

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**“El glutatión (GSH) intracelular como modulador  
de la actividad de MAP cinasas en diferentes  
órganos de ratón”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**P R E S E N T A:**  
**JORGE HUMBERTO LIMÓN PACHECO**

**DIRECTORA DE TESIS**  
**DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**

NOVIEMBRE DE 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

pdcb/grad/059Jur/2007.

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ

Director General de la  
Administración Escolar  
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informo que el 12 de septiembre del 2007, el Comité Académico del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, con base en el artículo 31 del nuevo Reglamento General de Estudios de Posgrado (aprobado el 29 de septiembre de 2006) asignó jurado para el examen de Doctorado en Ciencias, que sustentará el Biólogo **JORGE HUMBERTO LIMÓN PACHECO**, con no. de cuenta 96533051 quien presenta la tesis: "El glutatión (GSH) intracelular como modulador de MAP cinasas en diferentes órganos de ratón", dirigida por la Dra. Maaría Eugenia Gonsebatt Bonaparte.

Integran el jurado:

Presidente:	Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas
Secretario:	Dra: María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Vocal:	Dra. Ana Brigida Clorinda Arias Alvarez
Vocal:	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz
Vocal:	Dra. Luz María del Razo Jiménez

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

*"Por mi raza hablará el espíritu"*

Cd., Universitaria, D.F., 12 de septiembre de 2007.

Dr. J. Javier Espinosa Aguirre  
Responsable en el Instituto de  
Investigaciones Biomédicas

Dr. Federico Martínez Montes  
Coordinador del Doctorado  
en Ciencias Biomédicas

Esta tesis se realizó en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte. Agradezco el apoyo de la beca CONACYT No 173890 y DGEP de la UNAM.

## Dedicatorias

Esta es quizá la parte más difícil de escribir, no es porque no sepa a quien dedicar este trabajo, más bien, es que no se si este trabajo representará adecuadamente mi admiración y tributo hacia ustedes.

A mis papás Humberto y Beatríz, por planearme, hacerme, criarme, educarme, aguantarme, apoyarme, bendecirme. Aún me falta mucho, pero ustedes siempre serán mi ejemplo, siempre están en mi mente y corazón.

A mis hermanas Verónica y Montserrat, por compartir siempre la alegría de ser hermanos, siempre juntos.

A mis chiquillas Giovanna (Gusita) y Nathalia (Chiki), sigan enseñándome a ver la vida con ojos de niño.

A mi tía Coco, a Tropicat y Leri.

A mi neni hermosa por cada momento que me brindas *please miss...*

A mis abuelas, Petra, Zenaida y Chabelita, se adelantaron, pero se que desde donde están observan la culminación de otra etapa de mi vida. Gracias.

A mi gran amiga Gaby, por darme el avión cuando es necesario y escucharme en el momento preciso.

A las familias Arévalo-Ruíz (Carlos, Carmelita, Tanita), Arévalo-Garay (Giobany y Martha), gracias por considerarme un miembro más de la familia.

A la banda

Mayra, Claus E, Claudia V, Auroridae, Lilidae, Josesito, Capitán Ariel, Noe primo, Katy Tipo, Carlos Sandovader, Yadosa, Alfredo, Juanito, Miriam, Armando Pritchard, Octavio Suffus, Ramadán, Belén, Bárbara, Luis, Olga, Violeta, Abraham, ya casi no los veo, pero que quede en claro que siempre me acuerdo de ustedes.

A mis bandas: NADA (Rodrigo, Gonzalo) y HSP (René y Xavier)... “*Sin música, la vida sería un error*” (Nietzsche)

## Agradecimientos

Agradezco a las personas que formaron parte de mi Comité Tutorial: al Dr. Jesús Aguirre Linares y al Dr. Enrique Ortega Soto, por sus valiosas contribuciones, su guía, sus acertadas críticas, su paciencia, por el esfuerzo para que este trabajo resultara mejor y por demostrarme que a quien hay que vencer siempre es a uno mismo.

Al jurado examinador: Dra. Victoria Chagoya, Dra. María E Gonsebatt, Dra. Clorinda Arias, Dr. Rolando Hernández, Dra. Luz Ma. Del Razo, por sus valiosos comentarios que contribuyeron al mejoramiento de este escrito.

A aquellos profesores que son culpables de haber metido la biología en mi cabeza y por supuesto haberme dejado secuelas: Alicia Grau Delfín, Zenón Cano, Alton Meister, Maestra Carito, Cesari, José Resendíz, María E Gonsebatt, José Rodríguez; y a todos aquellos que, por mi mala memoria y falta de espacio, he omitido. A Patricia García Godinez, por reparar algunas secuelas mentales producidas por exceso de glutatión.

A mi querido laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del IIB en sus diferentes épocas, porque cada momento y desveló que ahí pase me hizo ser mejor. Por supuesto a sus integrantes que a lo largo de estos casi 10 años han modificado sustancialmente mi vida: Wendy García, Alicia Huerta, Belkis Martínez, Jazmín Roa, Gerardo Zamora, Valeria Berdón, Roxana Navarrete, Ana Lilia Torres, Leonora Olivos, Paty Guzmán, César Valdovinos, Elsa Gutierrez, Danny Molina, Luisrael Santiago, Rebeca Morales, Miriam Balderas, Alan, Manuel Torres, Emilia E., Lilia Galván, Quitzé, Bernardo, Citlali García, Paty Ramírez, Sra. Delfina, Luis Serrano (Regina's Lab), Celeste Martínez, Dra. Julieta Rubio, Clementina Castro, Camilo Molina, Karol Carrasco, Mariana Morales, Dr. Pavel Petrosyan. Por los momentos compartidos, siempre agradables, por la ayuda incondicional con la obtención de muestras de los ratones, por los chistes, las aventuras en campo, las pláticas tan enriquecedoras...

A la Dra. Ma. Luisa Fanjul y Julio Prieto, por su amable ayuda con el HPLC y otras tantas molestias. Al Dr. Zentella por los anticuerpos contra NF-kB. A mis primos Gerado, Héctor y Aaron y demás en CT, por la ayuda con la impresión de este trabajo y tantos más. Al Bioterio del IIB por la ayuda prestada con el manejo de animales.

A todos aquellos que destinaron su vida, para que podamos entender un poco del universo al que pertenecemos. Algún día seré ratón y el equilibrio llegará...

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi *Alma Mater*, por demostrar que aún queda algo bueno y honorable en este país y que vale la pena esforzarse por ello.

Aún faltan...

A las siguientes personas cuyo trabajo ha repercutido en mi quehacer científico:

Ludwig van Beethoven, Steve Harris, Bruce Dickinson, Adrian Smith, Dave Murray, Janick Gers, Nicko McBrain, Paul Di'Anno, Clive Burr, Blaze Bayley, Chuck Schuldiner, Gene Hoglan, Andy LaRoque, Steve Digiorgio, Sergio Arau, Francisco Barrios, Armando Vega Gil, Geddy Lee, Alex Lifeson, Neil Peart, Lars-Olof Johansson, Peter Svensson, Bengt Lagerberg, Nina Persson, Magnus Sveningsson, Bebel Gilberto, Miland 'Mille' Petrozza, Jürgen 'Ventor' Reil, Christian 'Speesy' Giesler, Sami Yli-Sirniö, Jerry Only, Glenn Danzig, Jeff Walker, Bill Steer, Carlo Regadas, Ken Owen, David Ellefson, Marty Friedman, Nick Menza, Dave Mustaine, Kelly Shaefer, Rand Burkey, Tony Choy, Steve Flynn, Roger Patterson, Paul Masvidal, Sean Reinert, Jason Gobel, Sean Malone, Bill Withers, Mikael Stanne, Niklas Sundin, Martin Henriksson, Michael Niklasson, Anders Jivarp, Martin Brändström, Ronie James Dio, Tom Araya, Kerry King, Jeff Hanneman, Dave Lombardo, Gus Chambers, Waldemar Sorychta, Rob Halford, Glenn Tipton, K.K. Downing, Ian Hill, Scott Travis, Don Airey, Florian Sussane, Fiffi Fuhrmann, Steffi Hertz, Luz Marsen, Asis Nasser, Hans Wolf, Claudio, Michi, Verónica, Ivica, Judith, Johannes, Mark, Michael, Giuseppe Fiore, Kathrin Hertz, Michael Kiske, Kai Hanse, Michael Weikath, Markus Grosskopf, Ingo Schwichtenberg, Tim Eiermann, Flo Schwarz, Joe Proell, Wolle Maier, Roman Schonsee, Ben Weasel, John Jughead, Warren Ozzfish, Steve Cheese, Jonas Mellberg, Lars Rosenberg, Piotr Wawrzeniuk, Tommy Eriksson, Jan Kazda, Wolf Simon, Kristian Niemann, Johan Niemann, Sami Karppinen, Christofer Johnsson, Mats Levén, Richard Evensand, Mats Levén, Snowy Shaw, Petter Karlsson, Sting, Andy Summers, Stewart Copeland, Peter Steele, Josh Silver, Kenny Hickey, Sal Abruscato, Randy Rhoads, Bob Daisley, Lee Kerlake, Don Airey, Ozzy Osbourne, Yellow Jackets, Norah Jones, Suffocation, Sepultura, Strawberry Hardcore, King Diamond, Annihilator, Pennywise, Pink Floyd, y muchos, muchos más, que por falta de espacio no menciono.

## AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte:

Gracias, por que a lo largo de estos casi 10 años me ha enseñado a ver el mundo con los ojos de un “detective”, mostrándome el vasto mundo de la ciencia, por abrirme las puertas de su laboratorio, su ejemplo y actitud frente a la vida.

Gracias por que ha tenido la paciencia, la dedicación, la entrega, de formarme académicamente y de paso como persona.

Gracias por enseñarme a que hay etapas en la vida que hay que vivir sin traumarse.

Por todo su apoyo muchas, muchas gracias.

A mis padres:

Gracias por que me han enseñado que la vida es un regalo que hay que aprovechar en cada instante, y sobre todo disfrutarla.



*“Quien no conoce nada, no ama nada. Quien no puede hacer nada, no comprende nada. Quien nada comprende, nada vale. Pero quien comprende también ama, observa, ve... Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa más grande es el amor... Quien cree que todas las frutas maduran al mismo tiempo que las frutillas nada sabe acerca de las uvas.”*

**PARACELSO**

*“In any field, find the strangest thing and then explore it.”*

**John Archibald Wheeler**

## ÍNDICE

<b>PRÓLOGO .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xv</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>2</b>
<i>ASPECTOS BIOQUÍMICOS DEL GLUTATIÓN .....</i>	<i>2</i>
<i>METABOLISMO DEL GSH .....</i>	<i>3</i>
<i>SÍNTESIS DE NOVO DE GSH Y EL CICLO <math>\gamma</math>-GLUTAMIL .....</i>	<i>3</i>
<i>TRANSPORTE DEL GSH Y AMINOÁCIDOS PRECURSORES .....</i>	<i>5</i>
<i>CONTENIDO DE GSH Y SU REGULACIÓN INTRA E INTER ÓRGANO EN MAMÍFEROS .....</i>	<i>8</i>
<i>GSH en hígado, bilis y plasma .....</i>	<i>8</i>
<i>GSH en riñón .....</i>	<i>9</i>
<i>GSH en músculo .....</i>	<i>9</i>
<i>GSH en cerebro .....</i>	<i>9</i>
<i>GSH en tracto gastrointestinal .....</i>	<i>10</i>
<i>REACCIONES ASOCIADAS A LA ÓXIDO-REDUCCIÓN DEL GSH .....</i>	<i>11</i>
<i>FUNCIONES ASOCIADAS AL GSH .....</i>	<i>12</i>
<i>MODULACIÓN DEL METABOLISMO DE GSH .....</i>	<i>13</i>
<i>Patologías asociadas a la deficiencia de GSH .....</i>	<i>15</i>
<i>EL GSH COMO MODULADOR DE LA RESPUESTA CELULAR A DIVERSOS ESTÍMULOS .....</i>	<i>17</i>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>18</b>
<i>SEÑALIZACIÓN CELULAR A TRAVÉS DE PROTEÍNAS CINASAS ACTIVADAS POR</i>	
<i>MITÓGENOS (MAPK) .....</i>	<i>18</i>
<i>REGULACIÓN DE LAS VÍAS DE MAPK .....</i>	<i>18</i>
<i>VÍAS DE MAPK EN MAMÍFEROS .....</i>	<i>19</i>
<i>SUBSTRATOS DE LAS MAPK .....</i>	<i>22</i>

<i>ENFOQUE TOXICOLÓGICO A LA MODULACIÓN DE RESPUESTAS A ALTERACIONES EN EL ESTADO REDOX INTRACELULAR POR MAPK.....</i>	<i>22</i>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>26</b>
<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</i>	<i>26</i>
<i>HIPÓTESIS.....</i>	<i>26</i>
<i>OBJETIVOS.....</i>	<i>26</i>
<i>Objetivo General.....</i>	<i>26</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>27</i>
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>28</b>
<i>MATERIALES Y MÉTODOS.....</i>	<i>28</i>
<i>Materiales.....</i>	<i>28</i>
<i>Animales.....</i>	<i>28</i>
<i>Tratamientos.....</i>	<i>29</i>
Tratamiento con BSO.....	29
Tratamiento con NAC-BSO.....	29
Tratamiento con SB203580, U0126 y BSO.....	29
<i>Determinación de las concentraciones de GSH y GSSG.....</i>	<i>29</i>
<i>Preparación del tejido.....</i>	<i>30</i>
<i>Análisis de proteínas por inmunoprecipitación e inmunodetección.....</i>	<i>30</i>
<i>Análisis de los Factores de Transcripción.....</i>	<i>31</i>
<i>Análisis de mRNA por RT-PCR semicuantitativo.....</i>	<i>32</i>
<i>Análisis de Datos.....</i>	<i>33</i>
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>34</b>
<i>RESULTADOS.....</i>	<i>34</i>
<i>La disminución en el contenido de GSH a nivel sistémico induce la activación específica de MAPK en hígado, riñón y cerebro.....</i>	<i>34</i>
<i>Efecto del tratamiento con la BSO en la activación de MAPK y la ubicación nuclear de los factores de transcripción NF-<math>\kappa</math>B, ATF-2 y Nrf2.....</i>	<i>34</i>
<i>Transcripción de genes antioxidantes como respuesta al tratamiento con BSO.....</i>	<i>39</i>

<i>Efecto de los inhibidores de MAPK SB203580 y U0126 en la respuesta órgano específica</i> .....	41
<i>Las vías de MAPK activadas y las respuestas órgano específicas observadas por efecto del BSO dependen del estado de tioles intracelular.....</i>	42
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>45</b>
<i>DISCUSIÓN .....</i>	45
<b>CAPÍTULO VII.....</b>	<b>53</b>
<i>CONCLUSIONES .....</i>	53
<b>CAPÍTULO VIII .....</b>	<b>55</b>
<i>PERSPECTIVAS.....</i>	55
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>

### Lista de abreviaturas

<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1
<b>ARE</b>	Elementos de respuesta antioxidante
<b>ATF-2</b>	Factor de transcripción activador 2
<b>BSO</b>	L-butionina-S-R-Sulfoximina
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DPEP</b>	Dipeptidasa
<b>DSP</b>	Fosfatasa de especificidad dual
<b>ERK1, 2</b>	Proteína cinasa activada extracelularmente 1 y 2
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
<b><math>\gamma</math>GCS<sub>c, r</sub></b>	$\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa; c, subunidad catalítica; r, subunidad reguladora
<b>GGT</b>	$\gamma$ -glutamyl transpeptidasa
<b>GCTG</b>	$\gamma$ -Glutamyl ciclotransferasa
<b>Grx</b>	Glutarredoxina
<b>GSSG-Rd</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSS</b>	Glutación sintetasa
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>GST</b>	Glutación s-Transferasa
<b>JNK</b>	Cinasa de c-Jun amino Terminal
<b>MAPK</b>	Proteína cinasas activadas por mitógenos, cinasas MAP
<b>NAT</b>	N-acetil transferasa
<b>NF-kB</b>	Factor de transcripción nuclear Kappa-B
<b>Nrf2</b>	Factor de transcripción nuclear E2 relacionado a la proteína 45
<b>OPLA</b>	5-Oxoprolinasa
<b>p38<sup>MAPK</sup></b>	Proteína cinasa 38 de la familia MAPK
<b>PP</b>	Proteína fosfatasa
<b>PTP</b>	Proteína fosfatasa de Tirosina
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>Ser</b>	Aminoácido serina
<b>Thr</b>	Aminoácido treonina
<b>Tyr</b>	Aminoácido tirosina
<b>Tx-1</b>	Tiorredoxina 1
<b>xCT</b>	Subunidad xCT del transportador X <sub>c</sub> <sup>-</sup>

## Lista de Figuras

- Figura 1** Estructura química del glutatión
- Figura 2** Representación de las rutas bioquímicas del GSH
- Figura 3** Modelo del transporte de GSH a nivel interórgano
- Figura 4** Estructura química de la L-butionina-SR-sulfoximina (BSO) y el  $\gamma$ -glutamil- $\alpha$ -aminobutirato
- Figura 5** Modulo básico en la señalización por MAPK
- Figura 6** Representación esquemática de las vías de señalización por MAPK en mamíferos
- Figura 7** Efecto de la BSO en las concentraciones de GSH en órganos de ratón
- Figura 8** Fosforilación de MAPK en distintos órganos de ratón
- Figura 9** Efecto de la BSO en la localización celular de NF- $\kappa$ B y Nrf2 en órganos de ratón
- Figura 10** Efecto de la BSO en la fosforilación de ATF-2 y c-Jun en hígado y riñón
- Figura 11** Efecto de la BSO en la expresión de enzimas antioxidantes en hígado y riñón
- Figura 12** Regulación coordinada de enzimas antioxidantes en cerebro
- Figura 13** Efecto de los inhibidores SB203580, U0126 y BSO en el contenido de GSH
- Figura 14** Efecto de los inhibidores SB203580, U0126 y BSO en la fosforilación de MAPK y la expresión de genes antioxidantes
- Figura 15** Efecto del NAC y BSO en la fosforilación de MAPK

## Lista de Tablas

- Tabla 1** Sistemas de transporte de aminoácidos
- Tabla 2** Funciones generales del GSH
- Tabla 3** Condiciones que son asociadas con el decremento de la concentración de GSH
- Tabla 4** Oligos de genes antioxidantes empleados para el RT-PCR semicuantitativo
- Tabla 5** Concentración de GSH en órganos de ratón después del tratamiento con NAC 5 mmol Kg<sup>-1</sup> y del tratamiento con BSO 6 mmol Kg<sup>-1</sup>

## PRÓLOGO

*We all agree that your theory is crazy. The question which divides us  
is whether it is crazy enough to have a chance of being correct.*

— Niels Bohr

Desde que el glutatión fue descrito por J. de Rey-Pailhade en 1888, se ha generado una gran cantidad de información acerca de su biología, fisiología, bioquímica y su importancia desde el punto de vista clínico. Sin embargo, en los últimos años y con el avance de las nuevas herramientas de estudio a nivel molecular, se han podido describir “nuevas funciones para viejas moléculas”. No es de extrañar entonces, que a una molécula ubicua y abundante como el glutatión, le sean atribuidas “nuevas funciones”, como la de ser capaz de modular proteínas que participan en señalización intracelular de diversas maneras, como se ha demostrado recientemente.

Actualmente es imperioso no sólo describir estas funciones limitándonos a los modelos *in vitro*, sino que paralelamente es de suma importancia el estudio de los efectos de la modulación en la concentración de GSH usando modelos *in vivo* que, a pesar de su complejidad, permitan abordar los fenómenos como la comunicación celular, la regulación tisular en respuesta al estrés y la interacción que guardan los diferentes tejidos de un organismo entre sí teniendo como mediador a este tripéptido.

En este trabajo se exponen las evidencias que sustentan la hipótesis del glutatión como un modulador de MAPK en varios órganos de ratón. Los resultados dejan al descubierto la complejidad de las redes de señalización que llevan a una respuesta que puede considerarse como órgano-específica. Esto plantea nuevos retos para nuestro conocimiento como se discute más adelante, aunque también nos permitirá a la larga entender los procesos a través de los cuales los tejidos responden de manera específica ante un mismo estímulo; así como la comprensión de por qué unos tejidos son más sensibles a los efectos de xenobióticos mientras que otros no lo son; y por qué la capacidad de respuesta de defensa ante un agente tóxico

disminuye con la edad, haciendo que un organismo sea más susceptible al desarrollo de patologías.

El presente trabajo es una pequeña contribución a esta grande y ambiciosa empresa: desentrañar los mecanismos que regulan el sistema glutatión en los seres vivos, tarea que a lo largo de más de cien años, ha sido llevada a cabo por los llamados “entusiastas del glutatión”.

**J. H. L. P**

**México, D. F. Noviembre 2007**



**ABSTRACT**

Mitogen activated protein kinases (MAPK) are activators of diverse cellular responses from cell division, survival and cell death. In recent years it has been postulated that these responses are modulated by cellular redox state, maintained principally by thiol glutathione (GSH). In mammals, GSH levels are different among tissues; however GSH metabolism and regulation occurs through intra and interorgan mechanisms. Also, it has been reported that exposure to xenobiotic or chemical depletors of GSH is reflected in MAPK activation *in vitro*; nevertheless, it is evident the lack of information concerning this modulation *in vivo*. In this study, we hypothesized that changes in GSH levels in an organism might induce organ-specific responses through MAPK activation. To test our hypothesis, mice were treated intraperitoneally with L-buthionine-S-R-sulfoximine (BSO) to inhibit GSH synthesis. A time-related GSH depletion in the liver and kidney correlated with p38<sup>MAPK</sup> phosphorylation and induction of *thioredoxin 1* (*Tx-1*) transcription. This positive regulation was associated with nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and ATF-2 and c-Jun phosphorylation in the liver, but only c-Jun phosphorylation in the kidney. Increased levels of GSH were observed in the brain together with extracellular regulated kinase 2 (ERK2) activation, Nrf2 nuclear accumulation, and increases in transcription of *Nrf2*, *xCT*,  *$\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ GCSr)* and *Tx-1*. Pretreatment with MAPK inhibitors SB203580 and U0126, or addition of the exogenous thiol N-acetylcysteine abrogated both p38<sup>MAPK</sup> and ERK2 activation as well as downstream effects on gene expression. No effect on  *$\gamma$ GCSr* was observed. These results indicate that in mice, GSH depletion is associated with MAPK activation in what could be considered part of organ specific “protective” response to thiol depletion.

## RESUMEN

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) son moduladoras de diversas respuestas celulares que van desde división, sobrevivencia, hasta la muerte celular. En los últimos años, se ha postulado que estas respuestas pueden estar moduladas por el estado redox celular, que es mantenido fundamentalmente por el tiol glutatión (GSH). En los mamíferos, el contenido de GSH varía en los diferentes tejidos, sin embargo el metabolismo sistémico del tiol obedece a mecanismos de regulación intra e interórgano. Se ha reportado que la exposición a xenobióticos y otros agentes químicos que disminuyen el contenido de GSH, se refleja en la activación de cinasas de la familia MAPK en modelos *in vitro*, sin embargo poco se sabe sobre esta modulación *in vivo*. En el presente estudio se planteó que los cambios en el contenido de GSH a nivel sistémico podrían estar asociados a la activación de MAPK generando una respuesta de manera órgano-específica. Para probar esta hipótesis se usaron ratones a los cuales se les inyectó L-butionina-S-R-sulfoximina (BSO) para inhibir la síntesis de GSH. Se observó una disminución del contenido de GSH respecto al tiempo en hígado y riñón que correlacionó con la activación de la cinasa p38<sup>MAPK</sup> y la inducción de la transcripción de tiorredoxina 1 (*Trx-1*). Esta regulación positiva estuvo asociada a la localización nuclear de NF- $\kappa$ B y ATF-2, además de la fosforilación de c-Jun en el hígado. En el riñón solo se observó la fosforilación de c-Jun. A diferencia de esto, en el cerebro se observó un aumento del nivel de GSH junto con la activación de la cinasa (ERK2), la acumulación nuclear de Nrf2 y el aumento en la transcripción de *Nrf2*, de la subunidad xCT del transportador X<sub>c</sub><sup>-</sup>, de la subunidad regulatoria de la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ GCSr) y de la *Trx-1*.

El pretratamiento con los inhibidores de MAPK, SB203580 y U0126, o la adición del tiol exógeno N-acetil cisteína (NAC), detienen la activación de p38<sup>MAPK</sup> y ERK2, así como la inducción de genes observada. Sin embargo, no se observó efecto del inhibidor U0126 en la expresión  $\gamma$ GCSr. Estos resultados nos indican que *in vivo*, la disminución en la concentración de GSH a nivel sistémico inducen la activación de cinasas MAPK y de respuestas que se podrían considerar como “protectoras” de manera órgano específica.

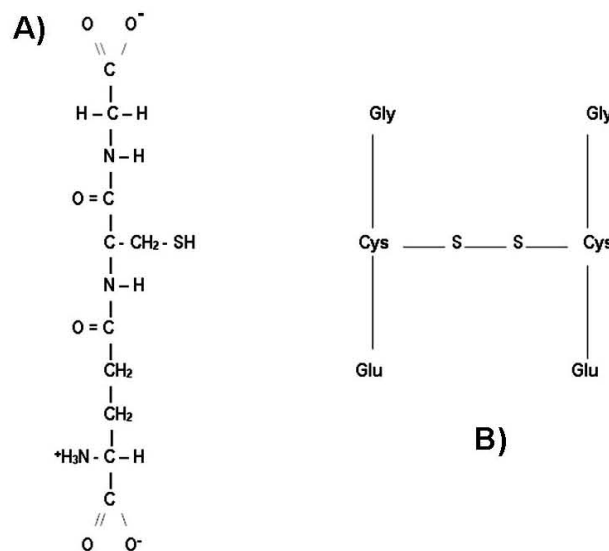
## INTRODUCCIÓN

La fosforilación oxidativa y la biotransformación metabólica en eucariontes son la principal fuente de especies reactivas del oxígeno (ROS) que causan un daño oxidante a macromoléculas como el DNA, los lípidos y las proteínas. Sin embargo, las células son capaces de contender con estos productos tóxicos sintetizando moléculas de bajo peso molecular como el glutatión (GSH). Este péptido es una de las moléculas más abundantes dentro de la célula, alcanzando concentraciones en el rango milimolar en algunos tejidos y tipos celulares, constituyendo así el mayor amortiguador redox celular. En los últimos años, se han arrojado evidencias que asocian al GSH con la modulación de diversas cascadas de señalización celular. Se ha sugerido que esto puede ocurrir a través de la interacción directa del GSH con las cisteínas localizadas en el sitio activo o en alguna región moduladora de cinasas, fosfatasas y factores de transcripción. A pesar de que algunos mecanismos se han descrito en modelos *in vitro*, los mecanismos *in vivo* han sido menos estudiados por lo que en el presente trabajo se pretende entender como el GSH intracelular puede modular vías de señalización en diferentes órganos de ratón.

## CAPÍTULO I

### ASPECTOS BIOQUÍMICOS DEL GLUTATIÓN

El glutatión (GSH) (L-γ-glutamil-L-cisteinilglicina), es un tripéptido constituido por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina (Fig. 1), cuyo grupo activo esta representado por el tiol (-SH) de la cisteína; es una molécula ubicua y es el tiol intracelular más abundante. En las células, el glutatión puede estar tanto en forma reducida (GSH), como en su forma oxidada (GSSG) (Fig.1), siendo la forma reducida la más abundante, aunque también puede estar unido a proteínas (Ghezzi, 2005; Gallogly y Mieyal, 2007).



**Figura 1. Estructura química del glutatión. A), forma reducida (GSH) y B), forma oxidada (GSSG). Tomado de Halliwell y Gutteridge, 1999.**

Desde su descubrimiento, se han descrito una gran variedad de funciones tanto para la forma GSH como para la GSSG, participando de manera directa o indirecta en muchos fenómenos biológicos, incluyendo la síntesis de proteínas y DNA, metabolismo de xenobióticos, actividad enzimática, defensa antioxidante y protección celular (Anderson, 1998). Además, el estado redox celular depende de la tasa de GSH/GSSG; y en condiciones normales el contenido de GSH en células de mamífero puede estar en concentraciones de 0.5-10 mM predominando siempre la forma reducida del tiol. La relación GSH/GSSG puede ser de 10/1

(Pastore *et al.*, 2003) aunque este valor no debe ser considerado como absoluto, pues mucho depende del estado celular, del tipo celular o tejido y del método empleado en su detección.

## **METABOLISMO DEL GSH**

### ***Síntesis de novo de GSH y el Ciclo $\gamma$ -glutamil***

La síntesis *de novo* del GSH y su degradación toma lugar en las reacciones del ciclo  $\gamma$ -glutamil (Tate *et al.*, 1973; Griffith y Meister, 1979a; Abbott *et al.*, 1986). El GSH se sintetiza en dos pasos consecutivos. En el primer paso, la enzima encargada del proceso es la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ GCS); la reacción consiste en la unión del glutamato con la cisteína mediante un enlace peptídico tipo  $\gamma$ -, que confiere resistencia a la mayoría de las peptidasas y que da como resultado el péptido  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteína (Anderson, 1998). La actividad de esta enzima es regulada por la subunidad ligera o regulatoria de la enzima ( $\gamma$ GCS<sub>r</sub>) y por inhibición negativa del producto final que es el GSH. En el paso subsiguiente, un residuo de glicina es adicionado al producto anterior mediante la acción de la enzima GSH sintetasa (GSS) para generar finalmente el GSH (Fig. 2). Cabe mencionar que ambas reacciones son dependientes de ATP. Una vez que es sintetizado el GSH puede ser exportado fuera de las células.

El catabolismo del GSH ocurre en el exterior celular en algunos tipos celulares y órganos como el riñón, plexo coroideo, linfocitos, ductos biliares, cuerpos ciliares, intestino, cerebro y páncreas (Anderson, 1998). Esta reacción es realizada por la enzima  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (GGT) que acepta la transferencia de aminoácidos y generar aminoácidos  $\gamma$ -glutamil. El GSH es exportado constantemente de las células a través de proteínas de la superfamilia de transportadores MRPs/ABCC (Rappa *et al.*, 1997; Munich *et al.*, 2006; Hammond *et al.*, 2007).

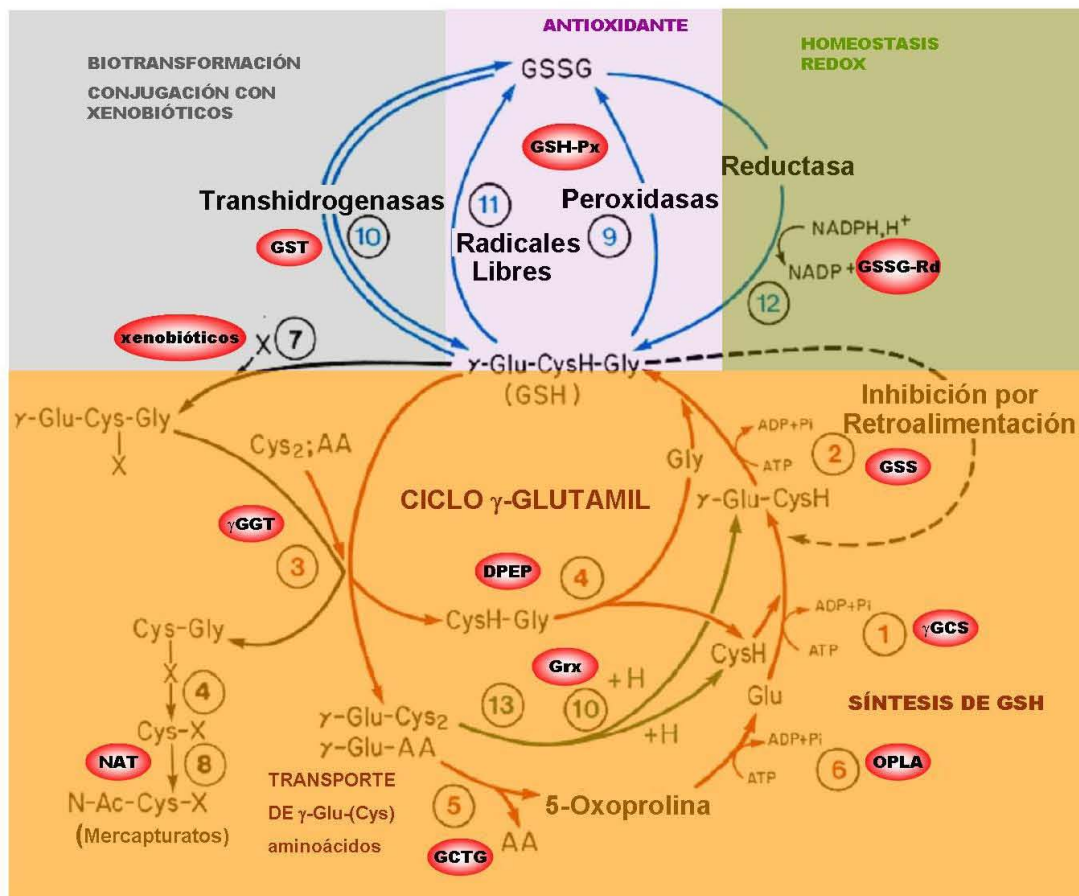


Figura 2. Representación de las rutas bioquímicas del GSH. AA, aminoácidos, X, compuestos que reaccionan con GSH para formar conjugados. Ciclo  $\gamma$ -glutamilo y síntesis de GSH: 1,  $\gamma$ -glutamilstetasa ( $\gamma$ GCS); 2, GSH sintetasa (GSS); 3,  $\gamma$ -glutamilo transpeptidasa ( $\gamma$ GGT); 4, dipeptidasas (DPEP); 5,  $\gamma$ -glutamilo ciclotransferasa (GCTG); 6, 5-oxoprolinasa (OPLA). Reacciones de óxido-reducción: 7, GSH S-transferasas (GST); 8, N-acetiltransferasa (NAT); 9, GSH peroxidasa (GSH-Px); 10, GSH tiol transferasas/glutarredoxina (Grx); 11, reacción de radicales libres con GSH, 12, glutatión disulfuro (GSSG) reductasa (GSSG-Rd); 13, transporte de  $\gamma$ -Glu-(Cys) aminoácidos. Tomado de Meister (1988).

Al atravesar la membrana celular, el GSH interactúa con la GGT, produciendo aminoácidos  $\gamma$ -glutamilo, que pueden ser transportados al interior de las células. Una vez que estos aminoácidos se encuentran al interior celular, pueden ser sustrato para la  $\gamma$ -glutamilo ciclotransferasa, la cual convierte estos compuestos a sus correspondientes aminoácidos generando además 5-oxoprolina, que es un producto intermediario del glutamato. Finalmente la 5-oxoprolina es convertida otra vez a L-glutamato por una reacción catalizada por la 5-oxoprolinasa. La cistina es uno de los mejores aceptores para la GGT, el producto que genera es  $\gamma$ -glutamilstetina (Thompson y Meister, 1976). En algunos tejidos, como en el caso del riñón, este producto puede ser incorporado y posteriormente reducido a cisteína o  $\gamma$ -glutamilstetina. La cisteína puede ser empleada en la síntesis de GSH o de proteínas, mientras que la  $\gamma$ -

glutamilcisteína puede incorporarse directamente a la síntesis de GSH por la interacción con la GSS (Anderson, 1998).

### ***Transporte del GSH y aminoácidos precursores***

Un aspecto del metabolismo de GSH y compuestos relacionados del que se sabe poco en mamíferos, es la manera en que este y/o sus precursores son transportados en los diferentes tejidos. Aunque la mayoría de los mecanismos no son del todo entendidos, para el presente trabajo vale la pena hacer una breve mención de algunos aspectos relevantes relacionados a: i), cómo se exporta el GSH del interior al exterior celular; ii), cuál es el destino del GSH y sus derivados una vez que se encuentran fuera de la célula; iii), cómo se lleva a cabo la distribución de los aminoácidos generados; y finalmente, iv), cómo ocurre la incorporación de los aminoácidos nuevamente al interior celular para la síntesis de GSH.

En primer lugar, algunos trabajos han demostrado que el GSH puede ser incorporado por transportadores específicos dependientes de sodio (Iantomasi *et al.*, 1999; Kannan *et al.*, 1999; 2000); sin embargo, aún no queda claro si este mecanismo ocurre en los distintos tipos celulares que conforman los tejidos bajo condiciones normales.

No obstante, la evidencia indica que el GSH está siendo constantemente exportado fuera de la célula, proceso que parece ocurrir a través de miembros de la familia de proteínas de resistencia a múltiples drogas (MRP). Las MRP 1 y 2 son capaces de exportar GSH, GSSG y conjugados con GSH, evidenciado por la interrupción del gen MRP1 que afecta el transporte de xenobióticos y de GSH (Rappa *et al.*, 1999). Un aspecto interesante es que la mayoría de los tejidos podrían exportar el GSH y sus conjugados, sin embargo la capacidad sería muy específica para cada tejido porque dependería del nivel de expresión de los transportadores MRP. Por ejemplo, la MRP2 sólo está presente en hígado y riñón, a diferencia de la MRP5 que es ubicua, o de la MRP1, que es ubicua pero tiene baja expresión en hígado (Borst *et al.*, 1999; König *et al.*, 1999). Una vez que el GSH o el GSSG están en el exterior celular, el ciclo  $\gamma$ -glutamil podría efectuarse. Ambas formas del GSH pueden ser sustratos para la GGT y alguna dipeptidasa que se encuentre intracelularmente, lo cual llevaría a la formación de aminoácidos  $\gamma$ -glutamil, glutamato, glicina, cisteína, cistina, cisteinilglicina, cisteinil-*bis*-glicina y disulfuros entre GSH, cisteína y cisteinilglicina (Griffith y Meister, 1979b; Bridges y Meister, 1985). Se han hecho estudios que han sugerido que estos aminoácidos formados, así como el GSH y GSSG

podrían ser movilizados a los diferentes tejidos a través del plasma sanguíneo (Anderson y Meister, 1980; Bridges y Meister 1985). El GSH y el GSSG podrían ser sustrato de la GGT en aquellos tejidos que la expresen, reanudando el ciclo  $\gamma$ -glutamil. Los aminoácidos entonces podrían ser incorporados a las células por sus correspondientes transportadores, por ejemplo GlyT2 para la glicina (Zafra *et al.*, 1995), el transportador de glutamato (Danbolt, 2001), el sistema  $X_c^-$  para la cisteína/cistina (Shanker y Aschner, 2001; Kanai y Endou, 2001).

Como ya se mencionó, los aminoácidos precursores del GSH son constantemente exportados e importados en las células y se ha aceptado que la disponibilidad de estos aminoácidos, en especial la cisteína, es un factor importante en la regulación de la concentración de GSH. La cisteína, que no es un aminoácido esencial, puede ser sintetizada a partir de la metionina (esencial) y la serina (no esencial) por un proceso denominado transulfuración realizado predominantemente en el hígado. Otros tejidos parecen requerir aporte exógeno de cisteína debido a su baja capacidad para sintetizarla (Bannai *et al.*, 1989). La cisteína en su estado reducido esta principalmente en el interior celular, mientras que la forma oxidada o cistina, se encuentra en el exterior celular. La cisteína fácilmente se oxida a cistina en el fluido extracelular pero una vez que entra al interior celular es rápidamente reducida a cisteína. Su disponibilidad claramente depende de su transporte, dado que la membrana plasmática es poco permeable a los aminoácidos.

