



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

TÍTULO DEL PROYECTO:

“MODULACIÓN POR ARSÉNICO DE LA EXPRESIÓN DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES (GSH Y TRX) EN EL CEREBRO DEL RATÓN”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. IRMA DANIELA SILVA ADAYA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

**DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, U.N.A.M**

COMITÉ TUTOR:

**DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, U.N.A.M**

**DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA
FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M**

CD.MX., OCTUBRE, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

TÍTULO DEL PROYECTO:

“MODULACIÓN POR ARSÉNICO DE LA EXPRESIÓN DE SISTEMAS ANTIOXIDANTES (GSH Y TRX) EN EL CEREBRO DEL RATÓN”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. IRMA DANIELA SILVA ADAYA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

**DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, U.N.A.M**

COMITÉ TUTOR:

**DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, U.N.A.M**

**DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA
FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M**

MÉXICO, CD.MX., OCTUBRE, 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

OFICIO CPCB/602/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **18 de mayo de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **SILVA ADAYA IRMA DANIELA** con número de cuenta **402054173** con la tesis titulada **“Modulación por arsénico de la expresión de sistemas antioxidantes (GSH y Trx) en el cerebro del ratón”**, realizada bajo la dirección de la **Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet
Vocal: Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
Secretario: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda
Suplente: Dr. José Pedraza Chaverri
Suplente: Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 23 de septiembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS

A las instituciones:

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México**; por la administración, orientación y apoyo durante el Doctorado.

Al **Sistema Nacional de Investigadores, CONACYT**.

A la UNAM a través del **Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)**, por el apoyo recibido durante la formación del Doctorado en Ciencias.

A mi tutor principal:

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte del Depto. de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del IIB-UNAM; por el apoyo, la dedicación y las enseñanzas durante la realización del proyecto de tesis de Doctorado.

A mi comité tutor:

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina y Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda; por las sugerencias, apoyo, el seguimiento y la revisión del proyecto de tesis de Doctorado.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS. Dirección General, Dirección de Investigación y a la Dra. Hilda Martínez Coria por su apoyo para la realización de este trabajo.

A los Drs. Pavel Petrosyan, Renato León Rodríguez y M.C. Patricia De la Torre; por toda la ayuda técnica y el apoyo experimental del proyecto.

A la M.C. Wendy Leslie González Alfonso y a la Biól. Alegna Pérez Acosta; por el apoyo en la medición de la producción relativa de H₂S.

Al Dr. Víctor Daniel Garzón Cortés, y a la MVZ. Rubí Elizabeth Zavala Gaytán de la Unidad de Modelos Biológicos, por toda la disposición y facilidades brindadas.

A la Dra. Julieta Rubio; por todos los cuestionamientos, dudas y correcciones en los seminarios de grupo.

Agradezco los valiosos comentarios a este trabajo al jurado de examen doctoral, conformado por: Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet, Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes, Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda, Dr. José Pedraza Chaverri y Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano.

DEDICATORIAS

A Dios. Por darme todo.

A mis padres:

Irma Adaya y Arnulfo Silva, por ser grandes personas, trabajadores, constantes y con muchos valores. Gracias a ustedes he logrado este grado, sin sus palabras de aliento y apoyo esto nunca se hubiera cumplido. Son mi eterno amor.

A mis hermanos:

Arnulfo, Juan Carlos, Gerardo, Mauricio, por todo el apoyo y ejemplo que siempre me dan. El camino, compartiendo alegrías y tristezas, siempre ha sido mejor a su lado. Por ser la mejor familia en la que Dios me pudo haber colocado. Gracias, los amo. A mis cuñadas Odette, Roció, Diana y Fabiola, por ser parte de esta gran familia, por escucharme. Las quiero mucho.

A mis sobrinos:

Pau, José, Juan Emiliano[†], Fer, Juanito, Xime, Teté, Coquito, Dani, Reni, Isabella, Nico, a los pequeños Marianne y Juanito. Por toda la felicidad, aprendizaje y ocurrencias. Por ser parte de mi familia, estoy eternamente agradecida. Los amo.

A mis tíos

Cuca[†], Alma y Juan Manuel por estar siempre pendientes de mí, los adoro.

A la Dra. Gonsebatt, por su profesionalismo, paciencia y por creer en mí.

A mis amigos:

Carla, Lucio, Ángel y Pavel; por ser mi segunda familia.

A mis amigos del alma, Patricia y Aser que mejor que caminar esta vida a su lado.

A mis amigos del INNN: Alelí, Danira, Dinora, Emma, Hilda, Minerva, Verónica, Victoria, y Benjamín, por sus consejos y tiempo que me regalan. Los quiero mucho

A mis amigos del IIB; Miguel, Wendy S., Jorge M., Cristina, Gerardo, Efraín, Erick, Janikua, Cynthia, Mónica y David por los momentos compartidos y toda la ayuda brindada. ¡Gracias!

A mi novio Juan Carlos por darme amor y cariño en este tiempo.

A Odín y Molko por ser la mejor compañía.

ÍNDICE	Página
1) RESUMEN.....	1
2) ABSTRACT.....	2
3) INTRODUCCIÓN	
(1) El arsénico como contaminante ambiental.....	3
(2) Efectos del arsénico sobre la salud humana.....	4
(3) Efectos del arsénico en el SNC.....	5
(4) Metabolismo del arsénico.....	5
(5) Mecanismos neurotóxicos del arsénico.....	7
(6) Sistemas antioxidantes en el SNC.....	8
(7) Sistema GSH y Trx en el SNC.....	9
(8) Fuentes de obtención de cisteínas para la síntesis de GSH.....	10
(9) Transportadores de aminoácidos asociados a la síntesis de GSH.....	12
(10) Factores de transcripción sensibles estrés oxidante.....	14
4) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
5) HIPOTESIS.....	17
6) OBJETIVOS.....	17
7) MATERIAL Y MÉTODOS	
(1) Reactivos.....	18
(2) Animales y tratamiento.....	18
(3) Determinación de los niveles de GSH.....	19
(4) Determinación de la expresión de proteínas y daño oxidante mediante Western Blots	19
(5) Análisis cuantitativo por PCR en tiempo real para la transcripción de <i>nfe212</i> , <i>ikkba</i> y <i>cbs</i>	20
(6) Medición de la producción de H ₂ S.....	21
(7) Análisis de datos.....	22
8) RESULTADOS	
(1) Efecto de la exposición a iAs sobre los niveles de GSH en distintas regiones cerebrales y Trx1 en la corteza.....	23
(2) Expresión de los transportadores de aminoácidos relacionados al transporte de precursores de la síntesis de GSH.....	24
(3) Marcadores de daño oxidante a biomoléculas.....	26
(4) Modulación de subunidades de receptores a glutamato por la exposición a iAs.....	26

(5) Modulación de <i>nfe2l2</i> y <i>ikkbα</i> por iAs. Activación de Nrf2 y NFκB.....	27
(6) Efecto del iAs en la producción de H ₂ S en la corteza cerebral e hígado de ratones.....	28
(7) Efecto del iAs sobre los niveles de proteína y ARNm de <i>cbs</i>	29
9) DISCUSIÓN.....	30
10) CONCLUSIONES.....	34
11) PERSPECTIVAS.....	35
12) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
13) ANEXOS	
(1) Artículos publicados como parte del proyecto de doctorado.....	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Efectos de la exposición a iAs en adultos y niños.....	4
Figura 2. Modelos de la Metilación del iAs ^{III}	6
Figura 3. Metabolismo y síntesis de la L-cys	11
Figura 4. Transportadores relacionados a la síntesis de GSH.....	13
Figura 5. Factores de transcripción asociados a transportadores de aminoácidos precursores de la síntesis de GSH.....	15
Figura 6. Niveles de GSH de diferentes regiones cerebrales.....	23
Figura 7. Expresión de la Trx1 en corteza cerebral.....	24
Figura 8. Expresión de transportadores de L-cys ₂ /L-glu, L-cys y L-glu en corteza cerebral	25
Figura 9. Efectos del iAs sobre los marcadores de estrés oxidante y nitrosante en corteza cerebral.....	26
Figura 10. Expresión de subunidades a receptores de glutamato en corteza cerebral.....	27
Figura 11. Niveles de de ARNm de <i>ikkbα</i> y <i>nfe2l2</i> en corteza cerebral.	28
Figura 12. Capacidad productora de H ₂ S en corteza cerebral e hígado.....	29
Figura 13. Niveles de proteína CBS y ARNm <i>cbs</i> en la corteza cerebral.....	30

