

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias



Tesis

Efecto transgeneracional de la exposición a arsénico inorgánico en dosis relevantes al ambiente sobre la expresión y metilación de genes asociados al neurodesarrollo y la plasticidad cerebral en el pez cebra (*Danio rerio*)

Presenta:

J. Jorge Hernández Sánchez

Director (a):

Dr. Ulises Gregorio III Pacheco Bardullas

Co-director (a):

Dra. Tatiana Nenetzen Olivares Bañuelos

Junio, 2020

Ensenada, B. C., México

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias
Licenciatura en Biología

Efecto transgeneracional de la exposición a arsénico inorgánico en dosis relevantes al ambiente sobre la expresión y metilación de genes asociados al neurodesarrollo y la plasticidad cerebral en el pez cebra (*Danio rerio*)

Tesis Profesional

Presenta:

José Jorge Hernández Sánchez

Aprobado por:



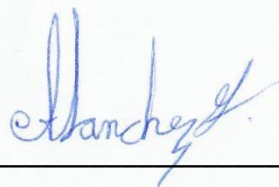
DIRECTOR DE TESIS
Dr. Ulises Gregorio III Pacheco Bardullas



CO-DIRECTORA DE TESIS
Dra. Tatiana Nenetzen Olivares Bañuelos



SINODAL
Dr. Carlos Alberto Flores López



SINODAL
Dr. Alejandro Sánchez González

Ensenada, B. C., México, a 02 de Junio del 2020

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

José Jorge Hernández Sánchez

Presente

Por este conducto le informamos a usted que después de haber leído su trabajo de tesis titulado “Efecto transgeneracional de la exposición a arsénico inorgánico en dosis relevantes al ambiente sobre la expresión y metilación de genes asociados al neurodesarrollo y la plasticidad cerebral en el pez cebra (*Danio rerio*)”, consideramos que cumple con los requisitos para aprobar la fase escrita de su **examen reglamentario**.

Atentamente:




DIRECTOR DE TESIS
Dr. Ulises Gregorio III Pacheco Bardullas



CO-DIRECTORA DE TESIS
Dra. Tatiana Nenetzen Olivares Bañuelos



SINODAL
Dr. Carlos Alberto Flores López



SINODAL
Dr. Alejandro Sánchez González

Resumen

Los procesos epigenéticos tienen un rol importante en funciones del sistema nervioso. Las sustancias tóxicas pueden modificar el epigenoma causando alteraciones neuroconductuales, lo que puede estar mediado por la habilidad de los tóxicos para alterar la expresión de genes clave del sistema nervioso vía modificaciones en la metilación de su promotor. Se ha sugerido que estas alteraciones pueden transmitirse a generaciones subsecuentes sin que haya exposición directa al tóxico. El arsénico (As) es un neurotóxico ubicuo asociado a alteraciones en la metilación de ADN y otros procesos epigenéticos; sin embargo, se desconoce si el As puede causar efectos transgeneracionales. Este estudio exploró posibles efectos transgeneracionales de la exposición parental a As a dosis relevantes al ambiente sobre la expresión y metilación de genes asociados al neurodesarrollo y la plasticidad cerebral en el pez cebra, relacionando estos cambios con alteraciones conductuales y en otros procesos epigenéticos. Embriones de una generación parental (F0) fueron expuestos directamente a 50 o 500 ppb de As desde las 4 hpf hasta su adultez, de donde se obtuvo la generación F1 (intergeneración) y subsecuentemente la generación F2 (transgeneración). Con qRT-PCR se evaluaron los niveles de expresión de los genes MBP, PPP1R1B, BDNF Y RELN encontrando que el As indujo una infraexpresión de BDNF en machos de F0 y F2. La metilación del promotor de BDNF en estos grupos se midió vía MethySYBR, revelando que hubo correlación entre la infraexpresión de BDNF y la hipermetilación de su promotor sólo en F0. Estos cambios coincidieron con alteraciones sobre la locomoción y conductas similares a la ansiedad observadas previamente en nuestros peces. Así, nuestros resultados sugieren que el As impacta sobre parámetros neuroconductuales al inducir una infraexpresión de BDNF a través de cambios en su metilación, y que estos efectos pueden transmitirse a la progenie, aportando la primera evidencia de que el As puede generar efectos transgeneracionales.

Summary

Epigenetic processes have an important role on nervous system functions. Toxic substances may alter the epigenome causing neurobehavioral alterations. These changes can be mediated by the ability of toxins to induce impaired gene expression on neural key genes via an alteration in methylation levels of their promoters. It has previously been suggested that these alterations may be transmitted to descendants without a direct exposure to the toxicant. Arsenic (As) is a ubiquitous neurotoxic substance associated with the disruption of DNA methylation and other epigenetic processes; however, it remains unknown the potential of As to produce transgenerational effects. This study focused on the exploration of possible transgenerational effects on the expression and methylation of neural key genes by parental exposure to doses relevant to the environment of As, associating these changes with alterations in behavior and epigenetic processes besides methylation. Embryos of F0 (parental generation) were directly exposed to 50 or 500 ppb of As from 4 hpf until adulthood. F0 adults were raised to produce the F1 generation (intergeneration) and subsequently the F2 generation (transgeneration). Via qRT-PCR we evaluated the expression levels of genes MBP, PPP1R1B, BDNF and RELN, finding an underexpression of BDNF induced by As exposure in F0 and F2 males. Methylation levels in these groups were measured by the MethySYBR method, and results showed a direct correlation between BDNF underexpression and its promoter hypermethylation only in F0. These changes were consistent with alterations in motor activity and anxiety-like behaviors which were transmitted to the F2 generation. Thus, our results suggest As impacts negatively on behavior by reducing BDNF expression via methylation changes in the BDNF promoter, and these effects can be inherited to non-exposed descendants, giving for the first time an evidence of transgenerational effects of arsenic exposure.

Agradecimientos

Habiendo tanto que agradecer luego de estos años de trabajo, quisiera empezar por mi familia, que durante toda mi vida ha estado alentándome a perseguir metas grandes, y ayudándome a encontrar la mejor versión de mí en todos los sentidos. Especialmente a mi madre, Mely, quien me ha dado su confianza y aliento en cada paso que he decidido dar. A mis hermanos, que siempre han sido la fuente de guía, comprensión, solidaridad y empatía más grande que tengo, con la que sin duda nunca hubiera dado el paso para adentrarme en el mundo de la ciencia.

A mis sobrinos, por recordarme siempre que la curiosidad por entender nuevas cosas es el motor que nos impulsa a explorar más allá de nuestros límites y con ello, a crecer. De manera muy especial, agradezco a mi padre, Alfonso, de quien siempre obtuve apoyo incondicional y un brazo incansable sin el cual, sin duda alguna no hubiera podido realizar mi formación profesional hasta este grado.

Agradezco profundamente a mis directores de tesis. Al Dr. Ulises Bardullas, por sus palabras siempre tan acertadas, por su empatía, por su manera de instruirme siempre tan paciente y empática, y principalmente por la gran oportunidad que me brindó al invitarme a formar parte de este gran proyecto de investigación que me daría tanto crecimiento profesional. A la Dra. Tatiana Olivares, de quien me llevo uno de mis mayores ejemplos del trabajo duro, el compromiso y el valor de tener en orden las prioridades, quien cambió grandes aspectos de mi perspectiva sobre la ciencia y a quien hoy le debo, sin duda, mucho del gran crecimiento que siento haber adquirido como científico.

A mis compañeros del proyecto zebrafish; Selma Valles, quien desde mi primer día estuvo presente, siempre tan gentil y solidaria, y a quien considero como una de mis maestras. A Victor Dipp, Darién Huerta, mis compañeros con los que siempre conté para obtener o brindar apoyo para sacar adelante el proyecto. A muchos de mis compañeros de carrera por tantos momentos felices que me dieron fuerza y frescura para seguir adelante.

Al Dr. Carlos Flores, quien nos permitió utilizar su material, y más aún, que siempre estuvo disponible para ayudar a disipar dudas, aportando su invaluable conocimiento. Al Dr. Alejandro Carballo, con quien en ocasiones compartí equipo de laboratorio, y a quien sin dudar acudí también en momentos de incertidumbre. Al Dr. Julio Valencia, por mostrar gran disponibilidad al momento de compartir conocimientos, e incluso reactivos para la realización de las tareas del proyecto.

A todos, muchas gracias. Nada de esto habría sido posible sin ustedes.

ÍNDICE

	Página
Página de aprobación	3
Resumen en español	4
Resumen en inglés	5
Agradecimientos	6
Capítulo 1. Introducción.	9
Capítulo 2. Antecedentes.	11
2.1 Epigenética	11
2.1.1 Metilación del ADN y su influencia sobre la expresión génica	11
2.2 Herencia epigenética transgeneracional	12
2.3 El arsénico	15
2.3.1 Exposición y distribución en México	15
2.3.2 Absorción	16
2.3.3 Metabolismo	16
2.3.3.1 Vía metabólica clásica	17
2.3.3.2 Vía de conjugación a glutatión	17
2.4 Neurotoxicidad del As _i y su relación con alteraciones en metilación de ADN	18
2.4.1 El As _i se reconoce como una sustancia neurotóxica	18
2.4.2 La metilación del ADN influye en el bienestar del sistema nervioso	19
2.4.3 Daños neurológicos por As _i podrían asociarse a cambios en metilación de genes neurales	20
2.4.4 Cambios gen-específicos en metilación por As _i podrían impactar al sistema nervioso vía alteraciones en la transcripción de genes neurales	21
2.5 Evidencias de efectos transgeneracionales por exposición a sustancias tóxicas	22
Capítulo 3. Hipótesis	24
Capítulo 4. Objetivos	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos específicos	25
Capítulo 5. Metodología	26
5.1 Diseño experimental	26
5.2 Selección de genes	26
5.3 Cuantificación de niveles de expresión génica	28
5.3.1 Diseño de primers	28

5.3.2 Verificación de fiabilidad y estandarización de los primers por PCR punto final	28
5.3.3 Extracción de ARN	29
5.3.4 PCR en tiempo real (qRT-PCR)	29
5.4 Evaluación de niveles de metilación	30
5.4.1 Extracción de ADN genómico	30
5.4.2 Ensayo de bisulfito	30
5.4.3 Diseño de primers	31
5.4.4 MethySYBR de un paso	32
5.5 Análisis estadístico e ilustración de datos	34
Capítulo 6. Resultados	36
6.1 Expresión de genes asociados al neurodesarrollo y la plasticidad cerebral	36
6.2 Nivel de metilación en el promotor de los genes	38
6.3 Relación entre la metilación del promotor y la expresión de los genes analizados	40
Capítulo 7. Discusión	41
7.1 El As_i causó alteraciones en la expresión génica en múltiples generaciones	41
7.1.1 Los efectos sobre la expresión de MBP, RELN y PPP1R1B fueron escasos	41
7.1.2 El As_i causó disminución sexo-dependiente de niveles de ARNm de BDNF en F0 y F2	41
7.2 El As_i alteró la metilación del promotor de BDNF en la primera generación	43
7.2.1 Ausencia de efectos sobre la metilación en F2 y sus posibles causas	44
7.2.2 La alteración de otros procesos epigenéticos pudo tener influencia sobre nuestros resultados	45
7.2.3 El As_i afectó mayormente a BDNF probablemente debido a particularidades del gen	46
7.3 Los cambios en metilación y expresión de BDNF por As_i subyacen alteraciones en la conducta	46
Capítulo 8. Conclusiones	48
Capítulo 9. Perspectivas	49
Anexos	50
Literatura citada	51

1. INTRODUCCIÓN

Un fenómeno transgeneracional se define como la habilidad de un fenotipo fisiológico o enfermedad para ser heredado a generaciones subsecuentes a través de la línea germinal¹. Es decir, cuando un organismo es expuesto a condiciones ambientales determinadas (p. e. cambios en la dieta, en las condiciones abióticas o exposición a sustancias tóxicas) puede desarrollar nuevas características fenotípicas que pueden ser heredadas a la progenie, sin que esta esté en contacto con la condición ambiental que generó los cambios.

El epigenoma se refiere a toda información biológica heredable situada alrededor pero no dentro de la secuencia de ADN, y que tiene influencia sobre la expresión génica y la homeostasis celular. Entre los distintos procesos epigenéticos existentes destacan la metilación de ADN, las modificaciones post-traduccionales de histonas y los ARN no codificantes². La metilación de ADN es el mecanismo de modificación epigenética más estudiado, y se refiere a la adición de un grupo metilo en citosinas del ADN situadas en dinucleótidos CpG (5' C-G 3').

Actualmente se reconoce que un efecto transgeneracional puede estar mediado por la alteración de información epigenética en el ancestro y la conservación de esas modificaciones en la progenie. Este fenómeno se conoce como herencia epigenética transgeneracional, y se define formalmente como la herencia, a través de la línea germinal, de información epigenética entre generaciones en ausencia de una influencia continua del ambiente que conduce a variaciones fenotípicas¹.

El arsénico (As) es un metaloide considerado una de las sustancias más ubicuas y tóxicas en el mundo, y se ha visto asociado a distintos efectos neurotóxicos³⁻⁸. Se piensa que parte de los daños neurológicos asociados a la exposición al As podrían estar mediados por alteraciones en la metilación de ADN con consecuentes cambios en el nivel de expresión de genes neurales, impactando así en la conducta. Asimismo, si estos cambios en la metilación de ADN se transmiten a la progenie, esta presentaría también las alteraciones en expresión génica y conducta.

Este estudio fue diseñado para determinar si el As es capaz de inducir efectos transgeneracionales sobre la expresión de genes asociados al neurodesarrollo y la plasticidad cerebral mediante la alteración de sus niveles de metilación. A pesar de lo bien estudiado que está el As a nivel toxicológico, hasta hoy no existen estudios que reporten alteraciones transgeneracionales a nivel molecular asociadas a la exposición al metaloide, por lo cual es necesario realizar estudios al

respecto dado el impacto que el As puede tener en la salud de poblaciones humanas que consumen aguas contaminadas con él, y sobre la biodiversidad, particularmente la acuática ⁹.

Para ello, en esta investigación se utilizó el pez cebra como modelo animal, dado que brinda amplias ventajas para estudios transgeneracionales. Ejemplo de ellos es su ciclo de vida corto, su alta tasa reproductiva, su desarrollo embrionario extrauterino y su relativamente fácil y económico manejo. Se realizaron ensayos basados en la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), con los que se cuantificaron cambios en la expresión (1) y en la metilación del promotor (2) de los genes MBP (proteína mielina básica), PPP1R1B (proteína fosfatasa 1 subunidad regulatoria 1B), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y RELN (reelina).

Los ensayos fueron hechos sobre el tejido cerebral de peces de tres generaciones lineales (F0, F1, F2), donde los grupos experimentales de la generación parental (F0) tuvieron contacto con As, mientras que los descendientes se criaron en un medio libre del contaminante. Los ensayos de expresión y metilación se aplicaron sobre los mismos individuos, lo cual permitió determinar si existe una correlación entre ambos parámetros. Asimismo, el realizar las pruebas en los descendientes que no tuvieron contacto directo con As hizo posible reconocer si hubo efectos transgeneracionales sobre alguno de los parámetros, o sobre ambos.

Los experimentos revelaron que los peces machos de las generaciones F0 y F2 tuvieron una disminución significativa del nivel de ARNm del gen BDNF, dando evidencia de un efecto transgeneracional sexo-dependiente por exposición al As. Asimismo, encontramos que en los machos F0 el promotor de BDNF se vio hipermetilado, demostrando una correlación negativa entre la expresión del gen y el nivel de metilación de su promotor. Además, en un contexto integral, la infraexpresión de BDNF está se vio asociada a la alteración de conductas asociadas a la ansiedad, lo cual se reportó en estudios adyacentes a esta tesis donde se utilizaron los mismos peces.

2. ANTECEDENTES

2.1 Epigenética

El término **epigenética** tuvo su origen tras el estudio de C. D. Waddington en 1940, en el cual investigó la interacción gen-ambiente y su relación con fenómenos de herencia no-Mendeliana ^{2,10}. La gran aportación de dicho estudio fue el dar evidencias de que un cambio en el ambiente puede causar cambios en el fenotipo de un organismo sin alterar su genotipo, y que posiblemente dichos cambios pueden ser transmitidos a generaciones subsecuentes ¹⁰. Actualmente se reconoce que dichos cambios se deben a la alteración de distintos factores a nivel molecular.

Con ello, hoy se ha define a la epigenética como el conjunto de procesos moleculares alrededor del ADN que son capaces de regular la actividad genómica de manera independiente al ADN, y que son mitóticamente estables ¹¹. Las alteraciones en el epigenoma son procesos dinámicos que se potencializan en presencia de cambios ambientales; asimismo, la capacidad de dichos cambios para modificar la expresión génica, hace que los procesos epigenéticos tengan un papel clave en el proceso de adaptación de un organismo ante un ambiente nuevo.

2.1.1 Metilación de ADN y su influencia sobre la expresión génica

La regulación epigenética involucra distintos mecanismos moleculares. Entre ellos destacan la metilación del ADN, las modificaciones post-traduccionales de histonas (PTM), y los ARN no codificantes, entre otros ². En la metilación del ADN, el grupo metilo se adhiere a las citosinas en los dinucleótidos CpG por acción de enzimas de la familia de las ADN metiltransferasas (DNMTs), quienes utilizan S-adenosylmetionina (SAM) como co-sustrato y donador de la molécula CH₃ ¹² que se adherirá al carbono 5 de la citosina, formando el complejo 5-metilcitosina (5mC) (figura 1).

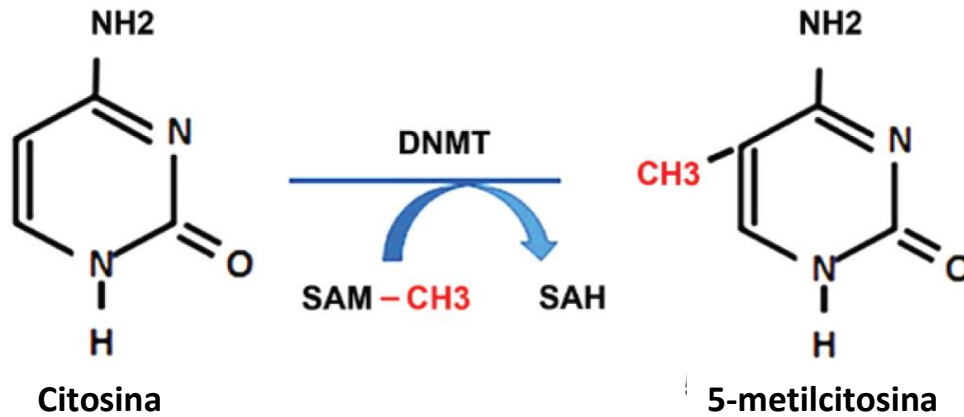


Figura 1.- Ilustración del proceso de metilación de ADN ¹². SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína; DNMT, DNA metiltransferasa

Anteriormente se ha sugerido que el mecanismo principal mediante el cual la metilación de ADN puede influir en la transcripción es que cuando el promotor de un gen se metila, se producen cambios estructurales en la cromatina, compactándola e inhibiendo su apertura para la unión de polimerasas y/o factores de transcripción ¹³. Por ello, la hipermetilación de la región promotora de un gen comúnmente se relaciona con su silenciamiento (figura 2) ^{14, 15}. Asimismo, se ha reconocido que este bloqueo en la expresión génica se debe a que los grupos metilo son reconocidos por proteínas que reclutan complejos proteicos represores de la transcripción ¹⁶.

