótesis que sugiere que el arsénico está asociado al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, específicamente, la enfermedad de Alzheimer.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., & Zimmermann, H. (2008). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences*, 32(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>
- Adeniji, A. O., Adams, P. W., & Mody, V. V. (2017). Amyloid - Hypothesis in the Development of Therapeutic Agents for Alzheimer's Disease. In *Drug Discovery Approaches for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Alzheimer's Disease*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802810-0.00007-6>
- Adinolfi, E., Cirillo, M., Woltersdorf, R., Falzoni, S., Chiozzi, P., Pellegatti, P., Callegari, M. G., Sandona, D., Markwardt, F., & Virgilio, F. Di. (2010). Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.09-153601>
- Aga, M., Johnson, C. J., Hart, A. P., Guadarrama, A. G., Suresh, M., Svaren, J., Bertics, P. J., & Darien, B. J. (2002). Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X 7. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(1), 222–232.
- Ajit, D., Woods, L. T., Camden, J. M., Thebeau, C. N., El-Sayed, F. G., Greeson, G. W., Erb, L., Petris, M. J., Miller, D. C., Sun, G. Y., & Weisman, G. A. (2014). Loss of P2Y2 nucleotide receptors enhances early pathology in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 49(2), 1031–1042. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8577-5>
- Alarcón, M., Leal, L., Martín, I., Miranda, S., & Benavides, A. (2014). Arsénico en Agua: presencia, cuantificación analítica y mitigación. In *Cimav* (Vol. 2). [https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/1056/1/Libro 2013-Arsenico en el Agua con ISBN.pdf](https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/1056/1/Libro%202013-Arsenico%20en%20el%20Agua%20con%20ISBN.pdf)
- Álvarez, S. M., Pedroso, I., De La Fe, A., Padrón, S. A., Álvarez, S. M., & Álvarez, L. (2008). Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 9(3), 196–201. [https://doi.org/10.1016/s1636-5410\(02\)70234-1](https://doi.org/10.1016/s1636-5410(02)70234-1)
- ANMM. (2017). *La Enfermedad de Alzheimer y otras demencias como problema nacional de salud*. [https://www.anmm.org.mx/publicaciones/ultimas\\_publicaciones/ANM-ALZHEIMER.pdf](https://www.anmm.org.mx/publicaciones/ultimas_publicaciones/ANM-ALZHEIMER.pdf)
- Arreguín Cortés, F. I., Chávez Guillén, R., Soto Navarro, P. R., & Smedley, P. L. (2010). Una revisión de la presencia de arsénico en el agua subterránea en México. *Revista Tlaloc AMH*, 45, 1–11.
- Augustin, R., Endres, K., Reinhardt, S., Kuhn, P., Lichtenthaler, S. F., Hansen, J., Wurst, W., & Trümbach, D. (2012). Computational identification and experimental validation of microRNAs binding to the. *BMC Medical Genetics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-13-35>

- Benzaquen, J., Heeke, S., dit Hreich, S. J., Douguet, L., Marquette, H. C., Hofman, P., & Vouret-Craviari, V. (2019). Alternative splicing of P2RX7 pre-messenger RNA in health and diseases: Myth or reality? *Biomedical Journal*, *42*, 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.05.007>
- Bhadbhade, A., & Cheng, D. W. (2012). Amyloid Precursor Protein Processing in Alzheimer's Disease. *Iranian Journal of Child Neurology*, *6*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>
- Black, A. R., Black, J. D., & Azizkhan-Clifford, J. (2001). *Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer*. *160*(2), 143–160.
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, *368*(9533), 387–403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)
- Bode, A., & Dong, Z. (2001). Apoptosis induction by arsenic: mechanisms of action and possible clinical applications for treating therapy-resistant cancers. *Drug Resistance Updates*, *3*(1), 21–29. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0114>
- Boeynaems, J. M., Communi, D., & Robaye, B. (2012). Overview of the pharmacology and physiological roles of P2Y receptors. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, *1*(5), 581–588. <https://doi.org/10.1002/wmts.44>
- Bundschuh, J., Pérez-Carrera, A., & Litter, M. (2008). Distribución del arsénico en la región Ibérica e Iberoamericana. *CYTED*.
- Burnstock, G. (2006). Pathophysiology and Therapeutic Potential of. *Pharmacological Reviews*, *58*(1), 58–86. <https://doi.org/10.1124/pr.58.1.5.58>
- Burnstock, G. (2015). Purinergic signalling in neuroregeneration. *Neural Regeneration Research*, *10*(12), 1919. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.165300>
- Burnstock, G. (2016). An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. *Neuropharmacology*, *104*(June), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.031>
- Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain and Neuroscience Advances*, *2*, 239821281881749. <https://doi.org/10.1177/2398212818817494>
- Burnstock, G., & Abbracchio, M. P. (2006). Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Autonomic Neuroscience*, *58*(3), 281–341. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.3.281>
- Burnstock, G., & Knight, G. E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International Review of Cytology*, *240*(SPEC.ISS.), 31–304. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)40002-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)40002-3)

- Burnstock, G., & Verkhatsky, A. (2010). Long-term ( trophic ) purinergic signalling : purinoceptors control cell proliferation , differentiation and death. *Cell Death and Disease*, 1(1), e9-10. <https://doi.org/10.1038/cddis.2009.11>
- Calderón, J., Navarro, M. E., Jimenez-Capdeville, M. E., Santos-Diaz, M. A., Golden, A., Rodriguez-Leyva, I., Borja-Aburto, V., & Díaz-Barriga, F. (2001). Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environmental Research*, 85(2), 69–76. <https://doi.org/10.1006/enrs.2000.4106>
- Camden, J. M., Schrader, A. M., Camden, R. E., González, F. A., Erb, L., Seye, C. I., & Weisman, G. A. (2005). P2Y2 nucleotide receptors enhance  $\alpha$ -secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18696–18702. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500219200>
- Carrizales, L., Razo, I., Téllez-Hernández, J. I., Torres-Nerio, R., Torres, A., Batres, L. E., Cubillas, A. C., & Díaz-Barriga, F. (2006). Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-smelter in San Luis Potosi, Mexico: Importance of soil contamination for exposure of children. *Environmental Research*, 101(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.07.010>
- Carroll, C. R., Noonan, C., Garrouette, E. M., Navas-Acien, A., Verney, S. P., & Buchwald, D. (2017). Low-level inorganic arsenic exposure and neuropsychological functioning in American Indian elders. *Environmental Research*, 156(September 2016), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.018>
- Chandravanshi, L. P., Gupta, R., & Shukla, R. K. (2018). Developmental Neurotoxicity of Arsenic: Involvement of Oxidative Stress and Mitochondrial Functions. *Biological Trace Element Research*, 186(1), 185–198. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1286-1>
- Chandravanshi, L. P., Gupta, R., & Shukla, R. K. (2019). Arsenic-Induced Neurotoxicity by Dysfunctional Cholinergic and Dopaminergic System in Brain of Developing Rats. *Biological Trace Element Research*, 189(1), 118–133. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1452-5>
- Chandravanshi, L. P., Shukla, R. K., Sultana, S., Pant, A. B., & Khanna, V. K. (2014). Early life arsenic exposure and brain dopaminergic alterations in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 38, 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.08.009>
- Chang, C., Guo, H., Tsai, W., Yang, K., Lin, L., Cheng, T., & Chuu, J. (2015). Subchronic Arsenic Exposure Induces Anxiety-Like Behaviors in Normal Mice and Enhances Depression-Like Behaviors in the Chemically Induced Mouse Model of Depression. *BioMed Research International*, 2015, 1–12.
- Cheewatrakoolpong, B., Gilchrest, H., Anthes, J. C., & Greenfeder, S. (2015). Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP

- channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.087>
- Chen, C., Zhou, W., Liu, S., Deng, Y., & Cai, F. (2012). *Increased NF- $\kappa$ B signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease*. 77–90. <https://doi.org/10.1017/S1461145711000149>
- Cheng, C., Li, W., Zhang, Z., Yoshimura, S., Hao, Q., Zhang, C., & Wang, Z. (2013). *MicroRNA-144 Is Regulated by Activator Protein-1 ( AP-1 ) and Decreases Expression of Alzheimer Disease-related A Disintegrin and Metalloprotease 10 ( ADAM10 )* \*. 288(19), 13748–13761. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381392>
- Chou, W., Chen, H., Yu, S., Cheng, L., Yang, P., & Dang, C. V. (2005). Arsenic suppresses gene expression in promyelocytic leukemia cells partly through Sp1 oxidation. *Blood Journal*, 106(1), 304–311. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0241>. Supported
- Christensen, M. A., Zhou, W., Qing, H., Lehman, A., Philipsen, S., Song, W., & Lol, M. O. L. C. E. L. L. B. (2004). *Transcriptional Regulation of BACE1 , the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein  $\beta$ -Secretase , by Sp1*. 24(2), 865–874. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.2.865>
- Cieślak, M., & Wojtczak, A. (2018). Role of purinergic receptors in the Alzheimer's disease. *Purinergic Signalling*, 14(4), 331–344. <https://doi.org/10.1007/s11302-018-9629-0>
- Congdon, E. E., & Sigurdsson, E. M. (2018). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 14(7), 399–415. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0013-z>
- De Marchi, E., Orioli, E., Dal Ben, D., & Adinolfi, E. (2016). P2X7 Receptor as a Therapeutic Target. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (1st ed., Vol. 104). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.11.004>
- Degagné, E., Grbic, D. M., Dupuis, A., Lavoie, E., Langlois, C., Jain, N., Weisman, G., Sévigny, J., & Pirre Gendron, F. (2009). P2Y2 Receptor Transcription Is Increased by NF- $\kappa$ B and Stimulates Cyclooxygenase-2 Expression and PGE2 Released by Intestinal Epithelial Cells. *Immunologists*, 183(7), 4521–4529. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803977>. P2Y
- Diaz-hernandez, J. I., Gomez-villafuertes, R., León-otegui, M., Jose, J., Gualix, J., & Miras-portugal, M. T. (2012). In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3  $\beta$  and secretases. *NBA*, 33(8), 1816–1828. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.040>
- Diaz-Hernandez, M., Pintor, J., Castro, E., & Miras-Portugal, M. T. (2002). Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology*, 42(1), 20–33.

- Díaz-Hernandez, M., Puerto, A., Díaz-Hernandez, J. I., Diez-Zaera, M., Lucas, J. J., Garrido, J. J., & Miras-portugal, M. T. (2008). Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal. *Journal of Cell Science*, *121* (22)(December), 3717–3728. <https://doi.org/10.1242/jcs.034082>
- Diaz-Hernandez, M., Sanchez-Nogueiro, J., & Miras-Portugal, M. (2006). Role of CaMKII in the Cross Talk Between Ionotropic Nucleotide and Nicotinic Receptors in Individual Cholinergic Terminals. *Journal of Molecular Neuroscience*, *30*, 177–180. <https://doi.org/10.1385/JMN/30>
- Diaz-Hernandez, M., Sanchez-Nogueiro, J., Pintor, J., & Miras-Portugal, M. (2004). Interaction between dinucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *311*(3), 954–967. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.072249>
- Donmez, G., Wang, D., Cohen, D. E., & Guarente, L. (2010). SIRT1 Suppresses  $\beta$ -Amyloid Production by Activating the  $\alpha$ -Secretase Gene ADAM10. *Cell*, *142*(2), 320–332. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.020>
- Donnelly-Roberts, D L, & Jarvis, M. F. (2007). Discovery of P2X7receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7receptor function and indicates a role in chronic pain states. *British Journal of Pharmacology*, *151*(5), 571–579. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707265>
- Donnelly-Roberts, Diana L, Namovic, M. T., Han, P., & Jarvis, M. F. (2009). Mammalian P2X7 receptor pharmacology : comparison of recombinant mouse , rat and human P2X7 receptors. *British Journal of Pharmacology*, *157*(December 2008), 1203–1214. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00233.x>
- Du, X., Tian, M., Wang, X., Zhang, J., Huang, Q., Liu, L., & Shen, H. (2017). Cortex and hippocampus DNA epigenetic response to a long-term arsenic exposure via drinking water. *Environmental Pollution*, *234*, 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.083>
- Duan, X., Gao, S., Li, J., Wu, L., Zhang, Y., Li, W., Zhao, L., Chen, J., Yang, S., Sun, G., & Li, B. (2017). Acute arsenic exposure induces inflammatory responses and CD4 + T cell subpopulations differentiation in spleen and thymus with the involvement of MAPK , NF-kB , and Nrf2. *Molecular Immunology*, *81*(77), 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.12.005>
- Elio, S. (2009). *Modulación del efecto citotóxico del arsénico por moléculas bioactivas.*
- Engel, T., Brennan, G. P., Sanz-rodriiguez, A., Alves, M., Beamer, E., Watters, O., Henshall, D. C., & Jimenez-mateos, E. M. (2017). A calcium-sensitive feed-forward loop regulating the expression of the ATP-gated purinergic P2X7 receptor via specificity protein 1 and microRNA-22. *BBA - Molecular Cell*

- Research*, 1864(2), 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.007>
- Erb, L., Cao, C., Ajit, D., & Weisman, G. A. (2015). P2Y receptors in Alzheimer's disease. *Biology of the Cell*, 107(1), 1–21. <https://doi.org/10.1111/boc.201400043>
- Erb, L., Liao, Z., Seye, C. I., & Weisman, G. A. (2006). P2 receptors: intracellular signaling. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 452(5), 552–562. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0069-2>
- Erb, L., Woods, L. T., Khalafalla, M. G., & Weisman, G. A. (2018). Purinergic signaling in Alzheimer's disease. In *Brain Research Bulletin* (Vol. 151). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.10.014>
- Erb, L., Woods, L. T., Khalafalla, M. G., & Weisman, G. A. (2019). Purinergic signaling in Alzheimer's disease. In *Brain Research Bulletin* (Vol. 151). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.10.014>
- Ercal, N., Gurer-orhan, H., & Aykin-burns, N. (2001). Toxic Metals and Oxidative Stress Part I : Mechanisms Involved in Metal induced Oxidative Damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 573, 529–539.
- Escudero-Lourdes, C. (2016). Toxicity mechanisms of arsenic that are shared with neurodegenerative diseases and cognitive impairment: Role of oxidative stress and inflammatory responses. *NeuroToxicology*, 53, 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.02.002>
- Espino-Valdés, M. S., Barrera-Prieto, Y., & Herrera-Pedraza, E. (2009). Presencia de arsénico en la sección norte del acuífero Meoqui-Delicias del estado de Chihuahua, México. *TECNOCIENCIA Chihuahua Vol. III, No. 1, III(1)*, 8–18.
- F. Lichtenthaler, S. (2012). Alpha-Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein: Proteolysis Regulated by Signaling Pathways and Protein Trafficking. *Current Alzheimer Research*, 9(2), 165–177. <https://doi.org/10.2174/156720512799361655>
- Feng, Y.-H., Li, X., Wang, L., Zhou, L., & Gorodeski, G. I. (2006). A Truncated P2X7 Receptor Variant (P2X7-j) Endogenously Expressed in Cervical Cancer Cells Antagonizes the Full-length P2X7Receptor through Hetero-oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17228–17237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602999200>
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Roberto, M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., & Virgilio, F. Di. (2006). The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *The Journal of Immunology*, 176(7), 3877–3883. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.3877>
- Ferreira-vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). *Alzheimer ' s Disease : Targeting the Cholinergic System*. 101–115.
- Flora, S. J. S. (2018). Arsenic: Exposure, toxicology, use, and misuse. In

*Encyclopedia of the Anthropocene* (Vols. 1–5). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809665-9.09884-0>