ABREVIATURAS

3NT, 3 nitrotirosina
4HNA, 4 hidroxinonenal
ADN, ácido desoxirribonucleico
AMPA, ácido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPA1 y AMPA2, subunidades del receptor AMPA
ANOVA, análisis de varianza
AQP, acuaporina
ARE, elementos de respuesta antioxidante
ARN, ácido ribonucleico
ARNm, ácido ribonucleico mensajero
As, arsénico
AS3MT, arsénico 3-metil transferasa
ATSDR, Agencia de sustancias tóxicas y el registro de enfermedades
BHE, barrera hematoencefálica
cADN, ácido desoxirribonucleico complementario
Ca²⁺, calcio (II)
CBS, cistationin-β-sintasa
CONAGUA, Comisión nacional del agua
CSE, cistationin-γ-liasa
Cu⁺, cobre (I)
CuZnSOD, superóxido dismutasa con cobre y zinc
DMAs, dimetil arsenico
DMAs^{III}(GS), glutatión dimetil arsénico
DTPA, pentaacetato de dietilentriamina
EAAC1,acarreador de aminoácidos excitadores
EAAT, transportadores de aminoácidos excitadores
EE, error estándar
ERNS, especies reactivas de nitrógeno
EROS, especies reactivas de oxígeno
Fe²⁺, hierro (II)
GCS, γ-glutamilcistein sintesa
GLAST, transportador de L-glutamato/L-aspartato
GLT1, transportador de glutamato 1
GLUT, transportador de glucosa
GPx, glutatión peroxidasa
GR, glutatión reductasa
GS, glutatión sintetasa
GSH, glutatión
GSSG, glutatión oxidado
GST, glutatión-S-transferasa
H₂O₂, peróxido de hidrógeno
H₂S, sulfuro de hidrógeno

IARC, Agencia internacional para la investigación del cáncer
iAs, arsénico inorgánico
iAs^{III}(GS)₃, triglutatión arsénico
iAs^{III}, arsenito
iAs^{IV}, arsenato
IFN γ , interferón γ
IKK, cinasa I κ B
IL, interleucina
I κ B α , inhibidor-alfa NF κ B
Keap1, proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch
LAT1, L-transportador ácido de aminoácidos 1
LCE, líquido cerebro espinal
L-cys, L-cisteína
L-cys₂, L-cistina
L-glu, L-glutamato
LTP, potenciación a largo plazo
MA^{III}(GS)₂, diglutatión monometilarsénico
MAs, monometil arsénico
MnSOD, superóxido dismutasa con manganeso
NaAsO₂, arsenito de sodio
NADPH, nicotinamida adeninan dinucleótido fosfato
NF κ B, factor nuclear κ B
NMDA, N-metil-D-aspartato
NR2A y NR2B, subunidades del receptor glutamatérgico de tipo NMDA
Nrf2, factor nuclear (derivado de eritroide 2)
O₂, oxígeno molecular
O₂⁻, anión superóxido
OMS, Organización mundial de la salud
OPA, O-ftalaldehído
PCR, reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RT, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
PLP, piridoxal 5'-fosfato
PB, amortiguador de fosfatos
PBS, amortiguador de fosfatos salino
Prx, peroxirredoxina
SAH, S-adenosil-homocisteína
SAM, S-adenosil-metionina
SDHA, succinado deshidrogenasa
SNC, sistema nervioso central
SOD, superóxido dismutasa
TNF α , factor de necrosis tumoral α
Trx, tiorredoxina
TR, tiorredoxina reductasa
xCT, intercambiador de L-cistina/ L-glu

γ -GluCys, γ -glutamylcisteina

1) RESUMEN

Los metales y metaloides son contaminantes ambientales relacionados con el desarrollo de distintas enfermedades. La exposición a arsénico inorgánico (iAs) está asociada a neurotoxicidad y la severidad depende de la dosis recibida. En la mayoría de los mamíferos el iAs cruza la barrera hematoencefálica (BHE) y una vez dentro de las células es metilado. Esto ocurre en prácticamente todas las regiones del sistema nervioso central (SNC). La metilación de iAs requiere de la presencia de agentes reductores tales como el glutatión (GSH), tioredoxina (Trx) y de la S-adenosil metionina (SAM) como donador de grupos metilo. Las vías de síntesis de SAM y GSH están conectadas a través de la vía de transulfuración en donde la cistationina- β -sintasa (CBS) es la enzima principal que participa en la producción del neuromodulador, sulfuro de hidrógeno (H_2S). El GSH (γ -L-glutamil-L-cysteinil-glicina) es el principal antioxidante presente en el SNC que cruza pobremente la BHE, por lo tanto los niveles de GSH en el SNC dependen de la síntesis *de novo* que es limitada por la disponibilidad de los aminoácidos L-cistina (L-cys₂)/ L-cisteína (L-cys). En este trabajo, se exploran las alteraciones tempranas en el SNC durante una exposición aguda a iAs. Para ello, investigamos los cambios en los niveles de GSH, Trx1, así como en la expresión de los transportadores de aminoácidos que participan en la síntesis de GSH como los transportadores de L-cys₂/L-cys, el transportador de L-glutamato/L-aspartato (GLAST) y el transportador de glutamato 1 (GLT1). También estudiamos los cambios en la expresión de su receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), así como la de la enzima CBS y la producción de H_2S en la corteza de ratones machos CD1. También, exploramos la actividad del factor nuclear (derivado de eritroide 2) (Nrf2) y del factor nuclear κ B (Nf κ B), que son modulados por cambios redox. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 5 o 14 mg/kg de arsenito de sodio. Los animales se sacrificaron a 2, 6 y 24 h. Nf κ B y Nrf2 se activaron a las 2 y 6 h respectivamente y los niveles de GSH aumentaron significativamente a las 24 h en la corteza. Este aumento en los niveles de GSH se relacionaron directamente con un aumento en la expresión del intercambiador de L-cistina/ L-glutamato (xCT), del acarreador de aminoácidos excitadores (EAAC1), GLAST y GLT1 en esta misma región. La sobrerregulación de los transportadores a las 24 h, fue acompañada por disminución en la expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA y la sobreproducción del neuromodulador H_2S , lo que sugiere una activación de la vía de transulfuración en la corteza que podría aportar (L-cys) para la síntesis de GSH y estar además, cumpliendo un papel neuroprotector.

2) ABSTRACT

Environment toxic agents such as metals and metalloids constitute the leading cause of disease worldwide. Inorganic arsenic (iAs) exposure is associated with neurotoxicity whose severity depends on the dose received. iAs crosses the blood-brain barrier (BBB) and is methylated in different brain regions. iAs methylation requires the presence of cellular reductants such as thioredoxin (Trx1) and glutathione (GSH) and S-Adenosyl methionine (SAM) as the methyl donor. SAM pathway and GSH production are linked through the transsulfuration pathway where cystathionine- β -synthase (CBS) is a main component participating also in the production of the neuromodulator hydrogen sulfide (H_2S). GSH is the main antioxidant in the central nervous system (CNS) which penetrates the BBB poorly, therefore, CNS GSH levels depend on *de novo* synthesis that is limited by the availability of the sulfhydryl amino acids L-cystine (L-cys2)/L-cysteine (L-cys). Mice exposed *in utero* and up to 3 months of age to iAs, showed increased extracellular levels of glutamate in the hippocampus, impaired Long-Term Potentiation response, and learning and memory abilities. Here, we explored the early CNS response to iAs, determining GSH levels and the expression of L-cystine (L-cys2)/L-cysteine (L-cys) transporters as well as GLAST and GLT-1 glutamate transporters, NMDA receptor expression as well as the expression of CBS and hydrogen sulfur (H_2S production in CD1 male mice brain regions. We also explored the activation of nuclear factors such as nuclear factor kappa B (NF κ B) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Mice received a single intraperitoneal injection containing 5 or 14 mg/kg of sodium arsenite. Animals were killed at 2, 6, 24 h. NF κ B and Nrf2 were activated at 2 and 6 h after exposure. Increased GSH levels were observed at 24 h. The higher levels of GSH were significantly and positively associated with increased expression of glutamate/cysteine antiporter (xCT), excitatory amino acid carrier (EAAC1), glutamate aspartate transporter (GLAST) and glutamate transporter 1 (GLT-1) in the cortex. Upregulation of these transporters at 24 h, was accompanied by the downregulation of NR2B NMDAR subunits expression and the overproduction of the neuromodulator H_2S , which could be playing a protective role.

3) INTRODUCCIÓN

(1) El arsénico como contaminante ambiental

El arsénico (As) tiene propiedades de metales y no metales, por lo que es clasificado como metaloide, sin embargo, frecuentemente se le refiere como un metal. Este elemento con número atómico 33, en la tabla periódica, se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente en el aire, agua y tierra. Generalmente, el As se encuentra combinado con otros elementos como oxígeno, cloro y azufre; en esta combinación se conoce como arsénico inorgánico. Mientras que el As combinado con carbono e hidrógeno se conoce como arsénico orgánico. Los compuestos de arsénico inorgánico (iAs), como los que se encuentran en el agua) son extremadamente tóxicos, en tanto que los compuestos de arsénico orgánico (como los que se encuentran en pescados y mariscos) son menos perjudiciales para la salud, a excepción de los metabolitos metilados que se forman por la actividad de la arsénico 3 metil transferasa (As3MT). El As es la sustancia tóxica más prevalente en el ambiente (ATSDR, 2007). Es por lo que la Agencia de sustancias tóxicas y el registro de enfermedades (ATSDR) coloca al As en la lista de prioridad de sustancias peligrosas sobre otros metales tóxicos como el plomo, cadmio y mercurio, debido a la frecuencia de la exposición y toxicidad sobre la salud humana (ATSDR, 2017). El iAs se encuentra naturalmente presente en altos niveles en las aguas subterráneas de diversos países incluyendo México. Los alimentos tales como: pescados, mariscos, carnes, aves de corral, productos lácteos y cereales también pueden ser fuentes alimentarias de arsénico. En el marisco, el arsénico está presente principalmente en su forma orgánica menos tóxica. Este elemento se utiliza industrialmente como agente de aleación, también en el procesamiento de vidrio, pigmentos, textiles, papel, adhesivos metálicos, protectores de madera y municiones. El arsénico también se emplea en los procesos de curtido de pieles, fabricación de plaguicidas, aditivos y en quimioterapias farmacéuticos. Las personas que fuman tabaco también pueden estar expuestas al iAs que contiene tabaco natural (OMS, 2018).