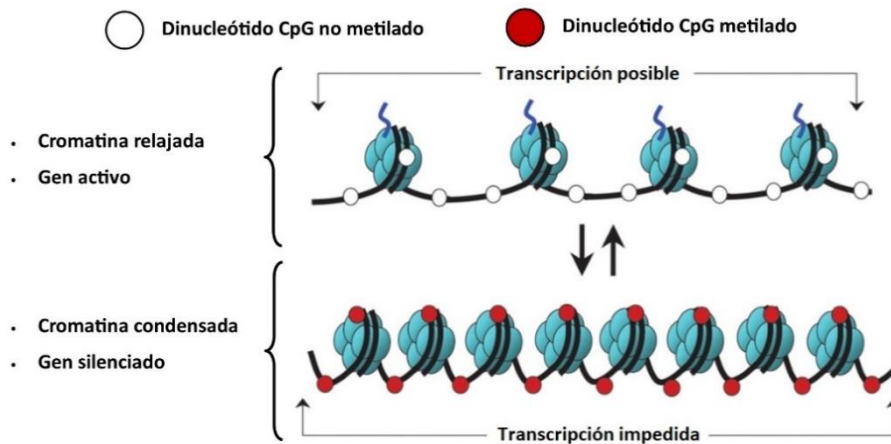


Figura 2.- Relación entre la metilación y la transcripción ¹⁷. La hipermetilación en una región del genoma puede conducir a la compactación de la cromatina en la zona; si dicha compactación se da en el promotor de un gen, se dificultará la entrada de polimerasas y factores de transcripción, reduciendo su expresión.

2.2 Herencia epigenética transgeneracional

Recientemente se han realizado numerosos estudios toxicológicos que reportan la capacidad de diversas sustancias tóxicas para generar efectos heredables a la descendencia ² (Tabla 1). A estos

efectos se les denomina efectos transgeneracionales, lo cual se refiere a que se presentan por exposición parental, pero no directa, a una condición ambiental determinada. Es decir, cuando un organismo se expone a un cambio ambiental, este puede ocasionar cambios fenotípicos; si su descendencia presenta la nueva variación fenotípica sin haber estado en contacto con la condición ambiental que la produjo, se dice que existió un efecto transgeneracional.

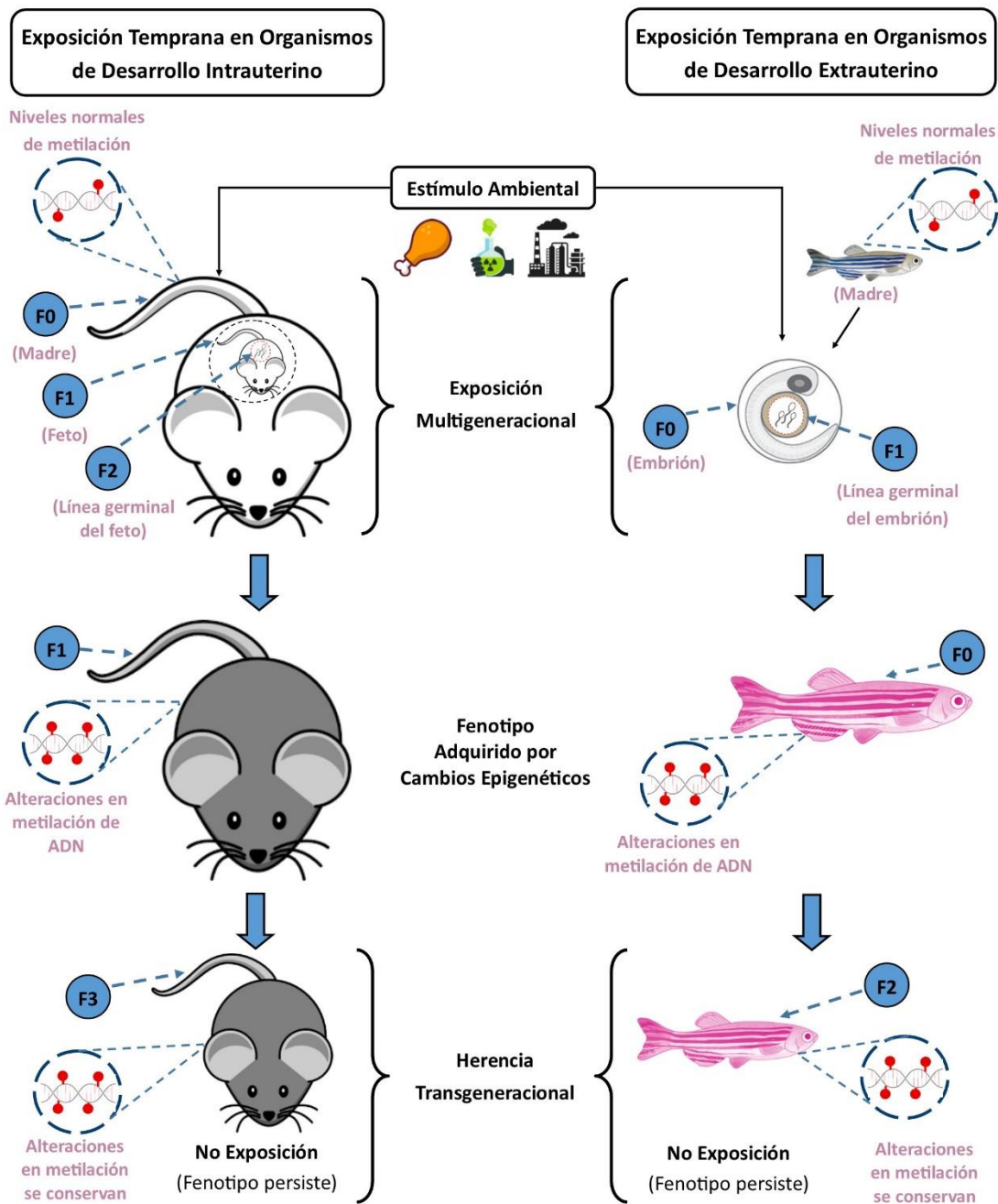


Figura 3. Fenómeno de la herencia epigenética transgeneracional y tipos de exposición a insultos ambientales (ej. Sustancias tóxicas, contaminantes ambientales o dieta). Adaptada de Nilsson et al (2018) ².

Cabe resaltar que cuando se expone al organismo parental (F0) a un contaminante, su línea germinal (F1) también puede verse afectada, por lo que se considera que la siguiente generación también fue expuesta; a esto se le conoce como exposición multigeneracional. La descendencia de la generación que fue expuesta como línea germinal (F2) será la primera con verdadera ausencia de exposición y por lo tanto, la primera con verdaderos efectos transgeneracionales, si los hay (figura 3) ².

El mecanismo mediante el cual estos efectos pueden heredarse aún no se entiende por completo, pero se ha sugerido que puede asociarse a la transmisión de información epigenética. Por ejemplo, si un organismo es expuesto a determinada condición ambiental su nivel de metilación puede alterarse, conduciendo a cambios en la expresión de genes y resultando así en el desarrollo de un nuevo fenotipo. El nuevo patrón de metilación podría ser heredado, siendo el que provoca la expresión del nuevo fenotipo en los descendientes; a este fenómeno se le conoce como herencia epigenética transgeneracional ^{1, 11}.

Tabla 1.- Evidencias de efectos transgeneracionales por exposición a condiciones específicas ².

Sustancia tóxica	Efecto
Vinclozolina	Daños en fertilidad en machos; enfermedades de próstata y riñón, tumores, patologías inmunológicas y reproductivas
Vinclozolina	Cambios género-específicos en comportamientos asociados a la ansiedad
Metoxicloro	Daños en fertilidad en machos; enfermedades de riñón, ovarios y obesidad
Permetrina/DEET	Enfermedades de próstata y riñón
Dioxina	Enfermedades de próstata y riñón, reducción de fertilidad y efectos negativos en resultados de embarazo
BPA/ftalatos	Enfermedades de próstata y riñón; obesidad
Mezcla de hidrocarburos	Enfermedades de próstata y riñón; obesidad; patologías inmunológicas y reproductivas
Vinclozolina, permetrina/DEET, plásticos, dioxina y mezcla de hidrocarburos	Ovario poliquístico, reducción de pool folicular primordial
DDT	Obesidad
Ftalato	Disrupción de organización de células germinales testiculares y de función de células madre espermatogoniales; cambios hormonales y en comportamiento
Ftalato	Disrupción de función ovárica
Tributilestano	Aumento en el almacenamiento de grasas
BPA	Enfermedades cardíacas y reducción de fertilidad
BPA	Cambios en comportamiento social y expresión de genes neurales
Atrazina	Enfermedades testiculares, pubertad temprana, fenotipo magro
Benzo(a)pireno	Deficits fisiológicos y de conductuales
Mercurio	Alteraciones conductuales
Nicotina	Función pulmonar anormal

Hasta hoy existe gran controversia sobre si la metilación del ADN es la información que se transmite a la progenie y que trae consigo la aparición de los efectos en la descendencia. En mamíferos, la

metilación total del ADN (i. e. metiloma) atraviesa al menos dos eventos de reprogramación durante el desarrollo embrionario ¹⁸, en los cuales las metilaciones presentes son eliminadas por procesos enzimáticos. Sin embargo, esta “limpieza” del metiloma no ocurre igual en todos los sitios del genoma ¹⁹. En ratones la metilación persiste en regiones específicas del ADN en los oocitos durante periodos post-fertilización que típicamente se caracterizan por presentar hipometilación global ²⁰. Estas regiones son conocidas como regiones diferencialmente metiladas (DMRs).

En el pez cebra se ha evidenciado que el patrón de metilación del esperma es heredado por los embriones en estadios tempranos del desarrollo ²¹. Asimismo, existen diversos reportes de efectos transgeneracionales en este modelo animal por exposición a distintos contaminantes ambientales como dioxinas, bisfenol A (BPA) y plaguicidas de interés comercial ²². En 2018 un estudio encontró que la exposición parental a radiación ionizante causa alteraciones en la metilación del ADN de peces cebra, que persisten de manera transgeneracional a través de la conservación de DMRs en generaciones posteriores ²³.

La gran mayoría de estas DMRs se localizaron en regiones reguladoras de la transcripción, como promotores de genes ²³. Los autores discutieron que estos cambios transgeneracionales en la metilación pueden estar ligados a efectos heredables que se reportaron previamente por exposición a la radiación ionizante, como inestabilidad genómica y déficits en la formación de los ojos ²⁴. A pesar de estas evidencias, aún se debe profundizar con estudios en el tema para determinar qué tanto del patrón de metilación del ancestro realmente se conserva en el descendiente, y si esta es en verdad la causa de los efectos vistos en la progenie.

2.3 El arsénico

Como se mencionó anteriormente, la exposición a sustancias tóxicas es uno de los tipos de cambio ambiental que se asocian a alteraciones transgeneracionales (Tabla 1). Una de las sustancias considerada como una de las más ubicuas y tóxicas del planeta es el **arsénico (As)**; un metaloide cuyo consumo se asocia al desarrollo de distintos tipos de cáncer, enfermedades vasculares, diabetes y problemas neurológicos ²⁵. A pesar de la amplia cantidad de estudios toxicológicos del As, al día de hoy no existen reportes de efectos transgeneracionales por su causa.

2.3.1 Exposición y distribución en México

El As se encuentra en forma natural en la corteza terrestre ²⁶ y se distribuye en suelos, sedimentos, ambientes acuáticos, y en organismos, debido a procesos de absorción ²⁷. La intoxicación con As se da principalmente por la ingesta de aguas contaminadas por procesos naturales y antropogénicos. Generalmente se encuentra conjugado con otros elementos químicos formando compuestos orgánicos e inorgánicos. Entre ellos, las formas inorgánicas son mayormente tóxicas que las orgánicas ²⁸.

En diversos estados del territorio mexicano se han documentado concentraciones de arsénico inorgánico (As_i) disuelto que sobrepasan el límite permisible de concentración en agua de uso y consumo humano (0.025 mg/L) determinado por la Secretaría de Salud (SS) ²⁹. Entre los dichos estados se encuentran Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Sonora y San Luis Potosí ³⁰⁻³². Cabe señalar que el límite impuesto por la SS para aguas Mexicanas sobrepasa el límite internacional determinado por la Organización Mundial de la Salud, que es de 0.01 mg/L ³³.

2.3.2 Absorción

El As_i puede presentarse naturalmente de dos formas relevantes por su importancia biológica. El arsenato (As_i^V o As pentavalente) es la que se encuentra con mayor frecuencia debido a que se da en condiciones aeróbicas, por lo que puede conservarse en el agua; mientras tanto, el arsenito (As_i^{III} o As trivalente) es más escaso ya que se presenta en condiciones anaeróbicas ³⁴. Estas formas están definidas por su estado de oxidación, mismo que modifica su nivel de toxicidad. El As_i^{III} parece ser responsable de la mayor parte de los efectos tóxicos del As ²⁸.

El As_i^V es la forma más comúnmente ingerida por el consumo de agua contaminada con As_i . Al ingerirla, alrededor del 90% es absorbido por el tracto gastrointestinal para posteriormente liberarse al torrente sanguíneo, llegando hasta los hepatocitos, quienes se encargan de su metabolización ^{35,36}. El ingreso del As a las células depende del estado de oxidación del As y del tipo celular; el As_i^V se absorbe con mayor facilidad a través de los transportadores de fosfatos, mientras que el As_i^{III} ingresa a través de acuagliceroporinas, debido a su mayor permeabilidad con respecto al As_i^V ³⁷⁻⁴⁰.

2.3.3 Metabolismo

El As_i es metabolizado por los organismos por medio de reacciones enzimáticas que involucran procesos de metilación y reducción para su conversión a una forma orgánica. La biotransformación

del As_i permite que el 70% de sus metabolitos sean excretados a través de la orina, mientras que sólo un pequeño porcentaje es retenido por el organismo ³⁵. Actualmente existen dos mecanismos propuestos sobre el proceso de metilación del As_i para su metabolización; la vía metabólica clásica de metilación oxidativa y la vía de conjugación a glutatión por metilación reductiva.

2.3.3.1 Vía metabólica clásica

Este proceso inicia cuando el As^V es reducido a As^{III} en presencia de glutatión s-transferasa omega (GST-omega), que funge como donador de electrones ⁴¹. El As^{III} es metilado por la enzima As3MT (arsenito metiltransferasa) (o por la enzima CYT19, la cual es homóloga de As3MT en humanos) utilizando SAM (S-adenosil metionina) como cofactor y donador del grupo metilo. Con ello el As^{III} se transforma en MMA^V (ácido monometilarsónico), que posteriormente es reducido a MMA^{III} (ácido monometilarsenioso) por acción de la enzima MMA^V reductasa. Finalmente el MMA^{III} es metilado a DMA^V (ácido dimetilarsínico) y reducido a DMA^{III} (ácido dimetilarsenioso) (figura 4)⁴².

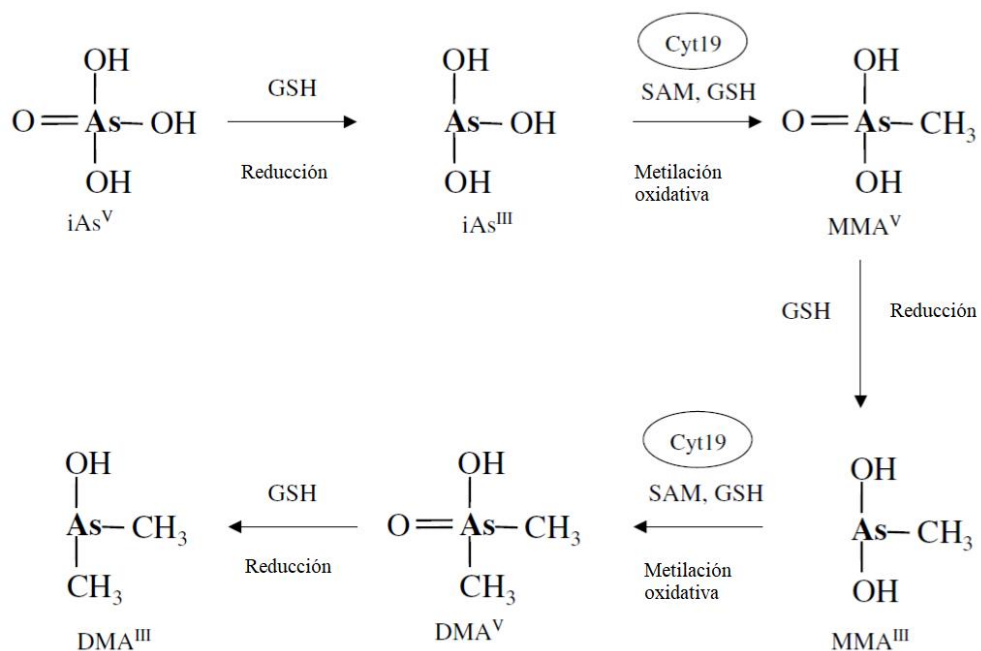


Figura 4. Vía metabólica clásica del As_i en mamíferos ⁴².

2.3.3.2 Vía de conjugación a glutatión

Esta vía ha sido propuesta de forma reciente, y se basa en la formación de complejos As-glutatión (GSH) ⁴². Se inicia con la formación de los complejos arsénico tri-glutatión (ATG) y monometilarsónico di-glutatión (MADG), quienes sirven como sustrato para CYT19 (la enzima

homóloga de As3MT en humanos), que a su vez requiere SAM como donador de grupos metilo. Estos complejos As-GSH son metilados para formar MADG y DMAG (dimetil arso-glutatión), respectivamente. Finalmente, estos MADG y DMAG son oxidados a MMA^V y DMA^V, que en esta vía se consideran productos finales, y no intermedios de la biotransformación del As_i (figura 5).

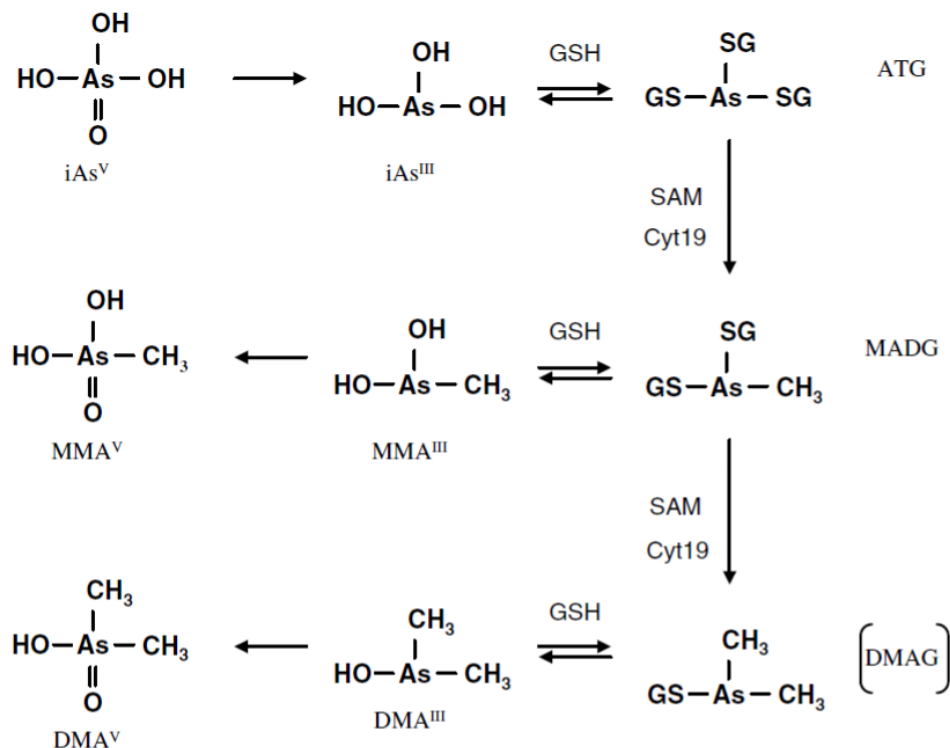


Figura 5. Nueva vía metabólica del As_i por complejos As-GSH ⁴².