- Francistiová, L., Bianchi, C., Di Lauro, C., Sebastián-Serrano, Á., de Diego-García, L., Kobolák, J., Dinnyés, A., & Díaz-Hernández, M. (2020). The Role of P2X7 Receptor in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13(June), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00094>
- García-Huerta, P., Díaz-Hernandez, M., Delicado, E. G., Pimentel-Santillana, M., Miras-Portugal, M. T., & Gómez-Villafuertes, R. (2012). *The Specificity Protein Factor Sp1 Mediates Transcriptional Regulation of P2X7 Receptors in the Nervous System* \*. 287(53), 44628–44644.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.390971>
- Garza-Lombó, C., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., Gonsebatt, M. E., & Franco, R. (2019). Arsenic-induced neurotoxicity: a mechanistic appraisal. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24(8), 1305–1316.  
<https://doi.org/10.1007/s00775-019-01740-8>
- Godoy, P. A., Ramírez-molina, O., & Fuentealba, J. (2019). *Exploring the Role of P2X Receptors in Alzheimer ' s Disease*. 10(November), 1–8.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01330>
- Gómez-Villafuertes, R., García-Huerta, P., & Díaz-Hernandez, J. I. (2015). PI3K / Akt signaling pathway triggers P2X7 receptor expression as a pro-survival factor of neuroblastoma cells under limiting growth conditions. *Nature Publishing Group, December*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep18417>
- Gomez-Villafuertes, R, del Puerto, A., Diaz-Hernandez, M., Bustillo, D., Diaz-Hernandez, J., Huerta, P., Artalejo, A., Garrido, J., & Miras-Portugal, M. (2009). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritogenesis in neuroblastoma cells. *FEBS Journal*, 276(18), 5307–5325. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07228.x>
- Gomez-Villafuertes, Rosa, Gualix, J., & Miras-Portugal, M. T. (2001). Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors , able to induce GABA secretion. *Journal of Neurochemistry*, 77(1), 84–93.
- Gong, G., & O'Bryant, S. E. (2010). The arsenic exposure hypothesis for Alzheimer disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 24(4), 311–316.
- Gualix, J., Gómez-Villafuertes, R., Díaz-Hernandez, M., & Miras-Portugal, M. T. (2003). Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *Journal of Neurochemistry*, 87(1), 160–171.  
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01975.x>
- Hamadani, J. D., Tofail, F., Nermell, B., Gardner, R., Shiraji, S., Bottai, M., & Arifeen, S. E. (2011). *Critical windows of exposure for arsenic-associated impairment of*



*cognitive function in pre-school girls and boys : a population-based cohort study.* 1593–1604. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr176>

- Hei, T. K., & Filipic, M. (2004). Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(5), 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.003>
- Hsia, H. E., Tüshaus, J., Brummer, T., Zheng, Y., Scilabra, S. D., & Lichtenthaler, S. F. (2019). Functions of 'A disintegrin and metalloproteases (ADAMs)' in the mammalian nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(16), 3055–3081. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03173-7>
- Hughes, M. F., Beck, B. D., Chen, Y., Lewis, A. S., & Thomas, D. J. (2011). Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicological Sciences*, 123(2), 305–332. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr184>
- Jacobson, K. A., Jarvis, M. F., & Williams, M. (2002). Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(19), 4057–4093. <https://doi.org/10.1021/jm020046y>
- Jiang, S., Su, J., Yao, S., Zhang, Y., Cao, F., Wang, F., Wang, H., Li, J., & 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), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096041>
- Jimenez-Mateos, E. M., Arribas-blazquez, M., Sanz-rodriguez, A., Concannon, C., Olivos-ore, L. A., Reschke, C. R., Mooney, C. M., Mooney, C., Lugará, E., Morgan, J., Langa, E., Jimenez-pacheco, A., Fernando, L., Silva, A., Mesuret, G., Boison, D., Miras-portugal, M. T., Letavic, M., Artalejo, A. R., ... Engel, T. (2015). microRNA targeting of the P2X7 purinoceptor opposes a contralateral epileptogenic focus in the hippocampus. *Nature Publishing Group, December*, 1–17. <https://doi.org/10.1038/srep17486>
- Jimenez-Mateos, E. M., Smith, J., Nicke, A., & Engel, T. (2019). Regulation of P2X7 receptor expression and function in the brain. *Brain Research Bulletin*, 151(November 2018), 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.12.008>
- Juárez-Reyes, A., Jiménez-Capdeville, M. E., Delgado, J. M., & Ortiz-Pérez, D. (2009). *Time course of arsenic species in the brain and liver of mice after oral administration of arsenate.* 557–563. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0378-7>
- Jutooru, I., Chadalapaka, G., Sreevalsan, S., Lei, P., Barhoumi, R., Burghardt, R., & Safe, S. (2010). Arsenic trioxide downregulates specificity protein (Sp) transcription factors and inhibits bladder cancer cell and tumor growth. *Experimental Cell Research*, 316(13), 2174–2188. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.04.027>
- Kahlenberg, J. M., & Dubyak, G. R. (2004). Mechanisms of caspase-1 activation by

- P2X7 receptor-mediated K<sup>+</sup> release. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286(5), 1100–1109.
- Kanellopoulos, J. M., & Delarasse, C. (2019). Pleiotropic Roles of P2X7 in the Central Nervous System. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(September), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00401>
- Khakh, B. S., & North, R. A. (2006). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*, 442(7102), 527–532. <https://doi.org/10.1038/nature04886>
- Kim, H. J., Ajit, D., Peterson, T. S., Wang, Y., Camden, J. M., Wood, W. G., Sun, G. Y., Erb, L., Petris, M., & Weisman, G. A. (2012). Nucleotides released from A $\beta$  1-42-treated microglial cells increase cell migration and A $\beta$  1-42 uptake through P2Y<sub>2</sub> receptor activation. *Journal of Neurochemistry*, 121(2), 228–238. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07700.x>
- Kindon, N., Davis, A., Dougall, I., Dixon, J., Johnson, T., Walters, I., Thom, S., McKechnie, K., Meghani, P., & Stocks, M. J. (2017). From UTP to AR-C118925, the discovery of a potent non nucleotide antagonist of the P2Y<sub>2</sub> receptor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(21), 4849–4853. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.043>
- King, B. F., & Townsend-Nicholson, A. (2003). Nucleotide and Nucleoside Receptors. *Tocris Reviews*, 23(1), 1–11.
- Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., & Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, 4, 575–590. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>
- Kong, Q., Wang, M., Liao, Z., Camden, J. M., Yu, S., Simonyi, A., Sun, G. Y., Gonzalez, F. A., Erb, L., Seye, C. I., & Weisman, G. A. (2005). P2X7 nucleotide receptors mediate caspase-8/9/3-dependent apoptosis in rat primary cortical neurons. *Purinergic Signalling*, 1(4), 337–347. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-7145-5>
- Lahiri, D. K., Maloney, B., & Ge, Y. (2006). *Functional Domains of the BACE1 and BACE2 Promoters and Mechanisms of Transcriptional Suppression of the BACE2 Promoter in Normal Neuronal Cells*. 29, 65–80. <https://doi.org/10.1385/JMN/29>
- Lai, M. K. P., Tan, M. G. K., Kirvell, S., Hobbs, C., Lee, J., Esiri, M. M., Chen, C. P., & Francis, P. T. (2008). Selective loss of P2Y<sub>2</sub> nucleotide receptor immunoreactivity is associated with Alzheimer's disease neuropathology. *Journal of Neural Transmission*, 115(8), 1165–1172. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0067-y>
- Lara, R., Adinol, E., Harwood, C. A., Philpott, M., Barden, J. A., Virgilio, F. Di,