La exposición al iAs es principalmente por el agua de bebida lo que representa un problema grave de salud pública. Al menos 140 millones de personas están expuestas a niveles de iAs en agua por encima de los recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (OMS, 2018) (Garza-Lombo *et al.*, 2019). Esta situación ha sido descrita en algunas partes de Argentina, Bangladesh, Chile, China, Hungría, India, México, Rumania, Taiwán, Vietnam y el suroeste de Estados Unidos. En México regiones en los estados de Durango, Chihuahua, Zacatecas sobrepasan el límite máximo permisible para agua de consumo humano en nuestro país, de 0.025 mg/L según la NOM-127-SSA1-1994, (Salud, 2000). Por ello, en nuestro país, se calcula que existen al menos 1.5 millones de personas que ingieren agua en una concentración mayor a 0.025 mg As/L y de éstos, aproximadamente 150,000 se encuentran en

mucho mayor riesgo por ingerir las concentraciones más altas de arsénico en agua 0.075-0.530 mg As/L (Alfaro De La Torre M.C., 2018).

(2) Efectos del arsénico sobre la salud humana

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), clasifica al arsénico en el grupo 1 como un carcinógeno humano porque la exposición a este elemento está asociada con cáncer de piel, vejiga, hígado y pulmón. Otras enfermedades relacionadas a la exposición a As (Figura 1) incluyen enfermedades vasculares y periféricas, neurológicas y diabetes mellitus, así como la enfermedad crónica del hígado (Abernathy *et al.*, 2003, Luz María Del Razo, 2018, Gonsebatt, 2018).

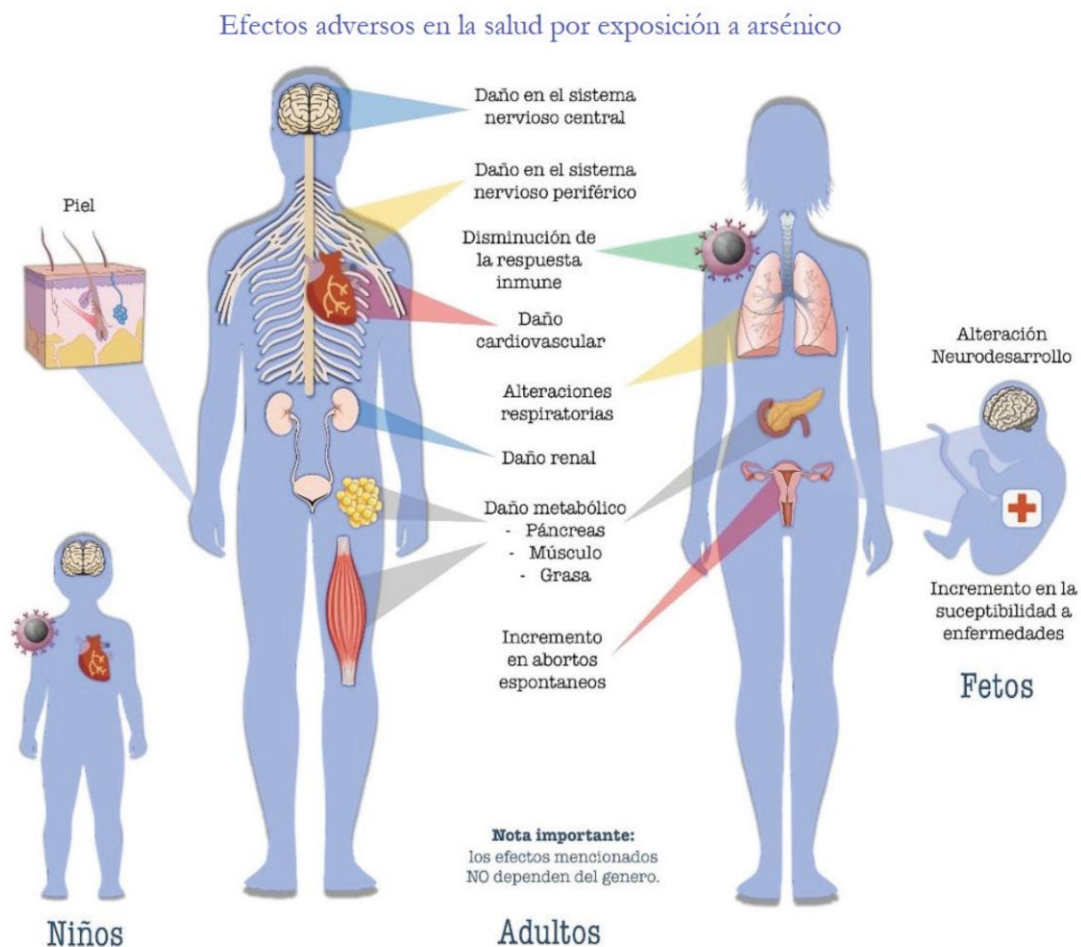


Figura 1. Efectos de la exposición a arsénico en adultos y niños. Tomado de (Gonsebatt, 2018)

(3) Efectos del arsénico en el SNC

La exposición aguda a iAs está relacionada con encefalopatías de moderadas a severas, dependiendo de la dosis. Los síntomas incluyen, confusión, alucinaciones, pérdida de la memoria y labilidad emocional (cambios exagerados en afecto y estado de ánimo) (Garza-Lombo *et al.*, 2019). Por otra parte, la exposición crónica a niveles bajos de iAs en el agua de bebida está asociada con alteraciones en la memoria y aprendizaje, tanto en niños como en adultos (Calderon *et al.*, 2001, Rodriguez *et al.*, 2003). Estudios en animales han mostrado que los niveles de As en cerebro están relacionados con los niveles de iAs en el agua de bebida, demostrando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica por el arsénico (Luo *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2017).

(4) Metabolismo del arsénico

La ingesta oral de iAs a través del agua de bebida en humanos, predomina en las formas iAs^{III} (arsénico trivalente) en aguas poco oxigenadas y iAs^V (arsénico pentavalente) en más oxigenadas. Diversos estudios en humanos demuestran que la absorción gastrointestinal de iAs^{III} y iAs^V es extensa, con una eliminación en orina del 45%-75% de una dosis oral (Ng *et al.*, 2015). En mamíferos, el As^V es capturado por las células a través de transportadores de fosfatos, mientras que el As^{III} lo hace a través de transportadores de acuaporinas y acuagliceroporinas 7 y 9 (AQP7 y AQP9) y por transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT4). La entrada del arsénico al cerebro es a través de GLUT1, mayoritariamente presente en las células epiteliales que forman la barrera hematoencefálica (BHE) (Rosen & Liu, 2009). Estudios demuestran que la administración aguda de arsenito de sodio (NaAsO₂) es suficiente para acumularse en el cerebro de manera diferencial en distintas estructuras cerebrales (Li *et al.*, 2017).

El metabolismo del arsénico ha sido ampliamente estudiado, y la biometilación ha sido considerada como el principal proceso de metabolismo (Sun *et al.*, 2016). El hígado es el sitio más importante donde se lleva a cabo la metilación del arsénico, pero la mayoría de los órganos metilan iAs incluyendo el cerebro (Rodriguez *et al.*, 2005).

La mayor parte del iAs absorbido, está en la forma de iAs^V, y es rápidamente reducido en la sangre a su forma de iAs^{III} (Vahter, 2002). El iAs^{III} es metilado por la vía clásica de metabolización de iAs, a través de una serie de reacciones de metilación-oxidativa y posteriores eliminaciones reductivas (Challenger, 1951). Estas metilaciones son catalizadas predominantemente por la arsénico 3-metil transferasa (AS3MT), usando a la S-adenosil-metionina (SAM) como donador de grupos metilo (Thomas *et al.*, 2004, Thomas *et al.*, 2007). Se ha propuesto que el glutatión (GSH) y otras moléculas como la tiorredoxina (Trx), funcionan como agentes reductores de compuestos intermediarios productos de la metilación

oxidativa de iAs^V a compuestos de iAs^{III} (Thomas et al., 2004), para que sean metilados nuevamente por la AS3MT (Figura 3A).