2.4 Neurotoxicidad del As_i y su relación con alteraciones en metilación de ADN

2.4.1 El As_i se reconoce como una sustancia neurotóxica

La exposición a As se ha asociado a diversos efectos negativos sobre el sistema nervioso demostrados en modelos animales y humanos ^{4,8}. Entre ellos destacan alteraciones en la memoria, el aprendizaje y las funciones motoras en animales ^{4,7}, y la disminución del coeficiente intelectual ^{3, 47, 48} y encefalopatía ⁵ en humanos. Además, se ha reportado que la exposición a dosis bajas de As puede alterar la función cognitiva y ser un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades psiquiátricas ⁶.

Estudios previos han reportado que la exposición a As_i en ratas en etapas tempranas del desarrollo (día 15 de gestación) produce hiperactividad en etapas adultas ⁴⁹. Asimismo, un recientemente se demostró que la exposición a As_i en dosis relevantes al ambiente (0.05 y 0.1 mg/L) en ratas durante periodos de gestación y lactancia produce un retraso en el desarrollo de reflejos motores sensoriales y decremento en la actividad motora 3 meses después del fin de la exposición ⁵⁰. Esto sugiere que la exposición a As_i durante etapas críticas de la gestación produce efectos tardíos en marcadores neuroconductuales, que se asocian a efectos neurotóxicos de la sustancia.

2.4.2 El metabolismo del As_i conduce a desregulación del proceso de metilación de ADN

El As se ha mostrado como un potente desregulador de procesos epigenéticos, asociándose frecuentemente a hipometilación del ADN global ⁴³. Se ha sugerido que el As produce estos cambios epigenéticos debido a que, como se mencionó arriba, su metabolismo requiere de SAM, independientemente de la ruta de metilación que se siga (figuras 3 y 4). Por ello, en presencia de As se reduce la disponibilidad del co-sustrato para la metilación del ADN por parte de las DNMTs ⁴⁴.

Esto se ha visto apoyado por estudios que reportan un decremento del nivel de SAM en el hígado (el principal órgano metabolizador de As) de ratas expuestas a As_i, acompañada de una disminución en la actividad de las DNMTs ^{45,46}. Aun así, esto no explica como el As_i induce otras modificaciones al epigenoma, por lo que es posible que los cambios se deban a múltiples mecanismos, lo cual hace necesario que se profundice con más estudios sobre el tema.

2.4.2 La metilación del ADN influye en el bienestar del sistema nervioso

Estudios en décadas recientes han relacionado la desregulación de procesos epigenéticos con el desarrollo de desórdenes neurológicos ⁵¹, señalando que los factores epigenéticos juegan un papel importante en el mantenimiento de funciones del sistema nervioso. Esto se ve apoyado por evidencias que prueban que en el sistema nervioso central los mecanismos epigenéticos son responsables, entre otras cosas, de la programación neuronal durante etapas tempranas del desarrollo embrionario ^{19,52-54}, de los cambios en la plasticidad sináptica dependiente a actividad ^{19,55-57}, y del almacenamiento de memoria a largo plazo ^{19,58-63}.

Como se mencionó anteriormente, el As puede fungir como desregulador de procesos epigenéticos. Numerosos estudios han reportado que el As_i es capaz de causar modificaciones epigenéticas en modelos animales y humanos ⁶⁵, incluyendo alteraciones en la metilación del ADN ⁴⁴.

Frecuentemente la exposición a As_i se asocia a hipometilación global ⁴³, y la hipometilación del ADN genómico se ha ligado a diversas patologías neurológicas, y especialmente a varios tipos de cáncer ⁶⁶. Anteriormente se ha señalado que la metilación del ADN juega un papel clave sobre la formación y mantenimiento de la memoria ⁶⁴.

2.4.3 Daños neurológicos por As_i podrían asociarse a cambios en metilación de genes neurales

Se reconoce que los cambios en la metilación genómica por exposición a una sustancia tóxica pueden ser sitio-específicos, por lo que se pueden dar de manera distinta en genes determinados. Con ello, al alterarse la metilación de genes clave del sistema nervioso, esto podría impactar negativamente sobre funciones del mismo, traduciéndose en alteraciones neuroconductuales. Esto se ve apoyado por evidencias como la de un estudio del año 2007, donde mediante la prueba de acondicionamiento contextual al miedo (CFC) se observó que en ratas, el acondicionamiento al miedo –que involucra al proceso de memorización- estuvo asociado a un decremento en la metilación del promotor del gen **RELN** ⁵⁸, el cual codifica a la proteína reelina.

La reelina está involucrada en los procesos de plasticidad neuronal; específicamente, mejora la inducción de potencialización a largo plazo (LTP), y una pérdida de su función conduce a déficits en la formación de memoria ^{58, 67, 68}. En 2011, Martinez *et al* ⁶⁹ reportaron que ratas expuestas a una dosis alta de As_i (36 ppm) de manera crónica y desde etapas tempranas del desarrollo, presentaron una hipermetilación en el promotor del gen RELN a los dos meses de edad, acompañada de un decremento en la capacidad de memoria de las ratas ⁶⁹. Esto da una prueba del importante papel que juega la metilación del gen RELN en el mantenimiento de funciones clave del sistema nervioso.

El mismo estudio ⁶⁹ encontró también que el As_i en las condiciones descritas causó un incremento en la abundancia de la forma no-metilada del promotor del gen **PP1 (proteína fosfatasa1)** (sugiriendo hipometilación del promotor) en el córtex y el hipocampo de ratas, acompañado de déficits dosis-dependientes en la memoria ⁶⁹. Esto mantiene congruencia con reportes anteriores que señalan que el proceso de memorización (medido por acondicionamiento al miedo) está asociado a la hipermetilación de PP1 ⁵⁸.

Por otro lado, Zarazúa *et al* en 2009 ⁷⁰ observaron que la exposición temprana a As_i (dosis 3 y 36 ppm) causa alteraciones en la mielinización de fibras nerviosas en el cerebro de ratas, acompañada de un decremento en el nivel de dimetil arginina ⁷⁰. Esto sugiere que el As altera la composición de

la mielina al interferir con la metilación de argininas presentes en el gen **MBP (Proteína mielina básica)**. La proteína MBP es un componente esencial de la mielina, que constituye un 30-40% del total de sus proteínas. Se ha sugerido que parte de la neurotoxicología del As podría deberse al daño en las fibras mielinizadas, que impacta en el proceso de transmisión de señales nerviosas ⁷⁰. Estos resultados coinciden con anteriores reportes que señalan que la metilación tiene un rol importante en la síntesis de MBP ^{71, 72}.

2.4.4 Cambios gen-específicos en metilación por As_i podrían impactar al sistema nervioso vía alteraciones en la transcripción de genes neurales

Como se mencionó anteriormente, el nivel de metilación de un gen influye en la transcripción del mismo, especialmente la metilación en su región promotora ^{12, 14-16} (figura 2). Esto sugiere que el As_i, al alterar la metilación en el promotor de genes neurales, causa cambios en su nivel de expresión, resultando así en efectos deletéreos sobre parámetros neuroconductuales. Esto tiene sentido debido a que diversos reportes señalan al As como un alterador de la expresión de genes neurales ^{4, 7, 8, 44, 64, 69, 70, 73}. Tyler *et al* (2013) reportaron que la exposición a una dosis de 50 partes por billón (ppb) de As_i causó cambios en la expresión de genes asociados al neurodesarrollo, incluyendo algunos involucrados al Alzheimer, y a la apoptosis y crecimiento neuronal ⁷³.

Hasta hoy no existen evidencias que prueben que el As_i altera simultáneamente y de manera correlacionada la expresión y metilación de algún gen clave del sistema nervioso. Sin embargo, estudios recientes señalan que la exposición a otras sustancias tóxicas u otros insultos ambientales sí pueden alterar la metilación del promotor de genes de importancia neurológica, con consecuentes cambios en su nivel de expresión impactando en la conducta ^{74, 75}. Por ello, puede hipotetizarse que el As_i también podría causar fenómenos similares.

En 2020 se reportó que la exposición aguda a tris (1,3-dicloro-2propil) fosfato (TDCIPP) desde la embriogénesis temprana (2h post fertilización) y hasta los 10 días post fertilización (dpf) resultan en hipermetilación del promotor del gen BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) acompañada de una infraexpresión del gen, lo que se asoció a un aumento en la vulnerabilidad hacia conductas similares a la ansiedad en hembras adultas de pez cebra ⁷⁵. Esto coincide con un estudio anterior que probó que la ingesta de una dieta alta en grasas (HFD por sus siglas en inglés) en ratones hembra durante 5 semanas antes de su apareamiento, resulta en hipermetilación e infraexpresión BDNF ⁷⁴.

BDNF es una proteína que funciona como factor de crecimiento, diferenciación y supervivencia neuronal ⁷⁶, jugando un rol clave en la regulación de la plasticidad sináptica y la estructuración de espinas dendríticas ⁷⁷. Se ha sugerido que la metilación de BDNF está asociada a la fisiopatología de padecimientos psiquiátricos como la esquizofrenia y desórdenes emocionales ⁸². Asimismo, el decremento en la síntesis de BDNF se ha relacionado a aberraciones en la habilidad cognitiva de individuos ⁷⁸⁻⁸¹.

En conjunto, las evidencias descritas sugieren que BDNF puede servir como marcador neurológico para evaluar efectos del As_i sobre la expresión y metilación de genes neurales. Cabe mencionar que una investigación reciente reveló que la expresión de BDNF se ve disminuida en ratones machos expuestos a As_i a 85 partes por millón (ppm), lo que condujo a alteraciones en la conducta social de los individuos ⁸³. Por ello sería interesante realizar estudios que determinen puntualmente si los cambios en la expresión de BDNF por As_i están asociados a cambios en la metilación de su promotor.

Asimismo, existen otros genes de los que se tienen evidencias de que el As_i altera su expresión o su metilación, pero no ambos, dejando pendiente la realización de estudios que correlacionen ambos parámetros moleculares. Un ejemplo es el gen **PPP1R1B**, que codifica la **fosfoproteína neuronal regulada por dopamina- y AMPc- (DARPP-32)**, la cual es una de las subunidades regulatorias de la enzima multimérica PP1 y tiene un rol importante en la comunicación neurona-neurona y las actividades neuronales mediadas por dopamina, por lo que es un marcador frecuentemente utilizado en estudios neurotoxicológicos.

Un estudio reciente reportó que en ratas expuestas a As_i (20 mg/kg) se produjo un decremento en la expresión de DARPP-32 Thr-34 ⁸⁴; un estado de fosforilación de la proteína en el cual funge como un inhibidor de PP1 ⁸⁵. Asimismo, como se mencionó anteriormente, el As_i se ha visto como un alterador de la metilación de PP1, causando hipometilación de su promotor e impactando negativamente sobre la memoria en ratas ⁶⁹. Esto tiene sentido debido a que PP1 se reconoce como un supresor de la memoria. De cualquier modo, aún falta profundizar estudios para determinar si los cambios en expresión y metilación de estos genes por As_i están relacionados.

2.5 Evidencias de efectos transgeneracionales por exposición a sustancias tóxicas

Hasta hoy, la mayor parte de los estudios sobre efectos transgeneracionales son dirigidos a efectos sobre la fisiología reproductiva y endocrina de los organismos ⁸⁶. Sin embargo, ha habido hallazgos

interesantes sobre efectos de este tipo sobre el sistema nervioso, traducidos en alteraciones conductuales ⁸⁷⁻⁹⁰. En 2012 un estudio demostró que la exposición gestacional a dosis bajas de bisfenol A (BPA) produce alteraciones multigeneracionales y transgeneracionales sobre la conducta social y la expresión génica de receptores a estrógeno, oxitocina, y vasopresina en ratones ⁸⁷.

Asimismo, un estudio reciente encontró que la exposición maternal a plomo condujo a efectos transgeneracionales en hembras sobre los niveles de BDNF en el cuerpo estriado y sobre parámetros conductuales como la locomoción ⁹¹. Además, en el mismo estudio los machos expuestos simultáneamente a plomo y a estrés prenatal mostraron efectos transgeneracionales sobre la actividad locomotora y sobre la metilación de BDNF ⁹¹. Con dichas evidencias se prueba que las sustancias tóxicas pueden promover alteraciones transgeneracionales sexo-dependientes sobre la expresión y la metilación de genes neurales, impactando en la conducta de múltiples generaciones.

En cuanto al As_i, no se han generado estudios que den evidencias sobre efectos transgeneracionales, por lo cual resulta necesario realizar estudios sobre el tema. En conjunto, las evidencias descritas anteriormente sugieren que la exposición gestacional a As_i podría alterar la metilación en el promotor de genes de importancia en el neurodesarrollo y la plasticidad cerebral, causando cambios en su nivel de expresión con repercusiones en parámetros neuroconductuales. Y que además, este conjunto de cambios podrían transmitirse a generaciones subsecuentes, de acuerdo al fenómeno de herencia epigenética transgeneracional ^{1,11}.

Este estudio fue diseñado para generar información que ayude a conocer más sobre ello, aprovechando características del pez cebra como modelo animal; principalmente (1) su desarrollo embrionario extrauterino que facilitará la exposición de un organismo en etapas gestacionales tempranas, y (2) su corto ciclo de vida, lo que ayudará a manejar y examinar múltiples generaciones en un periodo de tiempo relativamente corto.

Además, en el pez cebra se ha probado la existencia de múltiples genes de expresión constitutiva (housekeeping genes), útiles para la cuantificación relativa de expresión génica mediante RT-PCR. Principalmente y de acuerdo a múltiples estudios, los genes ribosomales se encuentran entre los más estables en cuanto a su expresión en los diversos tejidos del pez cebra ⁹²⁻⁹⁵. Asimismo, se ha demostrado que el gen rpl13a (proteína ribosomal L13a) es uno de los más fiables para su uso como normalizador de datos de expresión génica vía RT-PCR en estudios con tratamientos químicos ⁹⁶.

3. HIPÓTESIS

La exposición crónica al As_i en dosis relevantes al ambiente durante el desarrollo embrionario modifica el nivel de expresión de genes asociados al neurodesarrollo y la plasticidad cerebral en el pez cebra como consecuencia de una alteración del nivel de metilación en el promotor de dichos genes, y estos cambios se transmiten a generaciones subsecuentes.

4.- OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar si la exposición crónica al As_i en dosis relevantes al ambiente modifica el nivel de metilación en el promotor de genes asociados al neurodesarrollo y la plasticidad cerebral, causando alteraciones en su expresión en la generación expuesta y en sus descendientes en el pez cebra.

4.2 Objetivos específicos

1. Extraer el tejido cerebral de peces cebra de tres generaciones lineales (F0, F1 y F2).
2. Medir el nivel de expresión de los genes MBP, BDNF, DARPP-32 y RELN en los cerebros de los peces de las tres generaciones de pez cebra.
3. Evaluar el nivel de metilación del promotor de los mismos genes en todos los cerebros.
4. Determinar la relación entre expresión génica-metilación del promotor para los genes analizados.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño experimental

Los peces utilizados parten del diseño experimental descrito por Dipp *et al.* (2018)⁹⁷, donde se desarrollaron diversos ensayos sobre los individuos de la generación parental (F0) de este estudio. En resumen, se tomaron embriones de 4 horas post fertilización (hpf) para formar tres grupos (n=50); Control (CTR), As50ppb y As500ppb, mismos que estuvieron situados en medios con una concentración nominal de arsenito de sodio (NaAsO₂) (0, 50 y 500 ppb, respectivamente).

Las concentraciones de NaAsO₂ se mantuvieron constantes gracias a un sistema de flujo continuo previamente construido por el grupo de laboratorio, y las condiciones de crianza se mantuvieron como se especificó antes⁹⁷. A los 120 días post fertilización (dpf) los peces se reprodujeron, en un medio sin NaAsO₂, para obtener la generación F1; a partir de aquí, toda crianza estuvo libre de arsénico. Los peces F1 se reprodujeron a los 120 dpf para obtener la última generación (F2). El sacrificio de los peces para los ensayos moleculares se dio a los 127 dpf para las tres generaciones (figura 3), y todo individuo fue almacenado a -80°C.

Este estudio dio inicio desde la toma de las regiones cefálicas de las peces, mismas que previamente se almacenaron a -80°C. Se disecó el cerebro de 5 peces de cada sexo para cada tratamiento, y para cada una de las tres generaciones (figura 6). Se procuró que el proceso de disección fuera rápido y siempre en condiciones frías para evitar degradación del tejido cerebral. Cada cerebro fue colocado en tubos individuales de 1.5 ml rotulados y, fueron guardados a -80°C hasta su uso. Los cuerpos de cada pez fueron conservados para posibles usos posteriores.

5.2 Selección de genes

La selección de los genes se realizó con base en una serie de criterios para aumentar las probabilidades de encontrar efectos con impacto en el sistema nervioso en la generación expuesta y en las subsecuentes.

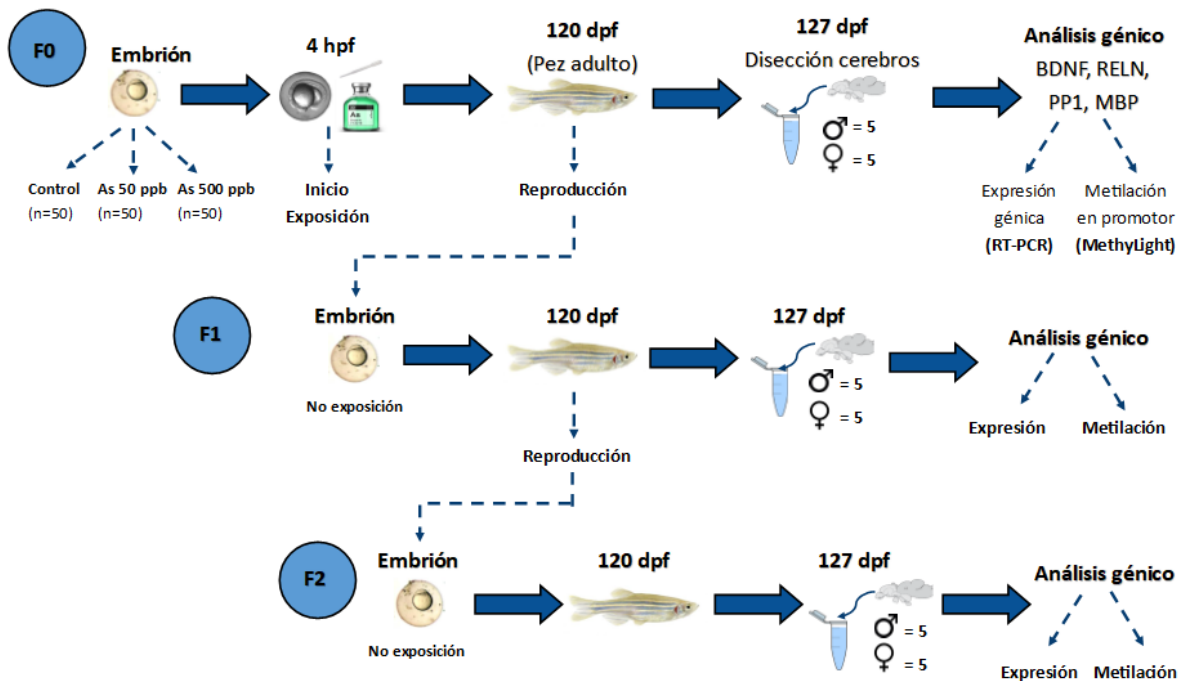


Figura 6.- Diseño experimental del estudio. Se partió desde la generación parental (F0) criada por Dipp *et al* (2018)⁹⁷. Las generaciones F1 y F2 se criaron en medios libres de arsénico, pero se siguió distinguiendo entre la progenie de cada grupo experimental (descendientes de control, de As50ppb y de As500ppb). Este estudio parte desde la disección cerebral; los peces se retomaron de su previo sacrificio y almacenamiento a -80°C a los 127 dpf.