El glutamato es un aminoácido que puede tener un papel en la regulación de la síntesis de GSH de 2 maneras: 1) con la incorporación de cisteína, 2) la prevención de la inhibición de GCS por GSH. Tanto la cistina como el glutamato comparten el sistema transportador de aminoácidos  $X_c^-$  (Wu *et al.*, 2003). Cuando la concentración extracelular de glutamato es alta, la incorporación de cistina es completamente inhibida, lo cual resulta en una disminución de la síntesis de GSH (Tapiero *et al.*, 2002). Por otra parte, el GSH es el inhibidor no alostérico de la GCS, pero en presencia de glutamato se da una competencia por la unión con la enzima (Griffith, 1999).

El sistema  $X_c^-$  es el transportador independiente de sodio responsable por la incorporación de cistina al intercambiarla en proporción 1:1 por el glutamato a través de la membrana celular (Bannai, 1984; Bannai y Kitamura, 1980; Bannai *et al.*, 1986; Watanabe y Bannai, 1987). La función de intercambio es realizada por un heterodímero que consiste en un



transportador de aminoácidos, 4F2hc, que es una cadena pesada; y una cadena ligera, xCT. Este transportador esta distribuido en varios tipos celulares y tejidos, su expresión ha sido detectada principalmente en macrófagos y en diferentes regiones del cerebro, riñón e intestino (Piani y Fontana, 1994; Sato *et al.*, 1999; 2002; Burdo *et al.*, 2006). En la tabla 1 se describen los transportadores de aminoácidos más importantes en mamíferos, algunos de los cuales pueden tener afinidad por los mismos sustratos.

**Tabla 1. Sistemas de transporte de aminoácidos (Tomado de Kannai y Endou, 2001).**

Nombre	Dependencia de $\text{Na}^+$	Sustrato	Transportador
<b>Aminoácidos neutros</b>			
A	sí	Ala, Pro, aminoácidos N-metilo	ATA1,ATA2,ATA3
G	sí	Gly, Ser	GLYT1,GLYT2
B <sup>o</sup>	sí	Amplia selectividad	
ASC	sí	Ala, Ser, Thr, Cys (Gln)	ASCT1, ASCT2
N	sí	Gln, Asn His	SN1, SN2
Sistema $\beta$	sí	$\beta$ -Ala, Tau	Taut
$y^+L$	sí	<sup>a</sup> Aminoácidos básicos y neutros	$y^+LAT1$ .4F2hc, $y^+LAT2$ .4F2hc
L	no	Aminoácidos neutros	<sup>b</sup> LAT1.4F2hc, LAT2.4F2hc
asc	no	Ala, Ser, Thr, Cys	<sup>b</sup> ASC-1. 4F2hc
T	no	Aminoácidos aromáticos	TAT1
$b^{o+}$	no	Aminoácidos básicos y neutros	<sup>b</sup> BAT1/ $b^{o+}$ AT.rBAT
<b>Aminoácidos básicos</b>			
$B^{o+}$	sí	Aminoácidos básicos y neutros	ATB <sup>o+</sup>
$y^+$	no	Aminoácidos básicos	CAT1, CAT2, CAT2A,CAT3,CAT4
$B^{o+}$	no	Aminoácidos básicos y neutros	<sup>b</sup> BAT1/ $b^{o+}$ AT.rBAT
$y^+L$	no	<sup>a</sup> Aminoácidos básicos y neutros	<sup>b</sup> $y^+LAT1$ .4F2hc, $y^+LAT2$ .4F2hc
<b>Aminoácidos ácidos</b>			
$X_{AG}^-$	sí	L—Glu, L-/D-Asp	EAAC1, GLT-1, GLAST, EAAT4, EAAT5
$X_C^-$	no	Intercambio Cistina/Glutamato	<sup>b</sup> xCT.4F2hc

<sup>a</sup> Sistema parcialmente dependiente de  $\text{Na}^+$  para aminoácidos neutros e independiente de  $\text{Na}^+$  para aminoácidos básicos.

<sup>b</sup> Transportadores heterodiméricos

Estas consideraciones hacen claramente evidente que en los mamíferos el sistema GSH es dinámico y que esta regulado por diversos mecanismos intra e interórgano.

### **Contenido de GSH y su regulación intra e inter órgano en mamíferos**

A lo largo de varias décadas, se han hecho grandes esfuerzos para entender la regulación del GSH a nivel intra e interórgano; sin embargo, esto aun no es del todo comprendido debido muy probablemente a la complejidad del fenómeno. A pesar de esta limitante se ha logrado establecer una idea general de cómo ocurre en los mamíferos. El estudio de la dinámica del GSH a nivel intra e interórgano en modelos animales y en voluntarios humanos durante una condición de ejercicio exhaustivo ha revelado que, durante éste, la concentración del GSSG se incrementa en el músculo esquelético (Ji y Fu, 1992) y en la sangre (Gohil *et al.*, 1988; Sastre *et al.*, 1992), lo que indica una utilización elevada del GSH. En el hígado, el contenido de GSH declina durante el ejercicio exhaustivo (Lew *et al.*, 1985; Pyke *et al.*, 1986) mientras que en el músculo, la respuesta es variable pues se ha observado que el contenido de GSH puede disminuir (Ji y Fu, 1992) o incrementar (Lew *et al.*, 1985; Leeuwenburgh y Ji, 1995). En la regulación del GSH a nivel interórgano, la distribución del flujo sanguíneo, y por ende, la incorporación de los precursores del GSH a los tejidos, esta íntimamente relacionada con el incremento en disponibilidad del GSH en cada uno. Por ello, es importante revisar algunos aspectos relacionados al GSH en algunos órganos.

#### *GSH en hígado, bilis y plasma*

El hígado es el principal órgano en la síntesis *de novo* del GSH y aporta cerca del 90% del GSH circulante bajo condiciones fisiológicas (Lauterburg *et al.*, 1984; Deneke y Fanburg, 1989). La concentración de GSH en este órgano es la más alta de los tejidos de los mamíferos y puede llegar a alcanzar concentraciones ~7-10 mM en hepatocitos (Hammond *et al.*, 2001). Algunos reportes indican que la mitad del GSH liberado en los hepatocitos de rata es transportado a través de la membrana canalicular a la bilis, donde el GSH alcanza concentraciones de 8-10 mM (Ballatori *et al.*, 1986; Hammond *et al.*, 2001). Se menciona que aproximadamente 20% del GSH sintetizado en hígado aparece excretado en la bilis (Sies *et al.*, 1978). Al parecer este flujo del GSH a la bilis y al plasma es promovido por diferentes hormonas como el glucagón y la vasopresina (Sies y Graf, 1985; Lu *et al.*, 1990). La concentración de aminoácidos en bilis de rata se encuentra entre 4-7 mM, que es cerca del doble de lo que se encuentra en plasma 2-3 mM. Los aminoácidos más abundantes en bilis de rata son el glutamato y la glicina, seguidos de valina y leucina (Ballatory *et al.*, 1986).

En contraste, la concentración de GSH en plasma normalmente se encuentra en el rango  $\mu\text{M}$  (Pastore *et al.*, 2003). Como ya se mencionó, una vez que el GSH y o los aminoácidos se encuentran en plasma, estos pueden ser distribuidos y utilizados por los tejidos periféricos para la síntesis de GSH a través del ciclo  $\gamma$ -glutamil (Fig. 2).

#### *GSH en riñón*

El riñón es el órgano con la mayor actividad de GGT de todos los tejidos, lo cual facilita que el GSH sea removido del plasma durante la filtración glomerular. En condiciones basales, entre el 80-90% del GSH plasmático es catabolizado por el riñón debido a su alta actividad de GGT, aunque otros tejidos como el músculo esquelético y el corazón también lo realizan en menor proporción (Leeuwenburgh y Ji, 1995). Este órgano usa el GSH que es transportado de las células renales, lo que es considerado como parte de un ciclo intraórgano, así como también el que se encuentra en plasma. El transporte de GSH de las células renales al túbulo renal en la rata representa el 80% del glutatión tubular; el restante proviene del plasma a través de la filtración glomerular (Pastore *et al.*, 2003).

#### *GSH en músculo*

De acuerdo a Leeuwenburgh y Ji (1995), el músculo esquelético es la poza de GSH más grande del cuerpo, esto en relación a la cantidad de tejido, que representa cerca del 40% del peso corporal en el caso del ratón. Las concentraciones de GSH se encuentran en el rango intermedio mM. Tanto el músculo esquelético como el cardiaco tienen la capacidad de catabolizar el GSH vía GGT aunque en menor proporción que el riñón (Leeuwenburgh y Ji, 1995).

#### *GSH en cerebro*

El cerebro es quizá, el órgano más susceptible al daño oxidante debido a varios factores entre los que se pueden destacar: un alto nivel de consumo de oxígeno (cerca del 20% del total consumido por el cuerpo), el contenido de hierro, la presencia de ácidos grasos no saturados y una actividad limitada de enzimas antioxidantes que participan en la desintoxicación, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión reductasa (GSSG-Rd) (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2007). De acuerdo a Cooper (1998), el contenido de

GSH en cerebro está muy relacionado con las concentraciones de aminoácidos presentes en el órgano, sangre y fluido cefalorraquídeo. Las concentraciones de GSH, cisteína y cistina en el cerebro están en el rango de ~1-3 mM y 30-70  $\mu$ M, respectivamente. La concentración del GSH total [GSH+ (GSSGx2)] en plasma de rata es de ~15-20  $\mu$ M, mayormente en forma GSH (Jain *et al.*, 1991). La concentración de cisteína y cistina en sangre de rata es de 70-100  $\mu$ M de lo cual ~90% está en forma de cistina (Semon *et al.*, 1989; Sastre y Rabenstein, 1978). Las concentraciones de glutatión total, de cisteína y cistina en líquido cefalorraquídeo de rata son de ~5 y 4  $\mu$ M, respectivamente predominando las formas reducidas (Anderson *et al.*, 1989). Cabe aclarar que estos valores no deben ser tomados como absolutos, ya que pueden variar de acuerdo a la especie, el método de detección empleado o las condiciones experimentales.

Por otra parte, en el cerebro, el plexo coroideo tiene una actividad de GGT similar al riñón y en menor proporción en otras regiones del cerebro como la corteza, cerebelo, tálamo y el núcleo caudado, indicando que el ciclo  $\gamma$ -glutamil y el transporte de aminoácidos ocurre en algunas regiones del cerebro (Tate *et al.*, 1973).

#### *GSH en tracto gastrointestinal*

El tracto gastrointestinal es muy importante dado que en él se absorben los precursores aminoácidos para la síntesis de GSH y las proteínas (Wu *et al.*, 2004). Hay evidencia que indica que el balance de aminoácidos en la dieta tiene un importante efecto en la síntesis de proteínas y por supuesto en la homeostasis de GSH. A diferencia del riñón, el intestino obtiene el glutamato para la síntesis de GSH a través de la dieta (Wu *et al.*, 2004). Se ha descrito que la glicina como suplemento en la dieta puede aumentar la concentración de GSH hepático (Grimble *et al.*, 1992). Por otra parte, el GSH proveniente de la dieta puede ser absorbido intacto, lo cual resulta en un incremento del GSH en el plasma sanguíneo (Hagen y Jones, 1987; Hagen *et al.*, 1990; Aw *et al.*, 1991). Un aspecto que llama la atención es que la inhibición de la síntesis del GSH en el tracto gastrointestinal lleva a cambios morfológicos en el tejido (Martensson *et al.*, 1990).

Es importante mencionar que la regulación intra e interórgano se puede ver afectada por factores como: edad del individuo, estado nutricional, estrés, exposición a xenobióticos, por

mencionar algunos. En la figura 3 se ilustra un modelo del transporte del GSH a nivel interórgano.

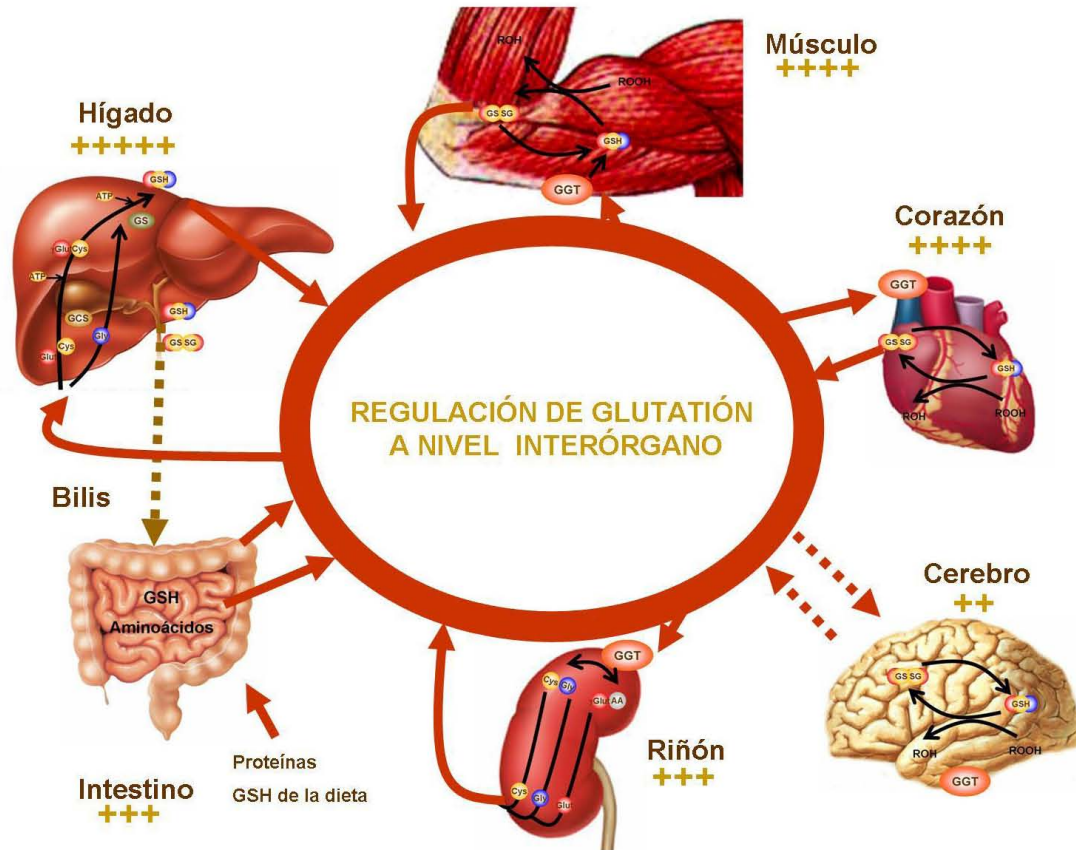


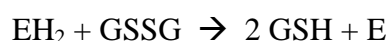
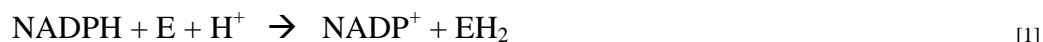
Figura 3. Modelo del transporte de GSH a nivel interórgano. El hígado es la principal fuente de GSH, pues en él se lleva a cabo la mayor síntesis de novo. Una vez sintetizado, el GSH puede ser exportado a plasma y bilis. El GSH, GSSG y los precursores aminoácidos son distribuidos a los diferentes órganos. Aquellos órganos con expresión y actividad de GGT como el riñón, el músculo y algunas regiones del cerebro, podrán romper el GSSG y el GSSG para incorporarlos al ciclo  $\gamma$ -glutamil. El intestino es muy importante en la absorción de aminoácidos y GSH que provienen de la dieta. (Modificado del modelo de Leeuwenburgh y Ji, 1995).

### Reacciones asociadas a la óxido-reducción del GSH

Hay varias reacciones donde el GSH tiene un papel importante, ya que el grupo tiol es clave y está relacionado con reacciones oxidoreductoras y formación de disulfuros que son en su mayoría procesos reversibles.

El GSH es usado por las GSH peroxidasas (GSH Px), las cuales pueden reducir el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) formado GSSG en el proceso. El radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pueden producir ROS que lleven a su vez a la formación de peróxidos orgánicos (Chance *et al.*, 1979). Por lo tanto al eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las GSH-Px protegen a las membranas celulares y a las proteínas ahí localizadas contra la oxidación (Meister, 1988). Una vez que se ha formado el GSSG, la reducción de GSSG a GSH es catalizada por la glutatión reductasa (GSSG-Rd), reacción dependiente de NADPH como cofactor de reducción y que procede en dos reacciones [EC 1]:



donde E, representa la forma oxidada de la enzima con sitio activo en los residuos Cys-58-Cys-63; en presencia de NADPH se forma EH<sub>2</sub>, que ahora es la forma reducida de la enzima con los residuos Cys-58 y Cys-63 como ditiol. Ambas formas son bastante estables; EH<sub>2</sub> puede ser producida a partir de la interacción de la GSSG-Rd con NADPH o GSH y se ha pensado que es la forma de la enzima predominante en el interior celular. Las glutatión transhidrogenasas o glutatión S-transferasas (GST) constituyen un grupo amplio de proteínas que en general, catalizan la reacción entre los grupos tiol (-SH) del GSH y agentes alquilantes potenciales con lo cual neutralizan los sitios electrofílicos haciéndolos solubles y excretables. Estas enzimas representan además uno de los mayores grupos de enzimas de fase II (Clapper y Szarka, 1998; Strange *et al.*, 2000).

### **Funciones asociadas al GSH**

Se ha descrito que el GSH participa en muchas funciones importantes, como el metabolismo y mantenimiento de tioles proteicos y de moléculas de bajo peso molecular, como el  $\alpha$ -tocoferol y el ácido ascórbico al evitar su oxidación (Bigley, *et al.*, 1981; Liebler *et al.*, 1986; Graham *et al.*, 1989; Scholich *et al.*, 1989; Murphy *et al.*, 1992; Leedle y Aust, 1990; Martensson y Meister, 1991a; Vethanayagam *et al.*, 1999). Se le considera también una reserva de cisteína debido a que el GSH contiene al aminoácido y se encuentra a altas concentraciones intracelulares (Halliwell y Gutteridge, 1999). Participa en la formación de desoxirribonucleótidos a través del sistema de glutarredoxina (Grx), que es dependiente de GSH y al cual usa para reducir a los ribonucleótidos (Luthman *et al.*, 1979). Reacciona espontáneamente con compuestos tóxicos para formar conjugados excretables, o

enzimáticamente, a través de las GSTs que lo acoplan a metabolitos reactivos desintoxicando con ello a la célula. Protege contra el daño oxidante causado por las ROS que se forman normalmente en el metabolismo celular. La reacción del GSH con estas moléculas tóxicas puede ser espontánea o a través de la GSH-Px en el caso de los peróxidos. Cabe mencionar que la mayoría de los estudios sobre las funciones de GSH han sido descritos en hígado y riñón, en donde su participación ha sido estudiada en mecanismos de desintoxicación, así como de resistencia a metales y fármacos, ya que los metabolitos acoplados a GSH son rápidamente excretados por transportadores de la familia de proteínas ABC (Borst *et al.*, 2000). Un resumen de sus funciones generales se muestra en la Tabla 2.

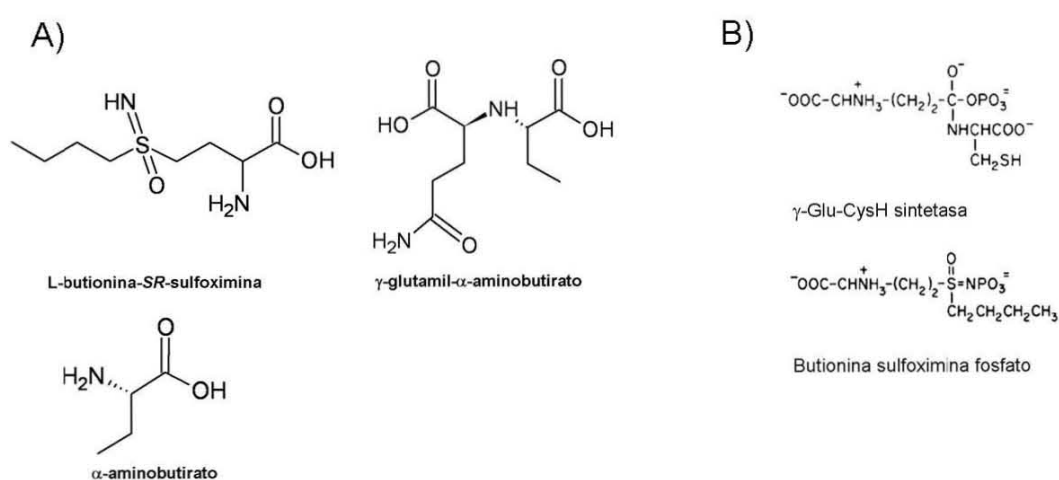
**Tabla 2. Funciones generales del GSH.**

Funciones	Referencias
<i>Agente reductor, antioxidante</i>	
Protección contra estrés oxidativo y peroxidación lipídica	Boobis <i>et al.</i> , 1989; Werns y Luchéis, 1990
Protección de membranas celulares	Kosower <i>et al.</i> , 1982; Yang <i>et al.</i> , 2001
Protección contra la radiación y luz UV; reparación de DNA	Revesz y Edgren, 1994; Connor y Wheeler, 1987
Mantenimiento de grupos SH de proteínas; destrucción de peróxidos y radicales libres	Kosower y Kosower, 1978; Meister, 1988; Beer <i>et al.</i> , 2004
<i>Desintoxicación de Xenobióticos</i>	
Conjugación con xenobióticos	Burk <i>et al.</i> , 1983
<i>Reservorio y transferencia de cisteína</i>	
	Meister, 1988
<i>Regulación metabólica</i>	
Cofactor y sustrato	Kosower y Kosower, 1978
Síntesis de proteínas y ácidos nucleicos	Meister, 1988
Síntesis de leucotrienos	Parker <i>et al.</i> , 1980
Transporte de aminoácidos	Meister y Tate, 1986
Mantenimiento de la homeostasis del Ca <sup>2+</sup> al proteger los -SH en ATPasas	Max, 1989; Mira <i>et al.</i> , 1991; Fearon <i>et al.</i> , 2000

### Modulación del metabolismo de GSH

Existen varias estrategias para manipular la concentración de GSH intracelular (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2007). Sin embargo, muchos trabajos a lo largo de tres décadas han demostrado que la mejor estrategia para disminuir el GSH intracelular, se basa en la inhibición de su síntesis. Esto se lleva a cabo mediante el uso de la L-butionina-S,R-sulfoximina (BSO), que es bien conocida por su efecto inhibitorio en la síntesis de novo de GSH, que disminuye la

formación del precursor  $\gamma$ -glutamilcisteinil y por consiguiente de GSH. Se ha sugerido que el consumo de GSH continúa en las reacciones donde normalmente se requiere y que el GSH intracelular preexistente puede ser exportado de las células lo que en suma da una eficiente disminución del tior (Griffith, 1981). Estructuralmente, la BSO es similar al  $\gamma$ -glutamil- $\alpha$ -aminobutirato, el producto enzimático formado a partir del glutamato y el  $\gamma$ -aminobutirato, que es el primer paso en la síntesis de GSH (Fig. 4).



**Figura 4.** Estructura química de la L-butionina-SR-sulfoximina (BSO) y el  $\gamma$ -glutamil- $\alpha$ -aminobutirato. A), estructura química no fosforilada de la BSO; B) Comparación entre el producto de la  $\gamma$ -GCS y la forma fosforilada de la BSO ambos sustratos de la  $\gamma$ -GCS (ver detalles en el texto). (Tomado de Limón-Pacheco y Gonsébat, 2007 y Meister, 1988).

La BSO es un potente inhibidor de una serie de análogos basados en la metionina sulfoximina (MSO), los cuales se unen a la GCS. La BSO es fosforilada al unirse a la enzima, dando como resultado butionina sulfoximina fosfato, la cual imita el intermediario natural  $\gamma$ -glutamilfosfato- $\alpha$ -aminobutirato. Este se une fuertemente al sitio activo de la enzima bloqueando así la progresión de la síntesis de GSH (Griffith y Meister, 1979c; Griffith, 1982; Griffith 1988).

La tasa de inhibición y la duración de la misma, dependen de la concentración de glutamato, el cual compite por el mismo sitio de unión. Se ha demostrado que en presencia de



5 mM de glutamato, 10 mM de ATP, 1 y 10  $\mu$ M de BSO inhiben a la GCS de riñón de rata un 52 y 100% respecto al control en 10 minutos (Griffith, 1982). Las concentraciones de GSH en hígado, riñón, páncreas y músculo esquelético fueron rápidamente disminuidas después de una sola dosis de BSO en roedores (Griffith y Meister, 1979c). Una de las desventajas del empleo de la BSO *in vivo*, es que en un mamífero adulto el compuesto es poco permeable a la barrera hematoencefálica por lo que su uso para disminuir el GSH en cerebro en un esquema agudo es limitado. La BSO puede ser administrada crónicamente y a dosis altas (72 mmol/kg) sin toxicidad aparente (Griffith, 1981; Mulder y Ouwerker-Mahadevan, 1997).

### ***Patologías asociadas a la deficiencia de GSH***

Existe una asociación entre la disminución del contenido de GSH y el desarrollo de patologías. Por ejemplo, se ha observado que existen bajas concentraciones de GSH asociadas al desarrollo de enfermedades degenerativas del sistema nervioso como el Síndrome de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Bains y Shaw, 1997). Por otra parte, la generación de ROS en exceso durante condiciones como el ejercicio extenuante, procesos infecciosos crónicos, parasitosis y la exposición crónica a xenobióticos también puede disminuir el contenido de GSH. Además, se ha visto que como consecuencia del envejecimiento, los sistemas antioxidantes incluido el GSH disminuyen en todos los tejidos, lo que les hace más susceptibles al daño oxidante (Tabla 3). De acuerdo a Sen (1997) los factores que pueden contribuir a las concentraciones bajas de GSH son: a) limitada síntesis de GSH, b) elevada utilización de GSH y c) una pobre reducción de glutatión oxidado (GSSG).

Deficiencias congénitas en la GSS son raras, pero han sido reportadas (Sen, 1997). Un factor limitante intracelular común de la síntesis, es la disponibilidad del sustrato cisteína. También existe una regulación de GSH por hormonas, y aunque todavía no es claro, se piensa que puede ser debido a una estrategia para preservar la cisteína celular para la síntesis proteica en respuesta al estrés (Lu *et al.*, 1991). Una elevada utilización de la molécula que contribuye a los bajos niveles de GSH ocurre al haber exposición a xenobióticos o durante el ejercicio extenuante (Leeuwenburgh y Ji, 1995).

**Tabla 3. Condiciones que son asociadas con el decremento de la concentración de glutatión (Tomado de Sen, 1997).**

<b>Condición/especie</b>	<b>Tejido/célula/componente subcelular</b>
<b>VIH +</b>	
Humano	Células mononucleares de sangre periférica Fluido del tejido de recubrimiento pulmonar
<b>Hepatitis C</b>	
Humano	Células mononucleares de sangre periférica
<b>Cirrosis Hepática</b>	
Humano	Plasma, eritrocitos
<b>Envenenamiento con acetaminofén</b>	
Ratón	Riñón , hígado
<b>Diabetes tipo II</b>	
Humano	Sangre total
<b>DMNID</b>	
Humano	Eritrocitos
<b>Trastorno de tolerancia a la glucosa</b>	
Humano	Eritrocitos
<b>Colitis ulcerosa</b>	
Humano	Sangre y tejido de colón
<b>Quemaduras de piel</b>	
rata y conejo	Tejido epidérmico y mitocondria
<b>Fibrosis pulmonar</b>	
Humano	Fluido de tejido recubrimiento pulmonar
<b>Síndrome respiratorio del adulto</b>	
Humano	Fluido de tejido recubrimiento pulmonar
<b>Desnutrición</b>	
humano	Eritrocito
<b>Ejercicio físico</b>	
Rata	Hígado, músculo y sangre
<b>Atrofia muscular</b>	
rata y perro	Músculo esquelético
<b>Envejecimiento</b>	
ratón	Hígado
humano	Mucosa gástrica y eritrocitos
rata y ratón	Mitocondria de hígado, riñón y cerebro
<b>Hipoxia perinatal</b>	
Humano	Sangre arterial umbilical
<b>Infarto agudo al miocardio</b>	
Humano	Sangre
<b>Citotoxicidad por glutamato</b>	
humano	Células T
rata	Neuronas
<b>Muerte celular programada</b>	
Humano	Células T

VIH+, virus de inmunodeficiencia humana; NIDDM, Diabetes Mellitus No-Insulinodependiente

La reducción limitada de GSSG a GSH también disminuye su disponibilidad. La GSSG-Rd requiere un adecuado suplemento de NADPH como cofactor (Salvemini *et al.*, 1999; Prévaille *et al.*, 1999). Si existe una limitada cantidad de NADPH intracelular, la reducción de GSSG a GSH tan esperada no ocurre, trayendo como consecuencia la acumulación de GSSG y su expulsión de la célula (Sen, 1997).

### ***El GSH como modulador de la respuesta celular a diversos estímulos***

En años recientes, además ha sido descrito el papel del GSH en la modulación de las señales intracelulares a través de la interacción directa con cisteínas localizadas en los sitios activos o regiones moduladoras de cinasas, fosfatasas y factores de transcripción que regulan la transcripción de una amplia variedad de genes implicados en procesos celulares como el crecimiento, la diferenciación y la muerte. En el siguiente capítulo se describirán aspectos generales de la familia de las MAPK, un grupo de cinasas que en los últimos años ha llamado la atención debido a que algunos de sus miembros parecen ser regulados a través del estado redox.

## CAPÍTULO II

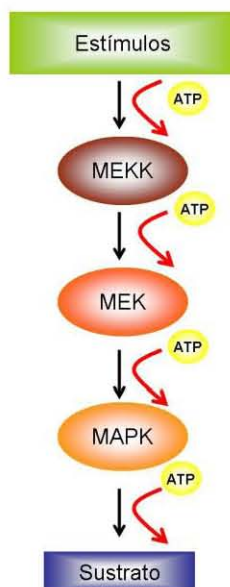
### SEÑALIZACIÓN CELULAR A TRAVÉS DE PROTEÍNAS CINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)

Una de las interrogantes más importantes en biología es como las células pueden percibir cambios en su entorno y responder de una manera específica. Este problema ha sido foco de atención por muchos años lo que ha permitido describir las bases del funcionamiento de los sistemas de transducción de señales. La fosforilación de proteínas es el mecanismo principal para transmitir las respuestas en el interior celular. Durante las décadas de los 70s y 80s, los esfuerzos se concentraron en aquellas proteínas que mediaban el efecto de factores de crecimiento y hormonas, como por ejemplo la insulina (Lewis *et al.*, 1998). A este grupo de proteínas se les dio el nombre de proteínas cinasas. Gracias a estos esfuerzos ahora sabemos que la activación de cascadas de proteínas cinasas es un mecanismo de señalización celular común en muchos procesos celulares. Uno de los grupos más importantes de este tipo de proteínas son las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), las cuales pueden activarse en respuesta a una diversidad muy grande de estímulos. Estos estímulos pueden ser producidos por las mismas células, como los factores de crecimiento y citocinas, hasta estímulos ambientales como la radicación, cambios en la osmolaridad, exposición a xenobióticos, entre muchos otros.

#### REGULACIÓN DE LAS VÍAS DE MAPK

Para la comprensión de la señalización celular por MAPK se debe tener en cuenta es que las vías están ensambladas en módulos de por lo menos tres componentes que establecen una vía de activación secuencial (Fig. 5). La primera cinasa de dicho modulo es una cinasa-cinasa de MAPK (MAPKKK o MEKK) (Fanger *et al.*, 1997). Estas cinasas pueden ser activadas por otras MEKK o por proteínas de la familia Ras o Rho (Widmann *et al.*, 1999). Las MEKK son cinasas de serina/treonina que una vez activas fosforilan y activan a la siguiente cinasa en el módulo, una MAPK-cinasa (MAPKK o MEK) (Siow *et al.*, 1997). A su vez, la MEK activa reconoce y fosforila el motivo Thr-x-Tyr o Pro-X-Ser/Thr-Pro del sitio de activación de la MAPK (Gonzalez *et al.*, 1992; Alvarez *et al.*, 1991; Marshall, 1994). Este motivo se emplea para distinguir a las diferentes cascadas (Lewis *et al.*, 1998). Las MAPK son el modulo final y una

vez activas fosforilan sustratos en residuos de Ser y Thr, siendo la mayoría factores de transcripción.



**Figura 5. Módulo básico en la señalización por MAPK. El módulo está compuesto por tres cinasas MEKK, MEK y MAPK, las cuales se activan de manera secuencial por fosforilación.**

La activación de MAPK termina por la acción de las proteínas fosfatasa que defosforilan los residuos de Ser, Thr o Tyr en las cinasas activas. Las fosfatasa se ubican en dos grupos generales, las proteínas fosfatasa (PPs) y las proteínas fosfatasa de Tyr (PTPs). Las PPs hidrolizan específicamente fosfoésteres de Ser/Thr e incluye a las PP1, PP2A, PP2B y PP2C (Wera y Hemmings, 1995). En cambio las PTPs hidrolizan fosfoésteres de Tyr e incluyen a las fosfatasa de especificidad dual (DSPs) que son capaces de hidrolizar tanto fosfotirosinas como fosfoserinas y fosfotreoninas (Fauman y Saper, 1996). Como se describirá más adelante, estas proteínas pueden tener sitios sensibles a óxido-reducción en sus sitios catalíticos, lo que indica una posible regulación redox dependiente.

### VÍAS DE MAPK EN MAMÍFEROS

En los mamíferos, existen cuatro tipos principales de MAPK las cuales se nombran de acuerdo a los componentes de cada subgrupo: 1), las cinasas reguladas por estímulos

extracelulares (ERKs); 2), las cinasas de c-Jun N-terminal (JNK), también conocidas como proteínas cinasas activadas por estrés (SAPKs 1); 3) las p38<sup>MAPK</sup>, conocidas también como SAPKs 2-4 ó p38  $\alpha$ - $\beta$ ; y 4) las cinasas reguladas por estímulos extracelulares 5, también conocidas como ERK5 ó BMK (Rubinfeld y Seger, 2004). En cada una de estas cascadas, se encuentran isoformas muy similares, las cuales amplían las posibilidades de actividad. Las MAPK difieren además en su papel fisiológico, por ejemplo, usualmente las ERKs juegan un papel importante en la proliferación y la diferenciación, que sin embargo pueden variar de acuerdo al tipo celular y la condición celular específica. Las JNK se asocian más al estrés de tipo metabólico, como la deficiencia de glucosa, en tanto que las p38<sup>MAPK</sup> responden más a estímulos por estrés ambiental (Owuor y Kong, 2002). Así, estas cinasas pueden translucir señales ante diversos estímulos, desde la proliferación celular, mitosis, diferenciación, respuestas al estrés, sobrevivencia celular y la apoptosis (Fig. 6).

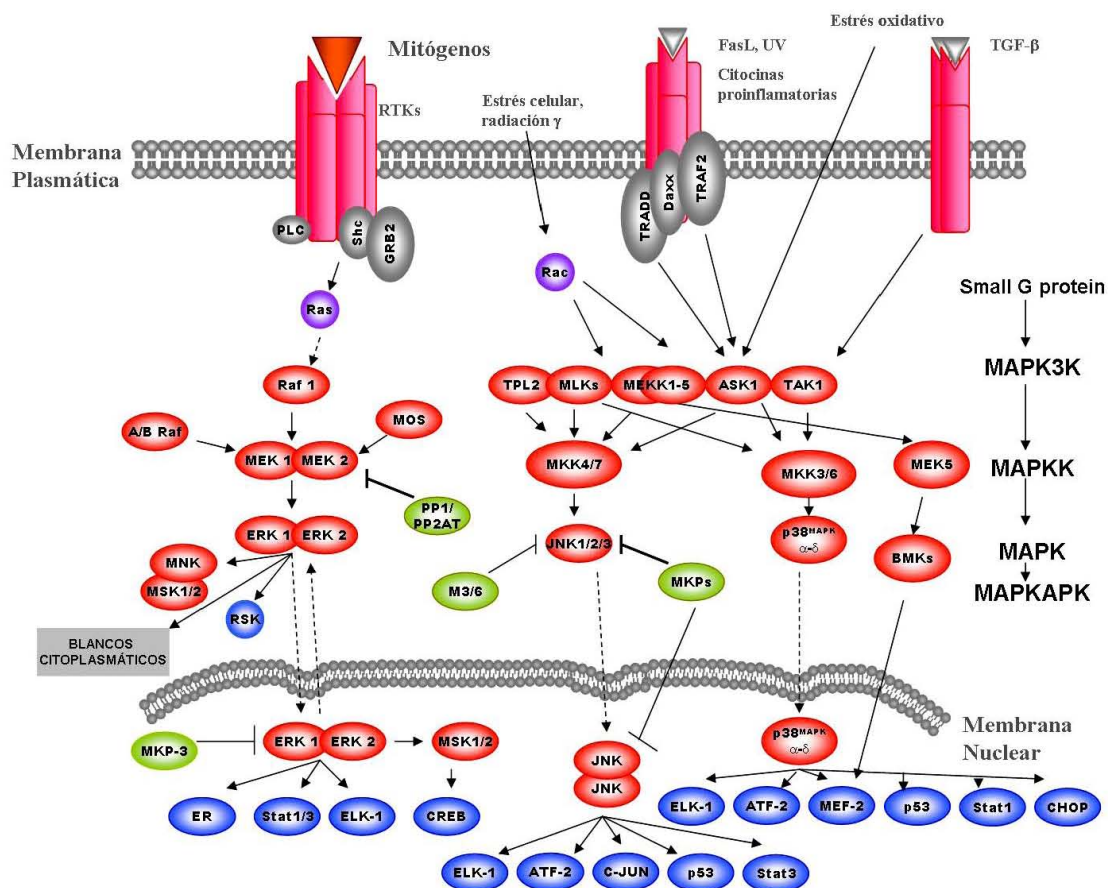


Figura 6. Representación esquemática de las vías de señalización por MAPK en mamíferos.

A continuación se mencionan algunos aspectos muy generales de las familias que se consideraron para el presente trabajo y se recomienda la lectura de Lewis *et al.*, 1998 y Widdman *et al.*, 1999 para ampliar sobre el tema.