También se ha propuesto otro mecanismo de metilación de iAs vía la conjugación con GSH, donde los complejos de GSH, mejor conocido como triglutatión arsénico ($iAs^{III}(GS)_3$). Esta conjugación ocurre de manera enzimática por la actividad de la glutatión-S-transferasa (GST) y también de manera no enzimática (Leslie *et al.*, 2004, Watanabe & Hirano, 2013). Los complejos de $iAs^{III}(GS)_3$ son metilados vía la acción de AS3MT para formar el diglutatión monometilarsénico ($MA^{III}(GS)_2$) y así generar glutatión dimetil arsénico ($DMA^{III}(GS)$). Cuando los niveles de GSH son bajos, los conjugados pueden ser hidrolizados y después oxidados para generar monometil arsénico (MA^V) y dimetil arsénico (DMA^V) (Watanabe & Hirano, 2013, Kobayashi *et al.*, 2005) (figura 3B).

La metilación del iAs es considerada la vía de desintoxicación del arsénico, sin embargo, también se sugiere que la metilación es la vía de toxicificación o el paso de bioactivación. La toxicidad del arsénico depende de su valencia y de la especie química en la que se encuentre, así como de la especie animal y el tipo celular (Sun et al., 2016). En general las especies pentavalentes son menos tóxicas, que sus contrapartes trivalentes (Schwerdtle *et al.*, 2003). Debido a que el arsénico trivalente se absorbe y se acumula con mayor eficiencia en distintos órganos y células, que el arsénico pentavalente (Styblo *et al.*, 2000, Hirano *et al.*, 2004).

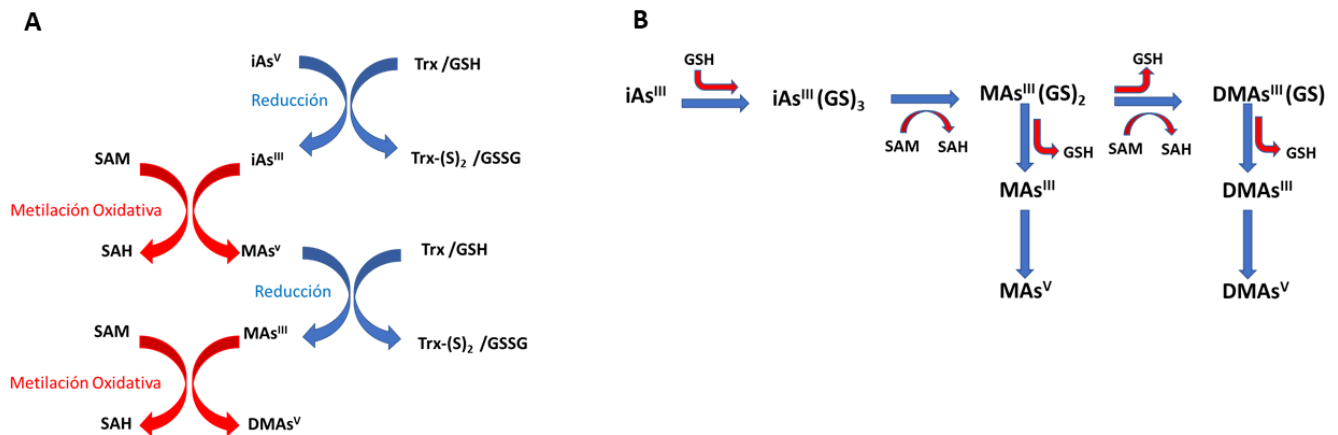


Figura 2. Metilación del arsénico trivalente (As^{III}). 3A Metilación oxidante del iAs^{III} usando como donador de grupos metilo S-adenosil-metionina (SAM), formando S-adenosil-homocisteína (SAH) y especies metiladas de arsénico inorgánico (iAs) tales como monometil arsénico (MA) y dimetil arsénico (DMA). Las especies metiladas de iAs , son reducidas de su forma pentavalente a su forma trivalente, por la tiorredoxina (Trx) y glutatión (GSH). Modificada de (Thomas et al., 2004). 3B Metilación de iAs^{III} vía conjugación con GSH, los conjugados triglutatión arsénico ($iAs^{III}(GS)_3$) son metilados vía la acción de Arsénico 3-metil transferasa (AS3MT) para formar el diglutatión monometilarsénico ($MA^{III}(GS)_2$) y posteriormente generar glutatión dimetil arsénico ($DMA^{III}(GS)$). Los conjugados son hidrolizados y después oxidados para generar MA^V y DMA^V modificada (Thomas, 2007).

(5) Mecanismos neurotóxicos del iAs

Los efectos neurotóxicos del iAs están asociados a mecanismos que causan neurodegeneración tales como el estrés oxidante, disfunción mitocondrial e inflamación (Garza-Lombo et al., 2019). Debido al alto consumo de O₂ y de contenido de lípidos, el cerebro es vulnerable al estrés oxidante (Patel, 2016). Diversos trabajos *in vivo* e *in vitro* han demostrado la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) y especies reactivas de nitrógeno (ERNS) por la exposición a iAs en el sistema nervioso central (SNC) (Ahmad et al., 2000, Garcia-Chavez et al., 2003, Flora et al., 2009). Se ha demostrado que la generación de EROS provienen del daño a los complejos mitocondriales principalmente I, II y IV seguidos de eventos como la carbonilación de proteínas y peroxidación lipídica (Jomova et al., 2011). La exposición a iAs va acompañada de daño a biomoléculas y disminución en los sistemas antioxidantes (Rao & Avani, 2004, Flora et al., 2009, Rodriguez et al., 2005). Se ha propuesto que durante la metilación del iAs dos sistemas antioxidantes (GSH y Trx) importantes del SNC participan, tanto como agentes reductores y en la formación de complejos de iAs-GSH lo cual lo hacen más vulnerable al estrés oxidante (Thomas et al., 2004, Watanabe & Hirano, 2013). Distintos trabajos han reportado niveles disminuidos de GSH en animales expuestos a iAs en diferentes regiones cerebrales de roedores, acompañados con un aumento de distintos marcadores a estrés oxidante (Flora et al., 2005, Flora, 1999) (Shila et al., 2005). El sistema Trx también se ve modificado en el cerebro de ratón por la exposición a iAs a nivel de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y va depender de la región, la dosis administrada y del sexo del roedor (Bardullas et al., 2009, Rodriguez et al., 2010). Durante la metilación oxidativa de iAs, hay consumo de SAM, el cual también se requiere para las señales epigenéticas dependientes de la metilación de ácido desoxirribonucleico (ADN), modificación de histonas y metilación proteica. Por lo tanto, la presencia de iAs en el organismo puede producir efectos en el control epigenético de expresión de genes por la reducción de los niveles de SAM por la exposición a iAs (Garza-Lombo et al., 2019). Diversos genes involucrados en la neuroplasticidad tienen patrones de metilación alterados cuando se exponen a iAs durante el desarrollo (Martinez et al., 2011). Dentro de los efectos neurotóxicos del iAs se encuentran la neuropatía periférica, que ha sido relacionado con alteraciones en la composición de mielina a través de cambios en la metilación de argininas y la disposición de grupos metilo de colina (Zarazua et al., 2010) (Rios et al., 2012).

El iAs induce la expresión de moléculas tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 8 (IL-8) (en humanos) y distintas respuestas inflamatorias como el aumento de interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6, interferón gamma (IFN γ), y TNF α en cultivos de microglía y astrocitos, así como en el hipocampo de ratón (Escudero-Lourdes et al., 2016, Firdaus et al., 2018, Mao et al., 2016). La neurotoxicidad inducida por

iAs también va acompañada de cambios en el metabolismo de neurotransmisores y se observan cambios en la transmisión sináptica (Rodríguez et al., 2003). En de nuestro grupo de trabajo se ha reportado que la exposición gestacional a iAs aumenta la expresión del intercambiador de L-cistina (L-cys₂)/L-glutamato (L-glu) (xCT), disminución de los niveles del transportador de glutamato 1 (GLT1), con un aumento en los niveles de glutamato extracelular, una deficiente inducción de la potenciación a largo plazo (LTP), cambios en la expresión de subunidades del receptor ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (AMPA) y del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (NMDAR) en el hipocampo murino (Ramos-Chavez et al., 2015). También se ha reportado una disminución en la expresión del receptor α7 nicotínico en ratas (Monaco et al., 2018). Otros trabajos también han reportado los efectos de la exposición a iAs en los sistemas dopaminérgico (Kim et al., 2014) y colinérgico (Srivastava et al., 2014).

(6) Sistemas antioxidantes en el SNC

Como se mencionó antes el cerebro es vulnerable al estrés oxidante debido no solamente a su alto consumo de oxígeno sino también por la señalización a través del calcio (II) (Ca²⁺), excitotoxicidad por glutamato, alta cantidad de lípidos insaturados, alta concentración de metales de transición Hierro (II) (Fe²⁺) y Cobre (I) (Cu⁺), el metabolismo de neurotransmisores como la dopamina y la auto oxidación de neurotransmisores como la dopamina. Además, el estrés oxidante en el cerebro, está íntimamente ligado a procesos neurodegenerativos (Cobley et al., 2018).