Los criterios establecidos fueron:

- 1.- El gen se encuentra de manera conservada en el pez cebra
- 2.- El gen se asocia al neurodesarrollo y/o a la plasticidad cerebral y tiene repercusión en la conducta
- 3.- Existen evidencias de que su expresión se ve alterada por exposición a As_i.
- 4.- Se han dado reportes de alteraciones en la metilación de su promotor inducidas por As_i
- 5.- La metilación de su promotor se ha visto alterada por exposición a otros contaminantes ambientales.
6. Se ha probado que el gen es de alta fiabilidad para su uso como gen de expresión constitutiva (criterio exclusivo para la elección housekeeping gene)

Luego de la revisión bibliográfica, los genes elegidos coincidieron con los criterios de la manera ilustrada en la tabla 2.

Tabla 2.- Coincidencia de los genes seleccionados con respecto a los criterios establecidos para la selección de genes. *, la expresión del gen directamente no se ha visto alterada, pero sí la del complejo proteico al que pertenece la proteína del gen; NA, el criterio no aplica para la selección de este gen.

Gen\Criterio	1	2	3	4	5	6
rpl13a	✓	NA	NA	NA	NA	✓
MBP	✓	✓	*	✓	?	NA
PPP1R1B	✓	✓	✓	✓	?	NA
BDNF	✓	✓	✓	?	✓	NA
RELN	✓	✓	?	✓	?	NA

5.3 Cuantificación de niveles de expresión génica

5.3.1 Diseño de primers

Las secuencias de ARNm de cada gen de pez cebra fueron obtenidas de la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org>). En los genes con más de una secuencia de ARNm reportada, las secuencias fueron alineadas con la herramienta Clustal Omega del sitio web del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) (<https://www.ebi.ac.uk>), en busca de regiones conservadas. Con la herramienta PrimerQuest Tool de Integrated DNA Technologies (IDT) en <https://www.idtdna.com> se obtuvo una serie de posibles primers para cada gen, de entre los cuales se seleccionaron aquellos que estuvieran situados en las regiones conservadas. Asimismo, de los primers resultantes se eligió al par con menor probabilidad de formar estructuras secundarias. Para corroborar la especificidad de los primers se realizaron BLASTs (Basic Local Alignment Search Tool) en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los primers seleccionados fueron adquiridos en T4Oligo (<https://www.t4oligo.com>).

5.3.2 Verificación de viabilidad y estandarización de los primers por PCR punto final

Una vez sintetizados los primers, se realizaron ensayos de PCR punto final para su estandarización, con el objetivo de encontrar las condiciones idóneas para cada reacción de cada juego de primers (Fw y Rv). El objetivo fue obtener amplificaciones específicas para cada gen, sin la presencia de amplificaciones secundarias. Lo anterior se realizó corroborando de forma visual las reacciones en

electroforesis con geles de agarosa al 1.5%, los cuales se corrieron a 110 V durante 35 minutos. Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo a las instrucciones del kit Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen, # de catálogo 10342-020), con un número de ciclos fijo en 35. En la tabla 3 se enlistan los primers utilizados junto a las concentraciones y Tms finales en las que fueron empleados.

5.3.3 Extracción de ARN

Los cerebros de pez cebra fueron homogenizados con el reactivo TRIzol® y la extracción del ARN total de cada muestra se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, agregando sólo algunas variaciones al protocolo; brevemente, se utilizaron 50µl de TRIzol® para homogenizar cada cerebro de pez cebra adulto. Se agregaron 10 µl de cloroformo a cada muestra, se agitaron con vórtex durante 30 segundos y se centrifugó a 12,000 x g a 4°C por 15 minutos para separar las fases.

La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y las fases restantes fueron almacenadas a -20°C para su posterior uso. A la fase acuosa se le añadió 25 µl de isopropanol y se dejó incubar una noche (~16 hrs) a -20°C para después centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante. El pellet fue lavado con 50 µl de etanol al 75% y centrifugado a 7,500 rpm por 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar al aire el pellet con la apertura de los tubos hacia abajo sobre papel seda durante 10-15 minutos.

El pellet seco fue resuspendido en 25 µl de H₂O libre de nucleasas y se guardó a -20°C hasta su uso. La concentración de ARN obtenido en las purificaciones fue medida en un NanoDrop Lite (Thermo Scientific), y para corroborar la calidad y conservación de cada muestra se realizaron electroforesis en gel al 1% de agarosa con TAE 1x, y se corrieron los geles a 110 V durante 35 minutos.

5.3.4 PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR)

Se utilizaron 500 ng de cada muestra de ARN total para obtener ADNc con el uso de High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de invitrogen (# de catálogo 4368814) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones de RT-PCR se realizaron con SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, # de catálogo 4309155) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las concentraciones utilizadas para cada primer están indicadas en la tabla 3. Las reacciones se

corrieron en un termociclador Step One Plus de Applied Biosystems, con un número de ciclos fijo en 40 repeticiones, con temperaturas dependientes a cada par de primers (tabla 3).

5.4 Evaluación de niveles de metilación

5.4.1 Extracción de ADN genómico

El aislamiento del ADN se realizó siguiendo las instrucciones del manual de usuario de TRIzol con algunas modificaciones. Brevemente, los tubos que contenían la fase orgánica e interfase resultante de la homogenización de los cerebros con TRIzol, fueron recuperados y se centrifugaron a 12,000 x g durante 5 minutos para volver a separar fases y descartar cualquier remanente de fase acuosa. Para la precipitación se agregaron 18 µl de etanol al 100% y se centrifugaron las muestras 15 minutos a 15,000 x g. Se realizó un solo lavado con 50 µl de solución de citrato de sodio, centrifugando a 2,500 x g por 5 minutos.

Finalmente se agregaron 75µl de etanol al 75% para el lavado final y se centrifugó una vez más a 2,500 x g durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 20 µl de buffer mix, una mezcla entre los buffers de solubilización y de lisis (tabla 2). Este buffer tiene la capacidad de disociar el ADN de las histonas y de solubilizar el ADN disociado. Las muestras fueron incubadas a 55°C durante una noche (~16 hrs.) para la digestión enzimática de las histonas por acción de la proteinasa K. Por último, se midió la concentración de cada muestra en un NanoDrop ND-1000™ y se almacenaron a -20°C hasta ser utilizadas.

Tabla 2.- Buffers utilizados para la extracción de ADN

Nombre	Ingredientes
Buffer de solubilización	8 mM NaOH + 1 mM EDTA, pH 7-8.
Buffer de lisis	14.74µl proteinasa K a 19 mg/ml + 100 µl SDS al 10% + 885.26 H ₂ O ultrapura
Buffer Mix	14.74 µl proteinasa K a 19 mg/ml + 10 g SDS + Buffer de solubilización hasta 1 ml

5.4.2 Ensayo de bisulfito

El ensayo se realizó con 500 ng de ADN de cada muestra, los cuales fueron utilizados para la conversión con bisulfito. El bisulfito de sodio convierte a las citosinas no metiladas en uracilos (que posteriormente terminará siendo reemplazado por timinas durante una reacción de PCR), mientras que las citosinas metiladas permanecen como citosinas (figura 8.2). Con ello, al identificar si hubo cambios en una región de ADN se puede determinar su estado de metilación original.

5.4.3 Diseño de primers

Dada la inexistencia de reportes que señalen puntualmente la localización del promotor de los genes analizados en el genoma del pez cebra, se optó por predecir esta región. Las secuencias de los genes fueron obtenidas de Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>); esta base de datos muestra la secuencia del gen de interés diferenciando entre exones e intrones. Al tener definido el primer exón de un gen, este se considera su sitio de inicio de la transcripción (TSS). Asimismo, el promotor de un gen usualmente se encuentra inmediatamente río arriba del TSS, por lo que es altamente recomendable que el sitio donde se localizarán los primers se encuentre cercano al TSS (Davidovic, 2014).

Los primers deberán localizarse sobre islas CpG (segmentos de ADN con alto contenido de dinucleótidos CpG ^{98, 99}) en el promotor región del promotor para que la eficacia de la reacción dependa del estado de metilación original (figura 8.3). Una isla CpG consta de al menos 200 bases con un contenido de G+C de al menos el 50%, y una proporción de frecuencia CpG (observada vs estadísticamente esperada) de ≥ 0.6 ¹⁰⁰. La búsqueda de islas CpG puede considerar un área de hasta 5,000 pb río arriba ^{101, 102}; este criterio fue empleado con éxito por Willems *et al* (2016) ¹⁰³ para cuantificar el nivel de metilación en el promotor de genes en células eucariotas.

En nuestro estudio, se consideró como promotor a la secuencia desde las 3,000 b río arriba del primer exón, y hasta el inicio de este exón. En dicha región existió un solo segmento de ≥ 200 pb con un porcentaje mayor a 45% de C+G, mismo que se consideró isla CpG y sobre él se localizaron nuestros primers (figura 7). El diseño de los primers se realizó con el software MethylPrimer Express v1.0 de Applied Biosystems, utilizando el protocolo para la obtención de primers para MSP (Methylation Specific PCR). El uso de los primers diseñados fue optimizado de la forma que se describió anteriormente con los primers de los ensayos de expresión génica.

Estructura del gen BDNF en pez cebra

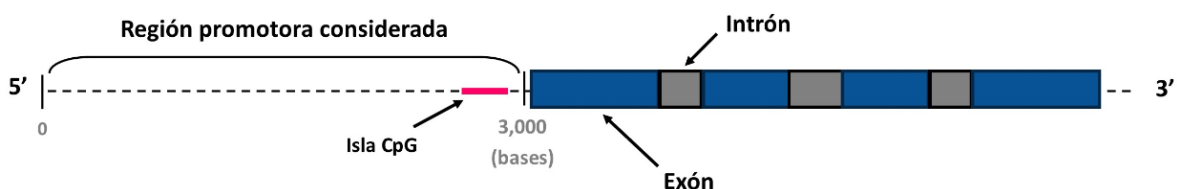


Figura 7.- Ilustración de la estructura del gen BDNF en el genoma del pez cebra. La región que se consideró como el promotor del gen fue la situada inmediatamente río arriba del primer exón, dado que se considera el sitio de inicio de la transcripción (TSS). Dentro de este promotor se encontró una isla CpG situada desde el nucleótido 2746 y hasta el 2990 (dentro de las 3000 bases del promotor, de 5' a 3'), y los primers se diseñaron dentro de dicho segmento.

Tabla 3.- Primers utilizados para los ensayos de RT-PCR de las dos etapas del estudio: expresión y metilación.

Expresión génica					
Gen	Sentido	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño de amplicon	Concentración de uso
rpl13a	Forward	5'-ATGGCGGACCGATTCAATAA-3'	66.5	132	0.5 uM
	Reverse	5'-GTTGATACCCTCACACCTCAC-3'	61.4		
MBP	Forward	5'-CGGAGGAGACAAGAAGAGAAAAG-3'	63.6	105	0.5 uM
	Reverse	5'-GAGGACACAAAGCTCCTGAA-3'	62.5		
BDNF	Forward	5'-GCGGACGAATATCGCAGAATA-3'	66.2	91	0.4 uM
	Reverse	5'-CCAGTCGTAAAGGAGACCATT-3'	64		
RELN	Forward	5'-GTCAGGAACCGCACTTATCTT-3'	62.4	121	0.4 uM
	Reverse	5'-CGGCACTCCTTTAGTGATGAA-3'	64.4		
DARPP-32	Forward	5'-CTGACCCACTTACCTTCGTATG-3'	62.7	100	0.5 uM
	Reverse	5'-CAACTCTGCTCTGTGTCTCAA-3'	61.4		
Nivel de metilación en promotor (BDNF)					
Tipo	Sentido	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño de amplicon	Concentración de uso
Independiente	Forward	5'-GGTTTAGGTGTTTAAATGTAT-3'	52.3	80	0.6 uM
	Reverse	5'-ACAATCAACTCCTACTTAAA-3'	51.1		
Metilado	Forward	5'-ATGTCGTGAATTGTAGGTTTC-3'	58.5	60	0.4 uM
	Reverse	5-GTCTCTACGTACATTACGCGT-3'	58.9		
No metilado	Forward	5'-AAAATGTTGTGAATTGTAGGTTTT-3'	59.7	60	0.4 uM
	Reverse	5'-CACATCTCTACATACTTACACAT-3'	55.4		

5.4.4 MethySYBR de un paso

Para medir el nivel de metilación en la región promotora se empleó el método MethySYBR¹⁰⁴; una variación del método original MethyLight¹⁰⁵, donde la principal diferencia es el uso de SYBR green como fluoróforo en lugar de sondas TaqMan especializadas, con lo que se reducen considerablemente los costos. Ambos métodos están basados esencialmente en reacciones de PCR en tiempo real, donde los primers y/o sondas se elaboran para que solo se amplifiquen las copias metiladas o las no metiladas de un mismo gen.

En el caso de MethySYBR, por ausencia de sondas, los primers son los que se especializan, y las amplificaciones se comparan contra una referencia del ADN total, que generalmente es la amplificación de un par de primers cuyo blanco es una zona sin dinucleótidos CpG (figura 8). Las reacciones de PCR en tiempo real (RT-PCR) se realizaron con el kit SYBR Green PCR Master Mix (# de catálogo 4368814) utilizando ADN tratado con bisulfito. Las concentraciones usadas para cada primer se especifican en la tabla 3.

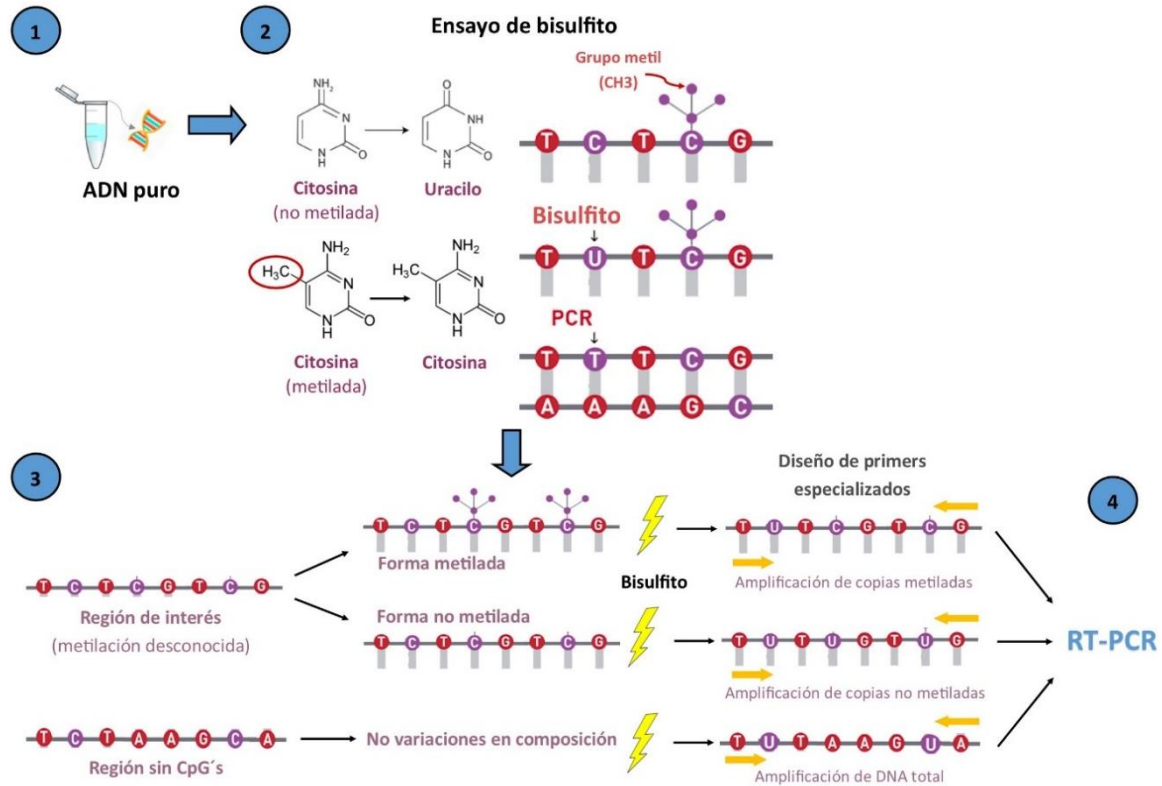


Figura 8. Fundamento del método MethySYBR. El ADN previamente purificado (1) se somete al ensayo de bisulfito (2), donde las citosinas no metiladas se convertirán en uracilos y las citosinas metiladas permanecerán como citosinas. Posteriormente, se selecciona una región de interés a amplificar (en nuestro caso, el promotor de BDNF). Este segmento podrá tener principalmente dos posibles conformaciones: con metilación en sus CpGs o sin metilación en sus CpGs. Por esto, se diseñarán dos pares de primers (3); uno que sea homólogo al sitio de interés si este mantuvo sus citosinas como citosinas (forma metilada), y otro que sea homólogo al mismo sitio si este ahora presenta uracilos donde estuvieron sus citosinas (forma no metilada). Un tercer par de primers será diseñado para sobreponerse a un segmento en el promotor carente de CpGs, de modo en que estos sitios no tengan posibilidad de sufrir cambios luego de la conversión de bisulfito. Esto asegurará que este par de primers amplificará de manera total nuestro sitio de interés, y servirá como referencia del ADN total introducido en nuestras reacciones de RT-PCR (4).

5.5 Análisis estadístico e ilustración de datos

Los datos obtenidos en las reacciones de RT-PCR para los ensayos de expresión génica y de los niveles de metilación fueron capturados y visualizados en StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems). El procesamiento de los datos se realizó mediante el método comparativo ($\Delta\Delta Ct$) y posteriormente se aplicaron ANOVAs de una vía para el análisis estadístico utilizando el programa StatView 5.0. Para la ilustración de los niveles de expresión génica se utilizó la variable fold ($2^{-\Delta\Delta Ct}$); el fold promedio del grupo control se tomó como la unidad (1.0), y los promedios de los grupos de arsénico se normalizaron con respecto a su grupo control.

La validez de los datos generados por el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ está ligada a la fiabilidad del control endógeno utilizado para la normalización de los datos, es decir, depende de que el gen constitutivo realmente tenga una expresión constante. Por ello, se realizaron análisis estadísticos para corroborar que no hubo variaciones en la expresión de *rpl13a* luego de la exposición a As₂. Para comprobar la constancia entre tratamientos se realizó una prueba de comparación múltiple de Turkey con todos los valores Ct obtenidos de los grupos experimentales. Asimismo, los datos obtenidos de machos y hembras fueron analizados utilizando una prueba t con corrección de Welch para corroborar que las lecturas fueron constantes entre sexos.