- McNulty, S., & Jameson, S. C. (2020). P2X7 in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutics. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 2–30. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00793>
- Lee, H. G., Won, S. M., Gwag, B. J., & Lee, Y. B. (2011). Microglial P2X7 receptor expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APP<sup>swE</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of alzheimer's disease. *Experimental and Molecular Medicine*, *43*(1), 7–14. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.1.001>
- León-Otegui, M., Gómez-Villafuertes, R., Díaz-Hernandez, J. I., Díaz-Hernandez, M., Miras-Portugal, M. T., & Gualix, J. (2011). Opposite effects of P2X7 and P2Y2 nucleotide receptors on  $\alpha$ -secretase-dependent APP processing in Neuro-2a cells. *FEBS Letters*, *585*(14), 2255–2262. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.048>
- León, D., Hervás, C., & Miras-Portugal, M. (2006). P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *European Journal of Neuroscience*, *23*(11), 2999–3013. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04832.x>
- Li, C. M., Campbell, S. J., Kumararatne, D. S., Bellamy, R., Ruwende, C., McAdam, K. P. W. J., Hill, A. V. S., & Lammas, D. A. (2002). Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population. *Journal of Infectious Diseases*, *186*(10), 1458–1462. <https://doi.org/10.1086/344351>
- Li, J., Duan, X., Dong, D., Zhang, Y., Zhao, L., Li, W., Chen, J., Sun, G., & Li, B. (2017). Tissue-specific distributions of inorganic arsenic and its methylated metabolites, especially in cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of mice after a single oral administration of arsenite. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *43*, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.10.002>
- Li, Y., Jiao, Q., Xu, H., Du, X., Shi, L., Jia, F., & Jiang, H. (2017). Biometal dyshomeostasis and toxic metal accumulations in the development of alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*(October), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00339>
- Liu, Z., Sanchez, M. A., Jiang, X., Boles, E., Landfear, S. M., & Rosen, B. P. (2006). *Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid*. *351*, 424–430. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.054>
- Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J. M., Mukhopadhyay, R., Agre, P., & Rosen, B. P. (2002). *Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9*. *99*(9).
- Luo, J. hua, Qiu, Z. qun, Shu, W. qun, Zhang, Y. yan, Zhang, L., & Chen, J. an. (2009). Effects of arsenic exposure from drinking water on spatial memory, ultra-structures and NMDAR gene expression of hippocampus in rats. *Toxicology Letters*, *184*(2), 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.10.029>

- Marr, R. A. (2016). The Amyloid  $\beta$  Precursor Protein and Cognitive Function in Alzheimer's Disease. In *Genes, Environment and Alzheimer's Disease*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802851-3.00004-8>
- Martel-Gallegos, G., Casas-Pruneda, G., Ortega-Ortega, F., Sánchez-Armass, S., Olivares-Reyes, J. A., Diebold, B., Pérez-Cornejo, P., & Arreola, J. (2013). Oxidative stress induced by P2X7 receptor stimulation in murine macrophages is mediated by c-Src/Pyk2 and ERK1/2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1830*(10), 4650–4659. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.023>
- Martin, E., Amar, M., Dalle, C., Youssef, I., Boucher, C., Le, C., Brückner, M., Prigent, A., Sazdovitch, V., Halle, A., Kanellopoulos, J. M., Fontaine, B., Delatour, B., & Delarasse, C. (2019). New role of P2X7 receptor in an Alzheimer's disease mouse model. *Molecular Psychiatry*, 108–125. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0108-3>
- Martínez-Frailes, C., Di Lauro, C., Bianchi, C., De Diego-García, L., Sebastián-Serrano, Á., Boscá, L., & Díaz-Hernández, M. (2019). Amyloid peptide induced neuroinflammation increases the P2X7 receptor expression in microglial cells, impacting on its functionality. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00143>
- Martínez-Villegas, N., Briones-Gallardo, R., Ramos-Leal, J. A., Avalos-Borja, M., Castañón-Sandoval, A. D., Razo-Flores, E., & Villalobos, M. (2013). Arsenic mobility controlled by solid calcium arsenates: A case study in Mexico showcasing a potentially widespread environmental problem. *Environmental Pollution*, *176*, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.12.025>
- McLarnon, J. G., Ryu, J. K., Walker, D. G., & Choi, H. B. (2006). Upregulated expression of purinergic P2X7 receptor in Alzheimer disease and amyloid- $\beta$  peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *65*(11), 1090–1097. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000240470.97295.d3>
- Medina, M., Robles, P., Mendoza, M., & Torres, C. (2018). Artículo de Revisión Arsenic Intake : Impact in Human Nutrition and Health. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, *35*(1), 93–102. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3604.93>
- Menéndez-González, M., Pérez-Pinera, P., Martínez-Rivera, M., Calatayud, M. T., & Blázquez Menes, B. (2005). APP Processing and the APP-KPI Domain Involvement in the Amyloid Cascade. *Neurodegenerative Diseases*, *2*(6), 277–283. <https://doi.org/10.1159/000092315>
- Miras-Portugal, M. Teresa, Diaz-Hernandez, J. I., Gomez-Villafuertes, R., Diaz-Hernandez, M., Artalejo, A. R., & Gualix, J. (2015). Role of P2X7 and P2Y2 receptors on  $\alpha$ -secretase-dependent APP processing: Control of amyloid plaques formation “in vivo” by P2X7 receptor. *Computational and Structural*

- Biotechnology Journal*, 13, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.02.005>
- Miras-Portugal, M<sup>a</sup> Teresa, Queipo, M. J., Gil-Redondo, J. C., Ortega, F., Gómez-Villafuertes, R., Gualix, J., Delicado, E. G., & Pérez-Sen, R. (2019). P2 receptor interaction and signalling cascades in neuroprotection. *Brain Research Bulletin*, 151(November 2018), 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.12.012>
- Mochizuki, H. (2019). Arsenic neurotoxicity in humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143418>
- Mochizuki, H., Phyu, K. P., Aung, M. N., Zin, P. W., Yano, Y., Myint, M. Z., Thit, W. M., Yamamoto, Y., Hishikawa, Y., Thant, K. Z., Maruyama, M., & Kuroda, Y. (2019). Peripheral neuropathy induced by drinking water contaminated with low-dose arsenic in Myanmar. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 24(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12199-019-0781-0>
- Monroy Fernández, M. G., Díaz-Barriga, F., Monroy, M., Razo, Q. I., & Carrizales, Q. L. (2002). EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR ARSÉNICO Y METALES PESADOS (Pb, Cu, Zn) Y ANÁLISIS DE RIESGO EN SALUD EN VILLA DE LA PAZ-MATEHUALA. *Instituto de Metalurgia*, 550, 7. <http://ambiental.uaslp.mx/docs/fdbymmf-020701-notacontvpmat.pdf>
- Moore, C. L., Flanigan, T. J., Law, C. D., Loukotková, L., Woodling, K. A., da Costa, G. G., Fitzpatrick, S. C., & Ferguson, S. A. (2019). Developmental neurotoxicity of inorganic arsenic exposure in Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 72(September 2018), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2019.01.007>
- Mufson, E. J., Counts, S. E., Perez, S. E., & Ginsberg, S. D. (2008). *Cholinergic system during the progression of Alzheimer ' s disease : therapeutic implications*.
- Müller, U. C., Deller, T., & Korte, M. (2017). Not just amyloid: Physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(5), 281–298. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>
- Nagaraja, T. N., & Desiraju, T. (1994). Operant Learning and Brain Acetylcholine Esterase Activity in Rats following Chronic Inorganic Arsenic Effects. *Human & Experimental Toxicology*, 13, 353–356. <https://doi.org/10.1177/096032719401300511>
- Nava-ruíz, C., & Méndez-armenta, M. (2011). *Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio)*. 16(3), 140–147.
- Nino, S. A., Martel-Gallegos, G., Castro-Zavala, A., Ortega-Berlanga, B., Delgado, J. M., Hernández-Mendoza, H., Romero-Guzmán, E., Ríos-Lugo, J., Rosales-Mendoza, S., Jiménez-Capdeville, M. E., & Zarazúa, S. (2018). Chronic Arsenic Exposure Increases A $\beta$ (1-42) Production and Receptor for Advanced Glycation End Products Expression in Rat Brain. *Chemical Research in Toxicology*, 31(1), 13–21. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00215>