El SNC tiene sistemas antioxidantes sencillos por lo que lo harían vulnerable al estrés oxidante (Halliwell, 1992, Halliwell, 2006). Todas las regiones del cerebro y del sistema nervioso contienen superóxido dismutasa con cobre y zinc (CuZnSOD), superóxido dismutasa con manganeso (MnSOD), GSH (a niveles mM), glutatión peroxidasa (GPx) y el sistema trx/peroxiredoxina(Prx) (Halliwell, 2006). Las enzimas superóxido dismutasa (SOD) remueven al anión superóxido (O₂^{·-}) (Fridovich, 1989). Las MnSODs están presentes en la matriz mitocondrial, mientras que las SOD cobre/zinc están en el espacio intermembranal mitocondrial y en el resto de la célula (Halliwell, 2006). Por su parte las catalasas remueven el peróxido de hidrogeno (H₂O₂), pero en el cerebro no cumplen funciones importantes, ya que no están presentes en las mitocondrias en donde se genera el O₂^{·-} (Turrens, 2003). Anteriormente se creía que la enzima más importante que remueve H₂O₂, era la GPx, una familia de enzimas que contienen selenio. Este grupo de enzimas reducen el H₂O₂ acompañados de la oxidación de GSH (Brigelius-Flohe, 1999, Halliwell, 2006). Actualmente se sabe que las peroxiredoxinas son la familia de peroxidases más importante que reducen el H₂O₂ y peróxidos orgánicos (Rhee et al., 2005). La defensa antioxidante cerebral tiene menor cantidad de antioxidantes comparado con otros tejidos (hígado), como

en el caso de la catalasa, (Ren *et al.*, 2017), así como un menor contenido de superóxido dismutasa y una actividad reducida de la glutatión peroxidasa en comparación con el hígado y riñón (Dringen *et al.*, 2000). Otros antioxidantes presentes en el cerebro de bajo peso molecular son el GSH, la Trx, la vitamina C, Vitamina E y coenzima Q (Halliwell, 2006).

(7) Sistema GSH y Trx en el SNC.

El GSH es el antioxidante endógeno más importante y tiene un papel importante en la desintoxicación de xenobióticos, así como en mantener el balance redox. El desbalance o disminución de los niveles de GSH está involucrado en diferentes desórdenes tal como el autismo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, desorden bipolar, esquizofrenia y esclerosis múltiple (Gu *et al.*, 2015). También, su disminución ha sido relacionado con las alteraciones de funciones cognitivas y el envejecimiento (Currais & Maher, 2013).

El GSH es un péptido formado por 3 aminoácidos (γ -L-glutamil-L-cysteinil-glicina), es el tiol esencial, más abundante en las células de mamífero. Es sintetizado por la acción de dos enzimas: la γ -glutamilcistein sintetasa (GCS) que usa L-glu y L-cys como sustratos y forma el péptido γ -GluCys (γ -glutamilcisteína), que se combina con la glicina en una reacción catalizada por la glutatión sintetasa (GS) para generar el GSH. El GSH tiene funciones importantes como antioxidante y molécula de almacenamiento de L-cys. Forma compuestos para la desintoxicación de xenobióticos, así como también es un cofactor para reacciones de isomerización. Además, el GSH mantiene a los grupos sulfidrilos de las proteínas reducidos. El sistema GSH es especialmente importante para la defensa contra las EROS, ya que es capaz de reaccionar directamente con los radicales de manera no enzimática y es un donador de electrones en la reducción de peróxidos catalizada por la GPx. El producto de la oxidación de GSH es el GSSG (glutatión oxidado). El GSH es regenerado de su forma oxidada en una reacción catalizada por la glutatión reductasa (GR). Durante las reacciones catalizadas por la GPx y GR, el GSH es reciclado, sin embargo el GSH es consumido constantemente durante la generación de GSH-S-conjugados por la GST o por su transporte hacia el exterior celular. Ambos procesos disminuyen los niveles del GSH intracelular, es por ello que el GSH necesita ser sintetizado continuamente a partir de sus aminoácidos (Dringen *et al.*, 2000).

El cerebro contiene GSH en diferentes concentraciones que varían de 2-3 mM en distintas regiones, siendo mayor en la corteza cerebral (Gu *et al.*, 2015). Los niveles de GSH dependen del tipo celular siendo menor en neuronas que en astrocitos, por su parte la microglía contiene niveles mayores que en

las neuronas o astrocitos *in vitro*. Ello sugiere que hay mecanismos reguladores del metabolismo y homeostasis de GSH específico para cada región y tipo celular (Aoyama & Nakaki, 2013).

El sistema Trx consiste en un donador de electrones y dos proteínas oxidoreductasas antioxidantes: El nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como donador de electrones y Trx y la tiorredoxin reductasa (TR) cómo oxidorreductasas. La Trx es una proteína pequeña de 12 KD y tiene un sitio conservado de Cys-Pro-Gly-Cys, esencial para su función como oxidorreductasa y donadora de electrones para algunas Prx. Además, la Trx es un regulador de funciones celulares en respuesta a señales redox y estrés, modulando varias vías de señalización, factores de transcripción y respuestas inmunológicas (Silva-Adaya *et al.*, 2014). Las Trx reducidas son potentes reductasas con un amplio espectro de sustratos, como la actividad de intercambio de grupos disulfuro-ditiol que catalizan la conversión de puentes disulfuro en tioles con una alta eficiencia. Los disulfuros en las Trx oxidadas son convertidas a tioles consumiendo NADPH a través del ciclo redox vía TrxR (Ren *et al.*, 2017). Las Trx son un regulador importante del balance redox en la célula y ha sido implicado en la supervivencia celular en condiciones tales como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Silva-Adaya *et al.*, 2014). El sistema Trx y TrxR está ampliamente expresado en varios tejidos incluidos el cerebro de distintas especies como el ratón, rata y humano (Silva-Adaya *et al.*, 2014).

(8) Fuentes de obtención de cisteínas para la síntesis de GSH

A pesar de que los niveles de aminoácidos varían en los diferentes tejidos o tipos celulares, los niveles de glutamato intracelular (1-10 nM) y glicina (2 mM en astrocitos y 10 mM en neuronas) son mucho mayores a los niveles de L-cisteína (L-cys) (0.15 mM), por lo que los niveles de L-cys intracelular son considerados el factor limitante para la síntesis de GSH (Aoyama & Nakaki, 2013). La L-cys, por la presencia de un grupo SH resulta muy reactiva y en elevadas concentraciones en el cerebro resulta neurotóxica (Janaky *et al.*, 2000), por lo que se considera que el GSH es una forma no tóxica de almacenar L-cys de 10-100 veces más que su concentración libre en los tejidos. El GSH liberado por el hígado no llega al cerebro, debido a la presencia de la BHE, por lo que el GSH entra pobremente al SNC por difusión pasiva (Cornford *et al.*, 1978). Debido a su naturaleza, la L-cys no cruza la BHE. Sin embargo, la forma oxidada, de disulfuro de dos L-cys o cistina, L-cys₂, si se transporta (Olney *et al.*, 1990). Así la L-cys₂ está presente en el plasma en mayor concentración que la L-cys, GSH u otro tiol, por lo que la L-cys₂ es la principal fuente de tioles en el cerebro (Wang & Cynader, 2000).

Además de su presencia en la proteína dietaria, se ha documentado que el aminoácido metionina es una fuente importante de L-cys para la síntesis de GSH en células como los astrocitos (McBean, 2012). La conversión de metionina a L-cys conocida como vía de transulfuración se lleva a cabo teniendo como

intermediarios a homocisteína y cistationina. Actualmente se sabe que la transulfuración proporciona aproximadamente un tercio de la L-cys requerida para la síntesis de GSH en condiciones normales en astrocitos primarios y células de glioma (Paul *et al.*, 2018). Los componentes de la vía de la transulfuración son dos enzimas dependientes de piridoxal fosfato, la cistationin- β -sintasa (CBS) y la cistationin- γ -liasa (CSE). La L-cys es generada por la enzima CSE a partir de cistationina, que es formado por la condensación de homocisteína y serina por CBS (Paul *et al.*, 2018). La enzima CBS esta expresada predominantemente en el cerebro y riñones de ratones (Kabil *et al.*, 2011), es distribuida de manera homogénea en el cerebro adulto de ratón (Enokido *et al.*, 2005). CSE se expresa menos que CBS en el cerebro y hay evidencia de que CBS es más importante que CSE en la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) en astrocitos (McBean, 2017). A su vez, la L-cys es sustrato de CSE y CBS para generar (H_2S) el que también puede ser producido a partir de homocisteína por CSE y CBS. El H_2S tiene varios efectos en el cerebro, entre los cuales se incluye la habilidad de proteger neuronas del estrés oxidante aumentando los niveles de GSH (Kimura *et al.*, 2006, Kimura *et al.*, 2010).