Para ilustrar los niveles de metilación se calculó el porcentaje de metilación de cada muestra a través de una adaptación de la ecuación original mencionada por Hehar *et al.* (2017)¹⁰⁶: %methylation = $100 / [1 + 2^{(\text{Ct}_{\text{Methylated}} - \text{Ct}_{\text{Unmethylated}})}]$. Para reconocer si existió una relación entre el estado de metilación del promotor de un gen y su nivel de expresión se calculó el coeficiente de correlación de Pearson, comparando el porcentaje de metilación contra la expresión génica en un mismo individuo. Todas las pruebas estadísticas y gráficas se realizaron en GraphPad Prism 8.0.1¹⁰⁷.

6.- RESULTADOS

6.1 Expresión de genes asociados al neurodesarrollo y la plasticidad cerebral

A raíz de las pruebas aplicadas para determinar la constancia en la expresión de *rpl13a* se observó que no hubo diferencias significativas entre los valores de Ct entre tratamientos ($p = 0.9484$) o entre sexos ($p > 0.05$), indicando que la expresión de *rpl13a* se mantuvo constante y otorgando fiabilidad a las mediciones de expresión de nuestros genes blanco (*MBP*, *PPP1R1B*, *BDNF* y *RELN*) (anexo I).

Las pruebas estadísticas hechas revelaron que la expresión del gen *BDNF* se vio significativamente reducida en los machos expuestos a 500 ppb de As en F0 [$F(2,12) = 4,098$, $p = 0.0468$] y F2 [$F(2,11) = 5,625$, $p = 0.0208$]. Para las hembras, *BDNF* redujo su expresión en el grupo As 500 ppb en F1 [$F(2,12) = 7.372$, $p = 0.0082$], y en F2 en el grupo As 50 ppb [$F(2,11) = 5.982$, $p = 0.0175$]. En términos generales, *BDNF* mostró efectos transgeneracionales en ambos sexos (decremento de expresión en F2), pero fue sólo en machos donde el efecto se mostró conservado, dado que se vio en los progenitores (F0) y en la progenie (F2) de un mismo grupo experimental, lo que indica un efecto transgeneracional de forma sexo-dependiente.

En el gen *Darpp-32* se redujo la expresión en los machos expuestos a ambas dosis de arsénico en la generación F1 [$F(2,12) = 6.142$, $p = 0.0146$]. En los machos de las generaciones F0 y F2 no hubo efectos estadísticamente significativos, al igual que en las hembras de las tres generaciones (tabla 4 y figura 8). Para los genes *MBP* y *RELN* no se encontraron cambios en su nivel de expresión en ningún tratamiento, sexo o generación.

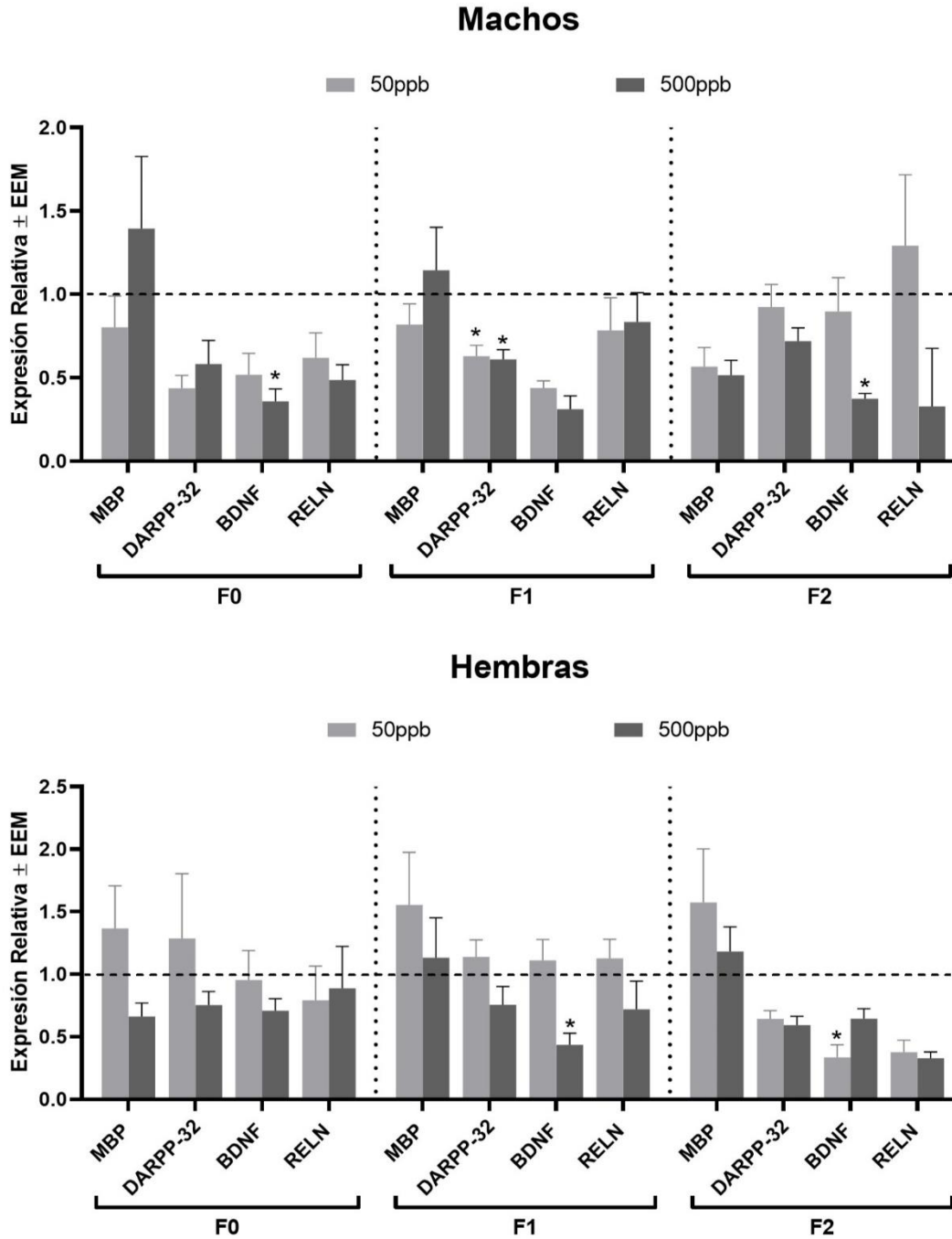


Figura 9.- Resultados de los ensayos RT-PCR para medir niveles de expresión génica. La exposición ancestral a arsénico redujo la expresión de BDNF de forma género-dependiente en la generación F2. El valor fold de las muestras fue obtenido de acuerdo al método $\Delta\Delta C_t$. El fold promedio en el grupo control fue tomado como la unidad (1.0, también puede interpretarse como el 100%), y los fold promedio de los grupos con arsénico se normalizó con respecto a su control (siempre comparaciones entre peces del mismo sexo y generación). Las cantidades por encima de la unidad (marcada con una línea punteada horizontal) se consideran sobreexpresión; por debajo de 1.0 se consideran infra expresión. * = $p < 0.05$

6.2 Nivel de metilación en el promotor de los genes

Con los resultados de los ensayos de expresión génica se decidió realizar los protocolos MethySYBR sólo sobre el gen BDNF en los machos de las generaciones F0 y F2, debido a que fue el único gen/sexo que mostró reducción significativa por exposición directa (F0) y transgeneracional (F2) en una misma dosis de arsénico (500ppb).

Los ANOVA univariados sobre los $\Delta\Delta C_t$ de las muestras mostraron un incremento en la expresión de la forma metilada del promotor de BDNF en la generación parental (F0) [$F(2,8) = 21.485$, $p = 0.0006$]; el análisis post-hoc mostró que el incremento fue significativo en los dos grupos expuestos a arsénico comparados con el grupo control (As50ppb; $p = 0.0041$, As500ppb; $p = 0.0002$) (figura 6). Para la forma no metilada en la misma F0 no se encontraron cambios significativos [$F(2,11) = 3.916$, $p = 0.052$]. En F2 no se encontraron efectos significativos sobre la expresión de ninguna de las formas de metilación del promotor de BDNF ([$F(2,8) = 1.802$, $p = 0.226$] para la forma metilada y [$F(2,10) = 1.975$, $p = 0.1893$] para la forma no metilada). Todos estos datos se enlistan en la tabla 5.

Estado de metilación del promotor de BDNF en machos

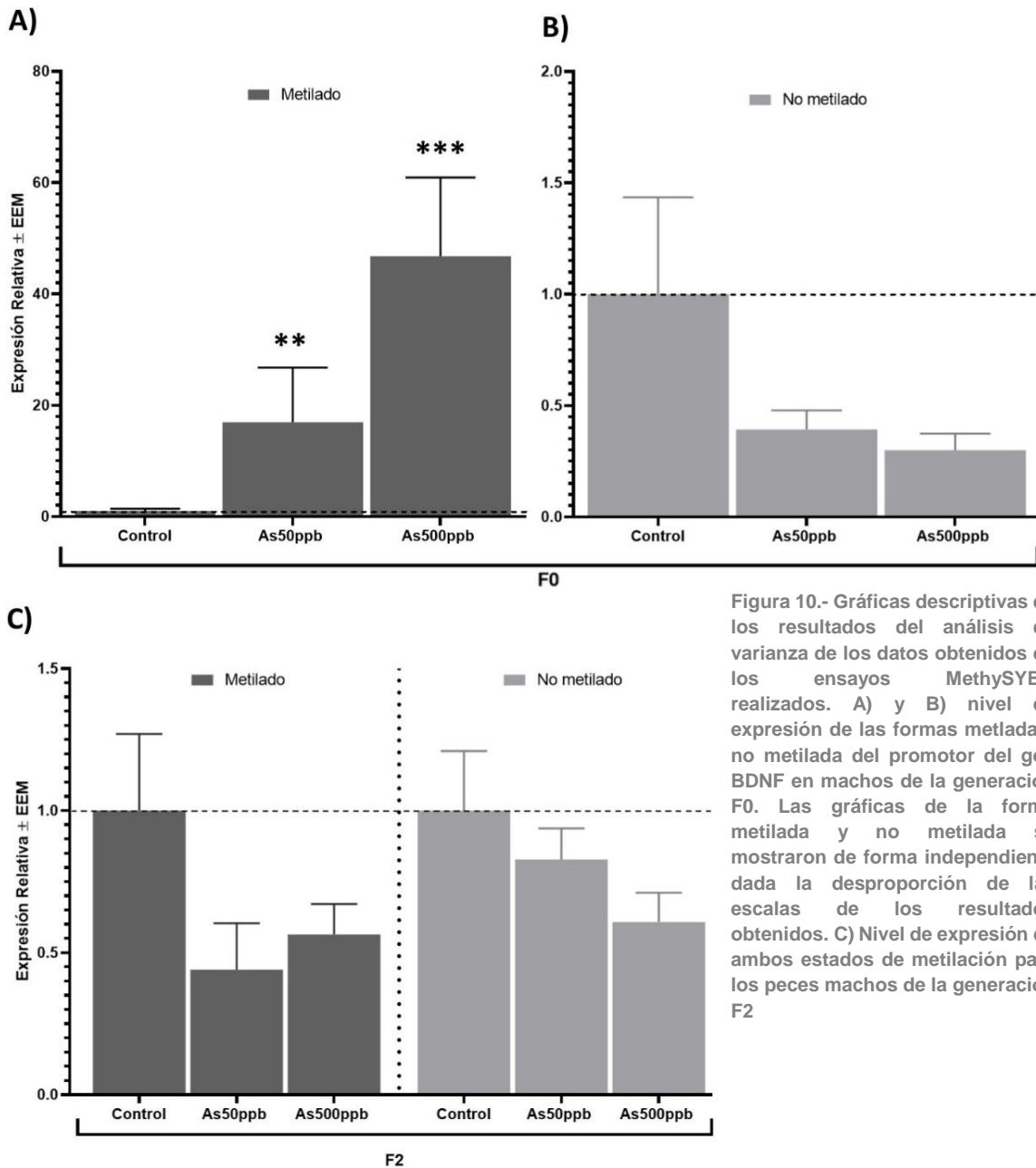


Figura 10.- Gráficas descriptivas de los resultados del análisis de varianza de los datos obtenidos de los ensayos MethySYBR realizados. A) y B) nivel de expresión de las formas metilada y no metilada del promotor del gen BDNF en machos de la generación F0. Las gráficas de la forma metilada y no metilada se mostraron de forma independiente dada la desproporción de las escalas de los resultados obtenidos. C) Nivel de expresión de ambos estados de metilación para los peces machos de la generación F2

Los datos de expresión de ambas formas de metilación fueron conjuntados y traducidos a un porcentaje de metilación para cada muestra, del modo descrito anteriormente en el punto 5.5 (metodología). El análisis de varianza de dichos datos arrojó que hubo cambios estadísticamente significativos en el porcentaje de metilación en F0 [$F(2,8) = 47.945, p < 0.0001$], viéndose aumentado

tanto en As50ppb ($p = 0.0001$) como en As500ppb ($p < 0.0001$). En la generación F2 no se observaron cambios en ninguno de los tratamientos con arsénico [$F(2,8) = 1.874$, $p = 0.215$] (figura 7).

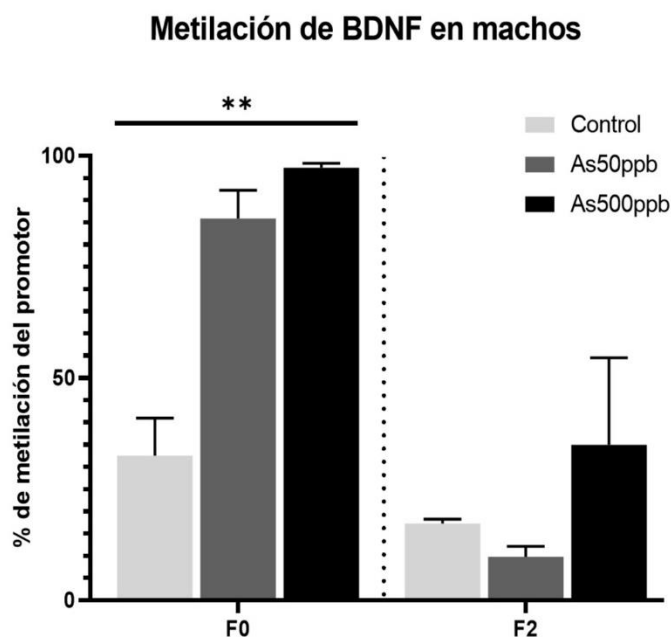


Figura 11.- Demostración ilustrativa del nivel de metilación en el promotor de BDNF en los peces macho de F0 y F2. Los resultados de los ensayos MethySYBR son traducidos a porcentajes para hacer una ilustración explícita y concisa. Los porcentajes fueron analizados con ANOVAs de una vía. ** = $p < 0.005$

6.3 Relación entre la metilación del promotor y la expresión de los genes analizados

La prueba estadística de Pearson demostró que existió una correlación entre el nivel de metilación (porcentaje) del promotor de un gen y el nivel de expresión de dicho gen en un mismo individuo, en los peces de la generación F0. Ambas variables mostraron un comportamiento de proporcionalidad inversa entre ellas, es decir; cuando el porcentaje de metilación aumentó, la expresión decreció. Contrariamente, en F2 no se repitió el caso, y estadísticamente no se encontró correlación entre ambas variables (tabla 6).

Correlación de Pearson		
	r	p
F0	-0.9334	<0.0001
F2	-0.2565	0.4744

Tabla 6.- Coeficiente de correlación de Pearson entre el porcentaje de metilación del promotor de BDNF y su nivel de expresión en machos. En la generación F0, un aumento en el porcentaje de metilación en el promotor de BDNF significó un decremento en su expresión, En F2 no existió relación entre ambas variables; un cambio en una de ellas no se ligó a un cambio en la otra.

7. DISCUSIÓN

Este estudio buscó determinar si la exposición crónica al arsénico inorgánico (As_i) en dosis relevantes al ambiente y durante etapas tempranas del desarrollo causa alteraciones en la metilación y la expresión de genes clave en el neurodesarrollo y la plasticidad cerebral. Se hipotetizó que ambos fenómenos estarían ligados y tendrían repercusión en la conducta, y que además los efectos se darían de forma transgeneracional. Para probarlo, en esta investigación se analizó la expresión y la metilación de cuatro genes que juegan un papel importante en el neurodesarrollo y/o la plasticidad cerebral: MBP, Darpp-32, BDNF y RELN, resultando en algunos hallazgos interesantes (anexo V).

7.1 El As_i causó alteraciones en la expresión génica en múltiples generaciones

7.1.1 Los efectos sobre la expresión de MBP, RELN y PPP1R1B fueron escasos

Al analizar los genes MBP y RELN no se encontraron efectos estadísticamente significativos sobre su expresión en ningún sexo, generación o tratamiento. En la literatura no existen hasta ahora reportes de cambios en la expresión del gen RELN por efecto del As_i. En el caso de MBP, Zarazúa *et al* (2009)⁷⁰ observaron un decremento en la síntesis de mielina, sin embargo no se refieren a un decremento en la expresión de MBP específicamente. Entonces, nuestro estudio no aportó datos novedosos que pudieran contrastarse con evidencias anteriores en cuanto al efecto del As_i sobre estos genes.

En PPP1R1B el nivel de expresión varió en los machos de la generación F1, reduciéndose en ambos grupos de As (figura 9). Las evidencias previas muestran que el As_i puede causar una reducción en la expresión de Darpp-32 Thr34⁸⁴, una de las conformaciones de la proteína Darpp-32 determinada por su estado de fosforilación. En un futuro próximo sería muy útil realizar inmunoensayos con las soluciones proteicas de los cerebros de nuestros peces, que fueron conservadas a - 80°C luego de los protocolos de purificación de ácidos nucleicos. Estos ensayos permitirían reconocer si la reducción de ARNm de PPP1R1B en F1 está acompañada de una reducción de Darpp-32 Thr34

7.1.2 El As_i causó disminución sexo-dependiente en niveles de ARNm de BDNF en F0 y F2

La exposición directa al As_i se ha asociado a cambios en la expresión de genes clave para el sistema nervioso cuando la exposición se da en dosis relevantes al ambiente^{108, 109}, y cuando se da durante etapas tempranas del desarrollo⁷³. En nuestro estudio, los peces tuvieron una exposición crónica

desde las 4 horas post fertilización (hpf), generando efectos sexo-dependientes en la expresión de BDNF; los machos del grupo As500ppb mostraron un decremento significativo del nivel de ARNm de BDNF en F0 (por exposición directa) y en F2 (por exposición transgeneracional) (figura 9).

Este resultado coincide con los de Htway *et al.* (2019)⁸³, quienes también reportaron una inhibición de la expresión del gen BDNF en el macho adulto por exposición directa a As_i durante la gestación. Ambos trabajos difieren en el modelo animal y las dosis de As_i empleadas; en nuestro estudio las dosis fueron más bajas que el trabajo de 2019, donde se emplearon dosis de 85 ppm en ratones⁸³. Además, nuestro estudio evaluó efectos de una exposición crónica al As_i, mientras que Htway *et al.* (2019)⁸³ realizaron una exposición aguda. De cualquier modo, ambos estudios señalan que parte de la neurotoxicidad del As_i podría estar mediada por un silenciamiento parcial del gen BDNF.