### **Cascada ERK**

Estas cinasas son activadas por una gran variedad de agentes extracelulares e incluyen a factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores (Chang y Karin, 2001; Cobb, 1997). Las cinasas más conocidas de este grupo son ERK1 y ERK2 cuyos pesos moleculares son de 42 y 44 kDa, respectivamente. Los factores extracelulares activan los receptores de membrana acoplados a proteínas G o de tipo tirosina cinasa, canales iónicos, entre otros, que pueden disparar señales hacia el interior de las células resultando en la activación de las cinasas ERK. En ella participan proteínas adaptadoras que se activan al ser reclutadas en la membrana (por ejemplo Ras) y entonces transmite la señal al nivel de MEKK (por ejemplo Raf1). Posteriormente la señal se transmite hacia cinasas MEK al fosforilarse el motivo Ser-Xaa-Ala-Xaa-Ser, que es el sitio de activación a este nivel. Al final, la activación de ERK se da por la fosforilación en tirosina y treonina en el motivo Thr-Glu-Tyr (Cobb y Goldsmith, 1995), lo cual transmite la señal a proteínas reguladoras de la transcripción o a otras cinasas de Ser/Thr a un nivel de cinasas activadas por MAPK (MAPKAPK) en las cuales se incluye la cinasa S6 ribosomal (RSK6) (Rubinfeld y Seger, 2004).

### **Cascada p38<sup>MAPK</sup>**

La cascada de p38<sup>MAPK</sup> participa típicamente en la respuesta de las células al estrés. Su peso aproximado de 43 kDa. Existen asociadas a su activación muchas cinasas en el nivel de MAP3K y MAP4K; pero los mecanismos aun no son muy claros (Rubinfeld y Seger, 2004). Se ha planteado que las p38<sup>MAPK</sup> existen en varias isoformas debido al procesamiento alternativo del mRNA, lo que trae como consecuencia, nueve isoformas todas activadas por fosforilación en Tyr y Thr en el motivo Thr-Gly-Tyr. Una vez activas transmiten su señal a MAPKAPK, para fosforilar moléculas reguladoras como fosfolipasa A<sub>2</sub> o activar factores de transcripción como ATF2, ELK1 o CHOP (Rubinfeld y Seger, 2004; Kramer *et al.*, 1996).

### **Cascada JNK**

Las cinasas JNKs son también activadas en respuesta al estrés, sin embargo estas enzimas no están estrechamente relacionadas a las p38<sup>MAPK</sup> aunque ambas cascadas pueden o no activarse simultáneamente en respuesta a un mismo estímulo. Existen tres cinasas, JNK1-3 las cuales tienen pesos moleculares de 46, 54 y 52 kDa, respectivamente. El sitio de activación es de Thr-Pro-Tyr. Se han identificado pocos blancos citosólicos e incluyen MAPKAPK, que a su vez puede ser reguladoras de factores de transcripción (Rubinfeld y Seger, 2004). Poco después de su activación, las JNKs se transportan al núcleo, donde se asocian físicamente con factores de transcripción blanco (Para más detalle se recomienda la lectura de Davis, 2000).

### **SUBSTRATOS DE LAS MAPK**

Como ya se mencionó, la mayoría de los sustratos de las MAPK son factores de transcripción. Sin embargo las MAPK tienen la habilidad de fosforilar otros sustratos como fosfolipasas y proteínas de citoesqueleto (Widmann *et al.*, 1999). Las ERK pueden fosforilar cinasas como Rsk-3, Mnk1-1, factores de transcripción como Elk-2, c-Myc, GATA-2, p53; y proteínas de citoesqueleto como Tau. Las JNK fosforilan c-Jun, p53 y finalmente p38<sup>MAPK</sup> a ATF-2, fosfolipasa A<sub>2</sub> entre otros (Lewis *et al.*, 1998). La lista de sustratos de las MAPK continúa en crecimiento conforme avanza nuestro conocimiento, por lo que no es posible mencionarlos en el presente trabajo. Es necesario enfatizar que estos sustratos incluso pueden ser blancos de varias cinasas y esto parece depender del estímulo y tipo celular, lo cual aumenta la complejidad del fenómeno.

### **ENFOQUE TOXICOLÓGICO A LA MODULACIÓN DE RESPUESTAS A ALTERACIONES EN EL ESTADO REDOX INTRACELULAR POR MAPK**

En el siglo XVI Paracelso sentenciaba: *Dosis sola facit venenum*, o “la dosis hace al veneno” y con ello sentó las bases de la toxicología moderna. Bajo esta premisa, resulta muy importante considerar que las respuestas celulares y tisulares a un estímulo claramente dependen de su intensidad. Esto da como resultado que aún bajo una misma condición de estrés se obtengan diferentes respuestas. Este argumento debe considerarse al estudiar a las



MAPK, ya que son capaces de responder a diferentes grados de intensidad de un mismo estímulo.

En los últimos años se ha planteado que la señalización celular puede ser regulada por el estado redox celular y el balance oxidante/antioxidante (Susuzki *et al.*, 1997; Kamata y Hirata, 1999; Arrigo, 1999; Allen y Tresini, 2000). También se han dado evidencias de que estos cambios en el estado redox pueden generar respuestas en la célula haciendo que su destino sea la sobrevivencia o la muerte celular. En la observación anterior radica una cuestión importante: La activación de estas cascadas ¿estará asociada a alguna alteración en el contenido de GSH? Para abordar esta interrogante se tiene que considerar que existen elementos en las MAPK susceptibles a cambios en el estado redox. En las cascadas de MAPK se ha descrito un miembro que es susceptible a oxidación al menos en un modelo *in vitro*. MEKK1 puede ser susceptible a glutationilación, un tipo de oxidación que ocurre al unirse una cisteína específica de la proteína a una molécula de GSH formando un puente disulfuro. La cisteína susceptible a esta modificación fue la 1238 localizada en el dominio de unión a ATP, inactivando a la proteína (Cross y Templeton, 2004). Interesantemente las fosfatasa son más sensibles al estrés oxidante. En la literatura hay cada vez más evidencias que sugieren una regulación redox a este nivel (Lee *et al.*, 1998). Por ejemplo, todas las fosfatasa de tirosina tienen en su sitio activo la secuencia de His-Cys-X5-Arg y un mecanismo catalítico que involucra la formación de un intermediario en el residuo de cisteína. Las fosfatasa incluyen a la PP1, PP2A, PP2B y la PP2C. Este grupo de enzimas es sensible al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la oxidación de sus cisteínas puede potenciar la activación de MAPK. Esto ha sido demostrado *in vitro* para la PTP1 donde la inactivación ocurre cuando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxida la cisteína y forma Cys-SOH, reacción que es reversible por administración de agentes reductores como el GSH (Denu y Tanner, 1998). Estructuralmente, la oxidación de PTP1B produce un intermediario de Cys-SOH que rápidamente es convertido a sulfenil-amida lo cual genera cambios conformacionales en el sitio catalítico de la enzima que impiden su unión con el sustrato y que podrían constituir un mecanismo reversible de regulación de esta enzima (Salmeen *et al.*, 2003). En cerebro de rata, la PP2A parece ser la fosfatasa principal en la regulación de MAPK, lo cual sugiere que su regulación puede depender importantemente del estado redox mantenido por el GSH (Foley *et al.*, 2004). Entonces, lo anterior plantea la posibilidad de que algunos de los cambios en la

señalización celular observados en patologías se relacionen con cambios en el contenido de GSH, que mantiene los tioles proteicos reducidos y por lo tanto una alteración en el estado redox podría influenciar la señalización celular causando alguna alteración. ERK2 es capaz de fosforilar a la proteína tau *in vitro* y convertirla en una forma similar a la proteína tau que forma los filamentos helicoidales pareados (PHF) (Drewes *et al.*, 1992) e interesantemente la defosforilación de tau es dependiente de la PP2A (Drewes *et al.*, 1993; Goedert, 1992). En el Alzheimer las actividades de la MAPKK y de la MAPK se encuentran elevadas además de que se ha asociado la disminución en el GSH. Este fenómeno es más pronunciado durante eventos tempranos de la enfermedad lo cual permite sugerir que el GSH podría de alguna manera modular la actividad de cinasas y fosfatasas a través de su oxidación y que ello alterar sus funciones normales haciendo más susceptibles a las neuronas al desarrollo de alguna patología (Limón *et al.*, 2007; manuscrito en preparación).

Por otra parte, la modulación redox de MAPK puede llevar a la activación de diferentes factores de transcripción entre los cuales están el factor E2 relacionado a la proteína 45 (Nrf2) y el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (Kong *et al.*, 2001; Hirota *et al.*, 1999). Se ha demostrado que JNK y p38<sup>MAPK</sup> participan en la regulación del factor de transcripción AP-1 modulando a las subunidades c-Jun y ATF-2 probablemente como un mecanismo de respuesta al estrés oxidante (Aggeli *et al.*, 2006). *In vitro* se ha demostrado que la cinasa ERK2 y la p38<sup>MAPK</sup> modulan la expresión de genes de que codifican para proteínas antioxidantes a través de la activación del factor Nrf2. Esta proteína se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) que se encuentran presentes en genes que codifican para enzimas de fase I, fase II y proteínas antioxidantes como la  $\gamma$ GCS subunidad catalítica ( $\gamma$ GCS<sub>c</sub>) y subunidad regulatoria ( $\gamma$ GCS<sub>r</sub>), la GSSG-Rd, las subunidades del sistema X<sub>c</sub><sup>-</sup>, xCT y 4F2hc; todos estos asociados con el sistema antioxidante del GSH (Miao *et al.*, 2005; Zipper y Mulcahy 2000; Wild *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1999; Shih *et al.*, 2003).

Otro ejemplo de regulación redox por señalización a través de las MAPK es mediada por Tx (Holmgren *et al.*, 2005). Esta es una proteína de 108 aminoácidos, con un peso de aproximadamente de 12 kDa y su sitio activo esta compuesto por la secuencia consenso Cys-Gly-Pro-Cys, lo cual le confiere la acción donadora de hidrógeno (Holmgren, 1989). La Tx cataliza la reducción de uniones disulfuro en el citosol, a través de su sitio activo, dando como

resultado Tx oxidada. La Tx reduce proteínas oxidadas al unirse a la proteína blanco y formar un intermediario disulfuro con la proteína que se reduce, mientras se oxidan los dos grupos cisteína-SH a cistina (disulfuro) de la Tx. Además funciona como donador de hidrógeno para la ribonucleótido reductasa, dona electrones a metionina sulfóxido reductasa, enzima que repara daño oxidante a los residuos de cisteína en proteínas (Halliwell y Gutierrez, 1999). Junto con la Tx reductasa (TxR), que es capaz de regresar a su estado reducido a la Tx oxidada usando NADPH como cofactor (Carmel-Harel y Storz, 2000), constituyen el sistema Tx de manera muy similar al sistema GSH-Grx. La isoforma citosólica Tx-1 tiene muchas funciones biológicas y estas incluyen la defensa antioxidante contra el estrés oxidante, la regulación de la expresión génica y la apoptosis mediada por proteínas de la familia MAPK (Powis y Montfort, 2001; Sayito *et al.*, 1998). La Tx-1 además es modulada a nivel transcripcional por Nrf2 bajo condiciones de estrés oxidante (Kim *et al.*, 2003). Además, se ha descrito que puede modular la unión de DNA de algunos factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1 (Vlami-Gardikas y Holmgren, 2002).

## CAPÍTULO III

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En años recientes se han descrito varias vías de señalización de MAPK que responden a alteraciones en el estado redox, pero el conocimiento sobre su modulación por moléculas como el GSH es aún muy incipiente. Además, los modelos *in vitro*, que han estudiado estos fenómenos, describen efectos a dosis elevadas, cuando la exposición ambiental ocurre a menores dosis y de manera aguda, lo que puede afectar de manera diferencial la respuesta observada en los distintos tejidos y sistemas de órganos. A pesar de que algunos mecanismos de señalización que involucran a la familia de MAPK han sido caracterizados *in vitro*, el conocimiento de la regulación de MAPK en los diferentes órganos de un mamífero es aun muy pobre. Lo anterior denota la necesidad de contar con un modelo *in vivo* que permita la caracterización de las respuesta de manera integral, a nivel de organismo, ya que podrían presentarse mecanismos de compensación en los distintos órganos que no se pueden estudiar en sistemas aislados *in vitro*. Por ello, en el presente trabajo se investigaron los efectos de la inhibición de la síntesis de GSH a nivel sistémico en la actividad de MAPK usando al ratón como modelo experimental.

### HIPÓTESIS

Al ser el GSH el principal tiol encargado del mantenimiento del estado redox intracelular, la disminución en la concentración de GSH por efecto de un inhibidor de su síntesis a nivel sistémico activará a diferentes MAPK dependientes del estado redox de manera órgano-específica.

### OBJETIVOS

#### ***Objetivo General***

El objetivo principal de este estudio fue investigar la disminución de GSH a nivel sistémico inducida por la administración de BSO y su efecto en la activación de MAPK en los órganos de estudio.

**Objetivos específicos**

Disminuir el contenido de GSH empleando BSO para inhibir la síntesis de GSH.

Estimar las concentraciones de GSH en los distintos órganos controles y tratados con BSO a 1, 2 y 3 horas de tratamiento.

Evaluar el estado de fosforilación de ERK 1, ERK 2, JNK, y p38<sup>MAPK</sup> en los distintos órganos con los niveles de GSH modificados.

Conocer cuales son los factores de transcripción activados por MAPK.

Describir el efecto de los inhibidores de MAPK SB203580 y U0126 en la fosforilación de MAPK y la expresión de genes.

Determinar el efecto de la N-acetilcisteína (NAC) y la BSO en la activación de MAPK cinasas.

Evaluar los cambios en la expresión de mRNA de genes de respuesta antioxidante.

## CAPÍTULO IV

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### *Materiales*

Todos los compuestos químicos se obtuvieron de SIGMA (St. Louis, MO, USA). Los anticuerpos primarios fueron producidos en conejo contra ERK2, Nrf2, NF- $\kappa$ B y la forma nativa y fosforilada de c-Jun se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Los anticuerpos contra la forma fosforilada de la cinasa ERK2, y las formas nativas y fosforiladas de p38<sup>MAPK</sup>, JNK y del factor de transcripción ATF-2 así como el anticuerpo secundario contra IgG de conejo acoplado a peroxidasa se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA).

#### *Animales*

Para este estudio se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/cAnN con un peso aproximado de 20g, los cuales fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales fueron mantenidos en un ambiente controlado, con periodos de 12 horas de luz/oscuridad (6 a.m. a 6 p.m.), con libre acceso al agua y al alimento. El manejo de animales se realizó de acuerdo a los procedimientos y guías establecidos en "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publicación #85-23, revisado en 1985) y la "Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación" (SAGARPA) con título: "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" (Clave NOM-062-ZOO-1999, publicada en agosto, 2001). Los órganos de interés fueron disecados inmediatamente, enjuagados con solución salina a 4 °C y congelados en nitrógeno líquido, para finalmente ser almacenados a -80 °C.

## **Tratamientos**

### *Tratamiento con BSO*

Los compuestos a probar fueron administrados intraperitonealmente (IP). Se ha reportado que una dosis de BSO desde 4 mmol Kg<sup>-1</sup> IP disminuye los niveles de GSH en diferentes tejidos de manera significativa (Griffith y Meister, 1979b,c). Para probar el efecto de la BSO, se en el presente trabajo se uso la dosis de 6 mmol kg<sup>-1</sup> de peso corporal, la cual se inyectó IP a los ratones para posteriormente ser sacrificados por dislocación cervical a una, dos y tres horas después de la inyección. A los animales control se les inyectó IP solo con agua salina. Debido a que el GSH mantiene ciclos a lo largo del día (Jaeschke y Wendel, 1985; White *et al.*, 1987), las inyecciones fueron administradas en el horario de 8 a.m. a 9 a.m. para evitar las variaciones circadianas.

### *Tratamiento con NAC-BSO*

En los experimentos para corroborar los efectos de la disminución de GSH en la activación de MAPK, a otros grupos de ratones se les inyectó IP con NAC a una dosis de 5 mmol kg<sup>-1</sup> de peso corporal, disuelto en solución salina, 30 min antes de administración de la BSO. El sacrificio de los animales se llevo a cabo como se describió previamente para el tratamiento con BSO.

### *Tratamiento con SB203580, U0126 y BSO*

Los inhibidores de MAPK U0126 (Upstate, NY, USA) y SB203580 (BIOSOURCE, CA, USA), para ERK2 y p38<sup>MAPK</sup> respectivamente, fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se administraron IP a una dosis de 5 mg kg<sup>-1</sup>, dos horas antes al tratamiento con BSO. Aquellos ratones que fueron inyectados con U0126-BSO se sacrificaron al termino de dos horas después de la administración de BSO y los ratones inyectados con SB203580 fueron sacrificados a la tercera hora. Al grupo control solo se le administró DMSO con solución salina.

## **Determinación de las concentraciones de GSH y GSSG**

El contenido de GSH fue determinado por HPLC de fase reversa como ya fue descrito previamente (Harvey *et al.*, 1989), pero con modificaciones. Se usó una columna de Spherisorb

RP-18 (5  $\mu\text{m}$ -diámetro con partículas esféricas; 250 x 4.6 mm, Perkin Elmer MA, USA). La fase móvil consistió en una solución de 10 mM de fosfato de sodio monobásico monohidratado (pH 2.7, ajustado con ácido fosfórico), 5 mM de sulfato de octilo y 2% (v/v) de acetonitrilo. Las eluciones fueron a flujo constante a un tasa de 0.8 ml  $\text{min}^{-1}$  a temperatura ambiente (22 °C). La fase móvil se hizo circular mediante un sistema de PM-80 (Solvent Delivery System) conectado de forma lineal a un desgasificador de vacío LC-26B (BASi, IN, USA). El GSH y el GSSG fueron detectados en la misma muestra con ayuda de un detector amperométrico LC-4C (BASi, IN, USA) teniendo como potenciales de 0.95 V para el electrodo de derivatización y 1.35 V para el electrodo de registro. La detección del GSH se llevo a cabo en el rango de 5  $\mu$  Amperes.

### ***Preparación del tejido***

Una porción de tejido fresco se enjuagó con solución salina a 4 °C para remover el exceso de sangre y residuos celulares. El tejido se homogenizó en 10 volúmenes de solución amortiguadora que contenía 154 mM KCl, 5 mM dietileno-triamino-penta-acetato (DTPA) y 0.1 M de solución de fosfatos. Una muestra del homogenado fue tomada y se le adicionaron dos volúmenes de ácido tricloroacético al 10%. Se agitaron las muestras brevemente y luego se centrifugaron por 30 minutos a 3,000 x g a 4 °C. El sobrenadante fue pasado a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Las muestras fueron diluidas en la fase móvil y se usaron 100  $\mu\text{l}$  para realizar las lecturas. La muestra se incorporó a la columna con ayuda de un inyector 7125 (BASi, IN, USA). Las muestras fueron analizadas por triplicado y se reportaron en  $\text{nmol g}^{-1}$  de tejido fresco.

### ***Análisis de proteínas por inmunoprecipitación e inmunodetección***

Se prepararon también homogenados de los tejidos para ser analizadas por western blot e inmunoprecipitación. Los homogenados se prepararon usando soluciones en frío y en un tiempo de dos minutos o menos. El tejido congelado se homogenizó al 30% (w/v) en solución de extracción de cinasas (100  $\mu\text{M}$  ortovanadato de sodio, 50 mM fluoruro de sodio, 10 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 0.5% Tritón X-100, 1 mM DTT, 1  $\mu\text{g/ml}$  pepstatina, leupeptina, aprotinina y 0.2  $\mu\text{M}$  PMSF, pH 7.2). De cada muestra se tomaron 20  $\mu\text{l}$  y se adicionaron a un tubo de microcentrífuga en frío. Las muestras fueron centrifugadas por 5



minutos a 10,000 x g para aclarar la muestra. La concentración de proteínas fue determinada usando la metodología descrita por Bradford (1976) (BioRad, Hercules, CA, USA).

Los sobrenadantes se usaron para la inmunoprecipitación. A un tubo de microcentrífuga se le adicionaron 30  $\mu$ l de proteína A sefarosa a concentración de 50% (w/v), 2  $\mu$ g de anticuerpo primario y 100  $\mu$ g de proteína de la muestra de interés. Se dejó inmunoprecipitar la mezcla por dos horas a 4 °C. Después las perlas de proteína A sefarosa se lavaron dos veces con solución de extracción de cinasas. Posteriormente, las proteínas precipitadas fueron sometidas a electroforesis (SDS-PAGE a gradiente 5–12%) y luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) para su análisis por Western blot. Las membranas se bloquearon usando una solución de sales de Tris y leche al 5% de leche todo a 4 °C. Después de lavados con TBS y TBS-Tween al 0.1 %, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario de interés seguido del secundario. Se empleó un anticuerpo contra la forma nativa de la proteína para detectar el contenido total de la proteína de interés. Finalmente las proteínas se visualizaron usando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences) y las imágenes se registraron en un analizador de imágenes Kodak ID versión 3.6 (Kodak, NY, USA).

### ***Análisis de los Factores de Transcripción***

La actividad de los factores de transcripción fue analizada en las fracciones nucleares y citosólicas (Ishii *et al.*, 2002; Hickenbottom *et al.*, 1999). Una porción de tejido fresco fue homogenizada en cinco volúmenes de solución (10 mM HEPES pH 7.8, 10 mM KC1, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, y 0.1 mM EDTA) por 10 min a 4 °C. Después las muestras fueron agitadas en vórtex brevemente antes de la adición de 0.1 volumen de Nonidet P-40 al 10 Los núcleos fueron colectados centrifugando por 0.5 min a 21,000 x g. Luego se incubó cada muestra con dos volúmenes de solución de extracción (50 mM HEPES pH 7.8, 50 mM KC1, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1  $\mu$ g/ml pepstatina, leupeptina, aprotinina y 0.2  $\mu$ M PMSF y 10% glicerol) por 20 min a 4 °C. Los extractos nucleares se separaron por centrifugación a 21,000 x g 10 min a 4 °C. Se adicionó finalmente un volumen equivalente de solución desnaturalizante y se hirvió la muestra por 5 min. Se usaron 5  $\mu$ g de proteína nuclear para analizar la ubicación de los factores de transcripción en el citoplasma y el núcleo; y para la determinación del estado de fosforilación por inmunoprecipitación como se describió previamente.

### **Análisis de mRNA por RT-PCR semicuantitativo**

La expresión de genes antioxidantes se analizó mediante RT-PCR semicuantitativo. El RNA total se aisló usando TRIzol (Invitrogen, CA, USA). La concentración de RNA se determinó a 260 nm en un espectrofotómetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia Biotech, UK). La integridad del RNA fue verificada por electroforesis en geles de agarosa al 1.1% en condiciones desnaturalizantes (2.2 M formaldehído). El RNA se transcribió a cDNA usando la transcriptasa reversa del virus de leucemia murina de Moloney M-MLV (Invitrogen). El cDNA fue amplificado usando los oligos que se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 4. Oligos de genes antioxidantes empleados para el RT-PCR semicuantitativo.**

Gene (GENEBANK)	Tamaño pb	Secuencia	Posición 5'	Oligo
<i>γGCSr</i>	577	5' AGG AGC TTC GGG ACT GTA TT 3'	162	Sentido
NM_008129		5' TGG GCT TCA ATG TCA GGG AT 3'	739	Antisentido
<i>Tx-1</i>	119	5' CGT GGT GGA CTT CTC TGC TAC GTG GTG	163	Sentido
NM_011660		3'	282	Antisentido
		5' GGT CGG CA GCA TTT GAC TTC ACA GTC		
		3'		
<i>GAPDH</i>	962	5' TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT T 3'	63	Sentido
NM_001081297		5' CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC C 3'	1025	Antisentido
<i>Nrf2</i>	94	5' TAC TCC CAG GTT GCC CAC ATT 3'	478	Sentido
NM_010902		5' TAT CCA GGG CAA GCG ACT CA 3'	572	Antisentido
<i>xCT</i>	101	5' AGC CAG TCG GTG ATA GCA AAG 3'	190	Sentido
NM_011990		5' AGG GGG AAA AAC AAA ACA AGA C 3'	291	Antisentido

Para la *γGCSr* y *Nrf2* se usaron las siguientes condiciones: 30 ciclos de 95 °C por 30 seg para la desnaturalización, 55 °C por 30 seg para el alineamiento y 72 °C por 30 seg para la elongación. Para el caso de *Tx-1*, *xCT* y *GAPDH* se usaron: 30 ciclos de 95 °C por 30 seg para la desnaturalización, 60 °C por 30 seg para el alineamiento y 72 °C por 30 seg para la elongación. Como control de expresión se usó el mRNA de *GAPDH*. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis al 2% en geles de agarosa y visualizados en un

transiluminador UV (BioRad). Las imágenes fueron capturadas en un analizador de imágenes ID versión 3.6 (Kodak, NY, USA). Los oligos para *Nrf2* y *xCT* se diseñaron usando el programa Oligo Ver. 4.1.

### ***Análisis de Datos***

Cada ensayo fue realizado por triplicado a menos que sea indicado algo distinto. Los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. La significancia se evaluó usando la prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett en cada caso. Se consideró un resultado significativo en todos los casos cuando el valor de  $p < 0.05$ .

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS

#### ***La disminución en el contenido de GSH a nivel sistémico induce la activación específica de MAPK en hígado, riñón y cerebro.***

Las concentraciones de GSH y GSSG así como los niveles de fosforilación de MAPK se determinaron en cada órgano de estudio después de la administración IP de BSO en los distintos tiempos indicados. En el hígado se observó una disminución en el contenido de GSH desde la primera hora posterior a la inyección de BSO ( $p < 0.01$ ), pero a las tres horas se detectó la disminución más importante ( $p < 0.001$ ) (Fig. 7). En el riñón, se observó una modesta pero significativa disminución en la concentración de GSH en todos los tiempos indicados ( $p < 0.01$ ). A diferencia de lo anterior, en el caso de cerebro se observó un aumento inesperado en el contenido de GSH, el cual fue significativo en las dos primeras horas posteriores a la inyección de BSO ( $p < 0.01$ ; Fig. 7). Por otra parte, la concentración de GSSG no cambió en ninguno de los tejidos analizados (Fig. 7). Estos cambios correlacionaron bien con la fosforilación de la cinasa  $p38^{MAPK}$  en hígado y riñón. (Figs. 8 A y B). En el caso de cerebro, se detectó la activación de la cinasa ERK2 lo cual fue indicado a través de su estado de fosforilación (Fig. 8C). También se evaluó el estado de fosforilación de JNK y ERK1, sin embargo no se observaron cambios significativos o correlación con los cambios en las concentraciones de GSH detectadas.

#### ***Efecto del tratamiento con la BSO en la activación de MAPK y la ubicación nuclear de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, ATF-2 y Nrf2***

La activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y Nrf2 ha sido relacionada a la respuesta protectora inducida bajo condiciones de estrés oxidante (Kong *et al.*, 2001). El factor NF- $\kappa$ B es un elemento sensible a cambios en el estado redox (Hirota *et al.*, 1999). En condiciones normales, se encuentra ubicado en el citoplasma, pero este puede cambiar al núcleo durante la respuesta frente a diferentes tipos de estrés celular como el oxidante (Kabe *et al.*, 2005). Para la activación de este factor de transcripción, la subunidad p65/RelA es

requerida; y la mayor actividad transcripcional es llevada a cabo a través del complejo p50-p65/RelA (Reuther-Madrid *et al.*, 2002).

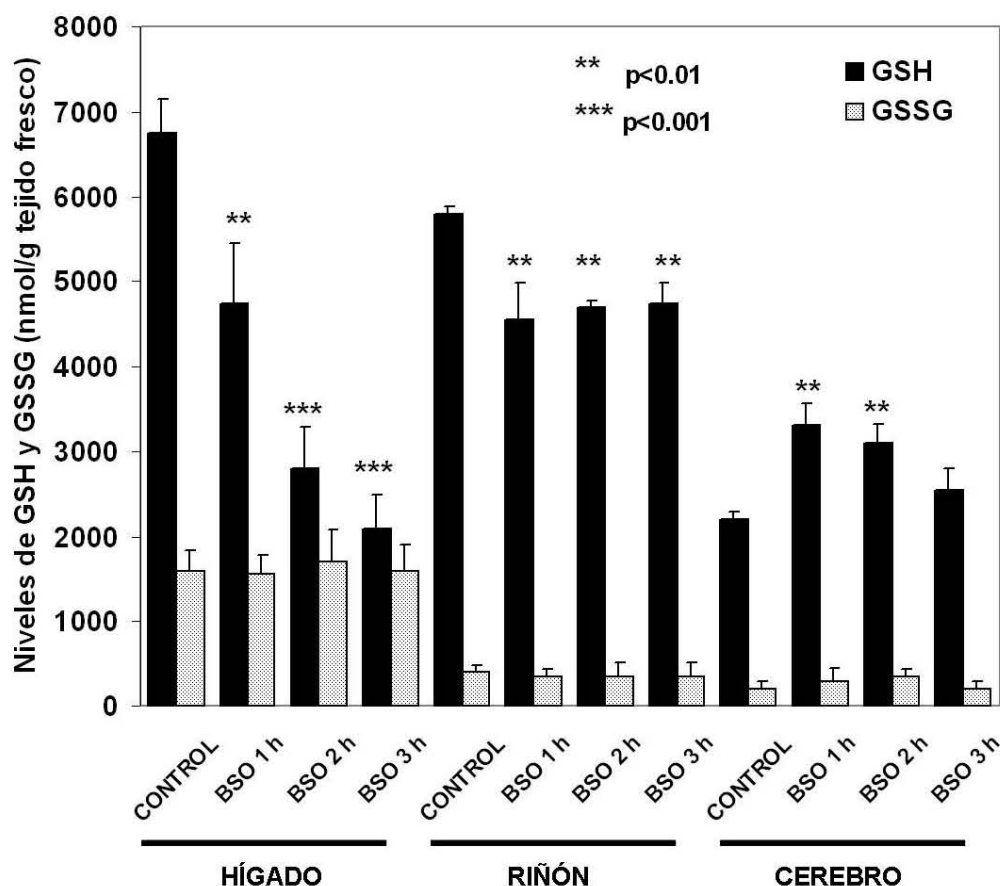


Figura 7. Efecto de la BSO en las concentraciones de GSH en órganos de ratón. La BSO fue administrada a una dosis de  $6 \text{ mmol kg}^{-1}$ . Después de 1, 2 y 3 h, los ratones fueron sacrificados y los órganos disecados para el análisis de GSH y GSSG. Los ratones control fueron inyectados únicamente con solución salina. Las barras representan el contenido promedio de GSH (oscurecidas) y GSSG (punteadas) de tres experimentos independientes. Los datos fueron expresados como  $\text{nmol g}^{-1}$  de tejido fresco y fueron analizados usando la prueba de ANOVA. Se indican las diferencias significativas respecto al control como \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$  de acuerdo a la prueba *post hoc* de Dunnett. Para estos experimentos la  $n=12$ .

En este trabajo consideramos la distribución de la subunidad p65/RelA en el núcleo como un indicador de su activación. En el caso del hígado se observó que el tratamiento con la BSO induce la acumulación nuclear de p65/RelA, acompañada de su decremento gradual en el citoplasma dos horas después de la administración del inhibidor (Fig. 9A). La localización nuclear ocurrió de forma concomitante al decremento significativo en las concentraciones de GSH y la fosforilación de  $p38^{\text{MAPK}}$  en el tejido. En el riñón, no se encontró a p65/RelA asociada a  $p38^{\text{MAPK}}$  debido a que dicha subunidad permaneció principalmente en la fracción citosólica

(Fig. 9B). En contraste con lo anteriormente descrito, en cerebro NF- $\kappa$ B permaneció en la fracción citosólica, mientras que la acumulación de Nrf2 se observó en la fracción nuclear.

La acumulación nuclear comenzó desde la hora primera hora posterior a la inyección con BSO, alcanzando el valor más alto más a las dos horas. Lo anterior ocurrió de manera coordinada con la fosforilación de ERK2 de manera significativo (Fig. 8C y 9C). Se realizó un análisis similar para el factor Nrf2 en hígado y riñón, sin embargo no se detectaron cambios importantes.

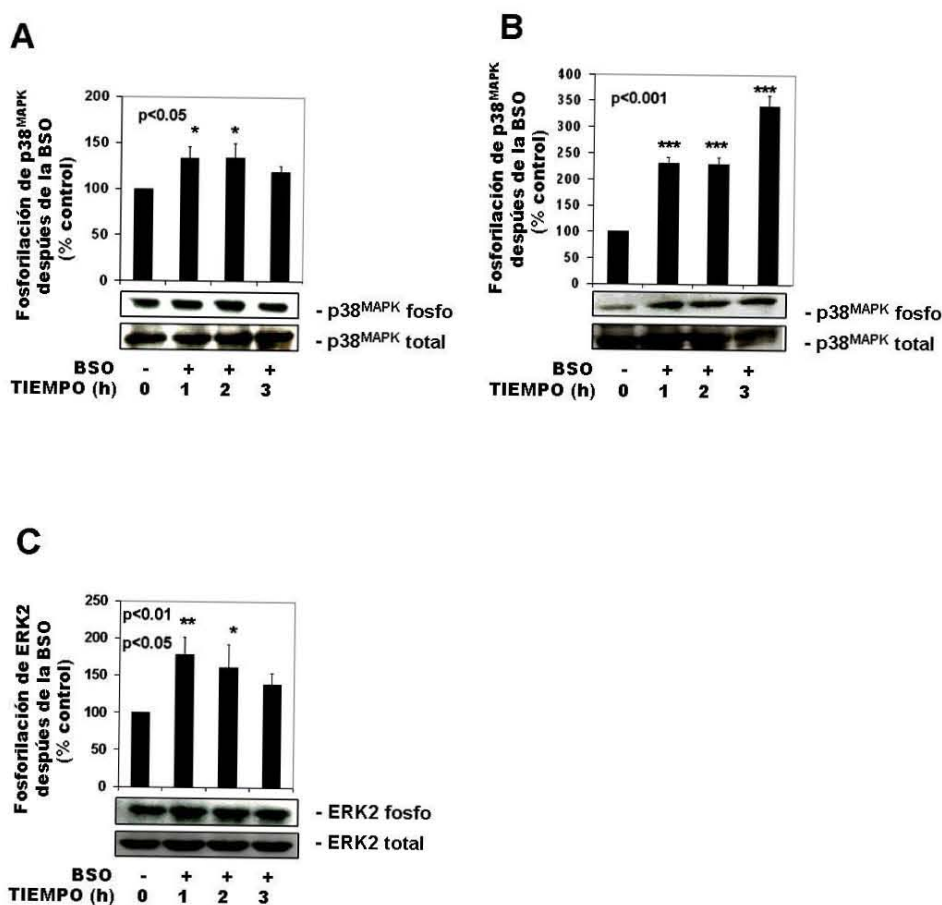


Figura 8. Fosforilación de MAPK en distintos órganos de ratón. En el panel superior se muestran los valores densitométricos obtenidos del análisis de imágenes de los western blots de p38<sup>MAPK</sup> para: (A), Hígado y (B), riñón; (C), corresponde a la ERK2 para cerebro. La evaluación por densitometría de las imágenes se ajustó considerando el valor de MAPK total como control. Se representan los promedios  $\pm$  ES de experimentos por triplicado. (\*) Significativamente diferente de los controles de acuerdo a la prueba *post hoc* de Dunnet,  $p < 0.05$ .,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ;  $n = 12$ .

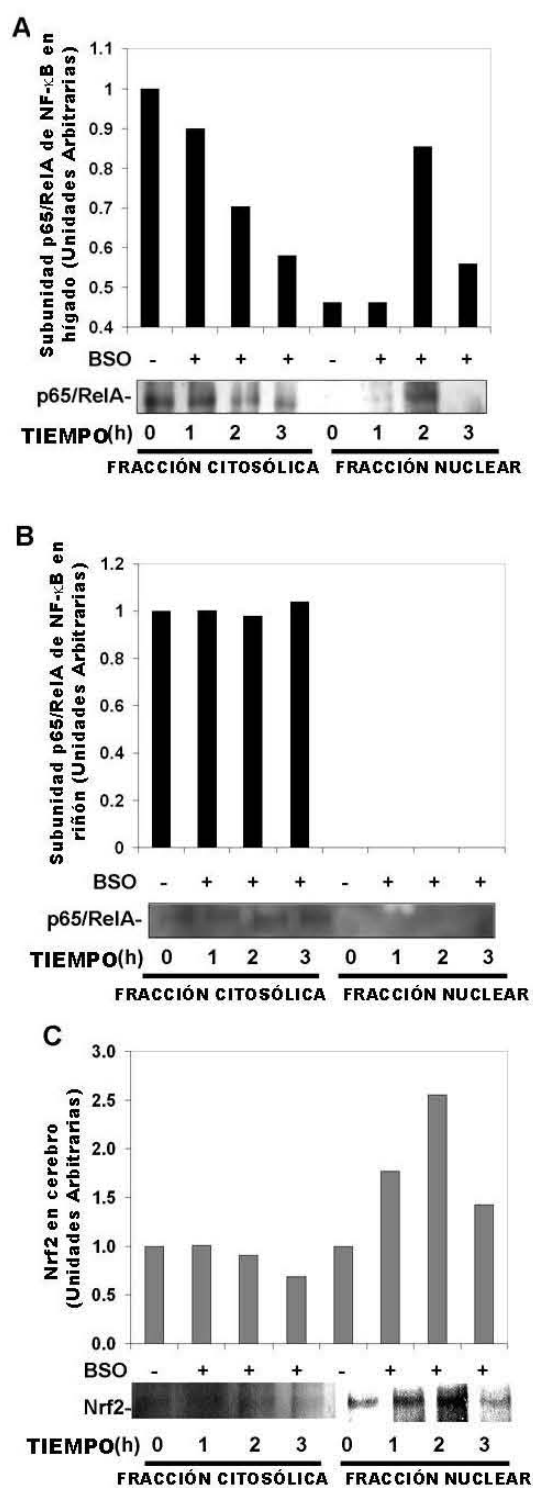


Figura 9. Efecto de la BSO en la localización celular de NF- $\kappa$ B y Nrf2 en órganos de ratón. Los tejidos fueron homogenizados para obtener la fracción citosólica y nuclear como se describe en materiales y métodos. El panel superior muestra los valores obtenidos por densitometría de la imagen. Se muestra una imagen representativa del blot en el panel inferior. (A), hígado, (B), riñón y (C) cerebro. n=12.

Otros factores de transcripción que participan en la respuesta adaptativa frente al estrés oxidante son los miembros de la familia AP-1 como es ATF-2 y c-Jun (Aggeli *et al.*, 2006). Usando la misma estrategia para los otros factores de transcripción se pudo observar que ATF-2 y c-Jun no sólo estaban localizados la fracción nuclear del hígado, sino que además exhibieron un incremento en su estado de fosforilación lo cual indica su actividad (Fig. 10 A).