- Niño, S. A., Morales-Martínez, A., Chi-Ahumada, E., Carrizales, L., Salgado-Delgado, R., Pérez-Severiano, F., Díaz-Cintra, S., Jiménez-Capdeville, M. E., & Zarazúa, S. (2018). Arsenic Exposure Contributes to the Bioenergetic Damage in an Alzheimer's Disease Model. *ACS Chemical Neuroscience*, *10*(1), 323–336. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.8b00278>
- North, R. A. (2002). Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiological Reviews*, *82*(4), 1013–1067. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>
- O'Bryant, S. E., Edwards, M., Menon, C. V, Gong, G., & Barber, R. (2011). Long-Term Low-Level Arsenic Exposure Is Associated with Poorer Neuropsychological Functioning : A Project FRONTIER Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *8*(3), 861–874. <https://doi.org/10.3390/ijerph8030861>
- Ortega, F., Pérez-Sen, R., & Miras-Portugal, M. T. (2009). P2X7 Nucleotide Receptor is Coupled to GSK-3 Inhibition and Neuroprotection in Cerebellar Granule Neurons. *Neurotoxicity Research*, *15*(3), 193–204. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9020-6>
- Ortega, F., Pérez-Sen, R., Morente, V., Delicado, E., & Miras-Portugal, T. (2010). P2X7 , NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1723–1733. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0278-x>
- Oyanedel Giaverini, N. (2015). Exposición laboral a arsénico. *Laboratorio de Toxicología Ocupacional. Instituto de Salud Pública de Chile.*, 10.
- Palop, Jorge J. & Mucke, L. (2011). Amyloid- $\beta$  Induced Neuronal Dysfunction in Alzheimer's Disease: From Synapses toward Neural Networks. *Nature Neuroscience*, *13*(7), 812–818. <https://doi.org/10.1038/nn.2583>. Amyloid-
- Pan, Q., Yang, S., Wei, Y., Sun, F., & Li, Z. (2010). SP1 acts as a key factor, contributes to upregulation of ADAM23 expression under serum deprivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *401*(2), 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.058>
- Parvathenani, L. K., Tertyshnikova, S., Greco, C. R., Roberts, S. B., Robertson, B., & Posmantur, R. (2003). P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(15), 13309–13317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209478200>
- Patlolla, A. K., & Tchounwou, P. B. (2005). *Serum Acetyl Cholinesterase as a Biomarker of Arsenic Induced Neurotoxicity in Sprague-Dawley Rats* . *2*(1), 80–83.
- Phiel, C. J., Wilson, C. A., Lee, V. M. Y., & Klein, P. S. (2003). GSK-3 $\alpha$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptides. *Nature*, *423*(6938), 435–

439. <https://doi.org/10.1038/nature01640>

- Puchałowicz, K., Tarnowski, M., Baranowska-Bosiacka, I., Chlubek, D., & Dziedziejko, V. (2014). P2X and P2Y receptors—role in the pathophysiology of the nervous system. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(12), 23672–23704. <https://doi.org/10.3390/ijms151223672>
- Pulido, M. D., & Parrish, A. R. (2003). Metal-induced apoptosis: Mechanisms. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *533*(1–2), 227–241. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.015>
- Queipo, M. J., Gil-Redondo, J. C., Morente, V., & Ortega, F. (2018). P2X7 Nucleotide and EGF Receptors Exert Dual Modulation of the Dual-Specificity Phosphatase 6 (MKP-3) in Granule Neurons and Astrocytes, Contributing to Negative Feedback on ERK Signaling. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00448>
- Rafehi, M., Burbiel, J. C., Attah, I. Y., Abdelrahman, A., & Müller, C. E. (2016). Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of the selective P2Y<sub>2</sub> receptor antagonist AR-C118925. *Purinergic Signalling*. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9542-3>
- Ríos, R., Santoyo, M. E., Cruz, D., Delgado, J. M., Zarazúa, S., & Jiménez-Capdeville, M. E. (2012). Methyl group balance in brain and liver: Role of choline on increased S-adenosyl methionine (SAM) demand by chronic arsenic exposure. *Toxicology Letters*, *215*(2), 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.10.005>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00262-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00262-5)
- Roger, S., Mei, Z. Z., Baldwin, J. M., Dong, L., Bradley, H., Baldwin, S. A., Surprenant, A., & Jiang, L. H. (2010). Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X<sub>7</sub> receptor functions. *Journal of Psychiatric Research*, *44*(6), 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2009.10.005>
- Rosado, J. L., Ronquillo, D., Kordas, K., Rojas, O., Alatorre, J., Lopez, P., Garcia-Vargas, G., del Carmen Caamaño, M., Cebrián, M. E., & Stoltzfus, R. J. (2007). Arsenic exposure and cognitive performance in Mexican Schoolchildren. *Environmental Health Perspectives*, *115*(9), 1371–1375. <https://doi.org/10.1289/ehp.9961>
- Roy, A., Kordas, K., Lopez, P., Rosado, J. L., Cebrian, M. E., Vargas, G. G., Ronquillo, D., & Stoltzfus, R. J. (2011). Association between arsenic exposure and behavior among first-graders from Torreón, Mexico. *Environmental Research*, *111*(5), 670–676. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.03.003>

- RSA- CONICET, C. N. de I. C. y T. (2018). *Arsénico en agua*.
- Ryu, H., Lee, J., Zaman, K., Kubilis, J., Ferrante, R. J., Ross, B. D., Neve, R., & Ratan, R. R. (2003). Sp1 and Sp3 Are Oxidative Stress-Inducible, Antideath Transcription Factors in Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23(9), 3597–3606.
- Santoyo Perez, M. (2006). *EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN TRANSPLACENTARIA Y POSTNATAL DE ARSÉNICO SOBRE EL CUERPO ESTRIADO DE LA RATA*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Sanz, J. M., Chiozzi, P., Ferrari, D., Colaianna, M., Idzko, M., Falzoni, S., Fellin, R., Trabace, L., & Di Virgilio, F. (2009). Activation of Microglia by Amyloid  $\beta$  Requires P2X 7 Receptor Expression . *The Journal of Immunology*, 182(7), 4378–4385. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803612>
- Sattar, A., Xie, S., Hafeez, M. A., Wang, X., Hussain, H. I., Iqbal, Z., Pan, Y., Iqbal, M., Shabbir, M. A., & Yuan, Z. (2016). Metabolism and toxicity of arsenicals in mammals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.020>
- Sayato, Y. (1989). WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. *Eisei Kagaku*, 35(5), 307–312. <https://doi.org/10.1248/jhs1956.35.307>
- Sharma, B., & Sharma, P. M. (2013). Arsenic toxicity induced endothelial dysfunction and dementia: Pharmacological interdiction by histone deacetylase and inducible nitric oxide synthase inhibitors. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273(1), 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.017>
- Sherwood, C. L., Lantz, R. C., & Boitano, S. (2013). *Chronic Arsenic Exposure in Nanomolar Concentrations Compromises Wound Response and Intercellular Signaling in Airway Epithelial Cells*. 132(1), 222–234. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs331>
- Sherwood, C. L., Lantz, R. C., Burgess, J. L., & Boitano, S. (2011). Arsenic Alters ATP-Dependent Ca<sup>2+</sup> Signaling in Human Airway Epithelial Cell Wound Response. *Toxicological Sciences*, 121(1), 191–206. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr044>
- Shi, Y., Wei, Y., & Qu, S. (2010). Arsenic Induces Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Through Mitochondrial Pathways. *Cardiovascular Toxicology*, 10(3), 153–160. <https://doi.org/10.1007/s12012-010-9073-z>
- Singh, A. P., Goel, R. K., & Kaur, T. (2011). Mechanisms Pertaining to Arsenic Toxicity. *Toxicology International*, 18(2), 87–94. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.84258>
- Sisodia, S. S. (1992). *precursor protein cleavage by a membrane- bound protease*. 89(July), 6075–6079.