Cabe resaltar que este estudio aporta valiosas evidencias que complementan los datos anteriores, al encontrar que los cambios sexo-dependientes en la expresión de BDNF también se presentaron en los peces del grupo As500ppb en F2. Esto significa la primera evidencia a nivel molecular de que un efecto neurotóxico por exposición al As_i puede conservarse a través de generaciones. Asimismo, este es el primer reporte de un efecto transgeneracional sobre la expresión del gen BDNF.

Aún se desconoce por qué el efecto estuvo ausente en F1, donde los peces tuvieron contacto directo con el As_i durante su forma gamética (figura 3). Hasta hoy no existen antecedentes de un fenómeno similar en estudios de efectos multigeneracionales, donde un efecto causado por una sustancia tóxica se ausente en la descendencia y reaparezca en la siguiente generación. Por ello, no queda claro si se trata de un fenómeno caracterizable o si fue consecuencia de un error en algún punto de nuestro procedimiento. Para aclararlo harán falta estudios futuros que profundicen en el tema.

Notablemente, nuestro resultado visto sobre la expresión de BDNF tuvo una marcada dependencia de sexo, afectando mayormente a los machos. La dependencia de sexo en efectos del As_i ha sido reportada previamente en diversos estudios^{110,111}. Winterbottom *et al.*¹¹² reportaron cambios sexo-dependientes en la expresión de múltiples genes en la placenta de humanas que consumieron agua contaminada con As_i durante el embarazo. Aparentemente esta discriminación entre sexos podría estar asociada a mecanismos distintos en un efecto u en otro. Por ejemplo, el impacto del As_i en un gen determinado podría ser distinto entre machos y hembras si el gen está ligado al sexo, o si la expresión del gen está ligado a factores endocrinológicos que funcionan distinto entre sexos.

En cuanto a los cambios vistos sobre la expresión de BDNF, su especificidad entre sexos podría estar asociada a una relación entre BDNF y el estrógeno, que ha sido sugerida en distintas ocasiones. En 1995 se reportó un incremento de los niveles de ARNm de BDNF en el hipocampo de ratas como resultado de un tratamiento con estrógeno a largo plazo ¹¹³. Poco después se evidenció que los niveles de ARNm de BDNF en el hipocampo fluctúan de significativamente durante el ciclo estral ¹¹⁴, sugiriendo que la expresión de BDNF puede verse influenciada por actividad hormonal.

Posteriormente se señaló que existe una relación directa entre BDNF y el receptor alfa a estrógeno (ER α) ¹¹⁵, dado que se observó una normalización en el nivel de ARNm de BDNF en ratas previamente gonadectomizadas, al tratarlas con benzonato de estradiol. Estas evidencias permiten hipotetizar que, en cuanto a nuestros resultados, los niveles elevados de estrógeno en los peces cebra hembras podrían estar promoviendo la expresión de BDNF, amortiguando el decremento de ARNm causado por el As_i. En los machos, los bajos niveles de estrógeno no habrían permitido contrarrestar el silenciamiento parcial del gen, permitiendo que la baja en su expresión fuera evidente.

7.2 El As_i alteró la metilación del promotor de BDNF en la primera generación

Este estudio buscó aportar evidencias con un enfoque integral, que relacionaran directamente cambios en expresión con cambios en la metilación del promotor de nuestros genes, y a su vez asociar estos cambios a efectos del As_i sobre funciones cognitivas. Por ello, al no encontrar cambios en la expresión de MBP y RELN se omitieron los ensayos de metilación en dichos genes. Esto no permitió generar datos contrastables con las evidencias previas sobre los efectos del As sobre ambos genes, donde se citan cambios en su metilación ^{69,70}.

En el caso de PPP1R1B, los cambios encontrados en su expresión podrían tener un gran potencial a futuro, sin embargo al no haberse dado de manera transgeneracional (en F2), seguían sin estar lo suficientemente apegados a nuestra hipótesis y objetivos. Por ello consideramos que la mejor decisión fue enfocar nuestros recursos en realizar los ensayos de metilación en BDNF, dado que los cambios en su expresión fue el resultado más contundente y que mejor cumplía nuestros objetivos.

Dicho lo anterior, se procedió a evaluar el nivel de metilación en el promotor de BDNF en los machos de F0 y F2, dado que estas fueron las generaciones y el sexo donde se vieron los cambios en la expresión del gen. Los ensayos MethySYBR revelaron, en términos generales, que en F0 existió una

hipermetilación del promotor de BDNF en ambas dosis de As_i con respecto al grupo control, mientras que en F2 estos cambios no estuvieron presentes.

Puntualmente, en F0 hubo un incremento en la expresión de la forma metilada del promotor de BDNF (figura 10.A), traduciéndose en un incremento en el porcentaje de metilación de dicha región (Figura 11). Mediante una prueba de correlación de Pearson se comprobó que en esta generación existió una correlación negativa entre el porcentaje de metilación del promotor del gen y su nivel de expresión (tabla 6). De este modo, nuestro resultado coincide con las hipótesis previas que dictan que la hipermetilación en el promotor de un gen provoca una disminución en su transcripción^{13-15, 17}, y además significa la primera evidencia de que la exposición gestacional a As_i puede causar una hipermetilación en el promotor de BDNF, conduciendo a un decremento en su expresión.

Aún desconocemos por qué en el grupo As50ppb existió hipermetilación del promotor pero no infraexpresión del gen. Una posible explicación es que bajo 50ppb de As_i el aumento en la expresión de la forma metilada fue menor que a 500ppb (figura 10.A), haciendo que ese grado de hipermetilación no fuera suficiente para disminuir la expresión del gen de manera significativa. Otra hipótesis es que con 500ppb de As_i podrían estarse activando otros mecanismos represores de la expresión génica, afectando la transcripción de BDNF. De cualquier modo harán falta pruebas de mayor profundidad para determinar cuál es la causa real de este fenómeno.

7.2.1 Ausencia de efectos sobre la metilación de BDNF en F2 y sus posibles causas

A diferencia de los resultados vistos sobre la expresión de BDNF, la metilación de su promotor no se vio afectada en la generación F2 (figuras 10.C y 11). Es decir, los efectos del As_i sobre la metilación del gen no se dieron de forma transgeneracional. Consecuentemente, en F2 no existió correlación entre la metilación del promotor de BDNF y su expresión, a diferencia de lo visto en F0 (tabla 6). Una de las causas de la variabilidad de estos resultados entre generaciones podría asociarse a la complejidad de la estructura del gen BDNF.

En el pez cebra se ha demostrado que BDNF contiene múltiples promotores regulados independientemente y exones no transcritos en 5', de manera similar a la estructura en mamíferos¹¹⁶, resultando en en docenas de posibles variantes transcriptómicas que al final codifican una proteína BDNF idéntica¹¹⁷. En nuestro estudio se analizó un solo sitio de una región sugerida como el promotor de BDNF por su cercanía al TSS (primer exón). Por ello, sigue abierta la posibilidad de

que en F2 existiera hipermetilación en otros promotores conduciendo a la infraexpresión de BDNF, siendo una posible explicación de la poca coincidencia entre los resultados de metilación en F0 y F2.

Asimismo, los cambios en metilación pudieron darse en diferentes sitios reguladores de la transcripción en la secuencia de BDNF, que incluso podrían encontrarse en la misma isla CpG analizada en nuestro estudio. Por ejemplo, en ensayos de cuantificación de metilación basados en PCR (como MethySYBR) es altamente recomendado reconocer si hay secuencias en nuestra isla CpG donde se adhieran factores de transcripción (FT) ¹⁰¹, debido a que la metilación puede reprimir la unión de los FTs al promotor de nuestro gen de interés, inhibiendo su expresión ¹¹⁸.

7.2.2 La alteración de otros procesos epigenéticos pudo tener influencia sobre nuestros resultados

Es importante resaltar que, como se mencionó anteriormente, hay otros mecanismos epigenéticos además de la metilación que pueden influir en la transcripción vía cambios estructurales de la cromatina; un ejemplo es la inducción de modificaciones post-traduccionales de histonas (PTHM). Esta tesis forma parte de un estudio mayor que inicia con el diseño experimental descrito en Dipp et al (2018) ⁹⁷, y finaliza con el estudio de Valles *et al* (2020) ¹¹⁹, donde nuestro equipo reportó un incremento en los niveles de H3K4me3 (i.e. una modificación epigenética de la histona H3, con la adición de 3 grupos metilo en la lisina 4) en peces cebra hembras del grupo As500ppb en F0 y F2. Mientras tanto en machos, los niveles de H3K4me3 solo se vieron aumentados en F0 ¹¹⁹.

Diversos estudios han sugerido que H3K4me3 es un marcador epigenético asociado a la activación transcripcional de genes involucrados con la transmisión sináptica y la actividad neuronal ¹²⁰. Además, existen reportes que señalan que la expresión de BDNF puede ser regulada activamente por una combinación de histonas donde se incluye a H3K4me3 ¹²¹. Por ello, se puede hipotetizar que los efectos de la exposición a As_i sobre la metilación del promotor de BDNF y de histonas (H3K4me3) en nuestros peces pudieron estar correlacionados de alguna forma.

Anteriormente se ha demostrado que la metilación de ADN y las PTHM se asocian directamente para influir en la transcripción. Esto a través de complejos mecanismos moleculares donde participan proteínas que son capaces de identificar y unirse a los dinucleótidos CpGs metilados ¹²²⁻¹²⁵ para reclutar deasetilasas y metilasas de histonas (HDACs y HMTs, respectivamente), entre otros complejos represores de la transcripción ^{126,127}. Esto sugiere que la metilación del ADN podría causar demetilación de histonas, lo que daría otra posible explicación a la sexo-dependencia de los efectos

vistos en nuestro estudio, dado que en machos la hipermetilación de BDNF pudo contrarrestar el aumento de H3K4me3 (visto en hembras), inhibiendo la activación transcripcional de BDNF.

De cualquier modo, con nuestros datos esto no podría ser explicado completamente aún, dado que en F2 la hipermetilación de BDNF en machos no estuvo presente. Esto hace resaltar la necesidad de futuros estudios donde se evalúen los cambios en la metilación de múltiples sitios reguladores de la transcripción en BDNF por exposición transgeneracional a As_i . Con ellos potencialmente se reconocerían sitios del promotor de BDNF donde la hipermetilación por As_i si se transmite a las generaciones subsecuentes, junto a los cambios en su expresión. Asimismo, se deberá determinar si los cambios en los niveles de H3K4me3 realmente estuvieron relacionados a los cambios en BDNF.

7.2.3 El As_i afectó mayormente a BDNF probablemente debido particularidades del gen

Una de las principales preguntas que se derivan de esta discusión es por qué BDNF aparentemente es más propenso a mostrar alteraciones epigenéticas bajo estímulos ambientales como la exposición a sustancias tóxicas como el As_i . Una posible causa es la complejidad estructural del gen BDNF; en roedores y humanos contiene nueve exones, cada uno con su propio promotor, resultando en más de 10 variables de transcripción que, interesantemente, son traducidas a una proteína BDNF idéntica ¹²¹. Esta estructura con promotores independientes para cada exón confiere un control espacial y temporal de la expresión de BDNF en una manera dependiente de la actividad ¹²¹.

Asimismo, diversos reportes han señalado que BDNF puede ser selectivamente regulado por la proteína 2 de unión metil-CpG (MeCP2) en respuesta a la actividad neuronal ^{16, 128-130}. MeCP2 actúa como un regulador global de la cromatina ¹¹² al ser una de las principales proteínas que reconocen los CpG metilados y activan reacciones que modifican la información epigenética en histonas. Además, se ha demostrado que la actividad neuronal influye en la transcripción del promotor I de BDNF, el cual se ha señalado como un blanco frecuente de represores de genes neurales ¹³¹⁻¹³⁴. Esto sugiere que existen diversos mecanismos mediante los que la transcripción de BDNF puede verse alterada por efecto insultos ambientales, incluso sin alteraciones epigenéticas de por medio.

7.3 Los cambios en metilación y expresión de BDNF por As_i subyacen alteraciones en la conducta

Como se mencionó previamente, este estudio nace del diseño experimental de Dipp *et al* 2018 ⁹⁷, donde se evidenció que en nuestros peces, la generación F0 mostró un decremento en la actividad motora y en la conducta exploratoria en un ambiente nuevo ⁹⁷. Posteriormente observamos que

estas alteraciones en la conducta se conservaron en la generación F2 ¹¹⁹, demostrando por primera vez que la exposición crónica en etapas tempranas al As_i puede tener efectos transgeneracionales sobre la conducta en el pez cebra ¹¹⁹. De este modo, nuestros hallazgos demuestran que el conjunto de cambios vistos sobre BDNF es una de las causas de algunos de los efectos neurotóxicos del As_i.

La desregulación de la expresión de BDNF se ha asociado a desórdenes del humor y ansiedad ¹³⁵. Asimismo se ha demostrado que la alteración de la señalización entre BDNF y su receptor (TrkB) induce conductas asociadas a la ansiedad en el pez cebra ¹³⁶. En murinos con BDNF silenciado se vio un decremento en la locomoción y en la conducta exploratoria ¹³⁷, mientras que la administración local de BDNF causó un incremento en estas conductas ¹³⁸. Recientemente se encontró que en humanos expuestos a As_i hubo una reducción dosis-dependiente de BDNF en el suero, acompañada de deterioro de funciones cognitivas ¹³⁹.

Todas estas evidencias coinciden con nuestros resultados, señalando la importancia de BDNF en el mantenimiento de funciones cognitivas. Además, recientemente la exposición temprana a tris (1,3-dicloro-2propil) fosfato (TDCIPP) en pez cebra causó un incremento en conductas de ansiedad en hembras, acompañada de una hipermetilación del promotor de BDNF y decremento en su expresión ⁷⁵. Estos resultados, al igual que los nuestros, prueban que la exposición a sustancias tóxicas puede modificar la metilación de BDNF, desregulando su expresión y alterando funciones conductuales.

8. CONCLUSIONES

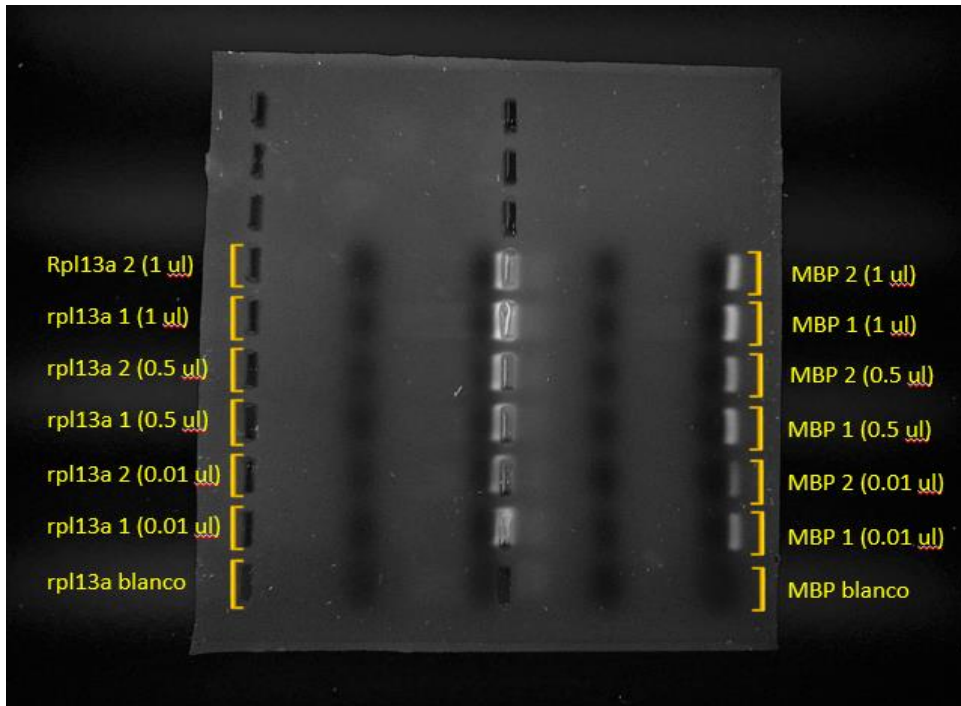
1. La exposición a As_i en dosis relevantes al ambiente causó un decremento sexo-dependiente en la expresión del gen BDNF en machos.
2. El efecto sexo-dependiente del As_i sobre la expresión de BDNF se heredó de manera transgeneracional.
3. El nivel de metilación en el promotor de BDNF se vio alterado por la exposición a As_i en machos, denotando que existió una relación negativa entre la expresión del gen y el nivel de metilación de su promotor.
4. El efecto visto sobre la metilación de BDNF en la generación parental (F0) no se heredó transgeneracionalmente.
5. El método MethySYBR permite evaluar cambios en la metilación de regiones específicas del genoma de cerebros individuales de pez cebra a un muy bajo costo comparado con otros métodos basados en el uso de sondas TaqMan o anticuerpos.

9. PERSPECTIVAS

Luego de los resultados de este trabajo, harán falta estudios profundos para resolver puntos clave que permitirán entender de mejor manera los procesos que subyacen a la heredabilidad de los efectos del As_i sobre la expresión de BDNF. Primeramente, se espera definir si otras regiones del promotor de BDNF (u otras isoformas del mismo) también sufren cambios en su nivel de metilación, buscando encontrar una región donde la posible hipermetilación sí sea transmitida a la progenie, lo que haría que nuestros datos concuerden directamente con el fenómeno descrito de herencia epigenética transgeneracional.

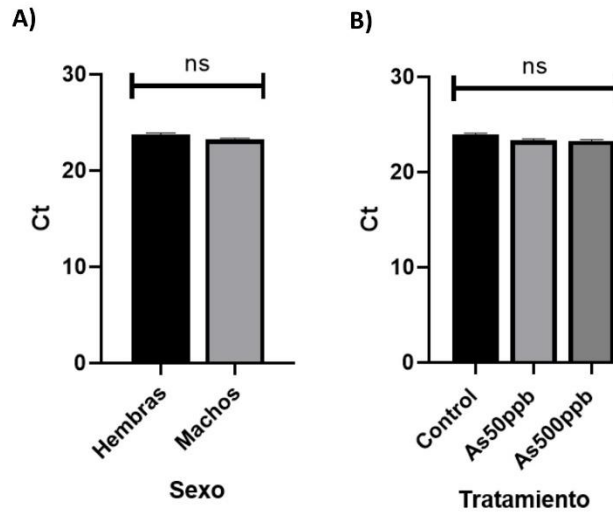
Otro objetivo próximo será profundizar en los resultados vistos sobre la expresión de PPP1R1B; el realizar inmunoensayos a nivel protéico (p. e. western blot) para detectar cambios en el nivel de Darpp-32 Thr 34 y Thr 75 ayudará a saber si el decremento de la expresión del gen en F1 tiene relación con la aparente ausencia de efectos del As_i en los parámetros neuroconductuales en F1. Asimismo, harán falta estudios para determinar si el aumento en H3K4me3 realmente tuvo relación con la expresión de BDNF; esto sería posible mediante protocolos que permitan reconocer el número relativo de asociaciones entre una histona específica y una región determinada del genoma, como la inmunoprecipitación cuantitativa de cromatina (qChIP).

Finalmente, sería útil realizar protocolos de mayor sensibilidad para la medición de metilación en regiones específicas del genoma para confirmar y refinar los datos obtenidos. Además, emplear estos protocolos en hembras, en la generación F1 en general, y sobre los otros genes analizados (además de BDNF), harían más íntegros nuestros hallazgos.