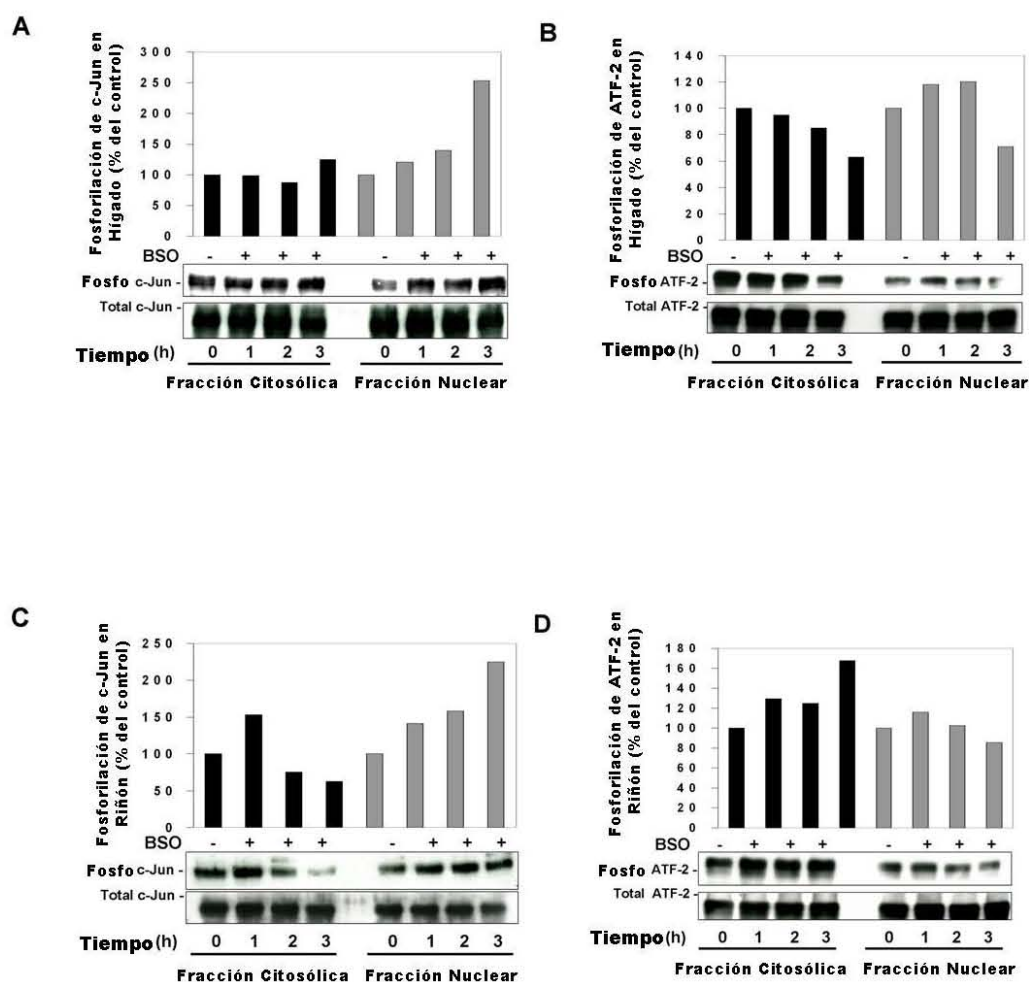


Figura 10. Efecto de la BSO en la fosforilación de ATF-2 y c-Jun en hígado y riñón. Los tejidos se homogenizaron para obtener la fracción citosólica y nuclear como se describe en materiales y métodos. Los extractos se analizaron por inmunoprecipitación y Western blot para evaluar el estado de fosforilación de ATF-2 y c-Jun. El panel superior muestra los valores densitométricos y el inferior un blot representativo. Fosforilación de (A), c-Jun y (B), ATF-2 en hígado; fosforilación de (C), c-Jun y (D), ATF-2 en riñón. n=12.



En riñón, ATF-2 disminuyó su fosforilación en la fracción nuclear, mientras que la fosforilación de c-Jun la fosforilación aumentó, alcanzando los niveles más altos a las dos horas posteriores a la inyección de BSO (Fig. 10 B).

### **Transcripción de genes antioxidantes como respuesta al tratamiento con BSO**

El análisis por RT-PCR semicuantitativo mostró un incremento en los niveles de mRNA de *Tx-1* mRNA en hígado y riñón, lo cual sugiere que esta respuesta debe estar modulada a través de la vía de  $p38^{MAPK}$  en estos tejidos (Fig. 11 A y B).

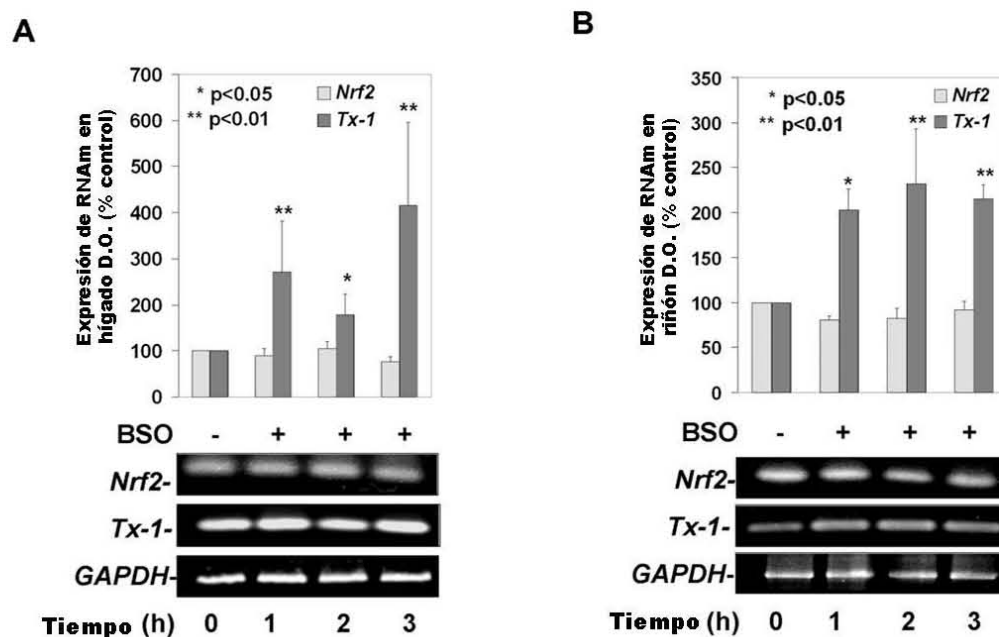


Figura 11. Efecto de la BSO en la expresión de enzimas antioxidantes en hígado y riñón. El RNA total se obtuvo para analizarlo por RT-PCR semicuantitativo como se describe en materiales y métodos. El panel superior indica los valores densitométricos para *Nrf2* y *Tx-1* y el inferior muestra imágenes representativas de geles de agarosa para los genes analizados. Corresponde (A), para hígado y (B), para riñón. La *GAPDH* se usó como control de expresión. Las barras indican media  $\pm$  ES de tres experimentos. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA y la prueba *post hoc* Dunnett.  $n=12$ . (\*)  $p<0.05$ ; (\*\*)  $p<0.01$ .

En el caso de cerebro se observó un incremento en la transcripción de *Nrf2* desde la primera hora, pero sólo es significativo hasta la segunda hora, lo cual concuerda con los niveles de proteína nuclear de Nrf2 previamente descritos ( $p < 0.05$ ). Además, en la primera hora de tratamiento hubo un incremento en la transcripción de *xCT* ( $p < 0.01$ ; Fig. 12), el cual codifica para una subunidad del intercambiador de cistina/glutamato del sistema  $X_c^-$  y que es requerido para la síntesis de GSH en neuronas. Estos resultados sugieren que la expresión de *xCT* está mediada por *Nrf2*, el cual como ya se indicó se acumula en el núcleo desde la primera hora (Fig. 9C). También se observó un incremento en la transcripción de  $\gamma$ GCSr, que codifica para la subunidad reguladora de la enzima limitante en la síntesis *de novo* del GSH. Finalmente, se observaron cambios en los niveles de mRNA de *Tx-1* similares a los cambios vistos en el hígado (Fig. 12).

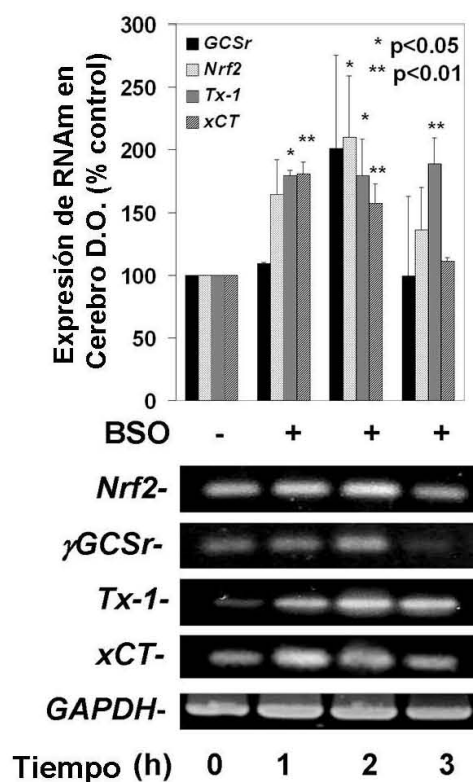


Figura 12. Regulación coordinada de enzimas antioxidantes en cerebro. El RNA total se obtuvo para analizarlo por RT-PCR semicuantitativo como se describe en materiales y métodos. El panel superior indica los valores densitométricos para  $\gamma$ GCSr, *Nrf2*, *Tx-1* y *xCT*; el inferior muestra imágenes representativas de geles de agarosa para los genes analizados. La *GAPDH* se usó como control de expresión. Las barras indican media  $\pm$  ES de tres experimentos. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA y la prueba *post hoc* Dunnett.  $n=12$ . (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ .

### Efecto de los inhibidores de MAPK SB203580 y U0126 en la respuesta órgano específica

Se emplearon inhibidores selectivos de las MAPK para dilucidar la importancia de la activación de las MAPK durante la respuesta al efecto del BSO en los órganos estudiados. *In vivo* se ha demostrado que la administración de los inhibidores de MAPK SB203580 y U0126 a la dosis de 5 mg kg<sup>-1</sup> administrados dos horas previamente a un reto químico inhiben efectivamente la activación de la cinasa MEK1 y de la p38<sup>MAPK</sup> en ratones (Chialda *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2001). Usando esta estrategia en el presente estudio, se administró a un grupo de ratones el inhibidor U0126 (para la vía de MEK-1-ERK2 en cerebro) y a otro grupo el inhibidor SB203580 (inhibidor selectivo para la vía p38<sup>MAPK</sup> en hígado y riñón) dos horas antes de la administración de BSO.

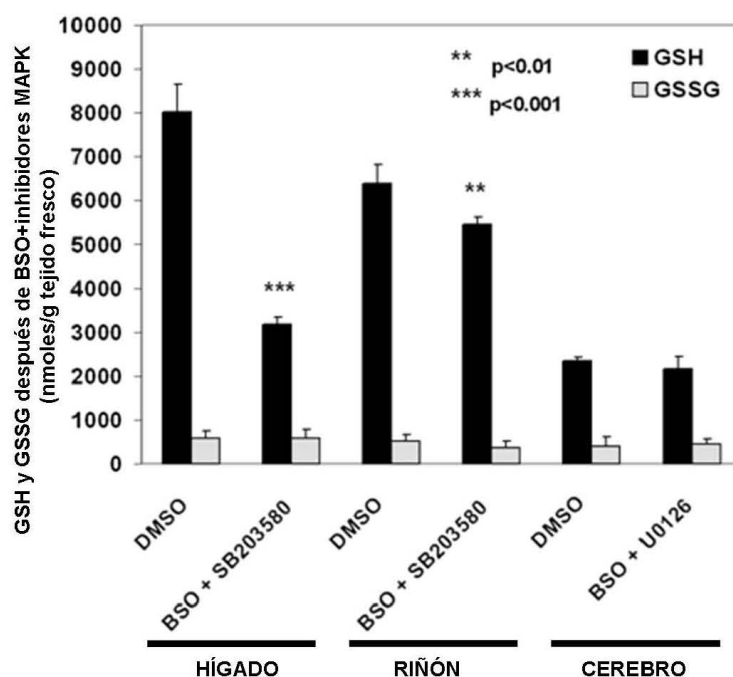


Figura 13. Efecto de los inhibidores SB203580, U0126 y BSO en el contenido de GSH. Las barras representan el contenido promedio de GSH (oscuras) y GSSG (punteadas). Los datos se expresaron como nmol g<sup>-1</sup> de tejido fresco y fueron analizados por ANOVA. Se indican las diferencias significativas respecto al control como \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$  de acuerdo a la prueba *post hoc* de Dunnet. Para estos experimentos la  $n=8$ .

Como se muestra en la figura 13 el inhibidor de p38<sup>MAPK</sup>, SB203580 no alteró el curso de inhibición de la síntesis de GSH en hígado y riñón (Fig. 13), sin embargo, bloqueó la activación de p38<sup>MAPK</sup> (Fig. 14 panel superior). La inhibición de la cinasa p38<sup>MAPK</sup>, se reflejó en los niveles de mRNA de *Tx-1* tanto en hígado como en riñón, que no permanecieron igual a los niveles del control en todo momento (Fig. 14 panel inferior). En contraste, el inhibidor de MEK U0126 tuvo un profundo efecto en las concentraciones de GSH en el cerebro. El incremento significativo previamente observado no ocurrió en la presencia del inhibidor U0126 y el contenido de GSH permaneció similar a los controles (Fig. 13). Además, la fosforilación de ERK2 fue muy similar a los valores control (Fig. 14, panel superior), y la inducción del mRNA de *xCT*, *Nrf2* y *Tx-1* fue similar al control (Fig. 14, panel inferior). Sin embargo, una gran diferencia observada fue que la inducción del mRNA de  $\gamma$ GCSr fue más marcada, lo cual sugiere que su regulación a nivel transcripcional esta relacionada a una cinasa distinta de ERK2 (Fig. 7E).

***Las vías de MAPK activadas y las respuestas órgano específicas observadas por efecto del BSO dependen del estado de tioles intracelular***

Para confirmar que la disminución del contenido de GSH intracelular moduló la activación de MAPK, se usó una fuente de tioles externa para prevenir activación de las cascadas de cinasas observadas. El compuesto administrado fue el NAC, que es un agente mucolítico, antioxidante y precursor de GSH comúnmente usado como una fuente de tioles y como un agonista de GSH en muchos tratamientos con agentes oxidantes (Kelly, 1998; McLellan *et al.*, 1995; Moldeus y Cotgreave 1994). En el hígado, el efecto del pretratamiento con 5 mmol kg<sup>-1</sup> de NAC suprimió la activación de p38<sup>MAPK</sup> en el hígado y en el riñón (Fig. 15 A y B, respectivamente). En estas condiciones experimentales, el NAC no tuvo efecto en la síntesis de GSH ya que después de la administración de la BSO ocurrió la inhibición de la síntesis de GSH en el hígado y el riñón (p<0.001) (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de GSH en órganos de ratón después del tratamiento con NAC 5 mmol Kg<sup>-1</sup> y del tratamiento con BSO 6 mmol Kg<sup>-1</sup>.

Tratamiento	HÍGADO	RIÑÓN	CEREBRO
	GSH	GSH	GSH
Control NAC	3453 ± 199	1025 ± 122	2030 ± 214
1 h BSO + NAC	2302 ± 200**	1004 ± 118	1696 ± 133
2 h BSO + NAC	2679 ± 172*	1004 ± 55	1842 ± 98
3 h BSO + NAC	2448 ± 172**	899 ± 53	1612 ± 64

Los valores son medias ± desviación estándar expresados en nmol g<sup>-1</sup> de tejido fresco. \* P<0.05, \*\* P<0.01; GSH, glutatión reducido; GSSG no detectable bajo las condiciones experimentales.

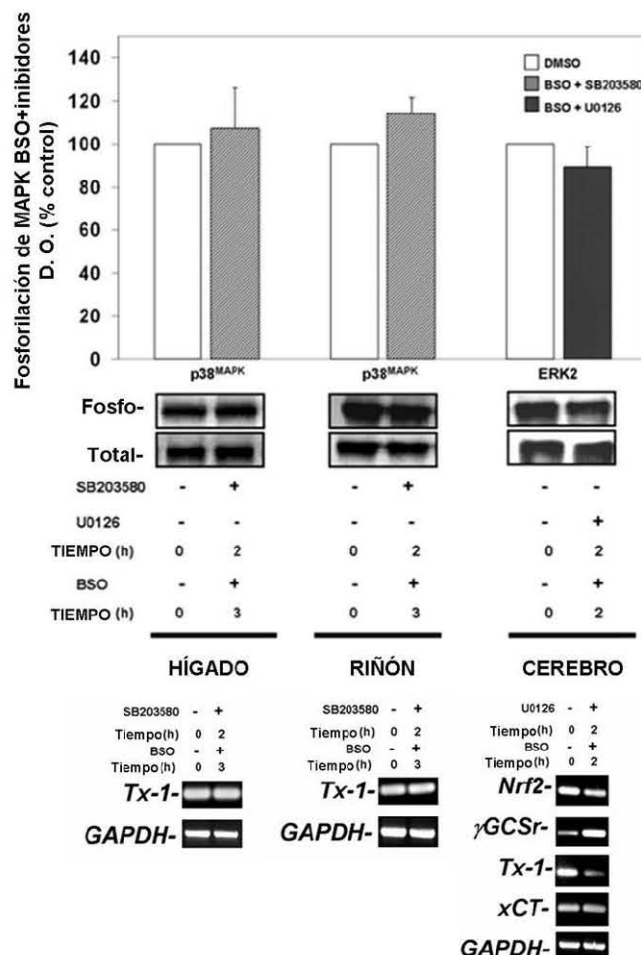


Fig. 14. Efecto de los inhibidores SB203580, U0126 y BSO en la fosforilación de MAPK y la expresión de genes antioxidantes. El panel inferior muestra geles representativos de *Nrf2* y *Tx-1* para hígado y riñón (panel inferior izquierdo y centro) y *γGCSr*, *Nrf2*, *Tx-1* y *xCT* para cerebro (panel inferior derecho). La *GAPDH* se usó como control de expresión.

El riñón fue el órgano en el cual los efectos del tratamiento NAC-BSO fueron más profundos. La inyección de estos compuestos no sólo indujo una severa disminución en las concentraciones de GSH que incluso en el control. En el cerebro, con el tratamiento NAC-BSO ya no se observó el incremento en la concentración de GSH en los tiempos previamente indicados; además, se pudo observar que la concentración de GSH disminuyó ligeramente a todos los tiempos incluyendo el grupo control (Tabla 5).

El tratamiento con NAC suprimió la activación de ERK2 de una manera similar a la que se observó con el inhibidor U0126 (Fig. 15 C). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la disminución en el contenido de GSH tisular se refleja en la modulación de MAPK cinasas que llevan a respuestas órgano específicas.

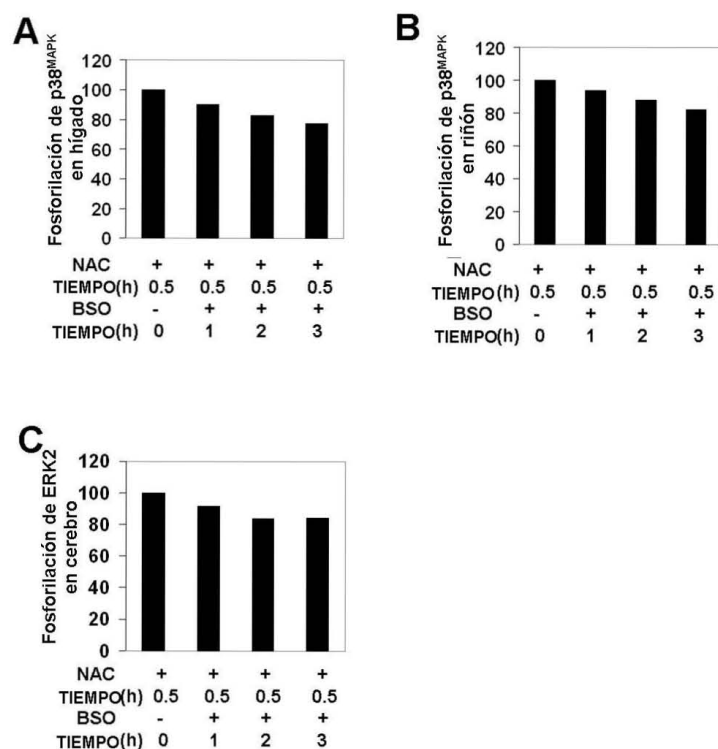


Figura 15. Efecto del NAC y BSO en la fosforilación de MAPK. (A) y (B) p38<sup>MAPK</sup> en hígado y riñón respectivamente; (C) ERK2 en cerebro. n=12.

## CAPÍTULO VI

### DISCUSIÓN

El contenido del GSH no es estático, sino por el contrario, es un sistema que refleja un fenómeno muy dinámico con el cual las células y tejidos responden a las alteraciones en el ambiente celular.

En el presente trabajo, se obtuvo evidencia de que las cinasas MAPK son parte de las respuestas generadas por los tejidos a cambios en el estado redox mantenido por el GSH y reflejado por la relación GSH/GSSG. La mayoría de los modelos que han descrito el papel del GSH como modulador de las MAPK, han sido modelos *in vitro*. Sin restarle importancia a estos trabajos, se consideró necesario pasar de dichos sistemas aislados, a un modelo *in vivo*, para poder investigar como la inhibición de la síntesis de GSH a nivel sistémico modula respuestas en los diferentes tejidos. El uso de la BSO administrada intraperitonealmente ha demostrado ser una estrategia válida para disminuir la concentración de GSH en varios órganos *in vivo* (Griffith y Meister 1979b,c). La dosis de BSO empleada en este modelo, fue similar a la reportada en un trabajo previo en el modelo de ratón. En este trabajo se demostró que usando una dosis de  $4 \text{ mmol Kg}^{-1}$  administrada IP, se produce una disminución del GSH en casi todos los tejidos cuantificable a las dos horas posteriores a la inyección (Griffith y Meister 1979b, c). Se debe aclarar que aunque aquí solo se mostró que la disminución de GSH ocurre en hígado y riñón, la disminución de GSH en otros tejidos ya ha sido demostrada con el mismo modelo, por lo que se puede considerar esta disminución de GSH como un estrés sistémico (Griffith y Meister 1979b). Los efectos de la BSO en la síntesis de GSH en hígado y riñón fueron muy similares a lo reportado previamente en el modelo de ratón (Griffith y Meister 1979b,c). En el ratón adulto, la BSO es fácilmente absorbida en hígado y riñón pero pobremente incorporada al cerebro debido a la barrera hematoencefálica (Steinherz *et al.*, 1990). En estudios previos se había descrito que el contenido cerebral de GSH no sufría alteración por efecto de la administración de BSO intraperitoneal (Griffith y Meister 1979b,c). Sin embargo, en este trabajo se observó, inesperadamente, un incremento transitorio pero significativo en el contenido de GSH en cerebro que duró hasta las dos horas posteriores a la inyección. Otras estrategias que se han empleado *in vivo* para disminuir la concentración de GSH en todos los tejidos son: 1), la administración de dosis repetidas de BSO vía IP durante el día; 2), administraciones de BSO

a largo plazo y a concentraciones elevadas dosificadas en el agua de bebida; 3), la administración de BSO disuelta en disolventes orgánicos como el DMSO; 4), el uso de BSO esterificada; y finalmente la administración de la BSO en ratones neonatos, en los cuales la barrera hematoencefálica no se ha desarrollado, para asegurar la disminución de los niveles de GSH en el cerebro (Steinherz *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 2003; Slivka *et al.*, 1988; Martensson *et al.*, 1991a,b; Andersen *et al.*, 1996). Los resultados del presente trabajo no confirman dichas observaciones, lo cual se atribuye a diferencias en la cepa de ratón o a las condiciones experimentales. Por ello además, es necesario enfatizar que la actividad de MAPK es transitoria y ocurre para transducir una señal percibida en la célula en respuesta a una situación de estrés o a un estímulo específico que puede disminuir con respecto al tiempo. Teniendo presente esta observación fue que se planteó el modelo experimental aquí presentado para investigar dichos cambios transitorios.

Debido a sus propiedades farmacológicas los inhibidores de cinasas se han usado ampliamente en modelos *in vitro* para explorar la señalización por MAPK (Davies *et al.*, 2000). Empero, su uso en modelos animales para estudiar la actividad de MAPK ha sido menor. En el presente trabajo, el uso de inhibidores de MAPK ha permitido corroborar que la alteración sistémica del contenido de GSH se refleja en la activación de p38<sup>MAPK</sup> en el hígado y riñón, mientras que la cinasa ERK2 se activa para cerebro. Los inhibidores de MAPK, SB203580 y U0126 bloquearon las vías de señalización de p38<sup>MAPK</sup> y de MEK1 (ERK2) y la expresión de genes antioxidantes inducidos por la inhibición de la síntesis de GSH. Estos datos confirmaron que las vías a través de las cuales se da la respuesta en los tejidos son mediadas por p38<sup>MAPK</sup> en hígado y riñón; y por ERK2 en el cerebro. Esta regulación parece ser dependiente del estado redox mantenido por el GSH, ya que la administración de NAC, una fuente externa de tioles y un precursor de GSH, inhibió la activación de MAPK. Estos hallazgos concuerdan con trabajos previos donde se ha demostrado que el NAC inactiva a las cascadas de MAPK activadas por la disminución intracelular de GSH (Wilhelm *et al.*, 1997; Haddad, 2002) y en condiciones de isquemia/repercusión (Mehta *et al.*, 2002). No obstante, el pretratamiento con NAC no restauró las concentraciones de GSH en hígado y riñón. En un estudio reciente en ratas a las que se les aplicó un pretratamiento con NAC, se encontró que ésta no restauró el contenido de GSH en hígado. A pesar de ello, el tratamiento pudo restringir la oxidación por la



disminución de GSH y la consecuente inducción de genes marcadores de estrés oxidativo (Patriarca *et al.*, 2005). Además, para entender la falla en la recuperación de las concentraciones de GSH por NAC, se debe considerar que el mecanismo podría diferir espacio-temporalmente de un sistema *in vitro* a uno *in vivo*, por lo que es probable que en este último, el tejido en el organismo requiera de mayor tiempo para iniciar la resíntesis o pueda resistir el estrés con la activación de otros mecanismos de defensa antioxidante. El tejido inicialmente podría utilizar al NAC como un antioxidante *per se* en lugar de un precursor de GSH (Patriarca *et al.*, 2005).

En la actualidad, cada vez hay más evidencias que indican que la alteración en el contenido de GSH intracelular, ya sea por el modelo de inhibición de la síntesis (de Bernardo *et al.*, 2004; Wu y Cederbaum, 2004) o por la exposición a xenobióticos (Wilhelm *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2004), activa diferentes vías de señalización por MAPK. Los mecanismos pueden incluir: i), modulación de MAPK por el GSSG (Filomeni *et al.*, 2003, Rao *et al.*, 2005; Filomeni *et al.*, 2005); ii), la oxidación de reguladores negativos de MAPK como Grx y Tx (Song y Lee 2003; Liu *et al.*, 2000); y iii), la oxidación reversible en cisteínas localizadas en los sitios activos de fosfatasas de MAPK producida por las especies reactivas del oxígeno (Levinthal y Defranco, 2005; Kamata *et al.*, 2005a). La evidencia más reciente apunta a que el GSH es un modulador directo de algunas MAPK. Recientemente se demostró *in vitro*, que la cinasa MEKK1 es inhibida por GSH mediante glutationilación, un proceso que consiste en la unión de GSH o GSSG a los tioles proteicos (Cross y Templeton, 2004). Dado que la glutationilación es un proceso de modificación postraduccional bastante común, cabe la posibilidad de que este mecanismo sea más general y que más proteínas implicadas en la señalización celular tales como proteínas fosfatasas y factores de transcripción y sus proteínas inhibidoras, sean así reguladas.

La disminución del contenido de GSH en el riñón y el hígado, refleja el balance entre la síntesis, utilización, exportación, distribución y acumulación entre estos órganos. La activación de p38<sup>MAPK</sup> observada en estos órganos es consistente con estudios *in vitro* donde el BSO promovió la activación de p38<sup>MAPK</sup> en HepG2 E47 y en hepatocitos de rata (Wu y Cederbaum, 2004), así como las vías p38<sup>MAPK</sup> y JNK en células renales de túbulo (Han *et al.*, 2004). En el presente estudio, la activación de p38<sup>MAPK</sup> en hígado correlacionó con la localización nuclear

del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y con la fosforilación de las subunidades de c-Jun y ATF-2 de AP-1, lo cual indica que este tejido es capaz de responder a la pérdida del contenido de GSH por varios mecanismos. Además, la fosforilación de estos factores de transcripción correlacionó con el incremento en la expresión de *Tx-1* a partir de la primera hora de tratamiento con BSO. Interesantemente, la acumulación nuclear de NF- $\kappa$ B y la fosforilación de ATF-2 y c-Jun ocurrieron cuando la concentración de GSH fue más baja. Esta observación refuerza la idea de que estos factores de transcripción están implicados en una respuesta de supervivencia a través de la inducción de *Tx-1*. A diferencia, el riñón es un órgano con una concentración de GSH moderada comparado con el hígado. En este órgano, la BSO activo p38<sup>MAPK</sup> desde la primera hora de tratamiento, lo cual fue correlativo con la transcripción de *Tx-1* (Fig. 5B). La evidencia entre la activación de p38<sup>MAPK</sup> y los factores de transcripción analizados no son suficientes para proponer un mecanismo de respuesta a la disminución de GSH en el tejido. Sin embargo, es probable que en la inducción de *Tx-1* participen otras cinasas como MSK1. Se ha visto que esta cinasa puede ser activada por p38<sup>MAPK</sup>, y a su vez es capaz de modular al factor de transcripción AP-1 (Aggeli *et al.*, 2006). Esta asociación se basa en que se observó la presencia de c-Jun fosforilada en la fracción nuclear de los extractos de riñón, sin embargo es necesario corroborar ésta hipótesis experimentalmente.

La *Tx-1* tiene un papel importante en la unión de NF- $\kappa$ B al DNA durante la respuesta al estrés oxidante. La *Tx-1* mantiene reducida a la Cys62 que se requiere para la unión al DNA (Matthews *et al.*, 1992). La región promotora de *Tx-1* contiene muchos motivos de regulación compatibles con la expresión inducible a través de NF- $\kappa$ B (Powis y Montfort, 2001; Kaghad *et al.*, 1994) y ARE (Tanito *et al.*, 2005). Los hallazgos en la localización nuclear de NF- $\kappa$ B, la fosforilación de ATF-2, de c-Jun, la transcripción de *Tx-1* y su bloqueo con el inhibidor SB203580, demuestran claramente que se trata de un mecanismo de respuesta a la disminución de GSH en hígado. Tanto AP-1 como *Tx-1* participan como parte de la respuesta adaptativa al estrés oxidante (Fratelli *et al.*, 2005; Hirota *et al.*, 1997). En el hígado, riñón y cerebro, se analizaron otras enzimas como *GSSG-Rd*, *GGT*, *GRX-1*, sin embargo no se apreció modificación en su expresión asociada con los cambios en el sistema GSH por BSO aparte de las que se reportan aquí. Se ha estudiado *in vivo* la distribución de *Tx* en los tejidos y se ha observado que las enzimas se encuentran en el túbulo proximal y distal del riñón en

mayor cantidad, pero también en las células del ducto colector distal y en las células del epitelio transicional (Oberley *et al.*, 2001). *Tx-1* se encuentra ampliamente expresada en cerebro y en especial en regiones con alta actividad metabólica como sustancia nigra y núcleo subtálmico (Patenaude *et al.*, 2005). La inducción además parece estar relacionada con ROS, involucrado con la secuencia ARE y el factor de transcripción Nrf2 (Patenaude *et al.*, 2005).

La evidencia de expresión de *Tx-1*, que representa un sistema igual de importante en el mantenimiento de la homeostasis redox, indica que puede ser un mecanismo de protección compensatorio. Esto plantea que hay perfiles de expresión similares en distintos órganos al hallarse bajo una condición de estrés sistémico. Ejemplo de esto es que el fungicida Triazol, induce un perfil de expresión similar de enzimas que metabolizan xenobióticos y transportadores en el hígado y los testículos de rata, lo cual se explica por un mecanismo común de regulación (Tully *et al.*, 2006). Además, algunos genes podrían ser regulados por una misma vía en distintos tejidos bajo el mismo estímulo, como se describió en el presente trabajo, donde la transcripción de *Tx-1* esta asociada a p38<sup>MAPK</sup>, en hígado y riñón. Cabe aclarar que la especificidad, sin embargo, se daría una vez que MAPK es activa ya que los factores de transcripción difirieron en los tejidos. Esta idea es apoyada por el hecho de que los sistemas Tx y GSH tienen funciones similares como antioxidantes y ambos sistemas son capaces de modular respuestas celulares al estrés oxidante a diferentes niveles de regulación. Este trabajo puso énfasis en el análisis de genes antioxidantes, sin embargo la activación de varios factores de transcripción indican la participación más mecanismos de regulación y probablemente de más genes involucrados en la sobrevivencia o preservación de la homeostasis celular y subsecuentemente tisular.

En el sistema nervioso central, ERK1 y ERK2 son abundantes (Ortiz *et al.*, 1995). Tienen un papel importante en la respuesta de sobrevivencia y adaptación de las neuronas durante el estrés por estímulos como la carencia de factores tróficos y citotoxicidad por glutamato (Cheng *et al.*, 2002), isquemia cerebral y la epilepsia (Fukunaga y Miyamoto, 1998). La evidencia *in vitro* en cultivos no neuronales, ha mostrado que ERK2 y Nrf2 están involucrados en la expresión de genes antioxidantes por tratamiento con inductores de enzimas de fase II (Wild *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1999). También ERK2 y junto con p38<sup>MAPK</sup> han sido descritos como posibles reguladores de Nrf2 en la transcripción de genes antioxidantes

(Zipper y Mulcahy, 2000). Además, los estudios con microarreglos han demostrado que los cultivos neuronales de ratones *Nrf2*<sup>+/+</sup> tienen una mayor expresión de proteínas antioxidantes que los de *Nrf2*<sup>-/-</sup> (Lee *et al.*, 2003). Nuestros hallazgos son consistentes con estas observaciones, ya que se encontró que la localización nuclear de *Nrf2* en cerebro correlacionó con la regulación de genes asociados a la síntesis de GSH. Este dato es coherente con observaciones hechas en cultivos de astrocitos donde la síntesis de GSH es regulada por *Nrf2* (Shih *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005).

En este trabajo se observó que el cerebro es capaz de desplegar una respuesta de protección al estrés sistémico través de la activación de ERK2-*Nrf2* nuclear y la expresión de *Nrf2*, *xCT*,  $\gamma$ *GCSr* y *Tx-1*. Este mecanismo es bloqueado con el inhibidor U0126 casi por completo, dado que el inhibidor no tuvo efecto en la  $\gamma$ *GCSr*, lo cual sugiere que otro mecanismo distinto de ERK2-*Nrf2* está involucrado en el incremento de GSH y la expresión de  $\gamma$ *GCSr* observados. Los mecanismos involucrados en la regulación transcripcional de  $\gamma$ *GCS<sub>c,r</sub>* parecen ser diferentes, sin embargo la evidencia al respecto es aun escasa. Estos mecanismos podrían incluir la estabilización del mRNA o la activación de distintas vías de cinasas activadas durante el estrés oxidante (Liu *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 1997). La detección de *Nrf2* en núcleo y la inducción de *Nrf2*,  $\gamma$ *GCSr* y *xCT* fue consistente con reportes previos (Li *et al.*, 2005; Kwak *et al.*, 2002; Shih *et al.*, 2003, Sun *et al.*, 2005). Como se mencionó al principio, el sistema  $X_c^-$  es importante para el mantenimiento de la concentración de GSH y del balance redox cistina/cisteína en el espacio extracelular (Paolicchi *et al.*, 2002). Uno de los datos más importante de este trabajo es que fue que la inducción de *xCT* en cerebro bajo las condiciones experimentales a partir de la primera hora de tratamiento fue bloqueada por el inhibidor U0126. Esto obviamente, sugiere que la subunidad *xCT* estuvo asociada a la incorporación de cistina para la síntesis de GSH que se observó, sin embargo lo más importante es que cuando su inducción es aparentemente bloqueada la síntesis de GSH no continúa y aun cuando la  $\gamma$ *GCSr* incrementa (Figura 14) lo cual subraya que la regulación de la síntesis de GSH no ocurre sin la incorporación de la cisteína y que la síntesis de GSH está regulada por varios mecanismos. La síntesis de GSH y la inducción  $\gamma$ *GCSr* son correlativas y consistentes con un reporte previo para cerebro (Kang *et al.*, 1999). Es importante mencionar que se ha observado una baja

actividad transcripcional de Nrf2 del ratón (Suh *et al.*, 2004) y la pérdida del GSH y de cistina en diferentes regiones del cerebro (Chen *et al.*, 1989) asociadas al envejecimiento.

El presente trabajo plantea una nueva hipótesis: la disminución de GSH en hígado y riñón es percibida por el cerebro como un *estrés oxidante sistémico*, lo cual inicia lo que consideramos una *respuesta de protección* regulada a través de la activación de ERK2-Nrf2 e inducción de genes. La pregunta inmediata que surge del planteamiento anterior es saber cuales son las moléculas implicadas en llevar la señal de estrés hacia el cerebro, que lleve a la activación de ERK2-Nrf2 y que finalmente esto se vea reflejado en un incremento en la concentración de GSH. Actualmente, se tiene la hipótesis de que el factor de crecimiento neuronal (también referido como factor de crecimiento nervioso o NGF) podría estar implicado. Estudios *in vitro* con células PC12, demostraron que NGF modula las cinasas ERK1/2 y el receptor TrkA (Volente *et al.*, 1993; Kao *et al.*, 2001; Kamata *et al.*, 2005b); que la presencia de NGF en cultivos de células PC12 promueve la incorporación de cistina, cisteína y un incremento en la concentración de GSH así como la expresión de enzimas antioxidantes como GCS, GSH-Px (Jackson *et al.*, 1994, Pan *et al.*, 1996). Sin embargo, en un modelo esto debe ser corroborado experimentalmente *in vivo*, donde los componentes que participan en la regulación de GSH en cerebro frente a condiciones de estrés podrían ser más.

El GSH representa el mayor búfer redox en las células y, con base en los hallazgos de este trabajo, la disminución y la subsiguiente alteración en el contenido de tioles es la señal recibida por los órganos para iniciar las respuestas órgano-específicas. En el presente estudio no se examinaron los tioles proteicos los cuales, como se mencionó al principio, son clave en la regulación de las respuestas adaptativas (Reynaert *et al.*, 2006; Beer *et al.*, 2004; Rao y Clayton, 2002), por lo que la posibilidad de que participen en las respuestas órgano-específicas queda por ser explorada. Este trabajo además sugiere un modelo de cooperación intra e interórgano durante la inhibición de la síntesis de GSH similar al propuesto por Leeuwenburgh y Ji (1995), en el cual algunos órganos (músculo esquelético, hígado) podrían continuar exportando el GSH al plasma y luego este ser catabolizado en tejidos con actividad de  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa y generar aminoácidos precursores. Esto ayudaría a que otros órganos más dependientes de GSH (cerebro, corazón, pulmón) incorporen los precursores para mantener su propia concentración de GSH (Leeuwenburgh y Ji, 1995). Por ello se tiene en

cuenta que se habrá de considerar el contenido de precursores de GSH y el estado redox en el plasma, la regulación intra e interórgano, así como el metabolismo y transporte de aminoácidos (Brosnan, 2003).