- Song, W. J., Son, M. Y., Lee, H. W., Seo, H., Kim, J. H., & Chung, S. H. (2015). Enhancement of BACE1 activity by p25/Cdk5-mediated phosphorylation in Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, *10*(8), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136950>
- Spilman, P., Jagodzinska, B., & Bredesen, D. E. (2015). *Enhancement of sAPP  $\beta$  as a Therapeutic Strategy for Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases*. September. <https://doi.org/10.24966/AND-9608/100001>
- Stokes, L., Fuller, S. J., Sluyter, R., Skarratt, K. K., Gu, B. J., & Wiley, J. S. (2010). Two haplotypes of the P2X7 receptor containing the Ala-348 to Thr polymorphism exhibit a gain-of-function effect and enhanced interleukin-1 $\beta$  secretion. *The FASEB Journal*, *24*(8), 2916–2927. <https://doi.org/10.1096/fj.09-150862>
- Su, Y., Ryder, J., Li, B., Wu, X., Fox, N., Solenberg, P., Brune, K., Paul, S., Zhou, Y., Liu, F., & Ni, B. (2004). Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid- $\beta$  precursor protein processing. *Biochemistry*, *43*(22), 6899–6908. <https://doi.org/10.1021/bi035627j>
- Sun, C., Chu, J., Singh, S., & Salter, R. D. (2010). Identification and characterization of a novel variant of the human P2X7 receptor resulting in gain of function. *Purinergic Signalling*, *6*(1), 31–45. <https://doi.org/10.1007/s11302-009-9168-9>
- Sushma, & Mondal, A. C. (2019). Role of GPCR signaling and calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *101*(October), 103414. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2019.103414>
- Syed, N., & Kennedy, C. (2012). *Pharmacology of P2X receptors*. <https://doi.org/10.1002/wmts.1>
- Tan, J., Li, Q., & Evin, G. (2016). Effects of Mild and Severe Oxidative Stress on BACE1 Expression and APP Amyloidogenic Processing. *Methods in Molecular Biology*, 101–116. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2627-5>
- Tan, N. Y., & Khachigian, L. M. (2009). Sp1 Phosphorylation and Its Regulation of Gene Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(10), 2483–2488. <https://doi.org/10.1128/MCB.01828-08>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Udensi, U. K., Pacurari, M., Stevens, J. J., Patlolla, A. K., Noubissi, F., & Kumar, S. (2019). State of the science review of the health effects of inorganic arsenic: Perspectives for future research. *Environmental Toxicology*, *34*(2), 188–202. <https://doi.org/10.1002/tox.22673>
- Thathiah, A., & Strooper, B. De. (2011). The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*(2), 9–11. <https://doi.org/10.1038/nrn2977>
- Trejo-Acevedo, A., Díaz-Barriga, F., Carrizales, L., Domínguez, G., Costilla, R., Ize-

- Iema, I., Yarto-Ramírez, M., & Gavilán-García, A. (2009). Exposure assessment of persistent organic pollutants and metals in Mexican children. *Chemosphere*, 74(7), 974–980. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.030>
- Tsai, S., Chou, H., The, H., Chen, C., & Chen, C. (2003). *The Effects of Chronic Arsenic Exposure from Drinking Water on the Neurobehavioral Development in Adolescence*. 24, 747–753. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00029-9)
- Tyler, C. R., & Allan, A. M. (2014). The Effects of Arsenic Exposure on Neurological and Cognitive Dysfunction in Human and Rodent Studies: A Review. *Current Environmental Health Reports*, 1(2), 132–147. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0012-1>
- Tyler, S. J., Dawbarn, D., Wilcock, G. K., & Allen, S. J. (2002).  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase: Profound changes in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299(3), 373–376. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02635-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02635-9)
- Van der Kant, R., & Goldstein, L. S. B. (2015). Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia. *Developmental Cell*, 32(4), 502–515. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.022>
- Vassar, R. (2014). *BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer ' s disease*. 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13195-014-0089-7>
- Verhoef, P. A., Estacion, M., Schilling, W., & Dubyak, G. R. (2003). P2X7 Receptor-Dependent Blebbing and the Activation of Rho-Effector Kinases, Caspases, and IL-1 Release. *The Journal of Immunology*, 170(11), 5728–5738. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.11.5728>
- Vial, C., Roberts, J. A., & Evans, R. J. (2004). Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Pharmacological Sciences*, 25(9), 487–493. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.07.008>
- View, D. A., & Tang, B. L. (2020). *brain sciences Enhancing  $\alpha$  -secretase Processing for Alzheimer ' s*. 1–15.
- Vijayakaran, K., Kesavan, M., Kannan, K., Sankar, P., Tandan, S. K., & Sarkar, S. N. (2014). Arsenic decreases antinociceptive activity of paracetamol : Possible involvement of serotonergic and endocannabinoid receptors. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(2), 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.07.001>
- Vincent, B. (2016). Regulation of the  $\alpha$ -secretase ADAM10 at transcriptional, translational and post-translational levels. *Brain Research Bulletin*, 126, 154–169. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.020>
- Virgilio, F. Di, Ben, D. D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L., & Falzoni, S. (2017). Review The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*, 47(1), 15–31.

- <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>
- von Kügelgen, I. (2019). Pharmacology of P2Y receptors. *Brain Research Bulletin*, 151(March), 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.03.010>
- Von Kügelgen, I., & Hoffmann, K. (2016). Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*, 104, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.030>
- Wasserman, G. A., Liu, X., Lolocono, N. J., Kline, J., Factor-Litvak, P., Van Geen, A., Mey, J. L., Levy, D., Abramson, R., Schwartz, A., & Graziano, J. H. (2014). A cross-sectional study of well water arsenic and child IQ in Maine schoolchildren. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-23>
- Wei, H., Hu, Q., Wu, J., Yao, C., Xu, L., Xing, F., Zhao, X., Yu, S., Wang, X., & Chen, G. (2018). Molecular mechanism of the increased tissue uptake of trivalent inorganic arsenic in mice with type 1 diabetes mellitus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 504(2), 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.029>
- Wei, M., Liu, J., Xu, M., Rui, D., Xu, S., & Feng, G. (2016). *Divergent Effects of Arsenic on NF- $\kappa$ B Signaling in Different Cells or Tissues: A Systematic Review and*. <https://doi.org/10.3390/ijerph13020163>
- Weisman, G. A., Ajit, D., Garrad, R., Peterson, T. S., Woods, L. T., Thebeau, C., Camden, J. M., & Erb, L. (2012). Neuroprotective roles of the P2Y2 receptor. *Purinergic Signalling*, 8(3), 559–578. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9307-6>
- Weisman, G., Woods, L., Erb, L., & Seye, C. (2012). P2Y Receptors in the Mammalian Nervous System: Pharmacology, Ligands and Therapeutic Potential. In *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* (Vol. 11, Issue 6). <https://doi.org/10.2174/187152712803581047>
- Wetzel, S., Seipold, L., & Saftig, P. (2017). BBA - Molecular Cell Research The metalloproteinase ADAM10: A useful therapeutic target? ☆. *BBA - Molecular Cell Research*, 1864(11), 2071–2081. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.06.005>
- WHO. (2005). Participant handbook: Detection, management and surveillance of arsenicosis in South-East Asia region. *Agenda*, 32, 45. [http://apps.searo.who.int/PDS\\_DOCS/B0301.pdf](http://apps.searo.who.int/PDS_DOCS/B0301.pdf)
- Woods, L. T., Ajit, D., Camden, J. M., Erb, L., & Weisman, G. A. (2016). Purinergic receptors as potential therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 104, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.031>
- Xi, S., Sun, W., Wang, F., Jin, Y., & Sun, G. (2009). Transplacental and early life

- exposure to inorganic arsenic affected development and behavior in offspring rats. *Archives of Toxicology*, 83(6), 549–556. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0403-5>
- Xu, J. X., Boumechache, M., Robinson, L. E., Marschall, V., Gorecki, D. C., Masin, M., & Murrell-Lagnado, R. D. (2012). Splice variants of the P2X7 receptor reveal differential agonist dependence and functional coupling with pannexin-1. *Journal of Cell Science*, 125(16), 3776–3789. <https://doi.org/10.1242/jcs.099374>
- Xu, P., Feng, X., Luan, H., Wang, J., Ge, R., Li, Z., & Bian, J. (2018). Current knowledge on the nucleotide agonists for the P2Y2 receptor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(2), 366–375. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.043>
- Yang, H. C., Fu, H. L., Lin, Y. F., & Rosen, B. P. (2012). Pathways of Arsenic Uptake and Efflux. In *Current Topics in Membranes* (Vol. 69). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00012-4>
- Young, M. T., Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2006). Amino Acid Residues in the P2X7 Receptor that Mediate Differential Sensitivity to ATP and BzATP. *Molecular Pharmacology*, 71(1), 92–100. <https://doi.org/10.1124/mol.106.030163.tory>
- Yuan, X. Z., Sun, S., Tan, C. C., Yu, J. T., & Tan, L. (2017). The Role of ADAM10 in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 58(2), 303–322. <https://doi.org/10.3233/JAD-170061>
- Zarazúa, S., Bürger, S., Delgado, J. M., Jiménez-capdeville, M. E., & Schliebs, R. (2011). *International Journal of Developmental Neuroscience Arsenic affects expression and processing of amyloid precursor protein ( APP ) in primary neuronal cells overexpressing the Swedish mutation of human APP*. 29, 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.03.004>
- Zarrinmayeh, H. (2020). *Purinergic Receptors of the Central Nervous System : Biology , PET Ligands , and Their Applications*. 19, 1–26. <https://doi.org/10.1177/1536012120927609>
- Zhang, Y. W., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>
- Zhou, Z. D., Chan, C. H. S., Ma, Q. H., Xu, X. H., Xiao, Z. C., & Tan, E. K. (2011). The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis, implications to pathogenesis and therapy of alzheimer Disease (AD). *Cell Adhesion and Migration*, 5(4), 280–292. <https://doi.org/10.4161/cam.5.4.16986>

## 12. ANEXOS

### TABLAS Y FIGURAS

#### ANTECEDENTES .....

Figura 1. Metabolismo del Arsénico (Modificado de Oyanedel, 2015).