Anexo I- Electroforesis con gel de agarosa con las muestras de la primera estandarización de los primers para expresión génica, donde se verificó la viabilidad de los primers para los genes rpl13a y MBP. Los volúmenes entre paréntesis representan la cantidad de templado de ADNc 1:10 utilizado, proveniente de la retrotranscripción de 500ng de ARN total en una reacción con volumen final de 20ul, de acuerdo a las instrucciones del kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de invitrogen (# de catálogo 4368814).

Constancia de expresión de rpl13a



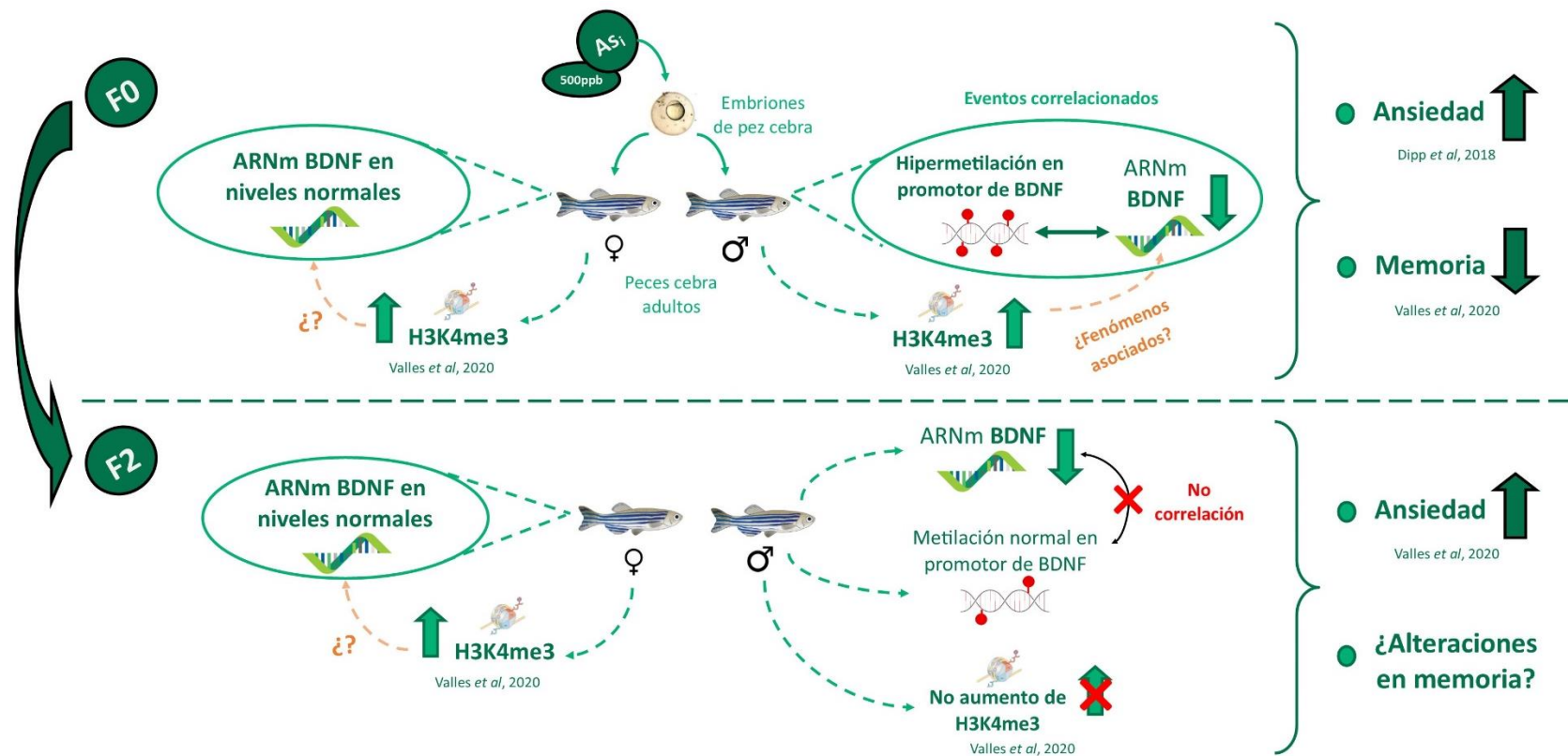
Anexo II.- Comprobación estadística de la constancia en la expresión de nuestro gen constitutivo rpl13a al comparar entre sexos (A) y entre nuestros 3 grupos experimentales (B). Todos los valores de Ct para rpl13a de todos los ensayos de RT-PCR realizados fueron analizados para corroborar que no hubo variaciones en su expresión luego de la exposición a arsénico, ya sea al comparar entre machos y hembras, o entre grupos experimentales. Todos los valores de rpl13a de los grupos experimentales fueron normalizados y analizados por medio de una prueba de comparación múltiple de Turkey, revelando que no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.9484$). Los datos obtenidos de machos y hembras fueron analizados utilizando una prueba t con corrección de Welch, mostrando que no hubo diferencias entre sexos ($p > 0.05$).

			Machos				Hembras			
	Generación	Tratamiento	Valor de P post hoc				Valor de P post hoc			
			$\Delta\Delta Ct$	Error Std.	P	(vs CTR)	$\Delta\Delta Ct$	Error Std.	P	(vs CTR)
MBP	F0	As50ppb	0.3633	0.3462	ns	ns	-0.4578	0.3792	ns	ns
		As500ppb	-0.3148	0.4568	ns	ns	0.4568	0.2007	ns	ns
	F1	As50ppb	0.1952	0.2384	ns	ns	-0.7466	0.3142	ns	ns
		As500ppb	-0.1935	0.3631	ns	ns	-0.2645	0.3463	ns	ns
	F2	As50ppb	0.8258	0.3777	ns	ns	-0.6678	0.4080	ns	ns
		As500ppb	0.9228	0.2513	ns	ns	-0.4046	0.2326	ns	ns
DARPP-32	F0	As50ppb	0.7547	0.2428	ns	ns	-0.0584	0.4903	ns	ns
		As500ppb	0.4607	0.3746	ns	ns	0.3885	0.1918	ns	ns
	F1	As50ppb	0.6503	0.1480	0.0146	0.0124	-0.1904	0.1608	ns	ns
		As500ppb	0.6904	0.1376	0.0088	0.0088	0.5057	0.3466	ns	ns
	F2	As50ppb	0.0856	0.2047	ns	ns	0.4951	0.1421	ns	ns
		As500ppb	0.4257	0.1614	ns	ns	0.6280	0.1764	ns	ns
BDNF	F0	As50ppb	0.9783	0.3787	0.0468	ns	0.2758	0.4171	ns	ns
		As500ppb	1.4181	0.3199	0.019	0.019	0.5448	0.2036	ns	ns
	F1	As50ppb	0.4011	0.1495	ns	ns	-0.2132	0.2300	0.0082	ns
		As500ppb	0.9848	0.3375	ns	ns	1.1926	0.2965	0.0082	0.0106
	F2	As50ppb	0.0902	0.3449	0.0208	ns	1.6325	0.3918	0.0175	0.0068
		As500ppb	1.2520	0.1166	0.011	0.011	0.5194	0.2209	0.0175	ns
RELN	F0	As50ppb	0.4882	0.4074	ns	ns	0.5284	0.5725	ns	ns
		As500ppb	0.7400	0.2826	ns	ns	0.3430	0.5298	ns	ns
	F1	As50ppb	0.4163	0.3133	ns	ns	-0.2178	0.2157	ns	ns
		As500ppb	0.3166	0.3265	ns	ns	0.5853	0.4549	ns	ns
	F2	As50ppb	-0.3616	0.5731	ns	ns	1.1474	0.3855	ns	ns
		As500ppb	-0.4295	0.5734	ns	ns	1.2391	0.2464	ns	ns

Anexo III.- Lista de valores del análisis estadístico para la expresión génica de los diferentes genes, generaciones y sexos. Los datos fueron obtenidos de ANOVAs univariadas utilizando el $\Delta\Delta Ct$ de cada grupo. El valor del grupo control no se especifica ya que el promedio de los $\Delta\Delta Ct$ s de dicho grupo siempre es cero. Se especifican los valores que resultaron significativos estadísticamente. **ns** = no significativo ($p > 0.05$).

Tipo	Generación	Tratamiento	$\Delta\Delta Ct$	Error Std.	Valor de P	P post hoc (vs CTR)
Metilado	F0	As50ppb	-3.7443	0.9178	0.006	0.0041
		As500ppb	-5.5047	0.4325		0.0002
	F2	As50ppb	1.2704	0.4739	ns	ns
		As500ppb	0.6841	0.2765		ns
No metilado	F0	As50ppb	1.1918	0.2705	ns	ns
		As500ppb	1.8032	0.5598		0.018
	F2	As50ppb	0.2151	0.2182	ns	ns
		As500ppb	0.6958	0.2394		ns

Anexo IV.- Lista de valores del análisis estadístico de los ensayos de metilación. Los ensayos MethySYBR se realizaron sobre el gen BDNF en machos de las generaciones F0 y F2. El análisis de los datos se realizó del mismo modo descrito en el **anexo III**. ns = $p > 0.05$



Anexo V.- Representación gráfica de nuestros resultados. Contraste con un enfoque integral de los hallazgos obtenidos en Dipp *et al* 2018⁹⁷, esta tesis, y Valles *et al* 2020¹¹⁹. Relacionando cambios en la expresión de BDNF, la metilación de su promotor, cambios en PTHM y alteraciones conductuales (Leer discusión). Las flechas anaranjadas indican posibles correlaciones que aún no se entienden por completo y deberán ser comprobadas con estudios futuros.

Literatura Citada

1. Skinner, MK. Epigenetic transgenerational toxicology and germ cell disease. *International Journal of Andrology* 2007; 30:393-397.
2. Nilsson E, Sadler-Riggleman I, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environmental Epigenetics* 2018; 4:1-13.
3. Calderon J, Navarro ME, Jimenez-Capdeville ME, Santos-Diaz MA, Golden A, Rodriguez-Leyva I, et al. Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environmental research*. 2001;85:69-76.
4. Rodriguez VM, Jimenez-Capdeville ME, Giordano M. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicol Lett*. 2003;145:1-18.
5. Diaz Z, Assaraf MI, Miller WH, Jr., Schipper HM. Astroglial cytoprotection by erythropoietin preconditioning: implications for ischemic and degenerative CNS disorders. *J Neurochem*. 2005;93:392-402.
6. Brinkel J, Khan MH, Kraemer A. A systematic review of arsenic exposure and its social and mental health effects with special reference to Bangladesh. *International journal of environmental research and public health*. 2009;6:1609-19.
7. Bardullas U, Limon-Pacheco JH, Giordano M, Carrizales L, Mendoza-Trejo MS, Rodriguez VM. Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. *Toxicology and applied pharmacology*. 2009;239:169-77.
8. Tyler CR, Allan AM. The Effects of Arsenic Exposure on Neurological and Cognitive Dysfunction in Human and Rodent Studies: A Review. *Current environmental health reports*. 2014;1:132-47.
9. Camacho LM, Gutierrez M, Alarcon-Herrera MT, Villalba Mde L, Deng S. Occurrence and treatment of arsenic in groundwater and soil in northern Mexico and southwestern USA. *Chemosphere*. 2011;83:211-25.
10. Waddington CH. *Organisers and Genes*. Cambridge: Cambridge University Press, 1940.
11. Skinner MK. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. *Epigenetics* 2011;6:838-42.
12. Cui, X., Jing, X., Wu, X., Yan, M., Li, Q., Shen, Y., Wang, Z. 2016. DNA methylation in spermatogenesis and male fertility (review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. 12: 1973-1979.
13. Jiang, Y., Langley, B., Farah, L., Renthal, W., Wood, M., Yasui, D., Kumar, A., Nestler, E., Akbarian, S., Beckel-Mitchener, C., (2008), Epigenetics in the Nervous System, *Journal of Neuroscience*, 28(46): 11753-11759.
14. Phillips, T. (2008) The role of methylation in gene expression. *Nature Education* 1(1):116
15. Phillips, T. & Shaw, K. (2008) Chromatin Remodeling in Eukaryotes. *Nature Education* 1(1):209
16. Karpova nina, N.N., Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity, *Neuropharmacology* (2013), doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.002
17. Rodenheiser, D. & Mann, M. 2006. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Canadian Medical Association Journal*. 174(3): 341-348. Doi: 10.1503/cmaj.050774.
18. Lee, H.J., Hore, T.A., Reik, W., 2014. Reprogramming the methylome: erasing memory and creating diversity. *Cell Stem Cell* 14, 710-719

19. Tusher, J. J. & Day, J. J. 2019. Multigenerational epigenetic inheritance: one step forward, two generations back. *Neurobiology of Disease*. 132:104591. Doi: 10.1016/j.nbd.2019.104591.
20. Smith, Z.D., Chan, M.M., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A., Meissner, A., 2012. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* 484, 339–344
21. Jiang, L., Zhang, J., Wang, J.J., Wang, L., Zhang, L., Li, G., Yang, X., Ma, X., Sun, X., Cai, J., Zhang, J., Huang, X., Yu, M., Wang, X., Liu, F., Wu, C.I., He, C., Zhang, B., Ci, W., Liu, J., 2013. Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell* 153, 773-784. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.041.
22. Kamstra JH, Alestrom P, Kooter JM, Legler J. Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology. *Environmental science and pollution research international*. 2014.
23. Kamstra, J. H., Hurem, S., Marin, L. M., Lindeman, L. C., Legler, J., Oughton, D., Salbu, B., Brede, D. A., Luche, J. L., Alestrom, P. 2018. Ionizing radiation induces effects of DNA methylation in zebrafish. *Nature Scientific Reports*. 8(1). Doi: 10.1038/s41598-018-33817-w.
24. Hurem S, et al. 2017. Parental gamma irradiation induces reprotoxic effects accompanied by genomic instability in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ. Res.*;159:564–578. doi: 10.1016/j.envres.2017.07.053.
25. Rodriguez VM, Jimenez-Capdeville ME, Giordano M. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicol Lett*. 2003;145:1-18.
26. National Research Council. 1977. Arsenic: Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants
27. Cullen, W., Reimer, K., 1989. Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews*; 89: 713-764
28. Kumari, B., Kumar, V., Sinha, A. K., Ahsan, J., Ghosh, A. K., Wang, H., DeBoeck, G., (2016), Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems, *Environ Chem Lett*.
29. IARC. 2004. Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants, including Arsenic. Arsenic chemicals to humans. Supplement 84, 39-267
30. Camacho LM, Gutierrez M, Alarcon-Herrera MT, Villalba Mde L, Deng S. Occurrence and treatment of arsenic in groundwater and soil in northern Mexico and southwestern USA. *Chemosphere*. 2011;83:211-25.
31. Cebrian ME, Albores A, Aguilar M, Blakely E. Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Human toxicology*. 1983;2:121-33.
32. Del Razo LM, Garcia-Vargas GG, Garcia-Salcedo J, Sanmiguel MF, Rivera M, Hernandez MC, et al. Arsenic levels in cooked food and assessment of adult dietary intake of arsenic in the Region Lagunera, Mexico. *Food Chem Toxicol*. 2002;40:1423-31.
33. Aitio, A., Becking, G. 2001. Arsenic and Arsenic Compounds. World Health Organization.
34. Watanabe, T., Hirano, S. 2013. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Archives of toxicology*; 87: 969-979, DOI: 10.1007/s00204-012-0904-5
35. Saha, J., Dikshit, A., Bandyopadhyay, M., Saha, K. 1999. A Review of Arsenic Poisoning and its Effects on Human Health. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*; 29: 281-313. DOI: 10.1080/10643389991259227.
36. Lin, S., Shi, Q., Nix, F., Styblo, M., Beck, M., Hervin-Davis, K., Thomas, D. 2002. A novel S-adenosyl-L-methionine:arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *The Journal of Biological Chemistry*; 277: 10795-10803. DOI: 10-1074/jbc.M110246200
37. Rosen, B. 2002. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloid in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*; 133: 689-693.

38. Yang, H., Fu, H., Lin, Y., Rosen, B. 2012. Pathways of arsenic uptake and efflux. *Current topics in membranes*; 69: 325-358. DOI: 10.1016/B978-0-12-394390-3.00012-4
39. Dopp, E., Hartmann, L., Von Recklinghausen, U., Florea, A., Rabieh, S., Zimmermann, U., Rettenmeier, A. 2005. Forced uptake of trivalent and pentavalent methylated and inorganic arsenic and its cytotoxicity in fibroblasts and hepatoma cells. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*; 87: 46-56. DOI: 1093/toxsci/kkfi218
40. Thomas, D., Styblo, M., Lin S. 2001. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 176: 127-144. DOI: 10.1006/taap.2001.9258.
41. Nemeti, B., Gregus, Z. 2004. Glutathione-dependent reduction of arsenate in human erythrocytes – a process independent of purine nucleoside phosphorylase. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*; 82: 419-428. DOI: 10-1093/toxsci/kfh301
42. Hayawaka, T., Kobayashi, Y., Cui, X., Hirano, S. 2005. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Archives of toxicology*; 79: 183-191. DOI: 10.1007/s00204-004-0620-x
43. Ren, X., McHale, C., Skibola, C., Smith, A., Smith, M., Zhang, L. (2011), An Emerging Role for Epigenetic Dysregulation Arsenic Toxicity and Carcinogenesis, *Environmental Health Perspectives*, 119(1).
44. Bailey KA, Fry RC. Arsenic-Associated Changes to the Epigenome: What Are the Functional Consequences? *Current environmental health reports*. 2014;1:22-34.
45. Caudill, M.A., Wang, J.C., Melnyk, S., Pogribny, I.P., Jernigan, S., Collins, M.D., et al., 2001. Intracellular s-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine b-synthase heterozygous mice. *J. Nutr.* 131, 2811-2818
46. Hoffman, D.R., Marion, D.W., Cornatzer, W.E., Duerre, J.A., 1980. S-adenosylmethionine and s-adenosylhomocysteine metabolism in isolated rat liver. *J. Biol. Chem.* 255, 10822-10827
47. Tsai SY, Chou HY, The HW, Chen CM, Chen CJ. The effects of chronic arsenic exposure from drinking water on the neurobehavioral development in adolescence. *Neurotoxicology*. 2003;24:747-53.
48. Carpenter SJ. Developmental analysis of cephalic axial dysraphic disorders in arsenic-treated hamster embryos. *Anatomy and embryology*. 1987;176:345-65.
49. Rodriguez VM, Carrizales L, Mendoza MS, Fajardo OR, Giordano M. Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *Neurotoxicol Teratol*. 2002;24:743-50
50. Gumilar F, Lencinas I, Bras C, Giannuzzi L, Minetti A. Locomotor activity and sensory-motor developmental alterations in rat offspring exposed to arsenic prenatally and via lactation. *Neurotoxicol Teratol*. 2015;49:1-9.
51. Urdinguio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M. 2009. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol* 8(11):1056–1072.
52. Fagiolini, M., Jensen, C.L., Champagne, F.A., 2009. Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 207–212.
53. Feng, S., Jacobsen, S.E., Reik, W., 2010. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330, 622–627.
54. Bale, T.L., 2015. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 332–344.
55. Cortes-Mendoza, J., Diaz de Leon-Guerrero, S., Pedraza-Alva, G., Perez-Martinez, L., 2013. Shaping synaptic plasticity: the role of activity-mediated epigenetic regulation on gene transcription. *Int. J. Dev. Neurosci.* 31, 359–369.
56. Karpova, N.N., Sales, A.J., Joca, S.R., 2017. Epigenetic basis of neuronal and synaptic plasticity. *Curr. Top. Med. Chem.* 17, 771–793.