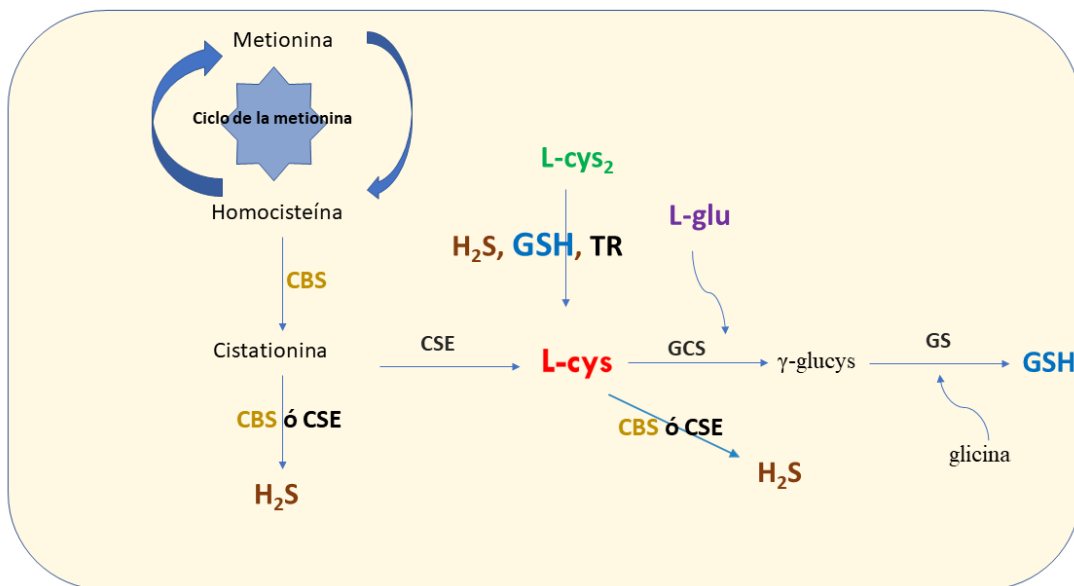


Figura 3. Metabolismo y síntesis de la L-cisteína (L-cys). La L-cistina (L-cys₂) es reducida a L-cys por la tiorredoxina reductasa TR o Glutación (GSH) o sulfuro de hidrógeno (H_2S). La L-cys es sintetizada a partir de metionina por la vía de la transulfuración por la acción de cistationin- β -sintasa (CBS) y cistationin- γ -liasa (CSE). La homocisteína y la cistationina son intermediarios de la vía de transulfuración. El GSH es sintetizado por la L-cys y glutamato, por la acción de la γ -glutamilcistein sintasa (GCS) formando la γ -glucocys seguido por la adición de glicina en una reacción catalizada por la glutatión sintetetasa (GS). La formación de H_2S a partir de L-cys o cistationina por CBS y CSE. Modificada de (McBean, 2017).

(9) Transportadores de aminoácidos relacionados con la síntesis de GSH

Como ya se mencionó antes, L-cys, L-glu y glicina son los aminoácidos que forman la molécula de GSH. Estos aminoácidos llegan a los astrocitos y neuronas a través de proteínas transportadoras específicas localizadas en la membrana celular. La expresión de estos transportadores puede ser modulada por la presencia de agentes xenobióticos (Limón Pacheco et al., 2007; Ramos-Chávez et al., 2015). A continuación, se describen los transportadores que se han asociado a la síntesis del péptido GSH en astrocitos y neuronas.

La L-cys no cruza la BHE, sin embargo su forma disulfurada con dos L-cys, la L-cys₂ es transportada de la sangre a las células endoteliales de la BHE a través del transportador de L-cys₂, llamado sistema xCT, la L-cys₂ es subsecuentemente reducida a L-cys y transportada hacia el líquido cerebro espinal (LCE) por un L-transportador ácido de aminoácidos (LAT1) en la BHE (Aoyama & Nakaki, 2013).

Las neuronas maduras importan la L-cys extracelular, pero no L-cys₂. Aproximadamente el 90% de la L-cys total importada por las neuronas es mediada por los transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT). Los EAAT son transportadores dependientes de sodio y remueven el glutamato extracelular en el SNC (Kanai & Hediger, 2003). 5 EAATs han sido clonados: el transportador de L-glu/aspartato (EAAT1, GLAST), transportador de glutamato 1 (EAAT2, GLT1), acarreador de aminoácidos excitadores (EAAT3, EAAC1), EAAT 4 y EAAT5 (Danbolt, 2001).

GLAST y GLT1 son expresados principalmente en astrocitos, y EAAC1, EAAT4 y EAAT5 se expresan en neuronas (Danbolt, 2001). EAAT4 y EAAT5 son exclusivamente localizados en neuronas de Purkinje y en la retina respectivamente, mientras que la proteína EAAC1 está ampliamente expresada en todo el cerebro. El exceso de glutamato extracelular es removido por EAATs, especialmente por GLT1, pero no por EAAC1. Los EAATs no solo transportan glutamato, sino también L-cys. En particular, EAAC1 tiene una mayor afinidad por L-cys con una eficacia de 10 a 20 veces mayor que GLAST o GLT1 (Aoyama & Nakaki, 2013). Además, EAAC1 es el transportador principal de importación de L-cys, y su deficiencia altera el metabolismo del GSH y genera estrés oxidante (Aoyama et al., 2006).

En astrocitos, la L-cys es importada en intercambio por L-glu por medio del intercambiador de L-cys₂/L-glu, xCT. Ya dentro de la célula es reducido a L-cys, ya sea por GSH o por TrxR (Mandal et al., 2010). El intercambio de L-cys₂ por L-glu viene acompañado por un posible riesgo de daño debido a que la salida de L-glu puede activar receptores de glutamato, aunque también el glutamato puede ser captado de manera eficiente por los recaptadores de glutamato (McBean, 2017). Ratones con deleciones en xCT, tienen un aumento en las concentraciones de glutamato extracelular en el hipocampo y memoria

espacial alterada, la cual es pronunciada en ratones jóvenes, acompañadas de susceptibilidad a convulsiones como resultado de cambios por la deficiencia de xCT (De Bundel *et al.*, 2011).

Los recapturadores de glutamato GLAST y GLT1 son los principales transportadores que mantienen los niveles óptimos de glutamato extracelular, que son menores que los intracelulares. El transportador de glutamato GLT1 es el principal importador de glutamato en astrocitos de cerebro humano, removiendo el 90% del glutamato extracelular cortical y se expresa de 4 a 6 veces más que GLAST en astrocitos (Valdovinos-Flores & Gensebatt, 2012, Rao *et al.*, 2015).

A pesar de que el GLT1 es el mayor recapturador, que remueve el exceso de glutamato de la hendidura sináptica, GLAST tienen un rol importante en la prevención del daño neuronal excitotóxico. La inhibición del GLAST aumenta los niveles extracelulares de glutamato que llevan a excitotoxicidad y a la muerte neuronal en ratones (Maragakis & Rothstein, 2004).

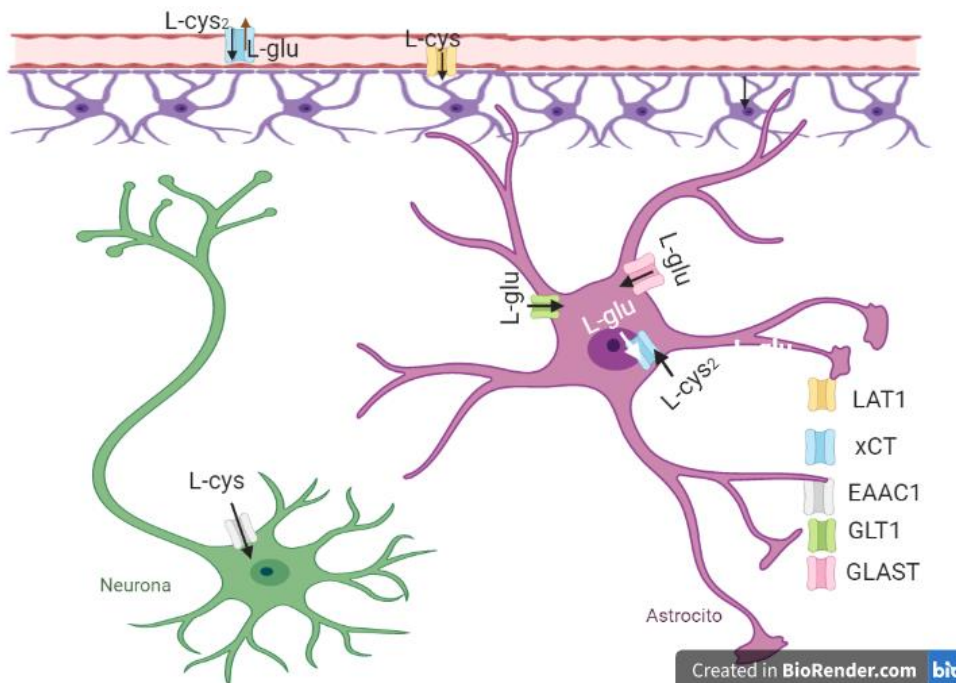


Figura 4. Transportadores de aminoácidos relacionados a la síntesis de glutatión (GSH). El intercambiador de L-cistina (L-cys₂)/L-glutamato (L-glu) (xCT) es un intercambiador, que importa L-cys₂ y exporta L-glu. Este transportador está presente en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (BHE) y en los astrocitos. El transportador de L-cisteína (L-cys), acarreador de aminoácidos excitadores (EAAC1), importa L-cys en la neurona. El transportador de glutamato 1 (GLT1) y el transportador de L-glutamato/L-aspartato (GLAST) se encargan de importar L-glu al astrocito. Creada en BioRender.com