Este trabajo ilustró como es que la disminución sistémica de GSH se refleja en respuestas órgano-específicas. Los efectos en otros órganos como el corazón, el músculo, órganos sexuales, sistema nervioso periférico y el pulmón deben ser evaluados, así como el mecanismo a través del cual la pérdida de GSH es percibida en los tejidos. El modelo aquí presentado ha demostrado que la disminución del GSH en diferentes órganos estimula la activación de diferentes vías de MAPK para responder al estrés generado, donde además el cerebro parece estar mejor protegido. Estos hallazgos podrían tener implicaciones en patologías degenerativas asociadas a la carencia de GSH, o atenuación de los sistemas antioxidantes y la excesiva producción de ROS. Estas patologías incluyen la diabetes tipo II, cirrosis y la intoxicación por acetaminofén, entre otras, donde la disminución de la síntesis de GSH o su consumo excesivo han sido descritos (Mastrocola *et al.*, 2005; Rosca *et al.*, 2005). Finalmente, el estudio del GSH como modulador de señales intracelulares en diferentes tejidos u órganos es un campo de gran interés debido a su potencial aplicación desde el punto de vista clínico.

## CAPÍTULO VII

### CONCLUSIONES

El modelo experimental aquí descrito es un buen modelo para estudiar al GSH como modulador de MAPK a nivel sistémico.

La inhibición de la síntesis de GSH a nivel sistémico activa vías de señalización por MAPK de manera órgano-específica.

La disminución de GSH activa la vía  $p38^{\text{MAPK}}$ -NF- $\kappa$ B/AP-1 en el hígado,  $p38^{\text{MAPK}}$ -ATF-2 en riñón y ERK2-Nrf2 en cerebro.

Bajo las condiciones experimentales la actividad de ERK2 fue independiente de ERK1 en cerebro

La activación de MAPK como consecuencia de la disminución de GSH induce la transcripción de genes antioxidantes.

La inducción de *Tx-1* ocurre en los tres órganos estudiados como respuesta al estrés sistémico.

Los genes regulados por ERK2-Nrf2 en cerebro son  $\gamma$ GCSr, *Tx-1*, *xCT* y *Nrf2*

La regulación de la expresión de  $\gamma$ GCSr es independiente de la vía ERK2-Nrf2

En órganos que tienen un contenido de moderado a alto de GSH como riñón e hígado tienen una inducción limitada de genes antioxidantes bajo las condiciones experimentales descritas.

El cerebro, que contiene baja concentración de GSH, se induce una respuesta coordinada de protección ante la disminución del contenido de GSH a nivel sistémico.

La activación de cinasas por deficiencia de GSH puede ser reprimida por la incorporación de tioles exógenos.

Estos hallazgos plantean que la regulación intra e interórgano de GSH esta asociada a la actividad de MAPK.



## CAPÍTULO VIII

### PERSPECTIVAS

Sin duda el modelo experimental empleado ha dejado más preguntas que respuestas. Es necesario realizar más estudios que permitan entender los mecanismos por los cuales los órganos perciben los cambios en el estado redox a nivel sistémico. Particularmente, el cerebro es un órgano que llama la atención, dado que el presente trabajo demostró que es un órgano que puede montar una respuesta coordinada de protección. Valdría la pena estudiar otros órganos donde el GSH juega un papel importante como el corazón, músculo esquelético, intestino y pulmón, para poder estudiar las llamadas respuestas órgano-específicas.

Tanto el sistema GSH-Grx como el de Tx, son considerados los sistemas antioxidantes más importantes en las células. La expresión de *Tx-1*, en todos los tejidos también sugiere que los diferentes tejidos pueden valerse de sistemas antioxidantes para compensar la deficiencia de otros y con ello promover la sobrevivencia, por lo que sería importante profundizar en este aspecto.

Tomando en cuenta que los sistemas de defensa antioxidante como el GSH varían con el tiempo, resulta muy atractivo estudiar como el GSH modula a las MAPK en organismos jóvenes (animales neonatos) y animales envejecidos.

Se debe profundizar en los mecanismos de regulación de aminoácidos precursores de GSH, en particular el sistema de transporte  $X_c^-$  para glutamato/cistina pues a largo plazo permitiría desarrollar estrategias para restaurar las concentraciones de GSH en condiciones patológicas donde se ha descrito su deficiencia.

Queda por estudiar el mecanismo por el cual la GCS es regulada, pues la inhibición de ERK2 con U0126 develó que es un mecanismo independiente de la vía ERK2-Nrf2.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, W. A., Griffith, O. W., Meister, A. (1986) Gamma-glutamyl-glutathione. Natural occurrence and enzymology. *J Biol Chem* **261**:13657-13661

Aggeli, I. K., Gaitanaki, C., Beis, I. (2006) Involvement of JNKs and p38-MAPK/MSK1 pathways in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced upregulation of heme oxygenase-1 mRNA in H9c2 cells. *Cell Signal* **18**:1801-1812

Allen, R. G., Tresini, M. (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* **28**:463-499

Alvarez, E., Northwood, I. C., Gonzalez, F. A., Latour, D. A., Seth, A., Abate, C., Curran, T., Davis, R. J. (1991) Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *J Biol Chem* **266**:15277-15285

Andersen, J. K., Mo, J. Q., Hom, D. G., Lee, F. Y., Harnish, P., Hamill, R. W., McNeill, T. H. (1996) Effect of buthionine sulfoximine, a synthesis inhibitor of the antioxidant glutathione, on the murine nigrostriatal neurons. *J Neurochem* **67**:2164-2171

Anderson, M. E., Meister, A. (1980) Dynamic state of glutathione in blood plasma. *J Biol Chem* **255**:9530-9533

Anderson, M. E., Underwood, M., Bridges, R. J., Meister, A. (1989) Glutathione metabolism at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *FASEB J* **3**:2527-2531

Anderson, M. E. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact* **111-112**:1-14

Arrigo, A. P. (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* **27**:936-944

Aw, T. Y., Wierzbicka, G., Jones, D. P. (1991) Oral glutathione increases tissue glutathione in vivo. *Chem Biol Interact* **80**:89-97

Bains, J. S., Shaw, C. A. (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Brain Res Rev* **25**:335-358

Ballatori, N., Jacob, R., Boyer, J. L. (1986) Intrabiliary glutathione hydrolysis. A source of glutamate in bile. *J Biol Chem* **261**:7860-7865

Bannai, S., Kitamura, E. (1980) Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem* **255**:2372-2376

Bannai, S. (1984) Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **779**:289-306

Bannai, S., Takada, A., Kasuga, H., Tateishi, N. (1986) Induction of cystine transport activity in isolated rat hepatocytes by sulfobromophthalein and other electrophilic agents. *Hepatology* **6**:1361-1368

Bannai, S., Ishii, T., Takada, A. en **Glutathione Centennial, Molecular perspectives and clinical implications**. eds. Taniguchi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y. y Meister, A. (Academic, New York), 1988 pp. 407-422

Beer, S. M., Taylor, E. R., Brown, S. E., Dahm, C. C., Costa, N. J., Runswick, M. J., Murphy, M. P. (2004) Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins: implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant defense. *J Biol Chem* **279**:47939-47951

Bigley, R., Riddle, M., Layman, D., Stankova, L. (1981) Human cell dehydroascorbate reductase. Kinetic and functional properties. *Biochim Biophys Acta* **659**:15-22

Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J. (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **92**:1295-1302

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254

Bridges, R. J., Meister, A. (1985) gamma-Glutamyl amino acids. Transport and conversion to 5-oxoproline in the kidney. *J Biol Chem* **260**:7304-7308

Brosnan, J. T. (2003) Interorgan amino acid transport and its regulation. *J Nutr* **133**:2068S-2072S

Burdo, J., Dargusch, R., Schubert, D. (2006) Distribution of the cystine/glutamate antiporter system xc<sup>-</sup> in the brain, kidney, and duodenum. *J Histochem Cytochem* **54**:549-557

- Cai, J., Huang, Z. Z., Lu, S. C. (1997) Differential regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy and light subunit gene expression. *Biochem J* **326**:167-172
- Carlberg, I., Mannervik, B. (1985) *Methods in Enzymology* **113**: 484-490
- Carmel-Harel, O, Storz, G. (2000) Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the Escherichia coli and saccharomyces cerevisiae responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol* **54**: 439-461
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**:527-605
- Chang, L., Karin, M. (2001). Mammalian MAP. kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37-40
- Chen, T. S., Richie, J. P. Jr., Lang, C. A. (1989) The effect of aging on glutathione and cysteine levels in different regions of the mouse brain. *Proc Soc Exp Biol Med* **190**:399-402
- Cheng, G., Yu, Z., Zhou, D., Mattson, M. P. (2002) Phosphatidylinositol-3-kinase-Akt kinase and p42/p44 mitogen-activated protein kinases mediate neurotrophic and excitoprotective actions of a secreted form of amyloid precursor protein. *Exp Neurol* **175**:407-414
- Chialda, L., Zhang, M., Brune, K., Pahl, A. (2005) Inhibitors of mitogen-activated protein kinases differentially regulate costimulated T cell cytokine production and mouse airway eosinophilia. *Respir Res* **6**:36
- Clapper, M. L. Szarka, C. E. (1998) Glutathione S-transferases biomarkers of cancer risk and chemopreventive response. *Chemico-Biological Interactions* **111-112**:377-388
- Cobb, M. H., Goldsmith, E. J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* **270**:14843-14846
- Cobb, M. H. (1999) MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* **71**:479-500
- Cross, J. V., Templeton, D. J. (2004) Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain. *Biochem J* **381**: 675-683
- Danbolt, N. C. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **65**:1-105
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **351**:95-105

Davis, R. J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**:239-252

de Bernardo, S., Canals, S., Casarejos, M. J., Solano, R. M., Menendez, J., Mena, M. A. (2004) Role of extracellular signal-regulated protein kinase in neuronal cell death induced by glutathione depletion in neuron/glia mesencephalic cultures. *J Neurochem* **91**:667-682

Deneke, S. M., Fanburg, B. L. (1989) Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* **257**:L163-L173

Denu, J. M., Tanner, K. G. (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* **37**:5633-5642

Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Doring, F., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Goris, J., Doree, M., Mandelkow, E. (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J* **11**: 2131-2138

Drewes, G., Mandelkow, E. M., Baumann, K., Goris, J., Merlevede, W., Mandelkow, E. (1993) Dephosphorylation of tau protein and Alzheimer paired helical filaments by calcineurin and phosphatase-2A. *FEBS Lett* **336**: 425-32

Fanger, G. R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M. B., Johnson, G. L. (1997) MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev* **7**:67-74

Fauman, E. B., Saper, M. A. (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem Sci* **21**:413-417

Filomeni, G., Rotilio, G., Ciriolo, M. R. (2003) Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J* **17**:64-66

Filomeni, G., Aquilano, K., Civitareale, P., Rotilio, G., Ciriolo, M. R. (2005) Activation of c-Jun-N-terminal kinase is required for apoptosis triggered by glutathione disulfide in neuroblastoma cells. *Free Radic Biol Med* **39**:345-354

Foley, T. D., Armstrong, J. J., Kupchak, B. R. (2004) Identification and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity of the major constitutive MAPK phosphatase from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* **315**: 568-574

Fratelli, M., Goodwin, L. O., Orom, U. A., Lombardi, S., Tonelli, R., Mengozzi, M., Ghezzi, P. (2005) Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:13998-14003

Fukunaga, K., Miyamoto, E. (1998) Role of MAP kinase in neurons. *Mol Neurobiol* **16**:79-95.

Gallogly, M. M., Miesal, J. J. (2007) Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr Opin Pharmacol* **7**:381-391

Ghezzi, P. (2005) Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res* **39**:573-580

Goedert, M. Cohen, E. S., Jakes, R., Cohen, P. (1992) p42 MAP kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein phosphatase 2A1. Implications for Alzheimer's disease. *FEBS Lett* **312**: 95-99

Gohil, K., Viguie, C., Stanley, W. C., Brooks, G. A, Packer, L. (1988) Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol* **64**:115-119

Gonzalez, F. A., Raden, D. L., Davis, R. J. (1991) Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J Biol Chem* **266**:22159-22163

Graham, K. S., Reddy, C. C., Scholz, R. W. (1989) Reduced glutathione effects on alpha-tocopherol concentration of rat liver microsomes undergoing NADPH-dependent lipid peroxidation. *Lipids* **24**:909-914

Griffith O. W., Meister, A. (1979a) Translocation of intracellular glutathione to membrane-bound gamma-glutamyl transpeptidase as a discrete step in the gamma-glutamyl cycle: glutathionuria after inhibition of transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**:268-72

Griffith, O. W., Meister, A. (1979b) Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**:5606-5610

Griffith, O. W., Meister, A. (1979c) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* **254**: 7558-7560

Griffith, O. W. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* **27**:922-935

Griffith, O. en **Glutathione Centennial, Molecular perspectives and clinical implications**. eds. Taniguchi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y., Meister, A. (Academic, New York), 1988 pp. 285-300. 20

Griffith, O. W. (1981) Depletion of glutathione by inhibition of biosynthesis. *Methods Enzymol* **77**: 59-63

Griffith, O. W. (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem* **257**: 13704-13712

Grimble, R. F., Jackson, A. A., Persaud, C., Wride, M. J., Delers, F., Engler, R. (1992) Cysteine and glycine supplementation modulate the metabolic response to tumor necrosis factor alpha in rats fed a low protein diet. *J Nutr* **122**:2066-2073

Haddad, J. J. (2002) The involvement of L-gamma-glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione/GSH) in the mechanism of redox signaling mediating MAPK (p38)-dependent regulation of pro-inflammatory cytokine production. *Biochem Pharmacol* **63**:305-320

Hagen, T. M., Jones, D. P. (1987) Transepithelial transport of glutathione in vascularly perfused small intestine of rat. *Am J Physiol* **252**:G607-G613

Hagen, T. M., Wierzbicka, G. T., Sillau, A. H., Bowman, B. B., Jones, D. P. (1990) Bioavailability of dietary glutathione: effect on plasma concentration. *Am J Physiol* **259**:G524-G529

Halliwell, B., Gutteridge, J. (1999). **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3a ed. Oxford University Press. UK.

Hammond, C. L., Marchan, R., Krance, S. M., Ballatori, N. (2007) Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins. *J Biol Chem* **282**:14337-14347.

Han, H. J., Lim, M. J., Lee, Y. J. (2004) Oxalate inhibits renal proximal tubule cell proliferation via oxidative stress, p38 MAPK/JNK, and cPLA2 signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**:C1058-C1066

Harvey, P. R., Ilson, R. G., Strasberg, S. M. (1989) The simultaneous determination of oxidized and reduced glutathiones in liver tissue by ion pairing reverse phase high performance liquid chromatography with a coulometric electrochemical detector. *Clin Chim Acta* **180**:203-212

Hickenbottom, S. L., Grotta, J. C., Strong, R., Denner, L. A., Aronowski, J. (1999) Nuclear factor-kappaB and cell death after experimental intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* **30**:2472-2477

Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., Yodoi, J. (1997) AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:3633-3638

Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K., Yodoi, J. (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappa B. *J Biol Chem* **274**:27891-27897

Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* **264**:13963-13966

Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lönn, M. E., Hudemann, C., Lillig, C. H. (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem Soc Trans* **33**:1375-1377

Iantomasi, T., Favilli, F., Vincenzini, M. T. (1999) Evidence of glutathione transporter in rat brain synaptosomal membrane vesicles. *Neurochem Int* **34**:509-516

Ishii, T., Itoh, K., Yamamoto, M. (2002) Roles of Nrf2 in activation of antioxidant enzyme genes via antioxidant responsive elements. *Methods Enzymol* **348**:182-190

Jackson, G. R., Werrbach-Perez, K., Pan, Z., Sampath, D., Perez-Polo, J. R. (1994) Neurotrophin regulation of energy homeostasis in the central nervous system. *Dev Neurosci* **16**:285-90

Jaeschke, H., Wendel, A. (1985) Diurnal fluctuation and pharmacological alteration of mouse organ glutathione content. *Biochem Pharmacol* **34**:1029-1033

Jain, A., Martensson, J., Stole, E., Auld, P. A., Meister, A. (1991) Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:1913-1917

Ji, L. L., Fu, R. (1992) Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol* **72**:549-554

Jurado, J., Prieto-Alamo, M. J., Madrid-Risquez, J., Pueyo, C. (2003) Absolute gene expression patterns of thioredoxin and glutaredoxin redox systems in mouse. *J Biol Chem* **278**:45546-45554



Kabe, Y., Ando, K., Hirao, S., Yoshida, M., Handa, H. (2005) Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal* **7**:395-403

Kaghad, M., Dessarps, F., Jacquemin-Sablon, H., Caput, D., Fradelizi, D., Wollman, E. E. (1994) Genomic cloning of human thioredoxin-encoding gene: mapping of the transcription start point and analysis of the promoter. *Gene* **140**:273-278

Kamata, H., Hirata, H. (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* **11**:1-14

Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., Karin, M. (2005a) Reactive oxygen species promote TNF alpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**:649-661

Kamata, H., Oka, S., Shibukawa, Y., Kakuta, J., Hirata, H. (2005b) Redox regulation of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells through modulation of the nerve growth factor receptor, TrkA. *Arch Biochem Biophys* **434**:16-25

Kanai, Y., Endou, H. (2001) Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. *Curr Drug Metab* **2**:339-354

Kang, Y., Viswanath, V., Jha, N., Qiao, X., Mo, J., Andersen, J. (1999) Brain gamma-glutamyl cysteine synthetase (GCS) mRNA expression patterns correlate with regional-specific enzyme activities and glutathione levels. *J Neurosci Res* **58**:436-441

Kannan, R., Chakrabarti, R., Tang, D., Kim, K. J., Kaplowitz, N. (2000) GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes: evidence for luminal localization of Na<sup>+</sup>-dependent GSH transport in HCEC. *Brain Res* **852**:374-382

Kao, S., Jaiswal, R. K., Kolch, W., Landreth, G. E. (2001) Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* **276**:18169-18177

Kelly, G. S. (1998) Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* **3**:114-127

Kim, Y. C., Yamaguchi, Y., Kondo, N., Masutani, H., Yodoi, J. (2003) Thioredoxin-dependent redox regulation of the antioxidant responsive element (ARE) in electrophile response. *Oncogene* **22**:1860-1865

Kim, S. G., Lee, C. H., Park, J. W. (2004) Deprenyl, a therapeutic agent for Parkinson's disease, inhibits arsenic toxicity potentiated by GSH depletion via inhibition of JNK activation. *J Toxicol Environ Health A* **67**:2013-2024

Kong, A. N., Owuor, E., Yu, R., Hebbar, V., Chen, C., Hu, R., Mandlekar, S. (2001) Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab Rev* **33**:255-271

Kramer, R. M., Roberts, E. F., Um, S. L., Borsch-Haubold, A. G., Watson, S. P., Fisher, M. J., Jakubowski, J. A. (1996) p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J Biol Chem* **271**:27723-27729.

Kwak, M. K., Itoh, K., Yamamoto, M., Sutter, T. R., Kensler, T. W. (2001) Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethiole-3-thione. *Mol Med* **7**:135-145

Kwak, M. K., Itoh, K., Yamamoto, M., Kensler, T. W. (2002) Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol* **22**:2883-2892

Lauterburg, B. H., Adams, J. D., Mitchell, J. R. (1984) Hepatic glutathione homeostasis in the rat: efflux accounts for glutathione turnover. *Hepatology* **4**:586-590

Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R., Rhee, S. G. (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* **273**:15366-15372

Lee, J. M.; Shih, A. Y.; Murphy, T. H.; Johnson, J. A. (2003) NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons. *J Biol Chem* **278**:37948-37956

Leedle, R. A., Aust, S. D. (1990) The effect of glutathione on the vitamin E requirement for inhibition of liver microsomal lipid peroxidation. *Lipids* **25**:241-245

Leeuwenburgh, C, Ji, L. L. (1995) Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys* **316**:941-949

- Levinthal, D. J., Defranco, D. B. (2005) Reversible oxidation of ERK-directed protein phosphatases drives oxidative toxicity in neurons. *J Biol Chem* **28**:5875-5883
- Lew, H., Pyke, S., Quintanilha, A. (1985) Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. *FEBS Lett* **185**:262-266
- Lewis, T. S., Shapiro, P. S., Ahn, N. G. Signal transduction through MAP kinase cascades. En Vande Woude, G y G. Klein. Ed. **Advances in cancer research**. Vol. 74 Academic Press. CA, USA. Pp 49-139.
- Li, W., Jain, M. R., Chen. C., Yue, X., Hebbar, V., Zhou, R., Kong. A. N. (2005) Nrf2 Possesses a redox-insensitive nuclear export signal overlapping with the leucine zipper motif. *J Biol Chem* **280**:28430-28438
- Liebler, D. C., Kling, D. S., Reed, D. J. (1986) Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol. Control of alpha-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *J Biol Chem* **261**:12114-12119
- Liu, R. M., Gao, L., Choi, J., Forman, H. J. (1998) gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. *Am J Physiol* **275**:L861-L869
- Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., Kyriakis, J. M. (2000) Free in PMC Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol Cell Biol* **20**:2198-2208
- Limón, J., Valdovinos, C., Gonsebatt, M. E. (2007) GSH regulation and its lost in central nervous system: a redox hypothesis to understand neurodegenerative disorders. (Manuscrito en preparación).
- Limón-Pacheco, J. H., Gonsebatt, M. E. (2007) Glutathione (GSH) synthesis inhibition in the nervous system: A model to comprehend GSH role in neuropathologies. In **New Perspectives on Brain Cell Damage, Neurodegeneration and Neuroprotective Strategies**. Eds. Santamaría, A., Jiménez-Capdeville, M. E. 10. pp 173-188. Kerala, India.
- Lu, S. C., Garcia-Ruiz, C., Kuhlentkamp, J., Ookhtens, M., Salas-Prato, M., Kaplowitz, N. (1990) Hormonal regulation of glutathione efflux. *J Biol Chem* **265**:16088-16095
- Lu, S. C., Kuhlentkamp, J., Garcia-Ruiz, C., Kaplowitz, N. (1991) Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. *J Clin Invest* **88**:260-269

- Lu, S. C. (2000) Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul* **36**:95-116
- Luthman, M., Eriksson, S., Holmgren, A., Thelander, L. (1979) Glutathione-dependent hydrogen donor system for calf thymus ribonucleoside-diphosphate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**:2158-2162
- Marshall, C. J. (1994) MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* **4**:82-89
- Martensson, J., Meister, A. (1991a) Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: ascorbate spares glutathione and protects. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:4656-4660
- Martensson, J., Jain, A., Stole, E., Frayer, W., Auld, P. A., Meister, A. (1991b) Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat: a model for endogenously produced oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:9360-9364
- Mastrocola, R., Restivo, F., Vercellinato, I., Danni, O., Brignardello, E., Aragno, M., Boccuzzi, G. (2005) Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J Endocrinol* **187**:37-44
- Matthews, J. R., Wakasugi, N., Virelizier, J. L., Yodoi, J., Hay, R. T. (1992) Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* **20**:3821-3830
- McLellan, L. I., Lewis, A. D., Hall, D. J., Ansell, J. D., Wolf, C. R. (1995) Uptake and distribution of N-acetylcysteine in mice: tissue-specific effects on glutathione concentrations. *Carcinogenesis* **16**:2099-2106
- Mehta, A., Sekhon, C. P., Giri, S., Orak, J. K., Singh, A. K. (2002) Attenuation of ischemia/reperfusion induced MAP kinases by N-acetyl cysteine, sodium nitroprusside and phosphoramidon. *Mol Cell Biochem* **240**:19-29
- Meister, A. (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* **263**:17205-17208
- Miao, W., Hu, L., Scrivens, P. J., Batist, G. (2005) Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element

signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J Biol Chem* **280**:20340-20348

Minich, T., Riemer, J, Schulz, J. B., Wielinga, P., Wijnholds, J., Dringen, R. (2006) The multidrug resistance protein 1 (Mrp1), but not Mrp5, mediates export of glutathione and glutathione disulfide from brain astrocytes. *J Neurochem* **97**:373-384

Moldeus, P., Cotgreave, I. A. (1994) N-acetylcysteine. *Methods Enzymol* **234**:482-492

Mulder, G. J., Ouwerkerk-Mahadevan, S. (1997) Modulation of glutathione conjugation in vivo: how to decrease glutathione conjugation in vivo or in intact cellular systems in vitro. *Chem Biol Interact* **105**: 17-34

Murphy, M. E., Scholich, H., Sies, H. (1992) Protection by glutathione and other thiol compounds against the loss of protein thiols and tocopherol homologs during microsomal lipid peroxidation. *Eur J Biochem* **210**:139-146

Niida, S., Kawahara, M., Ishizuka, Y., Ikeda, Y., Kondo, T., Hibi, T., Suzuki, Y., Ikeda, K., Taniguchi, N. (2004) Gamma-glutamyltranspeptidase stimulates receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing factor. *J Biol Chem* **279**: 5752-5756

Oberley, T. D., Verwiebe, E., Zhong, W., Kang, S. W., Rhee, S. G. (2001) Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney. *Free Radic Biol Med* **30**:412-424

Ortiz, J., Harris, H. W., Guitart, X., Terwilliger, R. Z., Haycock, J. W., Nestler, E. J. (1995) Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine. *J Neurosci* **15**:1285-1297

Owuor, E. D., Kong, A. N. (2002) Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* **64**:765-770. *Erratum in: Biochem Pharmacol* (2002) **64**:1547

Pan Z, Perez-Polo R. Increased uptake of L-cysteine and L-cystine by nerve growth factor in rat pheochromocytoma cells. *Brain Res* (1996) **740**:21-6

Paolicchi, A., Dominici, S., Pieri, L., Maellaro, E., Pompella, A. (2002) Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochem Pharmacol* **64**:1027-1035

Pastore, A., Federico, G., Bertini, E., Piemonte, F. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* **333**:19-39

- Patenaude, A., Murthy, M. R., Mirault, M. E. (2005) Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* **62**:1063-1080
- Patriarca, S., Furfaro, A. L., Domenicotti, C., Odette, P., Cottalasso, D., Marinari, U. M., Pronzato, M. A., Traversa, N. (2005) Supplementation with N-acetylcysteine and taurine failed to restore glutathione content in liver of streptozotocin-induced diabetics rats but protected from oxidative stress. *Biochem Biophys Acta* **1741**:48-54
- Piani, D., Fontana, A. (1994) Involvement of the cystine transport system xc<sup>-</sup> in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J Immunol* **152**:3578-3585
- Powis, G., Montfort, W. R. (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:261-295
- Preville, X., Salvemini, F., Giraud, S., Chaufour, S., Paul, C., Stepien, G., Ursini, M. V., Arrigo, A. P. (1999) Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. *Exp Cell Res* **247**:61-78
- Pyke, S., Lew, H., Quintanilha, A. (1986) Severe depletion in liver glutathione during physical exercise. *Biochem Biophys Res Commun* **139**:926-931
- Rao, R. K., Li, L., Baker, R. D., Baker, S. S., Gupta, A. (2000) Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**:G332-G340
- Rao, R. K., Clayton, L. W. (2002) Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochem Biophys Res Commun* **293**:610-616
- Rappa, G., Lorico, A., Flavell, R. A., Sartorelli, A. C. (1997) Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins. *Cancer Res* **57**:5232-5237
- Reuther-Madrid, J. Y., Kashatus, D., Chen, S., Li, X., Westwick, J., Davis, R. J., Earp, H. S., Wang, C. Y., Baldwin, Jr. A. S. (2002) The p65/RelA subunit of NF-kappaB suppresses the sustained, antiapoptotic activity of Jun kinase induced by tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* **22**:8175-8183

Reynaert, N. L., van der Vliet, A., Guala, A. S., McGovern, T., Hristova, M., Pantano, C., Heintz, N. H., Heim, J., Ho, Y. S., Matthews, D. E., Wouters, E. F., Janssen-Heininger, Y. M. (2006) Dynamic redox control of NF-kappaB through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory kappaB kinase beta. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:13086-13091

Rosca, M. G., Mustata, T. G., Kinter, M. T., Ozdemir, A. M., Kern, T. S., Szweda, L. I., Brownlee, M., Monnier, V. M., Weiss, M. F. (2005) Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**:F420-F430

Rubinfeld, H., Seger, R. en (2004). **MAP Kinase Signaling Protocols**. Seger, T. Ed. Vol 250. pp 1-28. Humana Press. New Jersey

Saetre, R., Rabenstein, D. L. (1978) Determination of cysteine in plasma and urine and homocysteine in plasma by high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* **90**:684-692

Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., Ichijo, H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* **17**:2596-2606

Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Meng, T. C., Hinks, J. A., Tonks, N. K., Barford, D. (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* **423**: 769-773

Sastre, J., Asensi, M., Gasco, E., Pallardo, F. V., Ferrero, J. A., Furukawa, T., Vina, J. (1992) Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol* **263**:R992-R995

Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., Bannai, S. (1999) Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate Exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem* **274**:11455-11458

Sato, H., Tamba, M., Okuno, S., Sato, K., Keino-Masu, K., Masu, M., Bannai, S. (2002) Distribution of cystine/glutamate exchange transporter system  $x_c^-$  in the mouse brain. *J Neurosci* **22**:8028-8033

Scholich, H., Murphy, M. E., Sies, H. (1989) Antioxidant activity of dihydrolipoate against microsomal lipid peroxidation and its dependence on alpha-tocopherol. *Biochim Biophys Acta* **1001**:256-261

Semon, B. A., Leung, P. M., Rogers, Q. R., Gietzen, D. W. (1989) Plasma and brain ammonia and amino acids in rats measured after feeding 75% casein or 28% egg white. *J Nutr* **119**:1583-1592

Sen, C. K. (1997) Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *J Nutr Biochem* **8**: 660-672

Shanker, G., Aschner, M. (2001) Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocyte transport. *J Neurosci Res* **66**:998-1002

Shih, A. Y., Johnson, D. A., Wong, G., Kraft, A. D., Jiang, L., Erb, H., Johnson, J. A., Murphy, T. H. (2003) Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci* **23**:3394-3406

Sies, H., Wahllander, A., Waydhas, C. H. (1978) **Functions of Glutathione in Liver and Kidney** (Sies, H and Wendel, A. eds.) pp 120-126, Springer-Verlag, Berlin

Sies, H., Graf, P. (1985) Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenalina. *Biochem J* **226**:545-549

Siow Y. L., Kalmar, G. B., Sanghera, J. S., Tai, G., Oh, S. S., Pelech, S. L. (1997) Identification of two essential phosphorylated threonine residues in the catalytic domain of Mekk1. Indirect activation by Pak3 and protein kinase C. *J Biol Chem* **272**:7586-7594

Slivka, A., Spina, M. B., Calvin, H. I., Cohen, G. (1988) Depletion of brain glutathione in preweanling mice by L-buthionine sulfoximine. *J Neurochem* **50**:1391-1393

Song, J. J., Lee, Y. J. (2003) Differential role of glutaredoxin and thioredoxin in metabolic oxidative stress-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Biochem J* **373**:845-853

Steinherz, R., Martensson, J., Wellner, D., Meister, A. (1990) Transport into brain of buthionine sulfoximine, an inhibitor of glutathione synthesis, is facilitated by esterification and administration of dimethylsulfoxide. *Brain Res* **518**:115-119

Strange, R. C., Jones, P. W., Fryer, A. A. (2000) Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters* **112-113**: 357-363



- Suh, J. H., Shenvi, S. V., Dixon, B. M., Liu, H., Jaiswal, A. K., Liu, R. M., Hagen T. M. (2004) Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:3381-3386
- Sun, X., Erb, H., Murphy, T. H. (2005) Coordinate regulation of glutathione metabolism in astrocytes by Nrf2. *Biochem Biophys Res Commun* **326**:371-377
- Suzuki, Y. J., Forman, H. J., Sevanian, A. (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* **22**:269-285
- Tanito, M., Masutani, H., Kim, Y. C., Nishikawa, M., Ohira, A., Yodoi, J. (2005) Sulforaphane induces thioredoxin through the antioxidant-responsive element and attenuates retinal light damage in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci* **46**:979-987
- Tapiero, H., Mathe, G., Couvreur, P., Tew, K. D. II. (2002) Glutamine and glutamate. *Biomed Pharmacother* **56**:446-457
- Tate, S. S., Ross, L. L., Meister, A. (1973) The -glutamyl cycle in the choroid plexus: its possible function in amino acid transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**:1447-1449
- Thompson, G. A., Meister, A. (1976) Hydrolysis and transfer reactions catalyzed by gamma-glutamyl transpeptidase; evidence for separate substrate sites and for high affinity of L-cystine. *Biochem Biophys Res Commun* **71**:32-36
- Tian, L., Shi, M. M., Forman, H. J. (1997) Increased transcription of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion. *Arch Biochem Biophys* **342**:126-133
- Tully, D. B., Bao, W., Goetz, A. K., Blystone, C. R., Ren, H., Schmid, J. E., Strader, L., Wood, C. R., Best, D. S., Narotsky, M. G., Wolf, D. C., Rockett, J. C., Dix, D. J. (2006) Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. *Toxicol Appl Pharmacol* **215**:260-273
- Vethanayagam, J. G., Green, E. H., Rose, R. C., Bode, A. M. (1999) Glutathione-dependent ascorbate recycling activity of rat serum albumin. *Free Radic Biol Med* **26**:1591-1598
- Vlami-Gardikas, A., Holmgren, A. (2002) Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *Methods Enzymol* **347**: 286-296

Volente, C., Angelastro, J. M., Greene, L. A. (1993) Association of protein kinases ERK1 and ERK2 with p75 nerve growth factor receptors. *J Biol Chem* **268**:21410-21415

Ward, K. W., Prokscht, J. W., Azzaranot, L. M., Mumawa, J. A., Roethke, T. J., Stelman, G. J., Walsh, M. J., Zeigler, K. S., McSurdy-Freed, J. E., Kehlert, J. R., Chokshi, J., Levy, M. A., Smith, B. R. (2001) Preclinical pharmacokinetics of SB-203580, a potent inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase. *Xenobiotica* **31**:783-797

Watanabe, H., Bannai, S. (1987) Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* **165**:628-640

Watanabe, T., Sagisaka, H., Arakawa, S., Shibaya, Y., Watanabe, M., Igarashi, I., Tanaka, K., Totsuka, S., Takasaki, W., Manabe, S. (2003) A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *J Toxicol Sci* **28**:455-469

Wera, S., Hemmings, B. A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* **311**:17-29

White, B. P., Davies, M. H., Schnell, R. C. (1987) Circadian variations in hepatic glutathione content, gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyl transferase activities in mice. *Toxicol Lett* **35**:217-223

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., Johnson, G. L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**:143-180

Wild, A. C., Moinova, H. R., Mulcahy, R. T. (1999) Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* **274**:33627-33636

Wilhelm, D., Bender, K., Knebel, A., Angel, P. (1997) The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Mol Cell Biol* **17**:4792-4800

Wu, D., Cederbaum, A. (2004) Glutathione depletion in CYP2E1-expressing liver cells induces toxicity due to the activation of p38 mitogen-activated protein kinase and reduction of nuclear factor-kappaB DNA binding activity. *Mol Pharmacol* **66**:749-760

Yu, R., Lei, W., Mandlekar, S., Weber, M. J., Der, C. J., Wu, J., Kong, A. T. (1999) Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem* **274**:27545-27552

Yu, R., Lei, W., Mandlekar, S., Weber, M. J., Der, C. J., Wu, J., Kong, A. T. (1999) Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem* **274**:27545-27552

Zafra, F., Aragon, C., Olivares, L., Danbolt, N. C., Gimenez, C., Storm-Mathisen, J. (1995) Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J Neurosci* **15**:3952-3969

Zipper, L. M., Mulcahy, R. T. (2000) Inhibition of ERK and p38 MAP kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. *Biochem Biophys Res Commun* **278**: 484-492

Original Contribution

# Glutathione depletion activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways that display organ-specific responses and brain protection in mice

Jorge H. Limón-Pacheco<sup>a</sup>, Norma A. Hernández<sup>b</sup>, María L. Fanjul-Moles<sup>c</sup>, María E. Gonsebatt<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Distrito Federal, México*

<sup>b</sup> *Subdirección de Investigación Clínica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando 22, Código Postal 14000, Tlalpan, Distrito Federal, México*

<sup>c</sup> *Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México*

Received 2 October 2006; revised 25 June 2007; accepted 27 June 2007

Available online 27 July 2007

## Abstract

Because mitogen-activated protein kinases (MAPK) are downstream effectors of antioxidant responses, changes in GSH levels in an organism might induce organ-specific responses. To test our hypothesis, mice were treated intraperitoneally with L-buthionine-S-R-sulfoximine (BSO) to inhibit GSH synthesis. A time-related GSH depletion in the liver and kidney correlated with p38<sup>MAPK</sup> phosphorylation and induction of *thioredoxin 1 (Tx-1)* transcription. This positive regulation was associated with nuclear translocation of NF-κB and ATF-2 and c-Jun phosphorylation in the liver, but only c-Jun phosphorylation in the kidney. Increased levels of GSH were observed in the brain together with extracellular regulated kinase 2 (ERK2) activation, Nrf2 nuclear accumulation, and increases in transcription of *Nrf2*, *xCT*, *γ-glutamylcysteine synthetase (γGCSr)*, and *Tx-1*. Pretreatment with MAPK inhibitors SB203580 and U0126, or addition of the exogenous thiol *N*-acetylcysteine, abrogated both p38<sup>MAPK</sup> and ERK2 activation as well as downstream effects on gene expression. No effect on *γGCSr* was observed. These results indicate that in mice, GSH depletion is associated with p38<sup>MAPK</sup> phosphorylation in the liver and kidney and with ERK2 activation in the brain, in what could be considered part of the brain's protective response to thiol depletion.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Mitogen-activated protein kinases; Glutathione; Organ-specific regulation; Redox environment

## Introduction

Oxidative phosphorylation and metabolic transformations in eukaryotes are the main sources of reactive oxygen species (ROS) that cause oxidative damage in cellular DNA, lipids, and

proteins. To contend with these toxic products, cells synthesize low molecular weight thiol-containing peptides such as glutathione (GSH; L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine). GSH constitutes the major intracellular redox buffer in the cells, but also functions as an antioxidant in xenobiotic metabolism and is considered a site for cysteine storage [1,2]. In recent years, a role for GSH in the modulation of signal transduction through direct interaction with key cysteines located in the active site or modulator regions of kinases, phosphatases, and transcription factors has been recognized [3–5]. GSH is synthesized in the cytosol in two steps. First, the enzyme *γ*-glutamylcysteine synthetase (*γ*GCS) catalyzes the formation of L-γ-glutamyl-L-cysteine. The glycine residue of the GSH tripeptide is added in the second step by glutathione synthetase. Cellular GSH exists predominantly in a reduced form, but small amounts of the oxidized disulfide form GSSG can also be detected. The GSH/GSSG ratio often is taken as an indicator of cellular redox

**Abbreviations:** AP-1, activating protein 1; ARE, antioxidant response element; ATF-2, activating transcription factor 2; BSO, L-buthionine-S-R-sulfoximine; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GAPDH, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; GCS<sub>c,r</sub>, glutamylcysteine synthetase, c, catalytic subunit, r, regulatory subunit; GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; JNK, c-Jun amino N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NF-κB, nuclear factor kappa B; Nrf2, nuclear factor E2 p45-related factor; p38<sup>MAPK</sup>, p38 kinase; ROS, reactive oxygen species; xCT, subunit of cysteine transporter.