57. Clayton, D.F., Anreiter, I., Aristizabal, M., Frankland, P.W., Binder, E.B., Citri, A., 2019. The role of the genome in experience-dependent plasticity: extending the analogy of the genomic action potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1820837116>.
58. Miller, C.A., Sweatt, J.D., 2007. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53, 857–869.
59. Lubin, F.D., Roth, T.L., Sweatt, J.D., 2008. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J. Neurosci.* 28, 10576–10586.
60. Gupta, S., Kim, S.Y., Artis, S., Molfese, D.L., Schumacher, A., Sweatt, J.D., Paylor, R.E., Lubin, F.D., 2010. Histone methylation regulates memory formation. *J. Neurosci.* 30, 3589–3599.
61. Day, J.J., Sweatt, J.D., 2011. Cognitive neuroepigenetics: a role for epigenetic mechanisms in learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 2–12.
62. Day, J.J., Childs, D., Guzman-Karlsson, M.C., Kibe, M., Moulden, J., Song, E., Tahir, A., Sweatt, J.D., 2013. DNA methylation regulates associative reward learning. *Nat. Neurosci.* 16, 1445–1452.
63. Zovkic, I.B., Paulukaitis, B.S., Day, J.J., Etikala, D.M., Sweatt, J.D., 2014. Histone H2A.Z subunit exchange controls consolidation of recent and remote memory. *Nature* 515, 582–586.
64. Du, X., Tian, M., Wang, X., Zhang, J., Huang, Q., Liu, L., Shen, H. 2018. Cortex and hippocampus DNA epigenetic response to a long-term arsenic exposure via drinking water. *Environmental Pollution.* 234: 590-600.
65. Zhang X, Gong Z. (2013) Fluorescent transgenic zebrafish Tg (nkx2.2a: mEGFP) provides a highly sensitive monitoring tool for neurotoxins. *PLoS One*; 8:e55474.
66. Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, et al. 2001. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 10(26):3001–3007.
67. Weeber et al., 2002^a E.J. Weeber, U. Beffert, C. Jones, J.M. Christian, E. Forster, J.D. Sweatt, J. Herz Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning *J. Biol. Chem.*, 277 (2002), pp. 39944-39952
68. U. Beffert, E.J. Weeber, A. Durudas, S. Qiu, I. Masiulis, J.D. Sweatt, W.P. Li, G. Adelman, M. Frotscher, R.E. Hammer, et al. Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2 *Neuron*, 47 (2005), pp. 567-579
69. Martinez L, Jimenez V, Garcia-Sepulveda C, Ceballos F, Delgado JM, Nino-Moreno P, et al. Impact of early developmental arsenic exposure on promotor CpG-island methylation of genes involved in neuronal plasticity. *Neurochemistry international.* 2011;58:574-81.
70. Zarazúa, S., Ríos, R., Delgado, J. M., Santoyo, M. E., Ortíz-Pérez, D., Jiménez-Capdeville, M. E. 2009. Decreased arginine methylation and myelin alterations in arsenic exposed rats. *NeuroToxicology*; 31: 94-100. DOI:10.1016/j.neuro.2009.10.014
71. Campagnoni AT. Molecular biology of proteins from the central nervous system. *J Neurochem* 1988;51:1–14.
72. Rawal N, Lee YJ, Paik WK, Kim S. Studies on NG-methylarginine derivatives in myelin basic protein from developing and mutant mouse brain. *Biochem J* 1992;287:929– 35.
73. Tyler, C. R., & Alan, A. M., 2013. Adult Hippocampal Neurogenesis and mRNA Expression are Altered by Perinatal Arsenic Exposure in Mice and Restored by Brief Exposure to Enrichment. *PLoS ONE*, 8(9), e73720. Doi: 10.1371/journal.pone.0073720
74. Yan, Z., Jiao, F., Yan, X., Ou, H. 2017. Maternal chronic folate supplementation ameliorates behavior disorders induced by prenatal high-fat diet through methylation alteration of BDNF and Grin2b in offspring hippocampus. *Molecular Nutrition & Food Research.* doi: 10.1002/mnfr.201700461.

75. Li, R., Guo, W., Lei, L., Zhang, L., Liu, Y., Han, J., Chen, L., Zhou, B. 2020. Early-life exposure to the organophosphorus flame-retardant tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate induces delayed neurotoxicity associated with DNA methylation in adult zebrafish. *Environmental International*; 134: 105293. doi.org/10.1016/j.envint.2019.105293
76. Horch, H. & Katz, L. BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 1177–1184(2002).
77. Sachin-Moonat, M. S. & Pandey, C., 2012. Stress, Epigenetics, and Alcoholism. *Alcohol Research: Current Reviews*: 495-505.
78. Karim, Y., Siddique, A.E., Hossen, F., Rahman, M., Mondal, V., Banna, H.U., Hasibuzzaman, M.M., Hosen, Z., Islam, M.S., Sarker, M.K., Nikkon, F., Saud, Z.A., Xin, L., Himeno, S., Hossain, K., 2019. Dose-dependent relationships between chronic arsenic exposure and cognitive impairment and serum brain-derived neurotrophic factor. *Environment international* 131, 105029. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105029. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105029.
79. Shimada, H., Makizako, H., Doi, T., Yoshida, D., Tsutsumimoto, K., Anan, Y., Uemura, K., Lee, S., Park, H., Suzuki, T., 2014. A large, cross sectional observational study of serum BDNF, cognitive function, and mild cognitive impairment in the elderly. *Front. Aging Neurosci.* 6, 69. PMID: 24782766. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00069>.
80. Siuda, J., Patalong-Ogiewa, M., Żmuda, W., Targosz-Gajniak, M., Niewiadomska, E., Matuszek, I., Jędrzejowska-Szypułka, H., Lewin-Kowalik, J., Rudzińska-Bar, M., 2017. Cognitive impairment and BDNF serum levels. *Neurol. Neurochir. Pol.* 51 (1), 24–32. PMID: 28341039. <https://doi.org/10.1016/j.pjnns.2016.10.001>.
81. Lee, S.J., Baek, J.H., Kim, Y.H., 2015. Brain-derived neurotrophic factor is associated with cognitive impairment in elderly Korean individuals. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 13 (3), 283–287. PMID: 26598587. <https://doi.org/10.9758/cpn.2015.13.3.283>.
82. Ikegame, T., Bundo, M., Murata, Y., Kasai, K., Kato T., Iwamoto, K., DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders. *J. Hum. Genet.* 2013, 58, 434-438.
83. Htway, S-M., Sein, M-T., Nohara, K., Win-Shwe, T-T. 2019. Effects of Developmental Arsenic Exposure on the Social Behavior and Related Gene Expression in C3H Adult Male Mice. *International Journal of Environmental Research and Public Health*: 16(2); 174. Doi: 10.3390/ijerph16020174.
84. Srivastava, P., Dhyriya, Y. K., Gupta, R., Shukla, R. K., Yadav, R. S., Dwivedi, H. N., Pant, A. B., Khanna, V. K. 2016. Protective Effect of Curcumin by Modulating BDNF/DARPP32/CREB in Arsenic-Induced Alterations in Dopaminergic Signaling in Rat Corpus Striatum. *Molecular Neurobiology*: 55(1), 445-461. Doi: 10.1007/s12035-016-0288-2
85. Cordova FM, Aguiar AS Jr, Peres TV, Lopes MW, Gonçalves FM, Remor AP, Lopes SC, Pilati C et al (2012) In vivo manganese exposure modulates Erk, Akt and Darpp-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motor function. *PLoS One* 7(3):e33057
86. Xin F, Susiarjo M, Bartolomei MS. 2015. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? *Seminars in cell & developmental biology*.
87. Wolstenholme JT, Edwards M, Shetty SR, Gatewood JD, Taylor JA, Rissman EF, Connelly JJ. Gestational exposure to bisphenol A produces transgenerational changes in behaviors and gene expression. *Endocrinology* 2012;153:3828–38
88. Knecht AL, Truong L, Marvel SW, Reif DM, Garcia A, Lu C, Simonich MT, Teeguarden JG, Tanguay RL. Transgenerational inheritance of neurobehavioral and physiological deficits from developmental exposure to benzo[a]pyrene in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol* 2017;329:148–57.

89. Carvan MJ, Kalluvila TA, Klingler RH, Larson JK, Pickens M, Mora-Zamorano FX, Connaughton VP, Sadler-Riggelman I, Beck D, Skinner MK. Mercury-induced epigenetic transgenerational inheritance of abnormal neurobehavior is correlated with sperm epimutations in zebrafish. *PLoS One* 2017; 12:e0176155–26.
90. Stockard CR, Papanicolaou GN. Further studies on the modification of the germ-cells in mammals: the effect of alcohol on treated Guinea pigs and their descendants. *J Exp Zool* 1918;26:119–226.
91. Sobolewski, M., Abston, K., Conrad, K., Marvin, E., Harvey, K., Susiarjo, M., Cory-Slechta, D. A. 2020. Lineage- and sex –Dependent Behavioral and Biochemical Transgenerational Consequences of Developmental Exposure to Lead, Prenatal Stress, and Combined Lead and Prenatal Stress in Mice. *Environ Health Perspect.* 128(2): 27001. Doi: 10.1289/EHP4977.
92. Filby, A.L., Tyler, C.R., 2007. Appropriate “housekeeping” genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. *BMC Molecular Biology* 8, 10. doi:10.1186/1471-2199-8-10
93. Liman, M., Wenji, W., Conghui, L., Haiyang, Y., Zhigang, W., Xubo, W., Jie, Q., Quanyi, Z., 2013. Selection of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Marine Genomics* 11, 67–73. doi:10.1016/j.margen.2013.08.002
94. Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W.C., Love, D.R., 2007. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39, 384–390. doi:10.1111/j.1745-7270.2007.00283.x
95. Yang, C.G., Wang, X.L., Tian, J., Liu, W., Wu, F., Jiang, M., Wen, H., 2013. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gene* 527, 183–192. doi:10.1016/j.gene.2013.06.013
96. Xu, H., Li, C., Zeng, Q., Agrawal, I., Zhu, X., Gong, Z. 2016. *Journal of Fish Biology.* 88: 2095-2110. Doi: 10.1111/jfb.12915
97. Dipp, V.R., Valles, S., Ortiz-Kerbertt, H., Suarez, J.V., Bardullas, U., 2018. Neurobehavioral Alterations in Zebrafish Due to Long-Term Exposure to Low Doses of Inorganic Arsenic. *Zebrafish.* DOI: 10.1089/zeb.2018.1627.
98. Deaton A. M., Bird A., CpG islands and the regulation of transcription, *Genes Dev*, 2011, 25, 1010-1022
99. Santos K. F., Mazzola, T. F., Carvalho, H. F., The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2005, 38, 1531-1541
100. Portela A., Esteller M., Epigenetic modifications and human disease, *Nature biotechnology*, 2010, 28, 1057-1068
101. Davidovic, R. S., Bozovic, A. M., Mandusic, V. L., Krajnovic, M. M. 2014. Methylation-specific PCR: four steps in primer design. *Central European Journal of Biology.* 9(12); 1127-1139. Doi: 10.2478/s11535-014-0324-z
102. Cho Y. G., Chang X., Park I. S., Yamashita K., Shao C., Ha P. K., et al., Promoter methylation of leukemia inhibitory factor receptor gene in colorectal carcinoma, *International journal of oncology*, 2011, 39, 337-344
103. Willems, E., Guerrero-Bosnaga, C., Decuypere, E., Janssens, S., Buyse, J., Buys, N., Jansen, P., Everaert, N. 2016. Differential Expression of Genes and DNA Methylation associated with Prenatal Protein Undernutrition by Albumen Removal in an avian model. *Nature Scientific Reports.* 6:20837. Doi: 10.1038/srep20837

104. Lo, P., Watanabe, H., Cheng, P., Teo, W. W., Liang, X., Argani, P., Lee, J. S., Sukumar, S. 2009. MethySYBR, a Novel Quantitative PCR Assay for the Dual Analysis of DNA Methylation and CpG Methylation Density. *Journal of Molecular Diagnostics*: 11(5); 400-414.
105. Eads, C. A., Danenberg, K. D., Kawakami, K., Saltz, L. B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P. V., Laird, P. W. 2000. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acid Research*; 28(8): e32. Doi: 10.1093/nar/28.8.e32
106. Hehar, H., Ma, I., Mychasiuk, R., 2017. Intergenerational Transmission of Paternal Epigenetic Marks: Mechanisms Influencing Susceptibility to Post-Concussion Symptomology in a Rodent Model. *Sci. Rep.* 7, 7171. DOI: 10.1038/s41598-017-07784-7.
107. GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com
108. Rodriguez, V.M., Limon-Pacheco, J.H., Carrizales, L., Mendoza-Trejo, M.S., Giordano, M., 2010. Chronic exposure to low levels of inorganic arsenic causes alterations in locomotor activity and in the expression of dopaminergic and antioxidant systems in the albino rat. *Neurotoxicol Teratol* 32, 640-647. DOI: 10.1016/j.ntt.2010.07.005.
109. Bardullas U, Giordano M, Rodriguez VM. Atrazine is primarily responsible for the toxicity of long-term exposure to a combination of atrazine and inorganic arsenic in the nigrostriatal system of the albino rat. *Neurotoxicol Teratol.* 2013;40:59-66.
110. Chervona, Y., Hall, M.N., Arita, A., Wu, F., Sun, H., Tseng, H.C., Ali, E., Uddin, M.N., Liu, X., Zoroddu, M.A., Gamble, M.V., Costa, M., 2012. Associations between arsenic exposure and global posttranslational histone modifications among adults in Bangladesh. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21, 2252-2260. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0833.
111. Muñoz, A., Chervona, Y., Hall, M., Kluz, T., Gamble, M. V., Costa, M. 2015. Sex-specific patterns of endocrine pathways in the gene expression profiles of Bangladeshi adults exposed to arsenic contaminated drinking water. *Toxicol Appl Pharmacol*; 284(3): 330-8
112. Winterbottom, E. F., Ban, Y., Sun, X., Capobianco, A. J., Marsit, C. J., Chen, X., Wang, L., Karagas, M., Robbins, D. J. 2019. Transcriptome-wide analysis of changes in the fetal placenta associated with prenatal arsenic exposure in the New Hampshire Birth Cohort Study. *Environmental Health*, 18(1). Doi: 10.1186/s12940-019-0535-x
113. Singh M, Meyer EM, Simpkins JW (1995) The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats. *Endocrinology* 136:2320–2324.
114. Gibbs RB (1998) Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement. *Brain Res* 787:259–268.
115. Solum, D. & Handa, R. J., 2002, Estrogen Regulated the Development of Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA and Protein in Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*: 22(7); 2650-2659.
116. Heinrich, G. 2003. A novel BDNF gene promoter directs expression to skeletal muscle. *BMC Neuroscience*. 4(1): 11. Doi: 10.1186/1147-2202-4-11.
117. Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., Timmusk, T., 2007. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res.* 85, 525-535
118. Brait M., Sidransky D., *Cancer epigenetics: above and beyond, Toxicology mechanisms and methods*, 2011, 21, 275-288
119. S. Valles, J. Hernández-Sánchez, V.R. Dipp, et al., Exposure to low doses of inorganic arsenic induces transgenerational changes on behavioral and epigenetic markers in zebrafish (*Danio rerio*), *Toxicology and Applied Pharmacology* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115002>

120. Dincer, A., Gavin, D.P., Xu, K., Zhang, B., Dudley, J.T., Schadt, E.E., Akbarian, S., 2015. Deciphering H3K4me3 broad domains associated with gene-regulatory networks and conserved epigenomic landscapes in the human brain. *Transl Psychiatry* 5, e679. DOI: 10.1038/tp.2015.169.
121. Chen, K.W., Chen, L., 2017. Epigenetic Regulation of BDNF Gene during Development and Diseases. *Int J Mol Sci* 18. DOI: 10.3390/ijms18030571.
122. Nan, X., Campoy, F.J., Bird, A., 1997. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88, 471-481.
123. Ng, H.H., Jeppesen, P., Bird, A., 2000. Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol*. 20, 1394-1406.
124. Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jorgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A., Prokhortchouk, E., 2001. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev*. 15, 1613-1618.
125. Wade, P.A., Geggion, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F., Wolffe, A.P., 1999. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet*. 23, 62-66.
126. Yoon, H.G., Chan, D.W., Reynolds, A.B., Qin, J., Wong, J., 2003. N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell* 12, 723-734
127. Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., Reinberg, D., 1999. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*. 13, 1924-1935
128. Chen, W.G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A.E., Griffith, E.C., Jaenisch, R., Greenberg, M.E., 2003. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302, 885-889.
129. Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., Sun, Y.E., 2003. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302, 890-893.
130. Zhou, Z., Hong, E.J., Cohen, S., Zhao, W.N., Ho, H.Y., Schmidt, L., Chen, W.G., Lin, Y., Savner, E., Griffith, E.C., et al., 2006. Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron* 52, 255-269.
131. Abuhatzira, L., Makedonski, K., Kaufman, Y., Razin, A., Shemer, R., 2007. MeCP2 deficiency in the brain decreases BDNF levels by REST/CoREST-mediated repression and increases TRKB production. *Epigenetics* 2, 214-222.
132. Bruce, A.W., Donaldson, I.J., Wood, I.C., Yerbury, S.A., Sadowski, M.I., Chapman, M., Gottgens, B., Buckley, N.J., 2004. Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10458-10463.
133. Hara, D., Fukuchi, M., Miyashita, T., Tabuchi, A., Takasaki, I., Naruse, Y., Mori, N., Kondo, T., Tsuda, M., 2009. Remote control of activity-dependent BDNF gene promoter-I transcription mediated by REST/NRSF. *Biochem Biophys Res Commun* .384, 506-511
134. Tian, F., Hu, X.Z., Wu, X., Jiang, H., Pan, H., Marini, A.M., Lipsky, R.H., 2009. Dynamic chromatin remodeling events in hippocampal neurons are associated with NMDA receptor-mediated activation of Bdnf gene promoter 1. *J Neurochem*. 109, 1375-1388
135. Autry, A.E., Monteggia, L.M., 2012. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* 64, 238-258. DOI: 10.1124/pr.111.005108.
136. Sahu, M.P., Pazos-Boubeta, Y., Pajanoja, C., Rozov, S., Panula, P., Castren, E., 2019. Neurotrophin receptor Ntrk2b function in the maintenance of dopamine and serotonin neurons in zebrafish. *Scientific reports* 9, 2036. DOI: 10.1038/s41598-019-39347-3.

137. Hall, F.S., Drgonova, J., Goeb, M., Uhl, G.R., 2003. Reduced Behavioral Effects of Cocaine in Heterozygous Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Knockout Mice. *Neuropsychopharmacology* 28, 1485–1490. DOI: 10.1038/sj.npp.1300192.
138. Martin-Iverson, M.T., Todd, K.G., Altar, C.A., 1994. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 activate striatal dopamine and serotonin metabolism and related behaviors: interactions with amphetamine. *Journal of Neuroscience* 14, 1262-1270. DOI:10.1523/JNEUROSCI.14-03-01262.1994
139. Karim, Y., Siddique, A.E., Hossen, F., Rahman, M., Mondal, V., Banna, H.U., Hasibuzzaman, M.M., Hosen, Z., Islam, M.S., Sarker, M.K., Nikkon, F., Saud, Z.A., Xin, L., Himeno, S., Hossain, K., 2019. Dose-dependent relationships between chronic arsenic exposure and cognitive impairment and serum brain-derived neurotrophic factor. *Environment international* 131, 105029. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105029. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105029