(10) Factores de transcripción sensibles al estrés oxidante

Las alteraciones del estado redox celular, activan vías de señalización como los mecanismos de defensa que atrapan radicales libres y reducen el riesgo al daño celular por la oxidación de proteínas, lípidos y ADN. En la activación de estas vías participan factores de transcripción que promueven la expresión de elementos de respuesta antioxidante (ARE), para neutralizar procesos oxidantes, así como respuestas inflamatorias (Sivandzade *et al.*, 2019). Los factores de transcripción, factor nuclear (derivado de eritroide 2) Nrf2 y el factor nuclear kappa B (NFkB) son dos complejos proteicos sensibles al estado redox de la célula. Nrf2 es el factor sensible al estado redox por antonomasia, es un modulador primario de sistemas constitutivos o inducibles para regular la homeostasis redox. Este proceso incluye la activación de la síntesis de antioxidantes (GSH, Trx, entre otros), moléculas antiinflamatorias, enzimas de fase I y II, enzimas de fase III, transportadores de aminoácidos y atrapadores de radicales (Sivandzade *et al.*, 2019). El Nrf2 es una proteína que reside en el citoplasma y que se encuentra en niveles basales bajos, dentro del citoplasma Nrf2 es secuestrado por la proteína Keap1 que lo presenta a una E3 ligasa que lo marca mediante ubiquitinación para su posterior degradación proteosomal. Las cisteínas de Keap1 son sensibles a cambios redox por estrés oxidante, como consecuencia, al oxidarse Keap 1 se separa de Nrf2, y este último se transloca al núcleo, donde se une a secuencias ARE (del inglés: Antioxidant Responsive Element) que contienen los promotores de genes asociados a la desintoxicación de EROS, por lo que se promueve la transcripción de los genes de respuesta antioxidante, así como la de su mismo gen (*nfe2l3*), promoviendo la homeostasis redox.(G *et al.*, 2017).

Por su parte, el factor de transcripción NFkB modula la respuesta celular inmunológica a consecuencia de una infección por ejemplo, y a cambios en el estado redox, coordinando respuestas proinflamatorias. Similar a Nrf2, NFkB es secuestrado en el citosol por el inhibidor-alfa NFkB (Ikb α). La liberación de NFkB requiere la fosforilación de Ikb α por la proteína IKK. La modificación de Ikb α lleva a su degradación proteosomal, liberando a NFkB para su translocación nuclear en donde inicia la transcripción de proteínas (incluyendo la de su modulador *ikkb α*) para restaurar la homeostasis y cuando el desbalance en el estrés redox está en niveles extremos(Stefanson & Bakovic, 2014). Se ha documentado que Nrf2 y NFkB tienen sitios de unión a promotores de transportadores de aminoácidos en el cerebro y/o se ha reportado que la activación o inhibición de los factores de transcripción Nrf2 y NFkB han sido asociados a la regulación de la expresión de los transportadores de aminoácidos xCT, EAAC1, LAT, GLT1 y GLAST (Valdovinos-Flores & Gonsebatt, 2012, Martinez-Lozada *et al.*, 2016, Pajarillo *et al.*, 2019) (Figura 6).

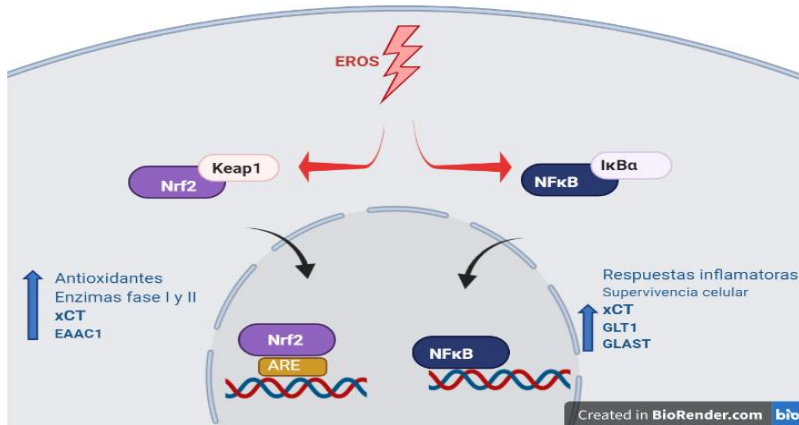


Figura 5. Factores de transcripción asociados a transportadores de aminoácidos precursores de la síntesis de glutatión (GSH). El factor nuclear (derivado de eritroide 2) (Nrf2) y el factor nuclear κ B (NFκB) Los factores de transcripción Nrf2 y NFκB son sensibles al estado redox de la célula, tales como el aumento de especies reactivas de oxígeno (EROS). Al activarse estos factores de transcripción se trasladan al núcleo donde modulan la entre otros genes, la transcripción de transportadores de aminoácidos, tales como el intercambiador de L-cistina/L-glutamato (xCT), acarreador de aminoácidos excitadores (EAAC1), transportador de L-glutamato/L-aspartato (GLAST) y transportador de glutamato 1 (GLT1). Creada en BioRender.com

4) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ingesta o intoxicación crónica por iAs, principalmente a través del agua de bebida se asocia con efectos neurodegenerativos. Este metaloide llega al cerebro donde es metabolizado a especies metiladas en un proceso en que los sistemas GSH y Trx están involucrados. Además, el GSH y la Trx participan en la homostasis redox en la cual, los factores de transcripción Nrf2 y NFκB activan respuestas antioxidantes como la síntesis de estos péptidos y proteínas. Los modelos murinos con exposición crónica a iAs han mostrado el impacto del metaloide en regiones del SNC como la corteza y el hipocampo en donde afectan el transporte de aminoácidos como L-cys, L-glu, los niveles de GSH, así como la expresión de los receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA. En este trabajo nos interesa valorar el efecto de la exposición a iAs (respuesta aguda o inicial) sobre los niveles de GSH y Trx, así como la participación de los transportadores de aminoácidos relacionados con la síntesis de GSH (xCT, EAAC1 y LAT1). Estos cambios podrían estar orquestados por los factores de transcripción Nrf2 y NFκB, sensibles a los cambios del estado redox. Al mismo tiempo sería importante explorar la participación de la vía de transulfuración ya que podría aportar L-cys para la síntesis del GSH inducida por iAs, efecto que no ha sido documentado en SNC. Por otro lado, dado que en exposiciones crónicas, se ha observado un aumento en la liberación de L-glutamato, sería importante saber si ocurren cambios agudos en la expresión de transportadores y receptores a glutamato (GLT1, GLAST y las subunidades NR2A y NR2B del NMDAR) en cerebro de ratón CD1 expuestos a iAs.

5) HIPÓTESIS

La respuesta aguda a iAs, disminuirá los niveles de GSH en distintas regiones del SNC, causando un ambiente oxidante que dañará moléculas y activará una respuesta antioxidante vía factores de transcripción como Nrf2 y NFκB.

6) OBJETIVOS

Objetivo general

Investigar la participación de factores de transcripción responsables de la homeostasis redox en el SNC de ratón en la respuesta aguda a iAs.

Objetivos particulares

- Determinar, los niveles de los niveles GSH y Trx en distintas regiones del cerebro de ratones CD1 expuestos de manera aguda a iAs.
- Evaluar la expresión de los transportadores xCT, EAAC1, LAT1, GLT1 y GLAST.
- Evaluar la expresión de las subunidades de los receptores de glutamato AMPA y NMDA.
- Evaluar la oxidación de biomoléculas.
- Evaluar la activación de los factores de transcripción Nrf2 y NFκB.
- Cuantificar la producción de H₂S, como indicador de la actividad de la vía de transulfuración
- Evaluar la transcripción y traducción de *cbs*

7) MATERIAL Y MÉTODOS

(1) Reactivos

Los anticuerpos primarios de conejo contra xCT (# ab37185), EAAC1 (# ab124802), GLAST (# ab416), GLT1 (# ab41621), CBS (# ab135626), AMPA1 (#ab109450), AMPA1 (#ab133477) se obtuvieron de Abcam (Cambridge, MA, EUA). Los anticuerpos primarios de conejo contra NR2A (# AB1555P) y NR2B (# AB1557P) fueron adquiridos de Millipore (Bedford, MA, EUA). El anticuerpo primario contra LAT1(sc-134994) fue adquirido de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). El anticuerpo de ratón anti β -tubulina (#T4026), el O-ftalaldehído (OPA), las microplacas y demás reactivos fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Darmstadt, Alemania). El kit de ensayo de determinación de proteína Pierce de ácido bicinonínico fue obtenido de Thermo Fisher Scientific (Meridian Rd, Rockford, EUA). Las membranas de nitrocelulosa y glicina fueron obtenidas de Bio-Rad (Alemania). El reactivo de detección de Western Blotting Amersham, ECL Prime fue obtenido de GE Healthcare BioSciences (Pittsburgh, PA). El Trizol fue obtenido de Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). La M-MLV reversa transcriptasa y el primer oligo(dT)15 fueron adquiridos de Promega (Madison WI, EUA). La mezcla universal de KAPA SYBR FAST fue adquirido de Kapa Biosystems, Cape Town, Sudáfrica)