\* Corresponding author. Apartado Postal 70-228, 04510, Ciudad Universitaria, Distrito Federal, México. Fax: +52 55 56229182.

E-mail address: [margen@servidor.unam.mx](mailto:margen@servidor.unam.mx) (M.E. Gonsebatt).

status. Changes in this ratio have been associated with modulation of transcription of a wide variety of genes implicated in multiple cellular processes such as growth, differentiation, and death [1,6].

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) are downstream effectors in antioxidant responses. Their activity is manifested in activation of many transcription factors including nuclear factor E2 p45-related factor (Nrf2) and nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) [7,8]. Roles for JNK and p38<sup>MAPK</sup> in the regulation of AP-1 transcription factors c-Jun and ATF-2 in the cellular adaptive response to oxidative stress have also been demonstrated [9]. In vitro models have shown that extracellular regulated kinase 2 (ERK2) and p38<sup>MAPK</sup> modulate the expression of antioxidant enzymes by activation of Nrf2. Nrf2 binds to antioxidant responsive elements (ARE) present in genes encoding phase I, phase II, and antioxidant enzymes such as  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase catalytic ( $\gamma$ GCS<sub>c</sub>) and regulatory ( $\gamma$ GCS<sub>r</sub>) subunits, glutathione reductase (GSSG-Rd), the subunits of the x<sub>c</sub><sup>-</sup> cystine transport system xCT, and the heavy chain of the 4F2 antigen. All of these gene products are related to the GSH antioxidant system [10–14]. Another example of redox regulation by MAPK signaling is through thioredoxin-1 (Tx-1), a small protein with a predominantly cytosolic isoform. Tx-1 has many biological functions that include defense against oxidative stress, regulation of gene expression, and apoptosis triggered through MAPK pathways [15,16]. Tx-1 also is modulated at the transcriptional level by Nrf2 under oxidative stress conditions [17].

In vivo models suggest that GSH is exported from the liver to the blood and is catabolized in the kidney to  $\gamma$ -glutamyl or cysteinylglycine. These compounds are distributed via the blood to all tissues where they may be incorporated into cells by the x<sub>c</sub><sup>-</sup> transport system and then used for de novo synthesis of GSH [18–22]. Mammalian organs have different levels of GSH. The liver has the highest concentration, while the kidney and brain have relatively low concentrations [23]. The brain is more susceptible to oxidative damage because of its high oxygen utilization (20% of the oxygen consumed by the body), high iron content, presence of unsaturated fatty acids, and decreased activities of detoxifying enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase, and GSSG-Rd [24–26]. Clinically, low levels of GSH in the brain are associated with neurodegenerative disorders and aging [27].

Although some of the mechanisms of MAPK signal modulation by GSH have been described in vitro, we investigated the effects of GSH depletion on MAPK activation and downstream transcription factor activation in the livers, kidneys, and brains of BALB/c mice after systemic inhibition of GSH synthesis by BSO. While the liver and kidney showed a significant decrease of GSH content that correlated with p38<sup>MAPK</sup> activation, there was an increase in GSH content in parallel with ERK2 activation in the brain. Activation of the p38<sup>MAPK</sup> pathway correlated with accumulation of NF- $\kappa$ B and nuclear phosphorylation of ATF-2 and c-Jun in the liver, and with c-Jun phosphorylation in the kidney. In both tissues, an increase in the transcription of *Tx-1* was observed. A protective response was concomitantly initiated in the brain by activation of the ERK2

pathway coordinated by Nrf2 accumulation, resulting in the upregulation of *xCT* and *Tx-1*. Pretreatment with MAPK inhibitors SB203580 and U0126 or administration of exogenous thiol *N*-acetylcysteine (NAC) blocked both p38<sup>MAPK</sup> and ERK2 activation and their downstream effects on gene expression. Our results suggest that changes in systemic GSH modulate organ-specific responses through the MAPK p38<sup>MAPK</sup> pathway in liver and kidney and the ERK2-Nrf2 pathway in the brain, initiating the transcription of antioxidant enzymes to confront the oxidative stress generated by BSO.

## Materials and methods

### Chemicals and antibodies

All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO) unless otherwise indicated. Primary antibodies against ERK2, Nrf2, NF- $\kappa$ B, and native and phosphorylated c-Jun were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibodies against ERK2, the native and phosphorylated forms of p38<sup>MAPK</sup> and ATF-2, and the secondary anti-rabbit antibody were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA).

### Animal use and treatments

Male BALB/c mice 4 weeks of age were obtained from the animal care facility of the Instituto de Investigaciones Biomédicas at Universidad Nacional Autónoma de México. Animals were maintained in 12-h light/dark cycles. Mice were injected intraperitoneally (ip) with BSO dissolved in saline solution at a dose of 6 mmol kg<sup>-1</sup> of body weight. Mice were sacrificed by cervical dislocation at 1, 2, and 3 h following BSO administration. In experiments to determine the effects of altered thiol levels, mice were treated with 5 mmol kg<sup>-1</sup> of NAC dissolved in saline solution 30 min prior to BSO administration. Control mice received saline solution or NAC only.

ERK2 and p38<sup>MAPK</sup> inhibitors U0126 (Upstate, NY) and SB203580 (Biosource, CA), respectively [28], were dissolved in DMSO according to the manufacturer's instructions and administered ip at a dose of 5 mg kg<sup>-1</sup> 2 h prior to challenge with BSO. Mice treated with U0126 were sacrificed 2 h following BSO administration and mice treated with SB203580 were sacrificed 3 h following BSO administration. Livers, kidneys, and brains were harvested, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

### Determination of GSH and GSSG levels

Glutathione content was determined by reverse-phase (RP-HPLC) as previously described, with modifications [29]. Briefly, a Spherisorb RP-18 column (5- $\mu$ m-diameter spherical particles; 250  $\times$  4.6 mm, Perkin-Elmer, MA) was used in all determinations. Buffer for the mobile phase consisted of 10 mM sodium phosphate monobasic monohydrate (pH 2.7, adjusted with phosphoric acid), 5 mM octyl sulfate, and 2% (v/v) acetonitrile. Elutions were carried out at a flow rate of 0.8 ml min<sup>-1</sup> at constant temperature (22°C). The mobile phase was

advanced using a PM-80 Solvent Delivery System connected linearly to a vacuum degasser LC-26B (BASi, IN). Reduced and oxidized glutathione were detected in the same sample with a LC-4C Amperometric Detector (BASi) with potentials of 0.95 V for derivatization electrode and 1.35 V for electrode register. Detection was performed in the 5  $\mu$ A range.

#### Tissue preparation

A small portion of fresh tissue was washed in ice-cold isotonic saline solution to remove debris and blood. Tissue was homogenized in 10 vol of buffer containing 154 mM KCl, 5 mM diethylenetriaminepentaacetate (DTPA), and 0.1 M phosphate buffer. A sample of the homogenate was taken and 2 vol of 10% trichloroacetic acid was added. Samples were shaken briefly and then centrifuged for 30 min at 3000g at 4°C. The supernatant was passed through a 0.45- $\mu$ m filter. Samples were diluted in the mobile phase and 100  $\mu$ l was injected into the column with a 7125 Injector (BASi). Samples were analyzed in triplicate and reported as nanomole per gram of fresh tissue.

#### Western blot analysis and immunoprecipitation

Organ extracts were prepared in 2 min or less in prechilled solutions. Frozen tissue was homogenized at 30% (w/v) in kinase extraction buffer (100  $\mu$ M sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM DTT, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, leupeptin, aprotinin, and 0.2  $\mu$ M PMSF, pH 7.2). Twenty microliters of each sample was added to a prechilled microcentrifuge tube. The samples were clarified by centrifugation for 5 min at 10,000g. Protein concentrations were determined using the methodology described by Bradford [30] (Bio-Rad, Hercules, CA).

Supernatants from clarified extracts were immunoprecipitated for 2 h at 4°C with the specific antibody for the protein of interest. Antigen-antibody complexes were collected with protein A-Sepharose added to samples at a final concentration of 50% (w/v). The beads were washed twice with kinase extraction buffer. Precipitated proteins then were subjected to SDS-PAGE (5–12% gradient) and then transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). The membranes were blocked overnight at 4°C in Tris-buffered saline containing 5% nonfat milk and then incubated with primary antibodies against the phosphorylated form of each kinase. Antibody against the native form was used to detect the total protein content. The proteins were visualized by chemiluminescence using the ECL system (Amersham Biosciences) and images were captured by the Kodak ID version 3.6 Image Analyzer (Kodak, NY).

#### Transcription factor analysis

Transcription factor activation was analyzed in the cytosolic and nuclear fractions [31,32]. Briefly, a small portion of fresh tissue was homogenized in 5 vol of a hypotonic buffer (10 mM Hepes, pH 7.8, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.1 mM EDTA)

for 10 min on ice. Samples were agitated by vortexing before the addition of 0.1 vol of 10% Nonidet P-40. Nuclei were collected by centrifugation for 0.5 min at 15,000 rpm and then incubated with twice the homogenate volume of extraction buffer (50 mM Hepes, pH 7.8, 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, leupeptin, aprotinin, and 0.2  $\mu$ M PMSF, and 10% glycerol) for 20 min at 4°C. The nuclear extracts were separated by centrifugation for 10 min at 15,000 rpm and then mixed with an equal volume of sample buffer and boiled for 5 min. Fifty micrograms of nuclear protein was used to analyze the translocation of transcription factors from the cytoplasm to the nucleus and for the determination of phosphorylation status by immunoprecipitation as described above.

#### Semiquantitative RT-PCR analysis

The expression of antioxidant genes was quantified by semiquantitative RT-PCR. Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA concentrations were determined by absorbance at 260 nm. RNA integrity was verified by electrophoresis in 1.1% denaturing agarose gels containing 2.2 M formaldehyde. RNA was transcribed into first-strand cDNA using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). The cDNA was amplified using the following primers:  $\gamma$ GCSr, 5' AGG AGC TTC GGG ACT GTA TT 3' (sense), 5' TGG GCT TCA ATG TCA GGG AT 3' (antisense); Tx-1, 5' CGT GGT GGA CTT CTC TGC TAC GTG GTG 3' (sense), 5' GGT CGG CAT GCA TTT GAC TTC ACA GTC 3' (antisense); GAPDH, 5' TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT T 3' (sense), 5' CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC C 3' (antisense) [33–35]; Nrf2, 5' TAC TCC CAG GTT GCC CAC ATT 3' (sense), 5' TAT CCA GGG CAA GCG ACT CA 3' (antisense); xCT, 5' AGC CAG TCG GTG ATA GCA AAG 3' (sense), 5' (antisense) AGG GGG AAA AAC AAA ACA AGA C 3' (antisense).  $\gamma$ GCSr and Nrf2 were amplified by 30 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s. Tx-1, xCT, and GAPDH were amplified by 30 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s. GAPDH mRNA levels were used as loading control. The PCR products were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel and visualized on a UV transilluminator (Bio-Rad). Images were captured by the Kodak ID version 3.6 Image Analyzer (Kodak, NY).

#### Data analysis

Each assay was performed in triplicate unless otherwise indicated. Data are expressed as means $\pm$ SD, and significance was assessed by a one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison test as indicated in each case. A *P* value of <0.05 was considered significant in all cases.

#### Ethics

The experiments reported in this manuscript were carried out following the guidelines stated in *Principles of Laboratory Animal Care* (NIH publication No. 85–23, revised 1985) and the *Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación* (SAGARPA)



entitled *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio* (Clave NOM-062-ZOO-1999, published in August 2001).

## Results

### *Changes in GSH levels in the liver, kidney, and brain are associated with specific MAPK activation*

GSH and GSSG levels were measured in each organ and MAPK phosphorylation was analyzed at various times after ip BSO injection. A significant decrease in GSH content in the liver was observed by the first hour after BSO injection ( $P < 0.01$ ), but the most extensive depletion was detected at the 3-h time point ( $P < 0.001$ ) (Fig. 1). In the kidney, a modest depletion of GSH was observed by the first hour ( $P < 0.01$ ). These changes correlated with p38<sup>MAPK</sup> phosphorylation in both tissues (Figs. 2A and B). In contrast, an unexpected increase in GSH content was observed in the brain at 1 and 2 h post BSO injection ( $P < 0.01$ ; Fig. 1). ERK2 also was activated as indicated by phosphorylation status (Fig. 2C). No significant changes in JNK or ERK1 phosphorylation that correlated with changes in GSH levels were detected (data not shown), and GSSG content did not change in any of the cases (Fig. 1).

### *Activation of MAPK and nuclear translocation of transcription factors NF- $\kappa$ B, ATF-2, and Nrf2 after BSO treatment*

The activation of NF- $\kappa$ B and Nrf2 has been described as a component of protective responses induced under oxidative

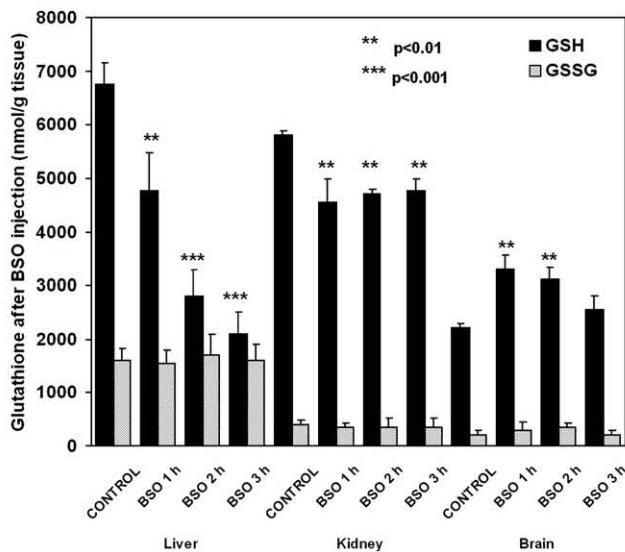


Fig. 1. GSH level after BSO injection in mouse organs. Mice were injected ip with 6 mmol kg<sup>-1</sup> BSO. After 1, 2 or 3 h, liver, kidney, and brain were removed for analysis of GSH and GSSG content. Control mice were injected with saline solution only. The data shown are glutathione content as GSH (filled) and GSSG (dotted) of three different experiments. Data are expressed in nmol/g  $\pm$  SE of fresh tissue and were analyzed by ANOVA. (\*) Significantly different from controls according to Dunnett's post hoc test \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . For this set of experiments,  $n = 12$ .

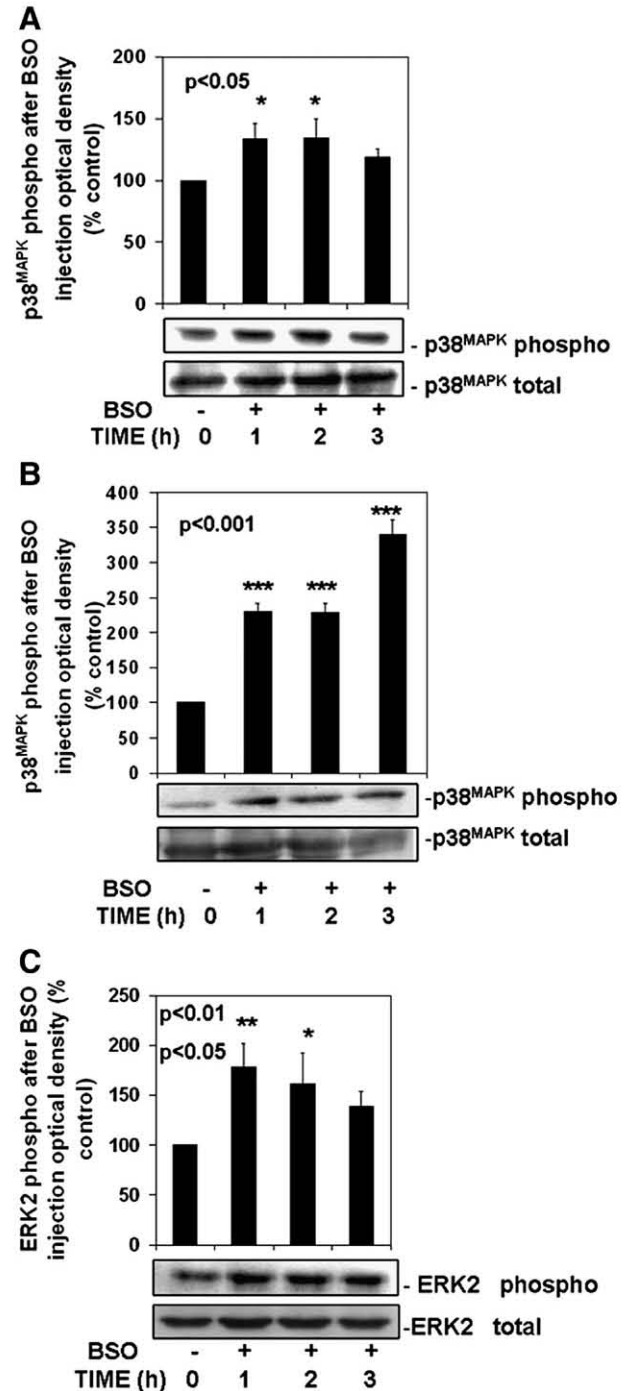


Fig. 2. Organ-specific MAPK activation is dependent on thiol redox status. Upper panels show densitometric values from Western blots of MAPK phosphorylation after BSO at indicated times. p38<sup>MAPK</sup> phosphorylation in (A) liver and (B) kidney. (C) ERK2 phosphorylation in brain. Densitometric evaluation of the blot images was performed using total MAPK as loading control. Bars represent the mean  $\pm$  SE of triplicate experiments. (\*) Significantly different from controls according to Dunnett's post hoc test, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;  $n = 12$ .

stress conditions [7]. NF- $\kappa$ B is a redox-sensitive factor [8] that normally is confined to the cytoplasm in unstimulated cells and translocates to the nucleus in response to various stimuli including oxidative stress [36]. The subunit p65/RelA is re-

quired for NF- $\kappa$ B activation, and the p50–p65/RelA complex displays the strongest transcriptional activation [37]. We investigated the distribution of the p65/RelA subunit in the livers of BSO-treated mice by Western blot. We observed nuclear accumulation of p65/RelA accompanied by its gradual decrease in the cytoplasm 2 h after BSO injection (Fig. 3A). Nuclear translocation occurred concomitantly with a significant decrease in GSH levels and p38<sup>MAPK</sup> phosphorylation. No change in Nrf2 was observed (data not shown). Other transcription factors involved in adaptive responses of the cell are members of the AP-1 family such as ATF-2 and c-Jun [9]. In our analysis, liver tissue exhibited increased phosphorylation of ATF-2 and c-Jun in the nuclear fraction (Fig. 4A).

In the kidney, p38<sup>MAPK</sup> activation also was observed, but the p65/RelA subunit of NF- $\kappa$ B remained in the cytosolic fraction (Fig. 3B). Nrf2 also remained in the cytosolic fraction (data not shown). ATF-2 phosphorylation decreased in the nuclear fraction, while c-Jun phosphorylation increased, reaching the highest levels by 2 h following BSO injection (Fig. 4B).

In contrast to what was observed in the liver and kidney, NF- $\kappa$ B remained in the cytosolic fraction of the brain extracts (data not shown) while Nrf2 accumulation was observed in the nuclear fraction. Nuclear accumulation of Nrf2 was observed by 1 h after BSO treatment and the highest accumulation occurred by 2 h, concomitant with the significant ERK2 phosphorylation (Fig. 3C).

#### Transcription of antioxidant genes in response to BSO treatment

Semiquantitative RT-PCR on tissue extracts showed an increase in *Tx-1* mRNA levels in the liver (Fig. 5A) and kidney (Fig. 5B), suggesting that this response is modulated by p38<sup>MAPK</sup> in these tissues. In the brain, we observed an increase in transcription of *Nrf2* from the first hour which became statistically significant at 2 h, in agreement with the observed Nrf2 nuclear protein levels ( $P < 0.05$ ). Also in the first hour after BSO treatment, there was increased transcription of *xCT* ( $P < 0.01$ ; Fig. 6), which codes for a subunit of the cystine/glutamate exchange transporter mediated by the  $x_c^-$  system and is required for GSH synthesis in neurons. These results suggest that *xCT* expression may be mediated by *Nrf2*, which started to accumulate in brain cell nuclei by 1 h after BSO treatment (Fig. 3C). We also observed increased transcription of  *$\gamma$ GCSr*, a subunit of the enzyme involved in de novo synthesis of GSH. Finally, significant changes in *Tx-1* mRNA levels also were observed in the brain, similar to the changes seen in the liver (Fig. 6).

#### Inhibition of MAPK by SB203580 and U0126 abrogated organ-specific responses

To elucidate the importance of MAPK activation in the specific organs, we analyzed whether selective MAPK inhibitors could inhibit the response observed during BSO challenge. In vivo studies have demonstrated that ip administration of SB203580 and U0126 inhibitors at 5 mg kg<sup>-1</sup> 2 h prior to a

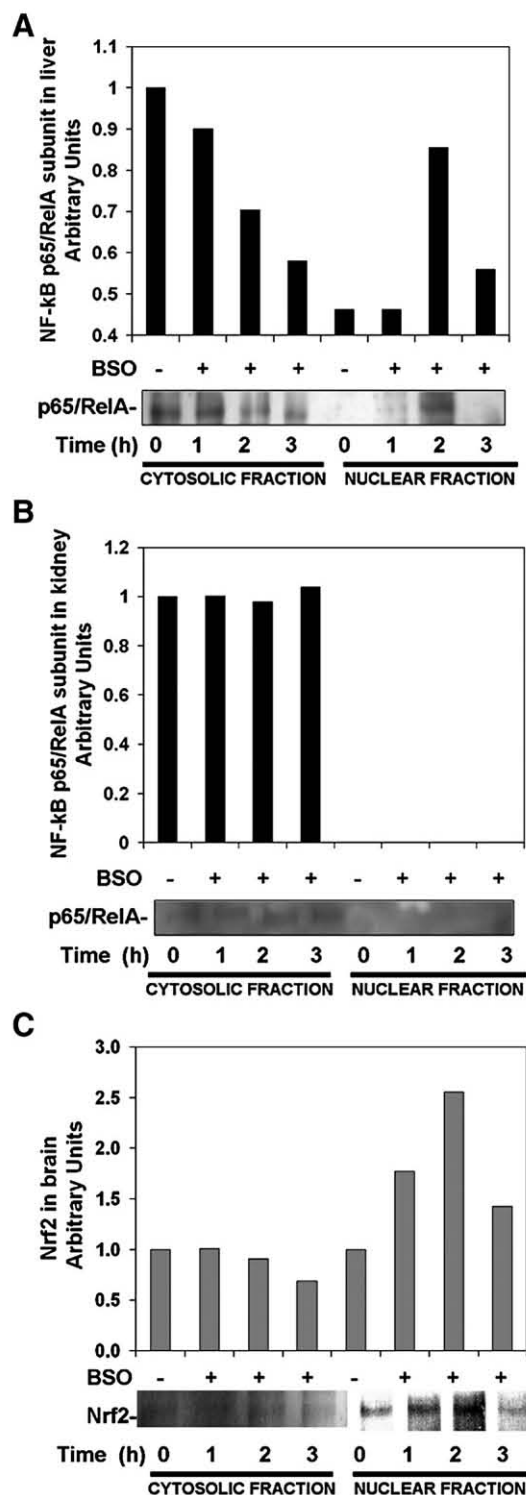


Fig. 3. BSO effects on NF- $\kappa$ B and Nrf2 nuclear translocation in mouse organs. Tissues from mice treated with 6 mmol kg<sup>-1</sup> BSO were homogenized, and cytosolic and nuclear extracts were obtained as described under Materials and methods. Cellular localization of the p65/RelA subunit of NF- $\kappa$ B and Nrf2. Upper panels show densitometric values from Western blot analysis. A representative blot is shown in the lower panels. (A) liver, (B) kidney, and (C) brain;  $n = 12$ .



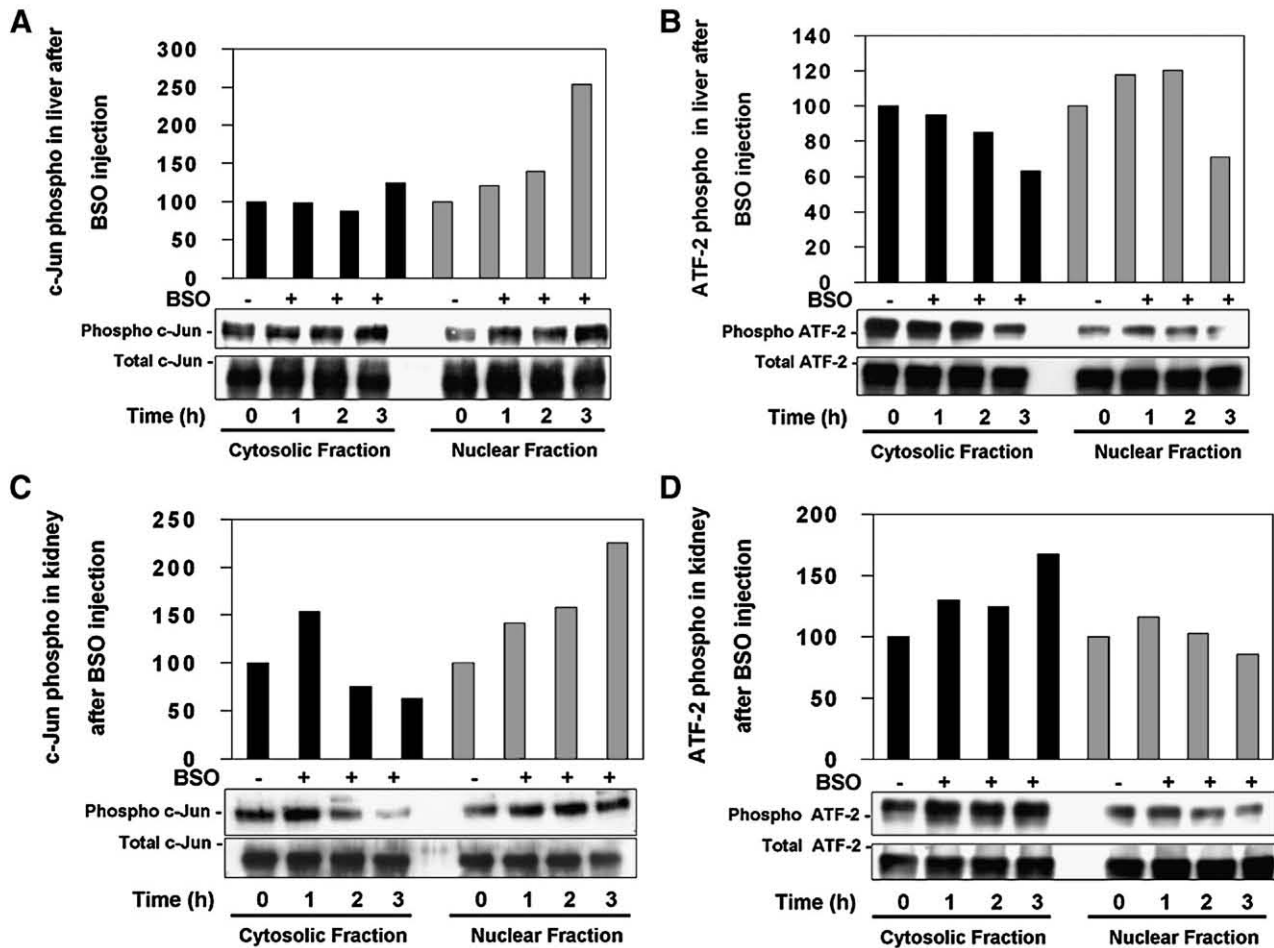


Fig. 4. Effect of BSO on nuclear phosphorylation of ATF-2 and c-Jun in liver and kidney. Tissues from mice treated with 6 mmol kg<sup>-1</sup> BSO were homogenized and nuclear extracts were obtained as described under Materials and methods. Nuclear extracts of liver and kidney were subjected to immunoprecipitation and Western blotting for phosphorylation status of ATF-2 and c-Jun protein. Upper panels show densitometric values from Western blot analysis. A representative blot is shown in the lower panels. (A) c-Jun and (B) ATF-2 phosphorylation in liver; (C) c-Jun and (D) ATF-2 phosphorylation in kidney;  $n = 12$ .

chemical challenge inhibited MEK1 and p38<sup>MAPK</sup> pathways in mice [28,38]. Using this strategy in our model, we injected U0126 (selective inhibitor of MEK1 for ERK2 pathway in brain) and SB203580 (selective inhibitor for p38<sup>MAPK</sup> in liver and kidney) 2 h prior to BSO administration. As shown in Fig. 7, SB203580 inhibited p38<sup>MAPK</sup> activation (Fig. 7B) but did not affect GSH depletion in liver and kidney (Fig. 7A). Inhibition of p38<sup>MAPK</sup> activation also was reflected in the mRNA levels of *Tx-1* in liver and kidney, which did not differ significantly from animals not treated with BSO (Figs. 7C and D). In contrast, the MEK inhibitor U0126 had a profound effect on the GSH status in the brain. The significant increase in GSH observed previously did not occur in the presence of the inhibitors and the content remained similar to controls (Fig. 7A). The levels of phosphorylated ERK2 also were similar to control values (Fig. 7B) and the induction of *xCT*, *Nrf2*, and *Tx-1* mRNA was diminished (Fig. 7E). However, at the time point analyzed, we observed a marked increase in expression of  $\gamma$ GCSr mRNA, indicating that  $\gamma$ GCSr transcriptional regulation is related to a kinase distinct from ERK2 (Fig. 7E).

#### The organ-specific responses and MAPK pathways observed after BSO treatment depends on the thiol redox status

To confirm that changes in the reduced thiol content regulated by GSH effectively modulate MAPK phosphorylation, we used an exogenous source of thiols to abrogate the effect of BSO on activation of the pathway. NAC is an antioxidant and GSH precursor commonly used as an exogenous source of thiols and also has been used as a GSH agonist in many oxidant treatments [39–41]. NAC administration suppressed p38<sup>MAPK</sup> activation in the liver and kidney (Figs. 8A and B, respectively). However, under these conditions, NAC not only prevented the inhibition of GSH synthesis in the liver and kidney ( $P < 0.001$ ), but also in control mice GSH levels were diminished (Table 1). The kidney is the organ where NAC/BSO treatment induces a severe depletion in GSH levels. In brain, the increase in GSH content was no longer observed and we detected a slight decrease that was not significantly different from controls (Table 1). NAC pretreatment suppressed ERK2 activation similar to observations in the experiments with MAPK inhibitors (Fig. 8C). Together, these findings suggest that systemic changes in redox

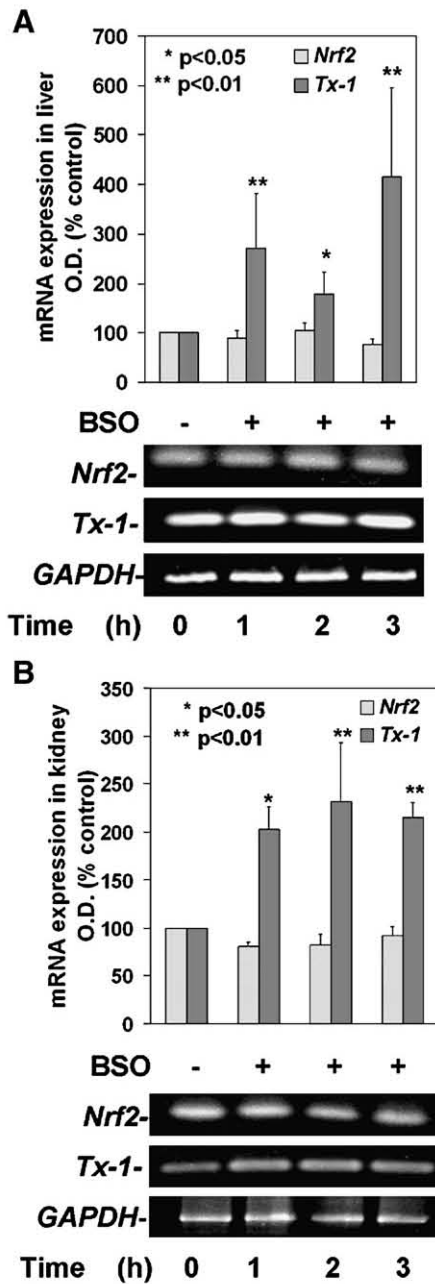


Fig. 5. Effect of BSO on the expression of antioxidant enzymes in liver and kidney. Liver and kidneys from mice treated with 6 mmol kg<sup>-1</sup> BSO were homogenized. Total RNA was extracted as indicated under Materials and methods. Upper panels show densitometric values of mRNA levels of *Nrf2* and *Tx-1* in liver and the lower panel shows a representative agarose gel of the enzymes analyzed: (A) liver and (B) kidney. *GAPDH* was used as a loading control. Bars represent mean±SE of triplicate experiments and were calculated from densitometry data. Data were analyzed using ANOVA and Dunnett's multiple comparison test; *n*=12.

status maintained by GSH are reflected in activation of organ-specific responses through MAPK pathways.

### Discussion

GSH content is not static, but rather reflects a dynamic system that responds to alterations in the cellular environment.

MAPK are downstream effectors in adaptive responses and some of the mechanisms of MAPK signal modulation by GSH have been described in vitro. To move away from isolated cell systems, we used an in vivo model to investigate how the changes in GSH status modulate tissue responses. Previous studies have demonstrated that ip injection of BSO is a valid strategy to deplete GSH levels in several organs in vivo [42]. The effects of BSO in liver and kidney were similar to previous reports where GSH levels decreased under similar conditions [42]. In adult mice, BSO is readily absorbed in liver and kidney, but poorly taken up by the brain due to the blood brain barrier [43]. Nevertheless, we observed an unexpected but significant increase in GSH in the brain that lasted 2 h after BSO injection. By 3 h, the GSH content had returned to the control value.

Other strategies were used to ensure GSH depletion, i.e., several ip injections per day, long-term administration of high BSO concentration in the drinking water, and the administration of BSO dissolved in DMSO or the use of BSO ester and the administration of BSO in neonate mice, to ensure the depletion of GSH in the brain [43–47]. Our results do not confirm these previous observations probably due to differences in the mouse strain or to the experimental conditions. It is known that MAPK activity is transient and functions to transduce a signal in the cell

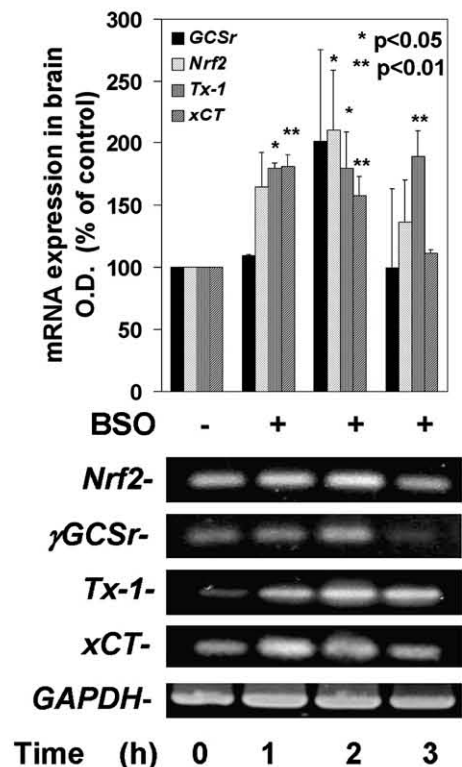


Fig. 6. Coordinated upregulation of antioxidant enzymes in brain. Brain was removed from mice treated with 6 mmol kg<sup>-1</sup> BSO and were homogenized. Total RNA was extracted as indicated under Materials and methods. Semiquantitative RT-PCR was performed for analysis of levels of  $\gamma$ GCSr; *Nrf2*, *Tx-1*, and *xCT* mRNA using *GAPDH* mRNA as expression control. Upper panel shows densitometric values of mRNA levels. A representative agarose gel of the enzymes analyzed is shown. Bars represent mean±SE of triplicate experiments. Data were analyzed using ANOVA and Dunnett's multiple comparison test, \**P*<0.05, \*\**P*<0.01; *n*=12.