Figura 2. Características patológicas de la enfermedad de Alzheimer (Congdon & Sigurdsson, 2018).

Figura 3. Procesamiento de APP (Modificada de Cárdenas *et al.*, 2014).

#### ANTECEDENTES INMEDIATOS.....

Figura 4. Efecto del As sobre la actividad de  $\alpha$ -secretasa y la expresión de los receptores P2X7 y P2Y2 (Barrón-López, Tesis de Maestría, 2018).

Figura 5. Efecto del As sobre la expresión de los receptores P2X7, P2Y2 y la actividad de  $\alpha$ -secretasa en un modelo *in vitro* Neuro2a (Barrón-López, Tesis de Maestría, 2018).

Figura 6. Efecto del As sobre la expresión de los receptores P2X7 y P2Y2 en un modelo *in vitro* Neuro2a analizada por RT-PCR punto final (Tesis de Maestría en desarrollo).

#### MATERIALES Y MÉTODOS.....

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el ensayo qPCR.

**Figura 7. Sustrato FRET modificado utilizado en el ensayo.** En la imagen A) se muestra la situación si ADAM 10 está inhibido: no reconoce el sitio de corte del sustrato y, en consecuencia, el fluoróforo se encuentra cerca del quencher y no emitirá fluorescencia. Por otra parte, en la imagen B) se expone la situación si ADAM 10 actúa: se produce un corte en la cadena peptídica y el fluoróforo queda alejado del quencher, por lo que emite fluorescencia susceptible de ser detectada.

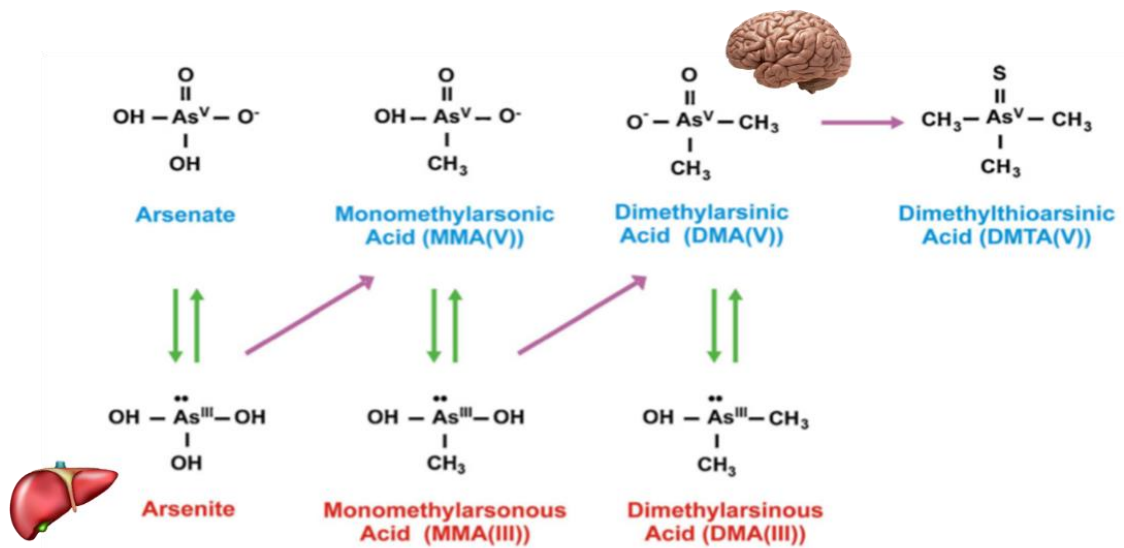


Figura 1. Metabolismo del Arsénico (Modificado de Oyanedel, 2015).

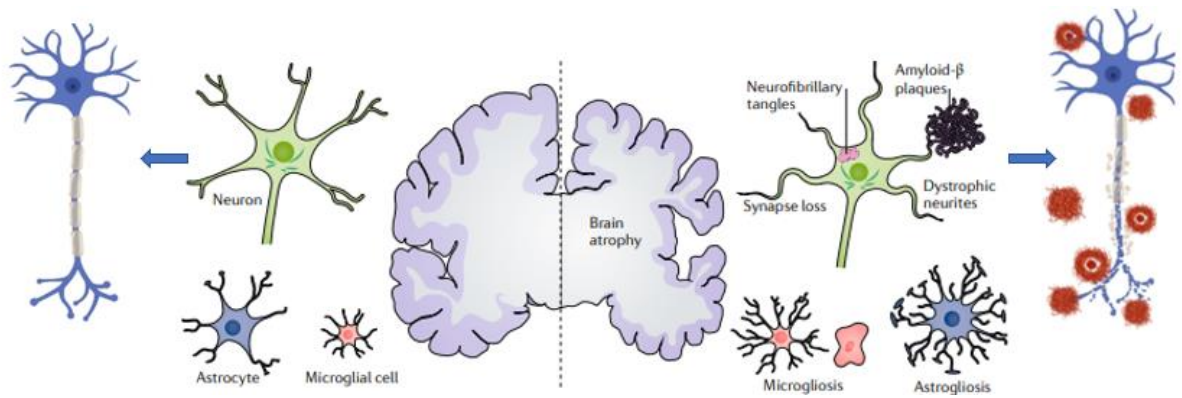


Figura 2. Características patológicas de la enfermedad de Alzheimer (Congdon & Sigurdsson, 2018).