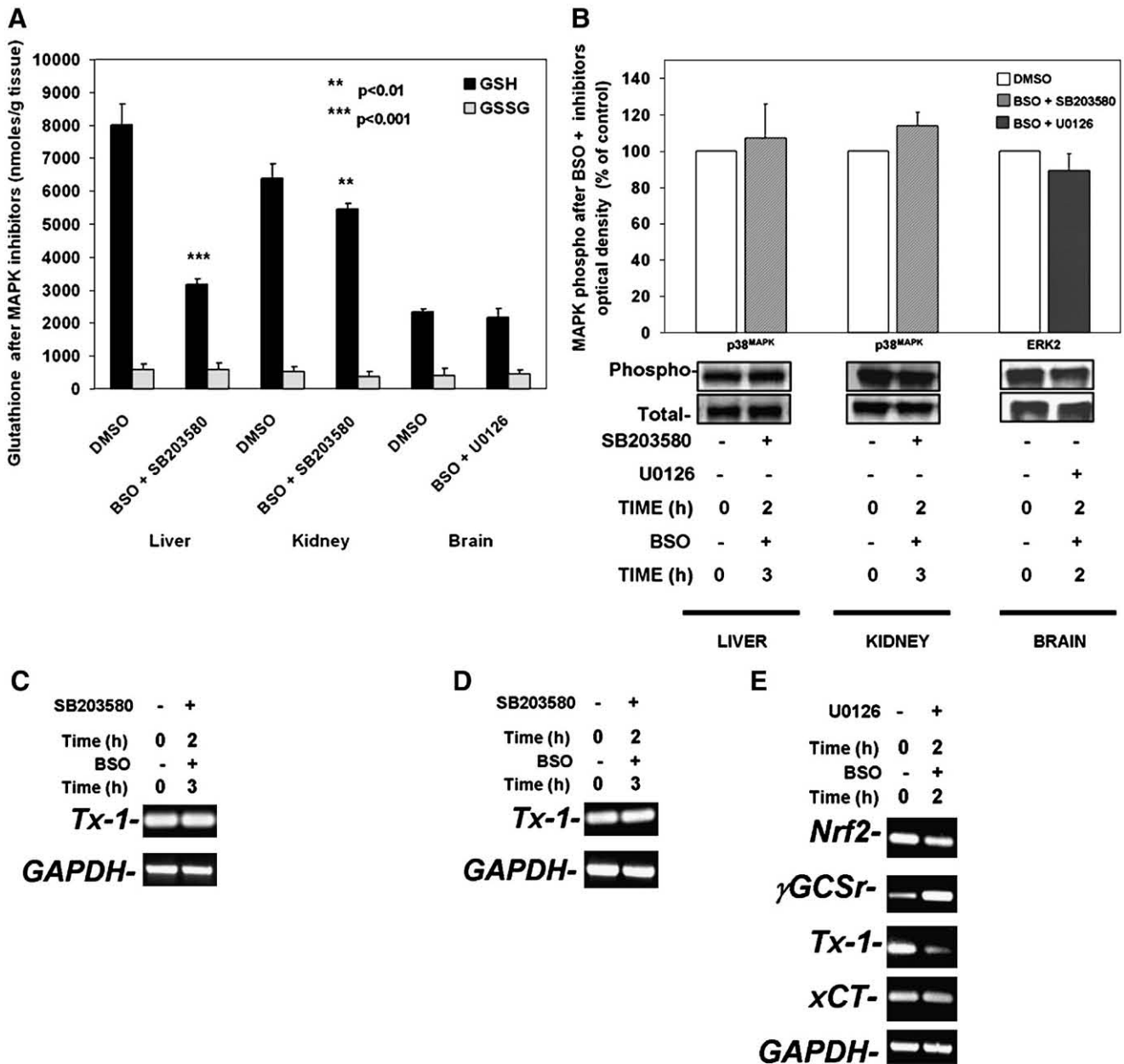


Fig. 7. Effect of MAPK inhibitors SB203580 and U0126 and BSO on glutathione content, p38<sup>MAPK</sup> and ERK2 pathways, and downstream targets. The amount of 5 mg kg<sup>-1</sup> inhibitor was injected into mice ip 2 h before BSO treatment. After BSO administration, tissues were removed and analyzed for (A) GSH content, (B) MAPK phosphorylation. Bars represent mean  $\pm$  SE of triplicate experiments. Data were analyzed using ANOVA and Dunnett's multiple comparison test, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 8$ . (C, D, and E) Effect of MAPK inhibitors on the transcription of genes analyzed in liver, kidney, and brain, respectively. Representative gels are shown.

in response to a stress condition or a stimulus that diminishes over time; therefore, we designed an experimental model to investigate these transient changes.

Our work provides evidence that systemic GSH alteration results in the activation of p38<sup>MAPK</sup> in the liver and kidney and ERK2 activation in the brain. To confirm the role of MAPK pathways in the regulation of responses observed in each organ, we used SB203580 and U0126 inhibitors to block p38<sup>MAPK</sup> and MEK1 (ERK2) pathways, respectively [48]. Pretreatment with these kinase inhibitors 2 h prior to BSO challenge abrogated the expression of the antioxidant genes induced by BSO. These data confirm that some of the organ-specific responses elicited by

BSO are initiated through p38<sup>MAPK</sup> in liver and kidney and by ERK2 in the brain. Moreover, administration of NAC as an exogenous source of thiols and a GSH precursor prevented the activation of MAPK, suggesting that MAPK activation was dependent on a redox signal likely initiated by the decrease in GSH. These findings are in agreement with previous reports wherein GSH or NAC inhibits MAPK activation induced by glutathione depletion [49,50] and by ischemia/reperfusion [51]. NAC pretreatment, however, did not restore GSH levels in liver and kidney. In a recent study in rats, it was suggested that although NAC was not able to restore liver GSH levels, the antioxidant treatment may have restrained GSH oxidation and

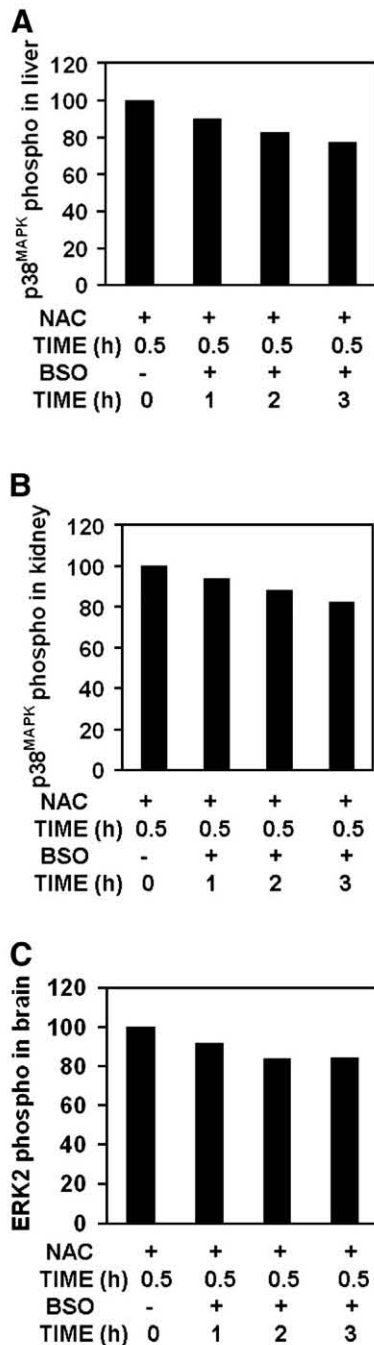


Fig. 8. Effect of NAC and BSO on GSH content and MAPK pathways. The amount of 5 mmol kg<sup>-1</sup> was injected into mice ip 30 min before BSO treatment. After BSO administration, tissues were removed and analyzed for MAPK phosphorylation. (A) p38<sup>MAPK</sup> in liver, (B) p38<sup>MAPK</sup> in kidney, and (C) ERK2 in brain. Bars represent mean±SE of triplicate experiments, *n*=12.

the consequent upregulation of oxidative stress markers [52]. Tissues likely exploit NAC as an antioxidant itself rather than as a GSH precursor [52] and we speculate that NAC utilization as a direct antioxidant also occurred under the conditions of our experiments.

There is ample evidence to indicate that depletion of intracellular GSH in cultured cells using BSO [53,54] and/or by exposure to a xenobiotic [49,55] activates signal transduc-

tion pathways through several mechanisms which include: (i) MAPK modulation by GSSG [6,56,57], (ii) oxidation of negative regulators of the MAPK kinase kinase ASK-1, such as glutaredoxin and Tx-1 [58,59], and (iii) reversible ROS oxidation of cysteines in ERK-directed phosphatases [60,61]. More recently, in vitro evidence showed a second mechanism whereby MAPK can be regulated directly by GSH interaction or glutathionylation in that MEKK1 is inhibited in vitro by this mechanism in menadione-treated cells [62].

GSH depletion by BSO in the kidney and in the liver seems to reflect the balance among accumulation, utilization, and exportation in these two organs. GSH depletion activated p38<sup>MAPK</sup> in the kidney and liver. These results are in agreement with in vitro findings where BSO induced p38<sup>MAPK</sup> activation in HepG2 E47 cells and in rat hepatocytes [54] and oxalate-induced oxidative stress activated the p38<sup>MAPK</sup> and JNK pathways in proximal renal tubule cells [63]. In the liver, p38<sup>MAPK</sup> activation correlated with the nuclear translocation of NF-κB and phosphorylation of c-Jun and ATF-2, which indicates that this organ activates several mechanisms to respond to the loss in thiol content. Phosphorylation of these transcription factors correlated with the transcriptional activation of *Tx-1*. Also, the highest nuclear accumulation of NF-κB and the phosphorylation of ATF-2 and c-Jun occurred when the levels of GSH in the liver were at their lowest. In contrast, the kidneys are organs with low amounts of GSH as compared with the liver. Here the depletion of GSH activated p38<sup>MAPK</sup>, which induced transcription of *Tx-1* by the first hour (Fig. 5B). This response was impaired by the MAPK inhibitor SB203580. Upregulation of *Tx-1* most likely involved MSK1, a p38<sup>MAPK</sup> target and modulator of AP-1 [9], since we observed the presence of phosphorylated c-Jun in the nuclear fraction of kidney extracts.

Tx-1 plays an important role in binding of the NF-κB p50 subunit to DNA during the antioxidant response to oxidative stress. Tx-1 maintains the Cys62 of the NF-κB p50 subunit in the reduced condition required for DNA binding [64]. In addition, the promoter region of *Tx-1* contains many potential regulatory binding motifs compatible with inducible expression through NF-κB [15,65] and with antioxidant response elements [66]. Nuclear localization of NF-κB at 2 h, together with ATF-2 and c-Jun nuclear phosphorylation, increase in transcription of *Tx-1* mRNA, and its down regulation by SB203580 strongly suggest that these components are part of the response to the GSH depletion in liver.

Table 1

GSH levels in mice organs after pretreatment with NAC 5 mmol kg<sup>-1</sup> and BSO 6 mmol kg<sup>-1</sup>

Treatment	Liver GSH	Kidney GSH	Brain GSH
Control NAC	3453±199	1025±122	2030±214
1 h BSO+NAC	2302±200**	1004±118	1696±133
2 h BSO+NAC	2679±172*	1004±55	1842±98
3 h BSO+NAC	2448±172**	899±53	1612±64

Values are means±SD (nmol g<sup>-1</sup> fresh tissue). GSH, reduced glutathione; \* *P*<0.05, \*\* *P*<0.01; GSSG levels were not detected under these conditions.



AP-1 and Tx-1 participate as part of an adaptive response to oxidative stress [67,68]. In the liver, kidney, and brain, we did not observe upregulation of other antioxidant enzymes associated with the GSH system aside of that reported here. However, we showed evidence that Tx-1, an equally important system in maintaining redox homeostasis, was activated likely as a compensatory or protective mechanism. In agreement with these observations recent work showed evidence of similar expression profiles in distinct organs under the same stressors. Triazole fungicide induces similar profiles of expression of some xenobiotic metabolizing enzymes (XME) and transporters in liver and testis in rats, suggesting possible common mechanisms of action [69]. Many genes also could be regulated by similar stimulus in different tissues, as in our experiments where the p38<sup>MAPK</sup> pathway appears to be regulating *Tx-1* expression in liver and kidney. This idea also is supported by the fact that Tx-1 and GSH systems have similar functions as antioxidants and both are capable of modulating cellular responses to oxidative stress at different levels. We only analyzed antioxidant genes, but the activation of several transcription factors indicates that more mechanisms and genes are involved in promoting survival or preserving homeostasis.

In the central nervous system, ERK1 and ERK2 are abundant [70]. ERK1 and 2 play important roles in the adaptive and survival response of neurons during stress by trophic factor deprivation, exposure to glutamate [71], brain ischemia, and epilepsy [72]. In vitro evidence has suggested that in other cell systems different from neurons, the ERK2 pathway is associated with Nrf2 for the regulation of antioxidant enzyme expression under treatment with phase II inducers [12,13]. ERK2 and p38<sup>MAPK</sup> also positively regulate Nrf2 activity [11] to initiate the transcription of antioxidant genes. Moreover, microarray data showed that Nrf2<sup>+/+</sup> mice neuronal cultures had higher expression levels of antioxidant proteins than Nrf2<sup>-/-</sup> neuronal cultures [73]. Our findings indicate that nuclear translocation of Nrf2 in brain extracts is associated with upregulation of mRNA transporters and enzymes that participate in the synthesis of GSH, similar to the Nrf2 regulation of GSH biosynthesis observed in cultured astrocytes [14,74].

As noted above, BSO is poorly transported to the brain due to the blood brain barrier. Thus we did not expect large changes in GSH brain levels after 3 h. Nevertheless, our model allowed us to observe that BSO induced a response in the brain through the activation of ERK2, Nrf2 nuclear translocation, and increased transcription of *Nrf2*, *xCT*, *γGCSr*, and *Tx-1*. An important observation is that U0126 blocked upregulation of *Nrf2*, *xCT*, and *Tx-1* but not *γGCSr*. These data suggest that another mechanism is involved in the GSH increase and *γGCSr* expression. A few studies have indicated that different mechanisms are involved in transcriptional regulation of catalytic and regulatory subunits of *γGCS*. Although the mechanisms are not completely understood, they probably include mRNA stabilization or the activation of distinct kinase pathways under oxidative stress [75–77]. Nuclear translocation and increased *Nrf2* mRNA levels have been observed as part of antioxidant enzyme regulation [78,79]. These results are very similar to the results of recent studies that demonstrated a

correlation between *γGCSr* mRNA expression and glutathione levels in the brain [80] and on cultured astrocytes where the GSH biosynthesis was regulated through a mechanism involving *Nrf2*, *xCT*, and *γGCS* subunit expression [14,74]. The  $x_c^-$  system is important for maintaining both the intracellular GSH levels and the redox balance between cystine and cysteine in the extracellular milieu [19]. The observed increase in *xCT* mRNA levels under BSO after the first hour of treatment, which was abrogated by U0126, suggests that the induction of the *xCT* subunit of  $x_c^-$  is related to the cystine incorporation used during GSH synthesis. Aging in the mouse is associated with lower Nrf2 transcriptional activity [81] and loss of GSH and cystine in different regions of the brain [82].

We hypothesize that under our conditions, GSH depletion in the liver and kidney is perceived in the brain as “systemic oxidative stress” initiating what can be considered “protective” induction of GSH synthesis through activation of ERK2-Nrf2 pathways. In this study we did not examine changes in protein thiols, which might participate in adaptive responses, so we cannot rule out the possibility that they participate in organ-specific responses. GSH might modulate signal transduction pathways through the direct interaction with key cysteines located in the active site or regulatory regions of proteins like kinases, phosphatases, and transcription factors [3–5]. Taken together, these data could help in understanding the response observed in the case of liver and kidney. In the brain, our findings suggest a model of interorgan cooperation similar to the glutathione depletion model in rested and exercised mice. In this model where GSH was depleted, GSH uptake in some organs such as skeletal muscle was decreased to ensure uptake by more vital organs such as brain, heart, and lung [23]. Further studies should take into consideration the redox state in plasma, the GSH interorgan regulation, and interorgan amino acid metabolism, transport, and regulation [83].

Finally, our model has shown that under GSH depletion, organs display different MAPK pathways to respond to oxidative stress, while the brain seems to be especially protected. These findings might have implications in degenerative pathologies associated with increased ROS production or defective antioxidant responses [84,85]. Study of how the changes in GSH levels modulate mechanisms that impair oxidative damage in different organs or tissues is a field of great interest because of the potential for applications as clinical therapy to prevent degenerative diseases and premature aging.

## Acknowledgments

We thank M.Sc. Julio Prieto Sagredo for valuable aid with HPLC determinations. J.H.L.P. received a scholar fellowship from CONACYT No. 173890 and DGEP UNAM. This work was partially supported by CONACYT 46193.

## References

- [1] Filomeni, G.; Rotilio, G.; Ciriolo, M. R. Cell signaling and the glutathione redox system. *Biochem. Pharmacol.* **64**:1057–1064; 2002.
- [2] Borst, P.; Evers, R.; Kool, M.; Wijnholds, J. A family of drug transporters:

- the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**: 1295–1302; 2000.
- [3] Reynaert, N. L.; van der Vliet, A.; Guala, A. S.; McGovern, T.; Hristova, M.; Pantano, C.; Heintz, N. H.; Heim, J.; Ho, Y. S.; Matthews, D. E.; Wouters, E. F.; Janssen-Heininger, Y. M. Dynamic redox control of NF-kappaB through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory kappaB kinase beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:13086–13091; 2006.
- [4] Beer, S. M.; Taylor, E. R.; Brown, S. E.; Dahm, C. C.; Costa, N. J.; Runswick, M. J.; Murphy, M. P. Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins: implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant defense. *J. Biol. Chem.* **279**:47939–47951; 2004.
- [5] Rao, R. K.; Clayton, L. W. Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**:610–616; 2002.
- [6] Filomeni, G.; Rotilio, G.; Ciriolo, M. R. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J.* **17**:64–66; 2003.
- [7] Kong, A. N.; Owuor, E.; Yu, R.; Hebbbar, V.; Chen, C.; Hu, R.; Mandlekar, S. Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab. Rev.* **33**:255–271; 2001.
- [8] Hirota, K.; Murata, M.; Sachi, Y.; Nakamura, H.; Takeuchi, J.; Mori, K.; Yodoi, J. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* **274**:27891–27897; 1999.
- [9] Aggeli, I. K.; Gaitanaki, C.; Beis, I. Involvement of JNKs and p38-MAPK/MSK1 pathways in H(2)O(2)-induced upregulation of heme oxygenase-1 mRNA in H9c2 cells. *Cell Signal.* **18**:1801–1812; 2006.
- [10] Miao, W.; Hu, L.; Scrivens, P. J.; Batist, G. Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* **280**:20340–20348; 2005.
- [11] Zipper, L. M.; Mulcahy, R. T. Inhibition of ERK and p38 MAP kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**:484–492; 2000.
- [12] Wild, A. C.; Moinova, H. R.; Mulcahy, R. T. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J. Biol. Chem.* **274**:33627–33636; 1999.
- [13] Yu, R.; Lei, W.; Mandlekar, S.; Weber, M. J.; Der, C. J.; Wu, J.; Kong, A. T. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J. Biol. Chem.* **274**:27545–27552; 1999.
- [14] Shih, A. Y.; Johnson, D. A.; Wong, G.; Kraft, A. D.; Jiang, L.; Erb, H.; Johnson, J. A.; Murphy, T. H. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J. Neurosci.* **23**:3394–3406; 2003.
- [15] Powis, G.; Montfort, W. R. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**:261–295; 2001.
- [16] Saitoh, M.; Nishitoh, H.; Fujii, M.; Takeda, K.; Tobiume, K.; Sawada, Y.; Kawabata, M.; Miyazono, K.; Ichijo, H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* **17**: 2596–2606; 1998.
- [17] Kim, Y. C.; Yamaguchi, Y.; Kondo, N.; Masutani, H.; Yodoi, J. Thioredoxin-dependent redox regulation of the antioxidant responsive element (ARE) in electrophile response. *Oncogene* **22**:1860–1865; 2003.
- [18] Anderson, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* **111–112**:1–14; 1998.
- [19] Paolicchi, A.; Dominici, S.; Pieri, L.; Maellaro, E.; Pompella, A. Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **64**:1027–1035; 2002.
- [20] Sato, H.; Tamba, M.; Okuno, S.; Sato, K.; Keino-Masu, K.; Masu, M.; Bannai, S. Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)-, in the mouse brain. *J. Neurosci.* **22**:8028–8033; 2002.
- [21] Griffith, O. W. Depletion of glutathione by inhibition of biosynthesis. *Methods Enzymol.* **77**:59–63; 1981.
- [22] Griffith, O. W. Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J. Biol. Chem.* **257**:13704–13712; 1982.
- [23] Leeuwenburgh, C.; Ji, L. L. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**:941–949; 1995.
- [24] Bharath, S.; Hsu, M.; Kaur, D.; Rajagopalan, S.; Andersen, J. K. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* **64**:1037–1048; 2002.
- [25] Dringen, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* **62**:649–671; 2000.
- [26] Rodriguez, V. M.; Del Razo, L. M.; Limón-Pacheco, J. H.; Giordano, M.; Sanchez-Peña, L. C.; Uribe-Querol, E.; Gutierrez-Ospina, G.; Gonshebb, M. E. Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicol. Sci.* **84**:157–166; 2005.
- [27] Bains, J. S.; Shaw, C. A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **25**:335–358; 1997.
- [28] Chialda, L.; Zhang, M.; Brune, K.; Pahl, A. Inhibitors of mitogen-activated protein kinases differentially regulate costimulated T cell cytokine production and mouse airway eosinophilia. *Respir. Res.* **6**:36; 2005.
- [29] Harvey, P. R.; Ilson, R. G.; Strasberg, S. M. The simultaneous determination of oxidized and reduced glutathiones in liver tissue by ion pairing reverse phase high performance liquid chromatography with a coulometric electrochemical detector. *Clin. Chim. Acta* **180**:203–212; 1989.
- [30] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254; 1976.
- [31] Ishii, T.; Itoh, K.; Yamamoto, M. Roles of Nrf2 in activation of antioxidant enzyme genes via antioxidant responsive elements. *Methods Enzymol.* **348**:182–190; 2002.
- [32] Hickenbottom, S. L.; Grotta, J. C.; Strong, R.; Denner, L. A.; Aronowski, J. Nuclear factor-kappaB and cell death after experimental intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* **30**:2472–2477; 1999.
- [33] Kwak, M. K.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Sutter, T. R.; Kensler, T. W. Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidant enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethiole-3-thione. *Mol. Med.* **7**:135–145; 2001.
- [34] Niida, S.; Kawahara, M.; Ishizuka, Y.; Ikeda, Y.; Kondo, T.; Hibi, T.; Suzuki, Y.; Ikeda, K.; Taniguchi, N. Gamma-glutamyltranspeptidase stimulates receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing factor. *J. Biol. Chem.* **279**:5752–5756; 2004.
- [35] Jurado, J.; Prieto-Alamo, M. J.; Madrid-Risquez, J.; Pueyo, C. Absolute gene expression patterns of thioredoxin and glutaredoxin redox systems in mouse. *J. Biol. Chem.* **278**:45546–45554; 2003.
- [36] Kabe, Y.; Ando, K.; Hirao, S.; Yoshida, M.; Handa, H. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid. Redox Signal* **7**:395–403; 2005.
- [37] Reuther-Madrid, J. Y.; Kashatus, D.; Chen, S.; Li, X.; Westwick, J.; Davis, R. J.; Earp, H. S.; Wang, C. Y.; Baldwin Jr., A. S. The p65/RelA subunit of NF-kappaB suppresses the sustained, antiapoptotic activity of Jun kinase induced by tumor necrosis factor. *Mol. Cell. Biol.* **22**:8175–8183; 2002.
- [38] Ward, K. W.; Prokscht, J. W.; Azzarano, L. M.; Mumawa, J. A.; Roethke, T. J.; Stelman, G. J.; Walsh, M. J.; Zeigler, K. S.; McSurdy-Freed, J. E.; Kehlert, J. R.; Chokshi, J.; Levy, M. A.; Smith, B. R. Preclinical pharmacokinetics of SB-203580, a potent inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase. *Xenobiotica* **31**:783–797; 2001.
- [39] Kelly, G. S. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern. Med. Rev.* **3**:114–127; 1998.
- [40] McLellan, L. I.; Lewis, A. D.; Hall, D. J.; Ansell, J. D.; Wolf, C. R. Uptake and distribution of N-acetylcysteine in mice: tissue-specific effects on glutathione concentrations. *Carcinogenesis* **16**:2099–2106; 1995.
- [41] Moldeus, P.; Cotgreave, I. A. N-Acetylcysteine. *Methods Enzymol.* **234**:482–492; 1994.
- [42] Griffith, O. W.; Meister, A. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5606–5610; 1979.
- [43] Steinherz, R.; Martensson, J.; Wellner, D.; Meister, A. Transport into brain of buthionine sulfoximine, an inhibitor of glutathione synthesis, is faci-

- lited by esterification and administration of dimethylsulfoxide. *Brain Res.* **518**:115–119; 1990.
- [44] Watanabe, T.; Sagisaka, H.; Arakawa, S.; Shibaya, Y.; Watanabe, M.; Igarashi, I.; Tanaka, K.; Totsuka, S.; Takasaki, W.; Manabe, S. A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *J. Toxicol. Sci.* **28**:455–469; 2003.
- [45] Slivka, A.; Spina, M. B.; Calvin, H. I.; Cohen, G. Depletion of brain glutathione in preweanling mice by L-buthionine sulfoximine. *J. Neurochem.* **50**:1391–1393; 1988.
- [46] Martensson, J.; Jain, A.; Stole, E.; Frayer, W.; Auld, P. A.; Meister, A. Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat: a model for endogenously produced oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:9360–9364; 1991.
- [47] Andersen, J. K.; Mo, J. Q.; Hom, D. G.; Lee, F. Y.; Harnish, P.; Hamill, R. W.; McNeill, T. H. Effect of buthionine sulfoximine, a synthesis inhibitor of the antioxidant glutathione, on the murine nigrostriatal neurons. *J. Neurochem.* **67**:2164–2171; 1996.
- [48] Davies, S. P.; Reddy, H.; Caivano, M.; Cohen, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **351**:95–105; 2000.
- [49] Wilhelm, D.; Bender, K.; Knebel, A.; Angel, P. The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Mol. Cell. Biol.* **17**:4792–4800; 1997.
- [50] Haddad, J. J. The involvement of L-gamma-glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione/GSH) in the mechanism of redox signaling mediating MAPK (p38)-dependent regulation of pro-inflammatory cytokine production. *Biochem. Pharmacol.* **63**:305–320; 2002.
- [51] Mehta, A.; Sekhon, C. P.; Giri, S.; Orak, J. K.; Singh, A. K. Attenuation of ischemia/reperfusion induced MAP kinases by N-acetyl cysteine, sodium nitroprusside and phosphoramidon. *Mol. Cell. Biochem.* **240**:19–29; 2002.
- [52] Patriarca, S.; Furfaro, A. L.; Domenicotti, C.; Odette, P.; Cottalasso, D.; Marinari, U. M.; Pronzato, M. A.; Traversa, N. Supplementation with N-acetylcysteine and taurine failed to restore glutathione content in liver of streptozotocin-induced diabetics rats but protected from oxidative stress. *Biochem. Biophys. Acta* **1741**:48–54; 2005.
- [53] de Bernardo, S.; Canals, S.; Casarejos, M. J.; Solano, R. M.; Menendez, J.; Mena, M. A. Role of extracellular signal-regulated protein kinase in neuronal cell death induced by glutathione depletion in neuron/glia mesencephalic cultures. *J. Neurochem.* **91**:667–682; 2004.
- [54] Wu, D.; Cederbaum, A. Glutathione depletion in CYP2E1-expressing liver cells induces toxicity due to the activation of p38 mitogen-activated protein kinase and reduction of nuclear factor-kappaB DNA binding activity. *Mol. Pharmacol.* **66**:749–760; 2004.
- [55] Kim, S. G.; Lee, C. H.; Park, J. W. Deprenyl, a therapeutic agent for Parkinson's disease, inhibits arsenic toxicity potentiated by GSH depletion via inhibition of JNK activation. *J. Toxicol. Environ. Health A* **67**:2013–2024; 2004.
- [56] Rao, R. K.; Li, L.; Baker, R. D.; Baker, S. S.; Gupta, A. Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**:G332–G340; 2000.
- [57] Filomeni, G.; Aquilano, K.; Civitareale, P.; Rotilio, G.; Ciriolo, M. R. Activation of c-Jun-N-terminal kinase is required for apoptosis triggered by glutathione disulfide in neuroblastoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* **39**:345–354; 2005.
- [58] Song, J. J.; Lee, Y. J. Differential role of glutaredoxin and thioredoxin in metabolic oxidative stress-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Biochem. J.* **373**:845–853; 2003.
- [59] Liu, H.; Nishitoh, H.; Ichijo, H.; Kyriakis, J. M. Free in PMC Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol. Cell. Biol.* **20**:2198–2208; 2000.
- [60] Levinthal, D. J.; Defranco, D. B. Reversible oxidation of ERK-directed protein phosphatases drives oxidative toxicity in neurons. *J. Biol. Chem.* **28**:5875–5883; 2005.
- [61] Kamata, H.; Honda, S.; Maeda, S.; Chang, L.; Hirata, H.; Karin, M. Reactive oxygen species promote TNF alpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**:649–661; 2005.
- [62] Cross, J. V.; Templeton, D. J. Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain. *Biochem. J.* **381**:675–683; 2004.
- [63] Han, H. J.; Lim, M. J.; Lee, Y. J. Oxalate inhibits renal proximal tubule cell proliferation via oxidative stress, p38 MAPK/JNK, and cPLA2 signaling pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**:C1058–C1066; 2004.
- [64] Matthews, J. R.; Wakasugi, N.; Virelizier, J. L.; Yodoi, J.; Hay, R. T. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res.* **20**:3821–3830; 1992.
- [65] Kaghad, M.; Dessarps, F.; Jacquemin-Sablon, H.; Caput, D.; Fradelizi, D.; Wollman, E. E. Genomic cloning of human thioredoxin-encoding gene: mapping of the transcription start point and analysis of the promoter. *Gene* **140**:273–278; 1994.
- [66] Tanito, M.; Masutani, H.; Kim, Y. C.; Nishikawa, M.; Ohira, A.; Yodoi, J. Sulforaphane induces thioredoxin through the antioxidant-responsive element and attenuates retinal light damage in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**:979–987; 2005.
- [67] Fratelli, M.; Goodwin, L. O.; Orom, U. A.; Lombardi, S.; Tonelli, R.; Mengozzi, M.; Ghezzi, P. Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:13998–14003; 2005.
- [68] Hirota, K.; Matsui, M.; Iwata, S.; Nishiyama, A.; Mori, K.; Yodoi, J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3633–3638; 1997.
- [69] Tully, D. B.; Bao, W.; Goetz, A. K.; Blystone, C. R.; Ren, H.; Schmid, J. E.; Strader, L.; Wood, C. R.; Best, D. S.; Narotsky, M. G.; Wolf, D. C.; Rockett, J. C.; Dix, D. J. Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **215**:260–273; 2006.
- [70] Ortiz, J.; Harris, H. W.; Guitart, X.; Terwilliger, R. Z.; Haycock, J. W.; Nestler, E. J. Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine. *J. Neurosci.* **15**:1285–1297; 1995.
- [71] Cheng, G.; Yu, Z.; Zhou, D.; Mattson, M. P. Phosphatidylinositol-3-kinase-Akt kinase and p42/p44 mitogen-activated protein kinases mediate neurotrophic and excitoprotective actions of a secreted form of amyloid precursor protein. *Exp. Neurol.* **175**:407–414; 2002.
- [72] Fukunaga, K.; Miyamoto, E. Role of MAP kinase in neurons. *Mol. Neurobiol.* **16**:79–95; 1998.
- [73] Lee, J. M.; Shih, A. Y.; Murphy, T. H.; Johnson, J. A. NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons. *J. Biol. Chem.* **278**:37948–37956; 2003.
- [74] Sun, X.; Erb, H.; Murphy, T. H. Coordinate regulation of glutathione metabolism in astrocytes by Nrf2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **326**:371–377; 2005.
- [75] Liu, R. M.; Gao, L.; Choi, J.; Forman, H. J. Gamma-glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. *Am. J. Physiol.* **275**:L861–L869; 1998.
- [76] Cai, J.; Huang, Z. Z.; Lu, S. C. Differential regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy and light subunit gene expression. *Biochem. J.* **326**:167–172; 1997.
- [77] Tian, L.; Shi, M. M.; Forman, H. J. Increased transcription of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion. *Arch. Biochem. Biophys.* **342**:126–133; 1997.
- [78] Li, W.; Jain, M. R.; Chen, C.; Yue, X.; Hebbar, V.; Zhou, R.; Kong, A. N. Nrf2 possesses a redox-insensitive nuclear export signal overlapping with the leucine zipper motif. *J. Biol. Chem.* **280**:28430–28438; 2005.
- [79] Kwak, M. K.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol. Cell Biol.* **22**:2883–2892; 2002.
- [80] Kang, Y.; Viswanath, V.; Jha, N.; Qiao, X.; Mo, J.; Andersen, J. Brain

- gamma-glutamyl cysteine synthetase (GCS) mRNA expression patterns correlate with regional-specific enzyme activities and glutathione levels. *J. Neurosci. Res.* **58**:436–441; 1999.
- [81] Suh, J. H.; Shenvi, S. V.; Dixon, B. M.; Liu, H.; Jaiswal, A. K.; Liu, R. M.; Hagen, T. M. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:3381–3386; 2004.
- [82] Chen, T. S.; Richie Jr., J. P.; Lang, C. A. The effect of aging on glutathione and cysteine levels in different regions of the mouse brain. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **190**:399–402; 1989.
- [83] Brosnan, J. T. Interorgan amino acid transport and its regulation. *J. Nutr.* **133**:2068S–2072S; 2003.
- [84] Mastrocola, R.; Restivo, F.; Vercellinato, I.; Danni, O.; Brignardello, E.; Aragno, M.; Boccuzzi, G. Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J. Endocrinol.* **187**:37–44; 2005.
- [85] Rosca, M. G.; Mustata, T. G.; Kinter, M. T.; Ozdemir, A. M.; Kern, T. S.; Szweda, L. I.; Brownlee, M.; Monnier, V. M.; Weiss, M. F. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **289**:F420–F430; 2005.



Research Signpost  
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



New Perspectives on Brain Cell Damage, Neurodegeneration and Neuroprotective Strategies, 2007: ISBN: 81-308-0164-7  
Editors: Abel Santamaría and María Esther Jiménez-Capdeville

# Glutathione (GSH) synthesis inhibition in the nervous system: A model to comprehend GSH role in neuropathologies

**Jorge Humberto Limón-Pacheco and María Eugenia Gonsebatt**  
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México  
Apartado Postal 70-228, 04510, Ciudad Universitaria, D.F., México

## Abstract

*Glutathione is the most important antioxidant system against free radicals in the nervous system where it also has other functions, such as the maintenance of neurotransmitters, membrane protection and metabolic regulation. Many strategies have been developed to model the lack of glutathione*

---

Correspondence/Reprint request: Dr. María Eugenia Gonsebatt, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México Apartado Postal 70-228, 04510, Ciudad Universitaria, D.F., México

*in the nervous system. They include depletion by de novo synthesis inhibition or conjugation with oxidants that react with glutathione directly. The inhibitor of de novo synthesis, buthionine sulfoximine (BSO) is the most extensive strategy to model the lack of GSH, because non desired effects are reduced, as compared with other inhibitors, and it may be used both in vitro and in vivo. GSH depletion by BSO in the nervous system may be also a good model to understand the role of antioxidant systems in neurodegenerative models for disorders such as Parkinson's, Huntington's and Alzheimer's diseases and cerebellar degeneration. In this work the advantages and disadvantages of the use of GSH depletors as strategy for to study the effects of thiol depletion in vitro and in vivo are reviewed and discussed.*

## **Introduction**

Glutathione (GSH) is the most abundant antioxidant molecule in the brain, with levels in the milimolar order, and it constitutes the principal mechanism of defense against free radicals in cells. Low GSH levels and a high production of reactive oxygen species (ROS) are pathological changes associated to neurodegenerative disorders such as Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's and cerebellar degeneration diseases. Evidence suggests that the presence of elevated levels of ROS is determinant for the development and progression of neural degeneration and aging. One of the strategies to understand the participation of ROS in neurodegenerative disorders is the modulation of GSH levels in tissues and cells. This can be accomplished through the inhibition of GSH synthesis with  $\alpha$ ,  $\beta$  carbonyl unsaturated molecules or by means of the oxidation of endogenous thiols with compounds that react directly with GSH. The purpose of this work is to discuss the advantages and disadvantages of the use of buthionine sulfoximine (BSO) and of other strategies for GSH depletion *in vitro* and *in vivo*.

## **Glutathione (GSH)**

The tripeptide GSH ( $\gamma$ -glut-cys-gly) is found in most eucaryotic cells and it is considered the principal source of intracellular thiols. Its concentration ranges between 0.2-10 mM [1]. GSH is synthesized from the amino acids glutamate, cysteine and glycine by  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) in a first step, GSH synthetase in a second step and both reactions are ATP dependent. Inside the cell, this thiol is maintained in a reduced form by the enzyme glutathione reductase (GR), which reduces oxidized glutathione (GSSG) through a NADPH dependent reaction [2]. GSH has many important functions in the cell: it acts as hydrogen donor for the free radicals generated during different metabolic pathways, regenerates other cellular antioxidants such as  $\alpha$ -tocopherol, ascorbate or ubiquinones by reduction and it also

reduces organic peroxides produced during lipid peroxidation. GSH is also considered a cysteine reservoir [3] and its participation in the synthesis of desoxiribonucleotides has been described, where the GSH dependent glutaredoxin system catalyzes the reduction of ribonucleotides using GSH [4]. GSH also reacts with toxic compounds spontaneously or enzymatically through glutathione S-transferases to form excretable GSH-conjugates [5]. In recent years, it has also been described the role of GSH in the modulation of signal transduction through the direct interaction with key cysteines located in the active site or regulatory regions of proteins like kinases, phosphatases and, transcription factors [6-8]. It has been also described as a neurotransmitter with its own receptors and as a modulator of ionotropic glutamate receptors [18-20].

The GSH system constitutes the most important mechanism against the oxidative damage caused by the ROS and the reactive nitrogen species (RNS) formed normally in the cellular metabolism. GSH may react with ROS or RNS spontaneously or by providing a reducing intermediate for glutathione peroxidase. A summary of the cell activities in which GSH participates is described in figure 1.

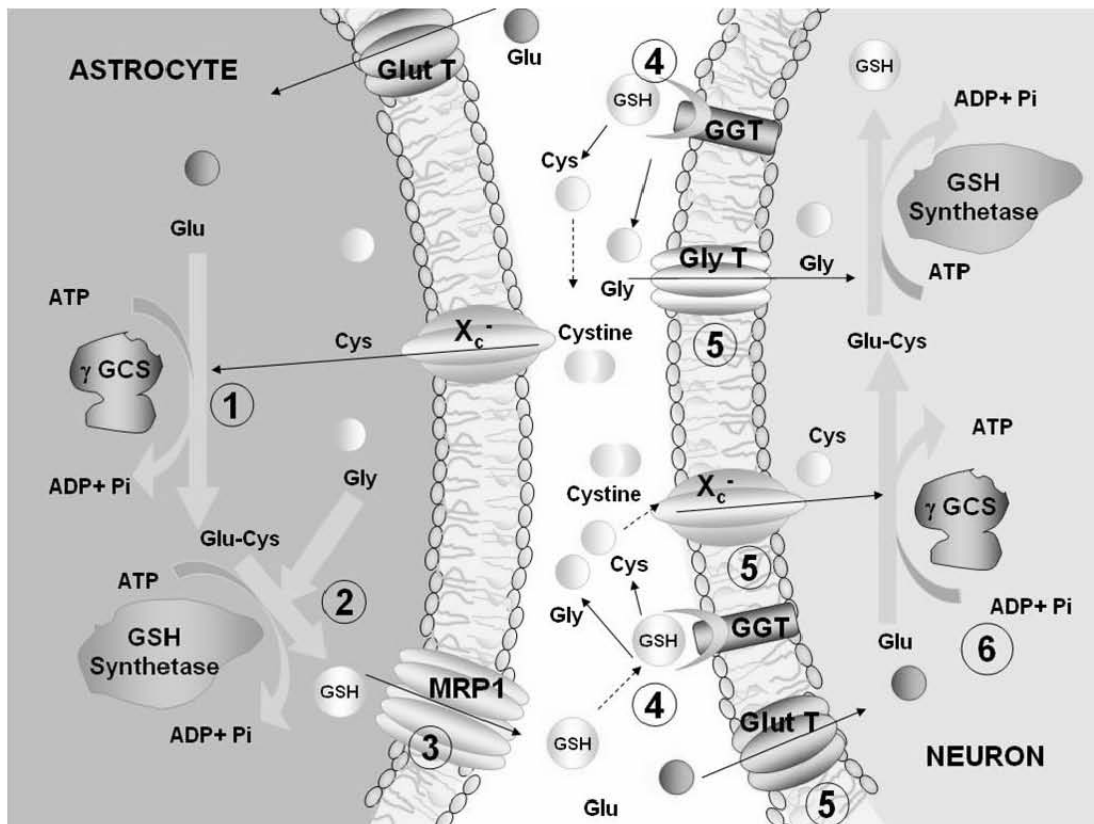
GSH levels in the brain have been reported in a range between 1 to 3 mM [9]. It has been demonstrated that GSH concentration is higher in astrocytes than in neurons [10]. *In vitro* studies suggest that astrocytes provide neurons with GSH precursors such as cysteine and glutamate, essential amino acids for the synthesis of GSH in neurons [11,12]. GSH is exported from astrocytes through the multidrug resistance protein 1 (MRP1). Once in the extracellular space it is catabolized by ectopeptidases like the  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) which is present in the external membrane of neurons [13,14]. The resulting amino acids may be then incorporated into the neuron through specific transporters like the GlyT2, Glutamate transporters or the cystine/glutamate antiporter system  $x_c^-$  [14-16] are used for GSH synthesis inside the neuron (see figure 2). It has been shown that the intracellular GSH content correlates with the  $\gamma$ -GCS mRNA levels and with its enzymatic activity. The content of GSH is variable among different brain regions following a descending order: cortex > cerebellum > hippocampus > brain stem [17].