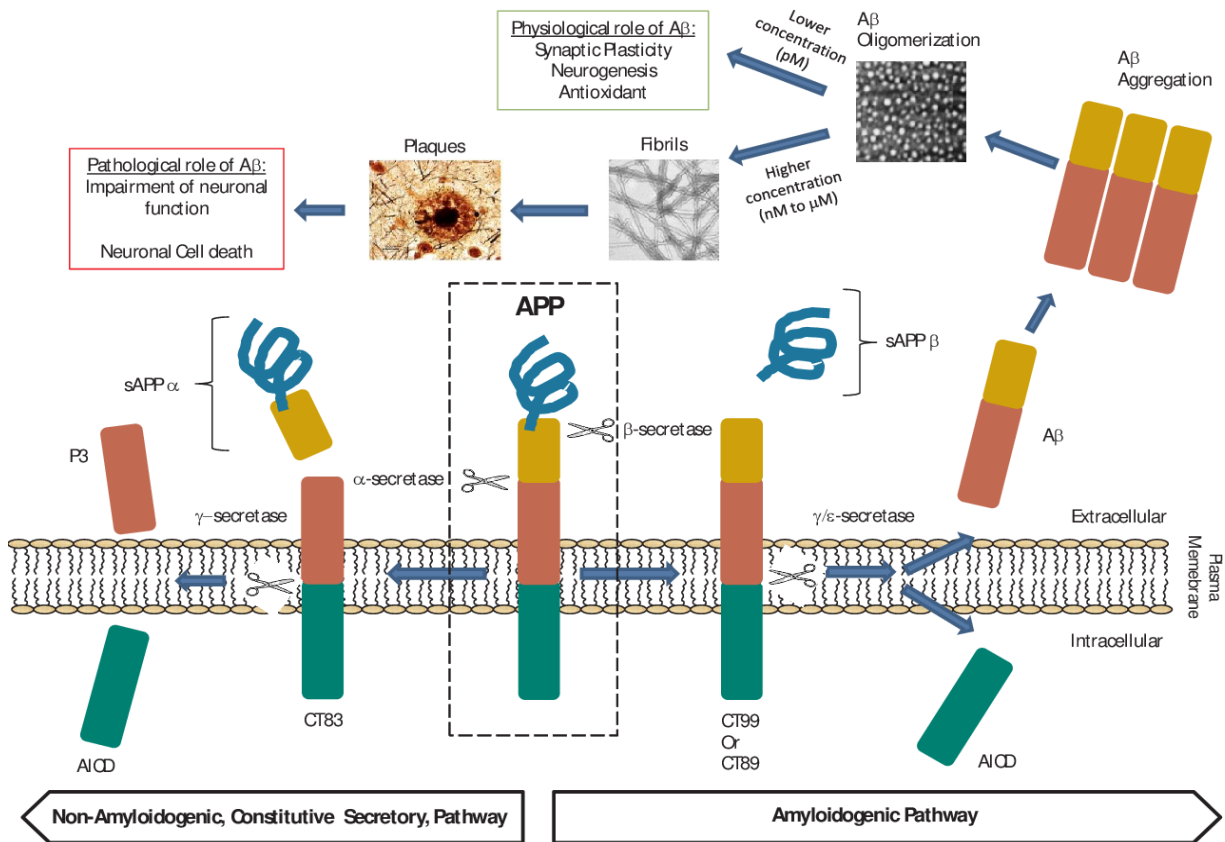


Figura 3. Procesamiento de APP (Modificada de Cárdenas *et al.*, 2014).

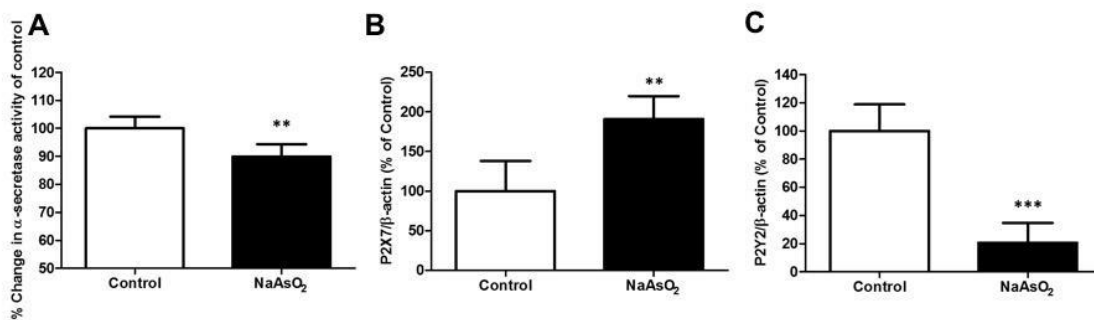


Figura 4. Efecto del As sobre la actividad de  $\alpha$ -secretasa y la expresi3n de los receptores P2X7 y P2Y2 (Barr3n-L3pez, Tesis de Maestr3a, 2018)

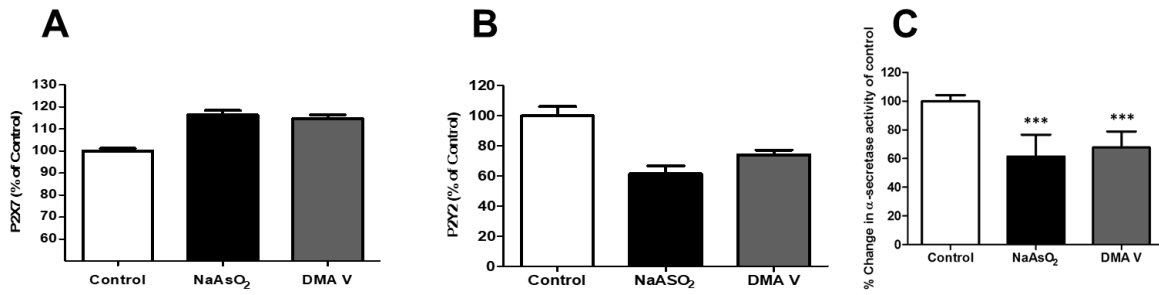


Figura 5. Efecto del As sobre la expresión de los receptores P2X7, P2Y2 y la actividad de  $\alpha$ -secretasa en un modelo *in vitro* Neuro2a (Barrón-López, Tesis de Maestría, 2018).

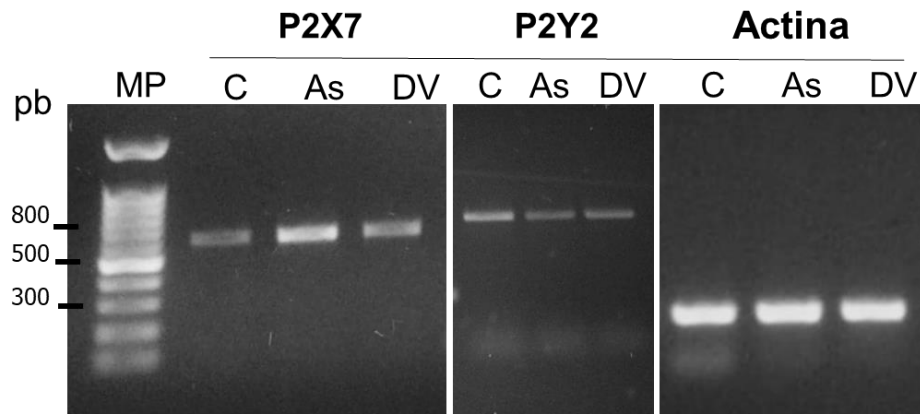
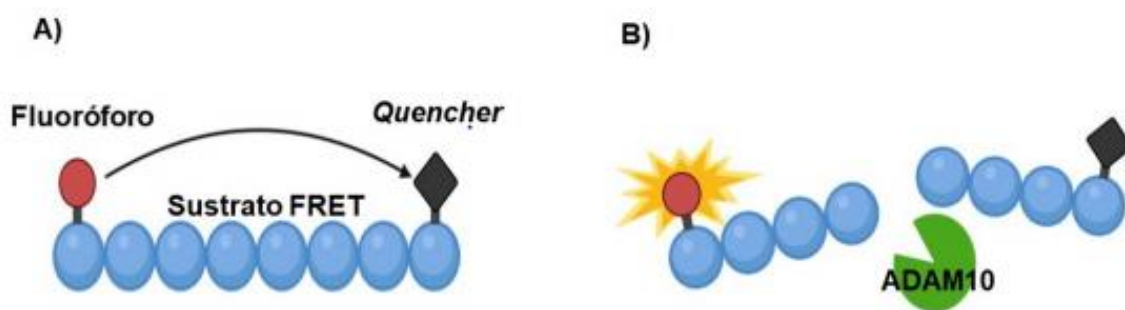


Figura 6. Efecto del As sobre la expresión de los receptores P2X7 y P2Y2 en un modelo *in vitro* Neuro2a analizada por RT-PCR punto final (Tesis de Maestría en desarrollo).



Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el ensayo qPCR

<b>P2X7</b>	GenBank NM_011027.3	
82 pb Tm 60°C	<b>Forward primer</b>	ACACCGTGCTTACAGGTGCTATG
	<b>Reverse primer</b>	GCAACAGCTGGGCAGAATG
<b>P2Y2</b>	GenBank NM_008773.4	
270 pb Tm 57.6°C	<b>Forward primer</b>	CTGCCGCTGTTGGTTTATTAC
	<b>Reverse primer</b>	GCTGGTGGTGACGAAGTAGAG
<b><math>\beta</math>-actina</b>	GenBank NM_007393.5	
101 pb Tm 63.2°C	<b>Forward primer</b>	CTCTTTTCCAGCCTTCTTCTTG
	<b>Reverse primer</b>	GAGGTCTTTACGGATGTCAACG



**Figura 7. Sustrato FRET modificado utilizado en el ensayo.** En la imagen A) se muestra la situación si ADAM 10 está inhibido: no reconoce el sitio de corte del sustrato y, en consecuencia, el fluoróforo se encuentra cerca del quencher y no emitirá fluorescencia. Por otra parte, en la imagen B) se expone la situación si ADAM 10 actúa: se produce un corte en la cadena peptídica y el fluoróforo queda alejado del quencher, por lo que emite fluorescencia susceptible de ser detectada.