GSH plays an important role in the physiology of the nervous system [18]. For example, in the coelenterate *Hydra vulgaris*, a conductual behavior to recognize a prey is displayed when GSH is released from the damaged cells arising from injuries of the prey, then GSH is recognized by putative specific receptors located in nematocytes of *Hydra* and this promotes the tentacle contraction. Mammalian N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) agonists caused a marked decreased of the response to GSH, suggesting a similar structure between the NMDA receptor and the putative GSH receptor [19]. Several evidences have demonstrated that GSH has a neurohormone function. First of



**Figure 1.** Major functions of GSH in the cells. GSH is involved in several aspects of the cell metabolism such as free radical inactivation, xenobiotics detoxification, protein maintenance, signal transduction modulation, transport and reserve of cysteine. For example, glutathionylation of phosphatases, kinases or transcription factors could be reversible and may induce important changes in the cell. Oxidized glutathione (GSSG) may participate in modification through binding to critical cysteine in proteins.

all, the presence of extracellular GSH in the brain is located particularly in the cerebrospinal fluid [20]. *In vitro* studies in brain slices after a stimulus with  $K^+$  have shown a  $Ca^{2+}$ -dependent GSH release. The most prominent release occurred in mesencephalon, cortex, hippocampus and striatum, and the lowest signal was detected in the cerebellar region [21]. Moreover, the specific binding of GSH to extracellular receptors was shown in astrocytes, where biotinylated GSH was used to detect the thiol binding to the receptor [22]. Also, reduced GSH stimulates the signal transduction that increases inositol triphosphate levels when it is applied directly to astrocytes and neuron cultures [23,24]. Finally, sodium currents in cortical brain slices are stimulated by GSH



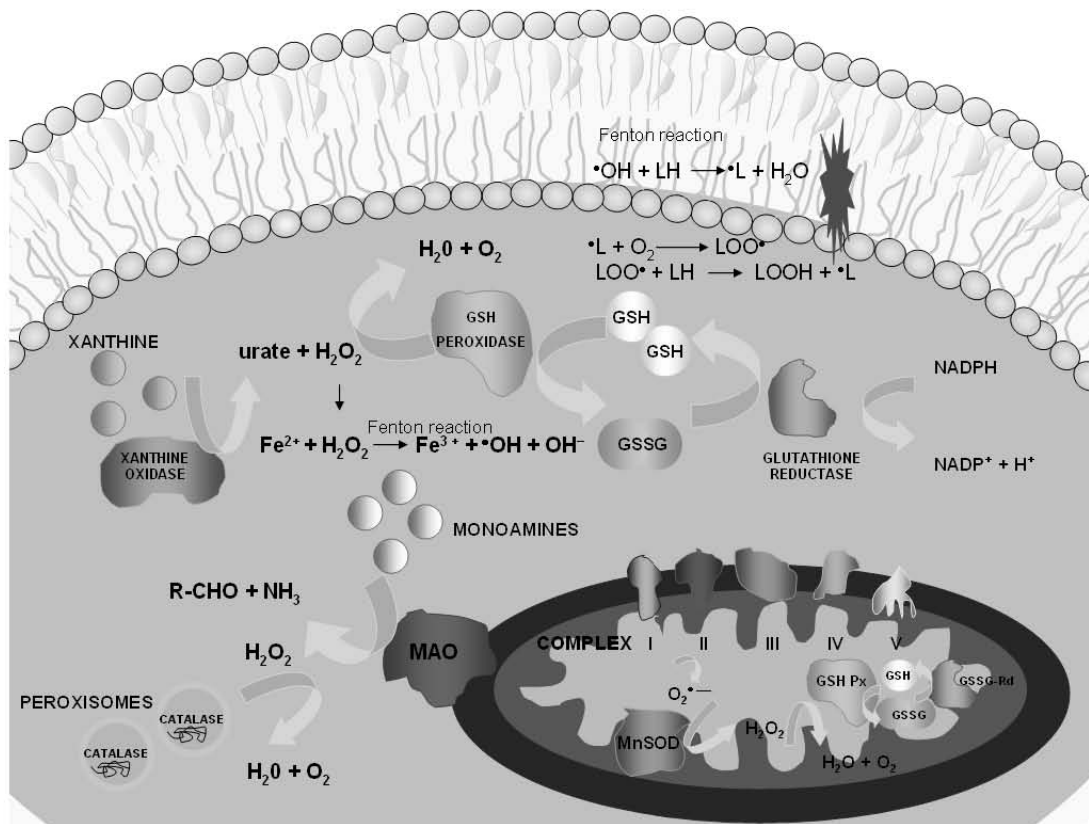
**Figure 2.** Possible interaction between astrocytes and neurons during GSH synthesis. Astrocytes synthesize glutathione from the amino acids glutamate (Glu), cysteine (Cys) and glycine (Gln) (1-2); then GSH is exported through MRP1 proteins (3) where the  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ GT) breaks the tripeptide back into its precursors (4). Cystine is reduced to cysteine inside the cell. Neurons might incorporate these precursors through the cystine/glutamate antiporter system  $X_c^-$ , GlyT2 or glutamate transporters (5) to synthesize its own GSH (6).

and they are not blocked with antagonists of glutamate receptors, extracellular  $Ca^{2+}$  removal or the inhibition of the potassium currents, which suggests the existence of a specific receptor [18]. Shaw [25] has reviewed with detail other aspects of GSH in the nervous system.

## Brain: A susceptible organ to free radicals and oxidative damage

The brain is the organ with the highest oxygen consumption per mass unit (20% of total body consumption). This high respiratory rate generates elevated levels of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) in mitochondria. This radical is a potential damaging agent to mitochondrial DNA, leading to mutations and deletions that increase with the age of the organisms [3,26]. Secondly, brain metabolism generates hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) during dopamine oxidation. The reaction is

catalyzed by monoamine oxidases (MAO) located in the external face of the mitochondrial membrane. The MAO<sub>A</sub> isoform oxidize mainly hydroxylated amines as serotonin and noradrenaline in noradrenergic neurons [3,27] while MAO<sub>B</sub> oxidizes non-hydroxylated amines and this enzyme is found in serotonergic neurons [27,28]. It has been proposed that the activities of xanthine oxidase, nitric oxide synthase and phospholipase A (2) also contribute to ROS generation in brain [29,30] (see Figure 3) and it has been recently proved that this event occurs during cerebral ischemia [31,32]. Also, ROS



**Figure 3.** A general model of reactive oxygen species (ROS) formation and antioxidant systems in nervous cells. Brain metabolism generates hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) during dopamine oxidation. The reaction is catalyzed by monoamine oxidases (MAO) located in the external layer of mitochondrial membranes in nervous cells. Also it has been proposed that the activity of xanthine oxidase contributes to ROS generation in brain cells. ROS produced in the presence of metallic ions as  $\text{Fe}^{2+}$  generate free radicals and they can react with membrane lipids resulting in lipid peroxidation through the Fenton reaction. Respiratory chain reactions also may produce  $\text{O}_2^{\bullet-}$  and subsequently  $\text{H}_2\text{O}_2$  by the activity of superoxide dismutase (SOD). Although antioxidant defenses in brain are modest as compared with other organs, antioxidant systems as GSH, GSH peroxidase, GSH reductase and enzymes as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in peroxisomes have been described. The brain has a limited ability to detoxify itself from ROS like  $\text{H}_2\text{O}_2$  or free radicals as  $\text{OH}^{\bullet}$ . Cell damage may occur when antioxidant defenses such as the glutathione system are insufficient.

generated in presence of metallic ions as  $\text{Fe}^{2+}$  may induce oxidative stress and brain damage [33].

Antioxidant defenses in brain are modest as compared with other organs such as liver or muscle. Low activities of antioxidant enzymes like superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) have been described [3,9], thus the ability to detoxify brain from ROS as  $\text{H}_2\text{O}_2$  or free radicals as  $\text{OH}^\bullet$  is limited. Another consideration is that the brain has a high content of iron, which in part is present in many brain enzymes as CYP450, ferritin, aconitase and hydroxylases of tyrosine and tryptophan, which catalyze the first reactions in dopamine and serotonin synthesis, respectively [3,34]. Brain damage through iron involves its liberation, which catalyzes reactions and forms free radicals as  $\text{OH}^\bullet$  derivated from  $\text{H}_2\text{O}_2$ . This event produces lipid peroxidation and neurotransmitter autoxidation [35,36]. Membrane lipids in neurons have a high content of lateral chains of non saturated fatty acids as eicosapentaenoic acid, which may be oxidized during lipid peroxidation [37]. Many neurotransmitters are autoxidable molecules, for example dopamine and noradrenaline may react with oxygen to form  $\text{O}_2^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  or quinones and semiquinones that react with GSH and deplete its levels. Also the reactive intermediates from these metabolic reactions can inactivate proteins by interaction with ROS via sulfhydryl groups in critical cysteines located at the active site [38] (see figure 3).

## **GSH content, oxidative damage and neuronal death**

Several studies have suggested a strong relationship between the decline of GSH in neurons and neuronal cell death [39]. A decrease in GSH content in cortical neurons initiates the activity of 12-lipoxygenase, and the peroxide production might induce damage in membranes due to lipid oxidation that leads to  $\text{Ca}^{2+}$  liberation and finally cell death [39]. Alterations in GSH content in brain cultures are associated to oxidative stress which may also induce apoptosis or necrosis [40,41]. The diminution of GSH in motor neuron NSC-34 and neuron NS20-Y cultures, causes mitochondrial dysfunction associated to an increase of ROS before the cell initiates apoptosis [42,43].

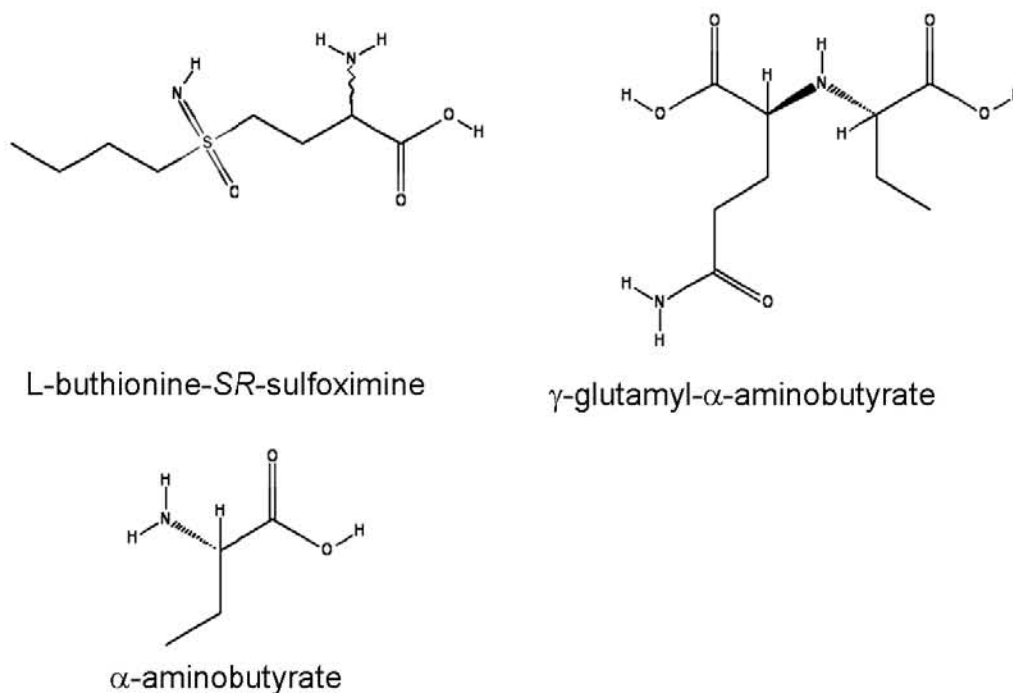
## **Buthionine sulfoximine (BSO) as a strategy to decrease the GSH content by synthesis inhibition**

BSO decreases the intracellular levels of GSH by blocking *de novo* synthesis. It is the most effective inhibitor of  $\gamma$ -glutamylcysteinyl ( $\gamma$ -GCS) formation, which is the first step in the GSH synthesis. In order to explain how the GSH levels are depleted using this compound, it has been proposed that BSO blocks *de novo* synthesis of GSH and then the pre-existent GSH pool is gradually exhausted, either by the use of the thiol in the reactions where it is

normally required, or it is exported to the cellular exterior [44]. BSO is an inhibitor derivated from a series of analogous based on the methionine sulfoximine (MSO). An important observation about BSO and its analogous is that they are not chemically reactive with other molecules under physiological conditions, therefore it does not decrease the levels of other thiols and reductants [45,46]. First, this inhibitor binds reversibly to  $\gamma$ -GCS as an analogue of  $\gamma$ -glutamyl- $\alpha$ -aminobutyrate, the enzymatic product formed from glutamate and  $\alpha$ -aminobutyrate, which is the first step in the synthesis of GSH (Fig. 4). The next suggested reaction for the inhibitory effect of BSO is the phosphorylation of the compound. Finally, the product of this reaction, buthionine sulfoximine phosphate, is structurally similar to the native intermediary  $\gamma$ -glutamylphosphate- $\alpha$ -aminobutyrate, which binds strongly to the active site of the enzyme blocking GSH synthesis [45-47].

An important aspect is that the rate of inhibition and its duration may be dependent of cell glutamate concentration, which is a competitive molecule for the binding site. For example, 0.02mM and 0.2mM of BSO inhibited  $\gamma$ -GCS 52 and 100 percent respectively in presence of 5 mM glutamate and 10 mM ATP in ten minutes [45].

GSH levels in liver, kidney, pancreas and skeletal muscle are quickly diminished after a single dose of BSO in murine models [48]. However, a disadvantage of BSO is that it does not cross the blood brain barrier easily,



**Figure 4.** Structures of  $\gamma$ -glutamyl- $\alpha$ -aminobutyrate and L-buthionine-SR-sulfoximine, both substrates of  $\gamma$ -GCS (see details in text).



which makes the compound useless for single dose via systemic administration. Nevertheless, this may be compensated by injecting BSO via intracerebroventricular (ICV), and the result constitutes an adequate strategy to model neuropathologies [49]. Also, the ICV injection of BSO decreases GSH strongly and the effect is longer due to the slow GSH turnover [50-52]. In the mouse, repeated doses via intraperitoneal injection induced an important decrease of GSH content in the substantia nigra [53]. Finally, BSO may be administered chronically at high concentrations which constitute an adequate strategy to study the neurodegenerative progression [45,48,54].

## **Effect of BSO in the central nervous system and its potential application for neuropathology modeling**

### ***In vivo* models**

Administration of BSO and dopamine via ICV effectively decrease GSH content due to oxidative stress generation in aged rats, which results in a significative deficiency in learning and memory processes [52]. These observations may help explain why in old individuals, brain dopamine is more susceptible to oxidation. Also, the free radical excess as a consequence of low levels of GSH and of other antioxidant defenses is what might finally lead to severe damage in brain tissue or neuronal apoptosis [52]. Mice treated with BSO via intraperitoneal administration at repeated doses during 16 h, showed diminished GSH content and morphological changes in the substantia nigra, similar to the changes described in older mice, such as the increase in lipofuscine accumulation and lipid peroxidation, which are events also observed in Parkinson's disease [53,55,56]. A condition similar to Parkinson's disease may be induced *in vivo* in human, mouse and rat models by 1-methyl-4-phenyl,1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP) administration, which produces a selective destruction of the dopaminergic striatal pathway [57,58]. The metabolite 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) is incorporated by dopaminergic neurons, where it inhibits the complex I in the respiratory chain, reducing the synthesis of ATP and generating free radicals that cause lipid peroxidation [57]. Furthermore, BSO treatment and consequent GSH depletion generated a marked increment in the effects of MPTP and MPP<sup>+</sup> in dopaminergic neurons which resulted in cellular death in adult rats. These events could be related to those that lead to the development of Parkinson's disease [58].

### ***In vitro* models**

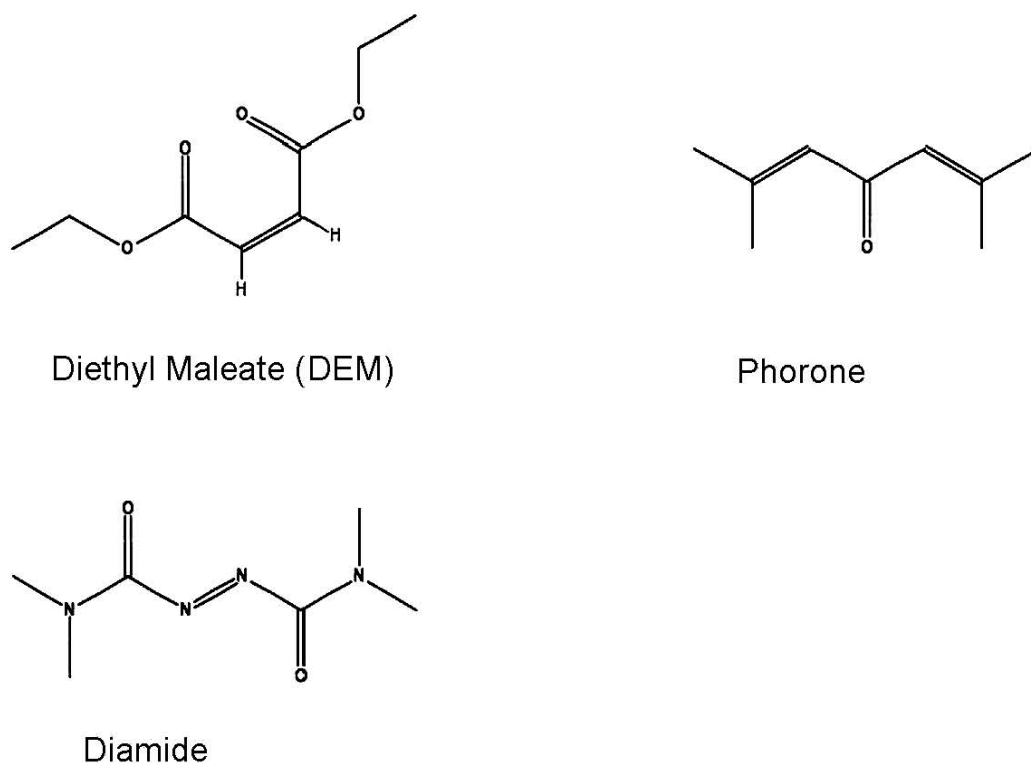
Although BSO produces a dramatic depletion in GSH, this effect depends on the kinetics of BSO incorporation into the cell and the rate of GSH utilization or transportation outside the cell [47]. In human glioma LN-229 and T98G cells, both derived from human cerebral tumors, treatment with BSO for

fifteen hours resulted in the loss of 80 % of cytosolic GSH and a 50 % loss of mitochondrial GSH, which makes these cells more sensitive to the effect of chemotherapeutic agents [59]. In hippocampus slices of guinea pigs treated with 5 mM of BSO for two hours, GSH was depleted near 80 % of control values and this had an important effect in the efficiency of the cell to repair oxidative damage [60]. In other example, the pre-incubation of astrocytes with BSO 1 mM for 24 hours depleted GSH content and the ability of the cells to metabolize hydrogen peroxide [61]. This effect has been observed also in dopaminergic neurons where GSH depletion by BSO led to cellular death [62]. GSH depletion with 20  $\mu$ M BSO induced neuronal death in a selective manner in neuron-glia cultures, and this event occurred both through necrosis and apoptosis [62]. This depletion was associated principally to ROS production in a dose and time-dependent manner in neurons. Interestingly, in the same work BSO treatment activated ERK1/2 proteins, members of mitogen activated protein kinases (MAPK) family, 4 and 6 hours after the treatment in astrocytes and microglial cells, but not in neurons. This event is probably related to the modulation of an antioxidant response in these cells through signal transduction pathways modulated by changes in GSH content, although this hypothesis requires further investigation.

Another important aspect is that  $Zn^{2+}$  has been found in high concentrations in excitatory synapses in the course of pathologies such as cerebral ischemia, and this condition induced apoptosis in glial cells and neurons [63]. In astrocytes, it was observed that BSO contributed to cell damage by excess of  $Zn^{2+}$  together with an increment in the GSSG, which made evident a mechanism of toxicity by changes in thiol homeostasis [63]. In mouse primary neuron cultures, the initial GSH depletion by 10-100  $\mu$ M BSO took place after 8 hours, but the most important depletion was observed 24 hours after treatment, where GSH levels were depleted to 30 % from control values [63, 64]. Copper concentration is high in the brain of patients with Alzheimer's disease, where also low levels in GSH content have been described [9,65].  $Cu^{2+}$  may bind and oxidize the  $\alpha$ -sinuclein, the more abundant non-amyloid protein in brain that forms Lewy bodies in senile plaques found in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease [66]. These findings make evident the importance of the precise regulation of metallic ions, such as copper and zinc, whose metabolism and ionic forms presence is modulated by GSH levels in the cells.

## **GSH depletion strategies based in thiol oxidation**

Other strategies to show the effects previously mentioned consist in the oxidation of GSH to GSSG or in the induction of a GSH reaction with electrophiles [47] (see figure 5). The first strategy for GSSG formation requires



**Figure 5.** Structures of chemicals used to deplete GSH by oxidation.

that the rate of GSH oxidation exceeds the reduction capacity from GSSG to GSH by glutathione reductase. This has been achieved with substrates for the GSH peroxidase as ter-butyl hydroperoxide and with agents that oxidize glutathione directly as diamide; thus GSH is diminished and GSSG is formed in all the cell compartments examined [67-69]. In some cells, total GSH ([GSH] + 2x [GSSG]) decrease due to the fact that GSSG was selectively and irreversibly carried out to the extracellular space [70,71]. This strategy generates high levels of GSSG increasing the glutathionylation, a post-translational process in which protein–glutathione mixed disulphides are formed and it results in changes in protein activity and expression [7,72,86-88]. If the cell is not destroyed by oxidants, GSH decrease is eventually reverted by the reduction of the GSSG to GSH by the glutathione reductase, or in the long term, through *de novo* synthesis [3,47].

A second strategy is the use of diethylmaleate (DEM), an  $\alpha,\beta$  carbonyl unsaturated electrophilic compound that reacts with GSH through the activity of glutathione transferases [73]. In rats and mice, intraperitoneal administration of DEM has demonstrated important effects in liver, kidney, heart and brain [74]. DEM at 3 mmol Kg<sup>-1</sup> via intraperitoneal depleted GSH 1 hour after injection, but subsequent GSH repletion was slower in brain than in liver and

kidney, which evidenced the susceptibility of brain after GSH depletion. In other models, DEM has been used to decrease intracellular GSH in rat brain to induce damage in striatal neurons [75]. DEM administration at 4 mmol Kg<sup>-1</sup> and 3 mmol Kg<sup>-1</sup> of phorone, another  $\alpha,\beta$  carbonyl unsaturated agent, depleted GSH content in rat brain to 40-43% of control values in 2 h. Also, a decrease in superoxide dismutase activity and the increment in the activity of catalase, glutathione S-transferase and selenium glutathione peroxidase and glucose 6-phosphate dehydrogenase together with the increase in protein oxidation were observed [76]. Nevertheless, several reports mentioned that DEM had different effects related to the GSH decrement. Some of these effects were the increase in hemeoxygenase activity in microsomal fraction of rat liver [77] and the hemeoxygenase (HO-1) in the brain [78], which could represent an antioxidant response to GSH depletion. However, DEM has been shown to have nonspecific effects, such as alteration of monooxygenase activities or changes in glycogen metabolism. In mice 1 ml kg<sup>-1</sup> of DEM caused a decrease in protein synthesis in brain and liver independent of the GSH content and partially due to its hypothermic effect [79]. Other effect is the lipid peroxidation described in hepatic cultures and liver homogenates of rat and mouse [80].

The  $\alpha,\beta$  carbonyl unsaturated agent phorone, (di-isopropylidene-acetone), acts similarly to DEM, interacting with GSH to form conjugates through the action of glutathione S-transferases [81]. An intraperitoneal dose of 250 mg Kg<sup>-1</sup> of phorone depleted GSH in liver to 9 % of control values in rats and mice while doses of 650 mg Kg<sup>-1</sup> depleted GSH levels to 6% of control values in two hours [82].

Finally, diamide is other chemical that has been used to deplete GSH, for example, in guinea pig hippocampus, diamide decreased GSH levels after 2 h and this effect compromised the cell repair efficiency under oxidative stress conditions [60]. In cortical slices diamide released neurotransmitters such as GABA, acetylcholine, norepinephrine and dopamine through a mechanism apparently dependent of thiol oxidation [83], nevertheless it is not clear whether GSH participated in this process.

An advantage of the use of these compounds is their ability to cross easily the blood brain barrier, so they may be used to model acute *in vivo* GSH deficiency and/or xenobiotic effects in the nervous system [84, 85]. Although these compounds have been demonstrated to be useful to deplete GSH content *in vivo* and *in vitro*, there are non desired side effects that should be considered according to the objectives of the study. Furthermore, studies with long term administration of DEM and phorone are necessary regarding protein synthesis inhibition and unspecific protein oxidation, in order to evaluate its potential application to model pathologies associated with chronic GSH deficiency.

## Conclusions

In the last few years it has become evident that GSH has different functions in the central nervous system [25], but the principal function is the antioxidant defense and cell detoxification. The study of neuropathologies where a decline in GSH has been observed raises questions about how thiol homeostasis is maintained, which mechanisms change in the brain with age and if these changes are associated with its decline. To have a better understanding of the role of GSH in neuropathologies it has become necessary to include models that simulate efficiently the lack of GSH. Although many strategies exist to deplete the GSH content in brain as diamide, DEM or phorone, these strategies may produce non desired side effects, not related to GSH decrease. The administration of BSO to manipulate GSH levels is a very useful strategy and has several advantages: i) it does not generate toxicity when administered at high dose, ii) it can be administered for prolonged periods of time (chronically) iii) it might be used to enhance the harmful effects of xenobiotics, iv) administration via intraperitoneal or intracerebroventricular produces a decrease in GSH content in the brain and this effect is prolonged. The administration of BSO in nervous system studies is a model extensively used in *in vitro* and *in vivo* studies to investigate the effects of GSH depletion in relation with age, xenobiotic toxicity and events related to the lack of this thiol, however further investigation is necessary to understand completely the role of GSH in neuropathologies.

## Acknowledgments

We wish to thank Dr. Clorinda Arias Berlanga and Dr. Ricardo Tapia Ibarguengoitia for their comments on the manuscript. This work was supported by CONACYT 173890.

## References

1. Anderson, M.E. 1998, Chem. Biol. Interact., 111-112,1.
2. Meister, A. 1982, Biochem. Soc. Trans., 10, 78.
3. Halliwell, B., and Gutteridge, J. 1999, Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, Oxford.
4. Luthman, M., Eriksson, S., Holmgren, A., and Thelander, L. 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 76, 2158.
5. Borst, P., Evers, R., Kool, M., and Wijnholds, J. 2000, J. Natl. Cancer. Inst., 92, 1295.
6. Reynaert, N.L., van der Vliet, A., Guala, A.S., McGovern, T., Hristova, M., Pantano, C., Heintz, N.H., Heim, J., Ho, Y.S., Matthews, D.E., Wouters, E.F., and Janssen-Heininger, Y.M. 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 103, 13086.
7. Cross, J.V., and Templeton, D.J. 2004, Biochem. J., 381, 675.
8. Rao, R.K., and Clayton, L.W. 2002, Biochem. Biophys. Res. Commun., 293, 610.

9. Dringen, R. 2000, *Prog. Neurobiol.*, 62, 649.
10. Rice, M.E., and Russo-Menna, I. 1998, *Neuroscience*, 82, 1213.
11. Dringen, R., and Hirrlinger, J. 2003, *Biol. Chem.*, 384, 505.
12. Dringen, R., Pfeiffer, B., and Hamprecht, B. 1999, *J. Neurosci.*, 19, 562.
13. Hirrlinger, J., Schulz, J.B., and Dringen, R. 2002, *J. Neurosci. Res.*, 69, 318.
14. Shanker, G., and Aschner, M. 2001, *J. Neurosci. Res.*, 66, 998.
15. Zafra, F., Aragon, C., Olivares, L., Danbolt, N.C., Gimenez, C., and Storm-Mathisen, J. 1995, *J. Neurosci.*, 15, 3952.
16. Danbolt, N.C. 2001, *Prog. Neurobiol.*, 65, 1.
17. Kang, Y., Viswanath, V., Jha, N., Qiao, X., Mo, J., and Andersen, J. 1999, *J. Neurosci. Res.*, 58, 436.
18. Shaw, C.A., Pasqualotto, B.A., and Curry, K. 1996, *Neuroreport*, 7, 1149.
19. Pierobon, P., Sogliano, C., Minei, R., Tino, A., Portu, P., Marino, G., Tortiglione, C., and Concas, A. 2004, *Eur. J. Neurosci.*, 20, 2598.
20. Anderson, M.E., Underwood, M., Bridges, R.J., and Meister, A. 1989, *FASEB J.*, 3, 2527.
21. Zangerle, L., Cuenod, M., Winterhalter, K., and Do, K. 1992, *J. Neurochem.*, 59, 181.
22. Guo, N. and Shaw, C., 1992, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 15, 207.
23. Guo, N., McIntosh, C., and Shaw, C. 1992, *Neuroscience*, 51, 835.
24. Lanius, R.A., Shaw, C.A., Wage, C., and Krieger, C. 1994, *J. Neurochem.*, 63, 155.
25. Shaw, C.A., 1998, *Glutathione in the Nervous System*, Taylor and Francis, Washington, DC.
26. Bharath, S., Hsu, M., Kaur, D., Rajagopalan, S., and Andersen, J.K. 2002, *Biochem. Pharmacol.*, 64, 1037.
27. Luque, J.M., Kwan, S.W., Abell, C.W., Da Prada, M., and Richards, J.G. 1995, *J. Comp. Neurol.*, 363, 665.
28. Westlund K.N., Denney, R.M., Rose, R.M., and Abell, C.W. 1988, *Neuroscience*, 25, 439.
29. Love, S. 1999, *Brain Pathol.*, 9, 119.
30. Lewen, A., Matz, P., and Chan, P.H. 2000, *J. Neurotrauma*, 17, 871.
31. Solaroglu, I., Okutan, O., Kaptanoglu, E., Beskonakli, E., and Kilinc, K. 2005, *J. Clin. Neurosci.*, 12, 273.
32. Sanganahalli, B.G., Joshi, P.G., and Joshi, N.B. 2005, *Brain Res.*, 1037, 200.
33. Dringen, R., Gutterer, J.M., and Hirrlinger, J. 2000, *Eur. J. Biochem.*, 267, 4912.
34. Gerlach, M., Ben-Shachar, D., Riederer, P., and Youdim, M.B. 1994, *J. Neurochem.*, 63, 793.
35. Ben-Shachar, D., Zuk, R., and Glinka, Y. 1995, *J. Neurochem.*, 64, 718.
36. Double, K.L., Maywald, M., Schmittel, M., Riederer, P., and Gerlach, M. 1998, *J. Neurochem.*, 70, 2492.
37. Halliwell, B. 1992, *J. Neurochem.* 59, 1609.
38. Spencer, J.P., Jenner, P., Daniel, S.E., Lees, A.J., Marsden, D.C., and Halliwell, B. 1998, *J. Neurochem.*, 71, 2112.
39. Li, Y., Maher, P., and Schubert, D. 1997, *Neuron*, 19, 453.
40. Canals, S., Casarejos, M.J., de Bernardo, S., Rodriguez-Martin, E., and Mena, M. 2001, *J. Neurochem.*, 79, 1183.

41. Canals, S., Casarejos, M.J., de Bernardo, S., Solano, R., and Mena, M. 2003, *Mol. Cell Neurosci.*, 24, 1012.
42. Rizzardini, M., Lupi, M., Bernasconi, S., Mangolini, S., and Cantón, A. 2003, *J. Neurol. Sci.*, 207, 51.
43. Merad-Boudia, M., Nicole, A., Santiard-Baron, D., Saille, C., and Ceballos-Picot, I. 1998, *Biochem. Pharmacol.*, 56, 645.
44. Griffith, O.W. 1981, *Methods Enzymol.*, 77, 59.
45. Griffith, O.W., and Meister, A. 1979, *J. Biol. Chem.*, 254, 7558.
46. Griffith, O.W. 1982., *J. Biol. Chem.*, 257, 13704.
47. Taniguchi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y., and Meister, A. 1988, *Glutathione Centennial*, Academic Press, California.
48. Griffith, O.W., and Meister, A. 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76, 5606.
49. Lin, A.M., Chen, C.F., and Ho, L.T. 2002, *Exp. Neurol.*, 176, 328.
50. Pileblad, E., and Magnusson, T. 1988, *Neurosci. Lett.*, 95, 302.
51. Pileblad, E., and Magnusson, T. 1989, *J. Neurochem.*, 53, 1878.
52. Shukitt-Hale, B., Erat, S.A., and Joseph, J.A. 1998, *Free Radic. Biol. Med.*, 24, 1149.
53. Andersen, J.K., Mo, J.Q. Hom, D.G., Lee, F.Y., Harnish, P., Hamill, R.W., and McNeill, T.H. 1996, *J. Neurochem.*, 67, 2164.
54. Mulder, G.J., and Ouwerkerk-Mahadevan, S. 1997, *Chem. Biol. Interact.*, 105, 17.
55. Mo, J.Q., Hom, D.G., and Andersen, J.K. 1995, *Mech. Ageing Dev.*, 81, 73.
56. Dexter, D.T., Carter, C.J., Wells, F.R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P., and Marsden, C.D. 1989, *J. Neurochem.*, 52, 381.
57. Bains, J.S., and Shaw, C.A. 1997, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 25, 335.
58. Wullner, U., Loschmann, P.A., Schulz, J.B., Schmid, A., Dringen, R., Eblen, F., Turski, L. and Klockgether, T. 1996, *Neuroreport*, 7, 921
59. Reber, U., Wullner, U., Trepel, M., Baumgart, J., Seyfried, J., Klockgether, T., Dichgans, J., and Weller, M. 1998, *Biochem. Pharmacol.*, 55, 349.
60. Pellmar, T.C., Roney, D. and Lepinski, D.L. 1992, *Brain Res.*, 583, 194.
61. Liddell, J.R., Robinson, S.R., and Dringen, R. 2004, *Neurosci. Lett.*, 364, 164.
62. de Bernardo, S., Canals, S., Casarejos, M.J., Solano, R.M., Menendez, J., and Mena, M.A. 2004, *J. Neurochem.*, 91, 667.
63. Kim, D., Joe, C.O., and Han, P.L. 2003, *Neuroreport*, 14,187.
64. White, A.R., and Cappai, R. 2003, *J. Neurosci. Res.*, 71, 889.
65. Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., and Markesbery, W.R. 1998, *J. Neurol. Sci.*, 158, 47.
66. Paik, S.R., Shin, H.J., Lee, J.H., Chang, C.S., and Kim, J. 1999, *Biochem. J.*, 340, 821.
67. Zavodnik, L.B., Zavodnik, I.B., Niekurzak, A., Szosland, K., and Bryszewska, M. 1998, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 44, 577.
68. Sies, H., Brigelius, R., and Graf, P. 1987, *Adv. Enzyme Regul.*, 26, 175.
69. Kosower, N. S., and Kosower, E.M. 1987, *Methods Enzymol.*, 143, 264.
70. Kondo, T., Dale, G.L., and Beutler, E. 1981, *Biochim. Biophys. Acta*, 645, 132.
71. Kondo, T., Murao, M., and Taniguchi, N. 1982, *Eur. J. Biochem.*, 125, 551.
72. Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Eberini, I., Salmona, M., Bonetto, V., Mengozzi, M., Duffieux, F., Miclet, E., Bachi, A., Vandekerckhove, J., Gianazza, E., and Ghezzi P. 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 3505.

73. Boyland, E., and Chasseaud, L.F. 1970, *Biochem. Pharmacol.*, 19, 1526.
74. Gerard-Monnier, D., Fougeat, S., and Chaudiere, J. 1992, *Biochem. Pharmacol.*, 43, 451.
75. Garcia, J.C., Remires, D., Leiva, A., and Gonzalez, R. 2000, *J. Mol. Neurosci.*, 14, 147.
76. Gupta, A., Gupta, A., Datta, M., and Shukla, G.S. 2000, *Mol. Cell. Biochem.*, 209, 55.
77. Burk, R.F., and Correia, M.A. 1979, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 24, 205.
78. Ewing, J.F., and Maines, M.D. 1993, *J. Neurochem.*, 60, 1512.
79. Costa, L.G., and Murphy, S.D. 1986, *Biochem. Pharmacol.*, 35, 3383.
80. Younes, M., and Siegers, C.P. 1980, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 27, 119.
81. Plummer, J.L., Smith, B.R., Sies, H., and Bend, J.R. 1981, *Methods Enzymol.*, 77, 50.
82. Wade, P.D., Fritz, L.C., and Siekevitz, P. 1981, *Brain Res.*, 225, 357.
83. van Doorn, R., Leijdekkers, C.M., and Henderson, P.T. 1978, *Toxicology*, 11, 225.
84. Dixit, R., Husain, R., Seth, P.K., and Mukhtar, H. 1980, *Toxicol Lett.*, 6, 417.
85. Shivakumar, B.R., and Ravindranath, V. 1992, *Biochem. Pharmacol.*, 43, 263.
86. Dandrea, T., Bajak, E., Warngard, L., and Cotgreave, I.A. 2002, *Arch. Biochem. Biophys.*, 406, 241.
87. Humphries, K.M., Juliano, C., and Taylor, S.S. 2002, *J. Biol. Chem.* 277, 43505.
88. Anselmo, A.N., and Cobb, M.H. 2004, *Biochem. J.*, 381: e1.