(2) Animales y tratamientos

Se usaron ratones machos CD-1 de 5 a 6 semanas de edad, obtenidos de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; los animales se mantuvieron a 23-25°C en ciclos de 12 h de luz/obscuridad y con una humedad relativa del 50-60%. Los animales tuvieron libre acceso a alimento (Harlan 208S Diet; Harlan, Indianapolis, IN, USA) y agua. Los animales fueron divididos en diferentes grupos de trabajo, para estudiar la respuesta aguda. Los animales fueron administrados intraperitonealmente (i.p.) con una solución (100 μ L) de 0, 5 ó 14 mg/kg arsenito de sodio disuelto en agua inyectable. Los grupos controles recibieron una inyección i.p. de 100 μ L de agua inyectable. Los animales fueron sacrificados a 2, 6 y 24 h después de la inyección i.p. También se incluyó un grupo con exposición semicrónica, para comparar los cambios observados aquí con las respuestas agudas. En este caso, los animales recibieron una inyección i.p. de 100 μ L de 0, 2.5 y 5 mg de arsenito de sodio por kg de peso durante 9 días. Las dosis fueron elegidas de acuerdo a reportes anteriores del grupo de trabajo, (Rodriguez et al., 2005, Sanchez-Pena *et al.*, 2010) y a los estudios de (Li et al., 2017). Las soluciones de arsenito de sodio fueron preparadas diariamente y fueron disueltas en agua inyectable estéril. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

Distintas regiones cerebrales (corteza, hipocampo, estriado y cerebelo) fueron disecadas e inmediatamente congeladas a -70°C , u homogenizadas en las soluciones descritas más adelante y congeladas para su análisis posterior.

Los experimentos y tratamientos de los animales fueron realizados con base a las guía establecidas en los “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication #85-23, revised 1985) y las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Clave NOM-062-ZOO-1999)” de la “Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)” (publicada en Agosto, 2001). El protocolo experimental fue aprobado por el CICUAL del Instituto de Investigaciones Biomédicas

(3) Determinación de los niveles de GSH

Los niveles de GSH se determinaron en la corteza, cerebelo, estriado e hipocampo del cerebro de ratones, de los distintos grupos de trabajo. Al sacrificio, los tejidos se homogenizaron en 10 volúmenes de amortiguador A (KCl 154 mM, pentaacetato de dietilentriamina (DTPA) 5 mM y amortiguador de fosfatos (PB) 0.1 M a pH 6.8). Después se agregó la misma cantidad de amortiguador A, de amortiguador B (HCl 40mM, DTPA 10 mM, ácido ascórbico 20 mM y ácido tricloroacético 10%). Las muestras pueden ser almacenadas, hasta por 4 semanas.

La suspensión se centrifugó a 14000 g y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de $0.45\ \mu\text{M}$, $2\ \mu\text{L}$ de sobrenadante fueron usados para la determinación de GSH. La medición de los niveles de GSH fueron realizadas mediante la metodología descrita por Senft et al. (2000) (Senft *et al.*, 2000). El ensayo fluorométrico de O-ftalaldehído (OPA) fue adaptado a microplaca (Ramos-Chavez et al., 2015). La fluorescencia se determinó con filtros de 365 nm de excitación y 430 nm de emisión en un Multidetector de Elisa DTX 800/880 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). Se usó como referencia una curva estándar de GSH. El ensayo, se basa en la formación de un derivado fluorescente, isoindol, para el caso de del GSH.

(4) Determinación de la expresión de proteínas y daño oxidante mediante Western Blots.

Para la determinación de 4HNA, 3NT, CBS y Trx1, el tejido total fue homogenizado en un amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 1 mM, pirofosfato de sodio 2.5 mM, glicerol-2-fosfato 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, Triton X-100 1%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM) con inhibidor de proteasas enfriado en hielo. Los homogenados fueron centrifugados a 15,000 g durante 15 min a 4°C .

Para la determinación de transportadores de aminoácidos (xCT, EAAC1, LAT1, GLAST y GLT-1), y subunidades de receptor NMDA (NR2A y NR2B) y subunidades del receptor AMPA (AMPA1 y AMPA2),

los tejidos se procesaron mediante el método descrito por Schindler et al. (2006) (Schindler *et al.*, 2006), para proteínas membranales. En breve, el tejido congelado fue homogenizada en 10 volúmenes de amortiguador de extracción (HEPES 10 mM, NaCl 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, NaHCO₃ 5 mM, EDTA 5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0.5 mM, PMSF 1 mM, y aprotinina y leupeptina 10 mg/ml) que contenía 10% de sacarosa 2.5 M. El homogenado obtenido se centrifugó en dos ocasiones a 6,300 x g a 4°C por 10 minutos, colectando los sobrenadantes. Los sobrenadantes colectados fueron centrifugados a 100,000 g por 30 minutos a 4°C. El precipitado fue recuperado y solubilizado en Tris-HCl 40 mM, pH 9.5, urea 8 M y Triton X-100 4% (v/v). La concentración de proteína fue determinada usando el ensayo de proteína Pierce de ácido bicinconínico. Las muestras (20-40 µg) fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 8% (NR2A y NR2B), ó 10% (4-HNA, 3NT, CBS, xCT, EAAC1, LAT1, GLAST y GLT1), ó 20% (Trx1) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (, en condiciones de voltaje y amperaje constante, respectivamente. Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en TBS-Tween-20 0.1%, y posteriormente se incubaron con el respectivo anticuerpo primario. Una vez revelada la proteína de interés, los anticuerpos de la proteína problema se desprendieron mediante un tratamiento con NaOH 0.2 M (stripping), para posteriormente incubar con el anticuerpo primario contra la proteína que se utilizó como control de carga: β-tubulina. Las bandas de las proteínas fueron visualizadas con un anticuerpo secundario ligado a HRP, usando el reactivo de detección ECL Prime. Las imágenes de las placas fotosensibles fueron capturadas y la densitometría analizada con Image J software versión 1.46r software (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

(5) Análisis cuantitativo por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT) para la transcripción de *nfe212*, *ikkba* y *cbs*.

El ARN total de la corteza de ratones fue aislado usando el método de TRIzol. La integridad de las muestras fue evaluada por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Las mediciones de absorbancia A_{260/280} y A_{260/230} fueron usadas para evaluar la pureza del ARN aislado. La concentración de ARN fue determinada midiendo la absorbancia a 260 nm. 1 µg de ARN de cada muestra fue transcrita inversamente a cADN a 37°C usando M-MLV reversa transcriptasa y el primer oligo(dT)₁₅. Para el análisis cuantitativo por PCR-RT, el c-ADN de cada muestra fue diluido a 20 ng del ARN total en la mezcla de reacción conteniendo 0.5 µM de cada primer derecho y reverso y 1x de KAPA SYBR FAST Universal Mix(. El Rotor-Gene Q PCR cycler (QiagenGmbH, Hilden, Alemania) fue usado para cuantificar los productos de la PCR. Las condiciones del PCR fueron: una temperatura inicial a 94°C por 3 min, seguido de 40 ciclos por 1 sec, 63°C por 10 sec, and 72°C por 12 sec. Finalmente, las curvas de fusión fueron generadas de 73°C a 93°C para cada corrida de PCR. Los niveles de ARNm del gen de la

succinato deshidrogenasa (SDHA) fueron usados como el gen de referencia. La media de la eficiencia de amplificación fue de 1.017 ± 0.035 , calculado para cada corrida de PCR para *nfe2l2*, *ikkba* and *SDHA* a partir de curvas generadas con 5 diluciones, con una R^2 0.993 ± 0.005 (todas por encima de 0.982). Los primers usados fueron los siguientes: 5'-caccagtggatccgccagcta-3' y 5'tatccagggaagcgactca-3' para *nfe2l2* (Valdovinos-Flores *et al.*, 2019); 5'-aaatctccagatgctacccgagag3' y 5'-ataatgtcagacgctggcctccaa-3' para *ikkba* (Valdovinos-Flores & Gonsebatt, 2013); 5'-cctatgaggtggaagggatt -3' y 5'- ttagttccgcacagagtca -3' para CBS (Markand *et al.*, 2013); y 5'-caaatgctggagaagaatcgg -3' y 5'-catcgacttctgcatgttaggc -3' para *SDHA*. Los resultados fueron analizados usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001) y expresados como promedios normalizados de *nrf2* and *ikkba* \pm EE.

(6) Medición de la producción H₂S.

Como una medida indirecta de la vía de transulfuración medimos la producción de H₂S, el cual es generado durante la síntesis de cisteína a partir de homocistenina por las enzimas CBS y CSE. Es una medida indirecta, porque también CBS puede producir este gas por la conversión de cisteína a serina y lantionina (Singh *et al.*, 2009). Para este protocolo nos basamos en el trabajo de Hine and Mitchell (2017) con algunas adaptaciones (Hine & Mitchell, 2017). Brevemente, aproximadamente 100 mg de cortezas o hígados de ratón congelados fueron homogenizados en 250 μ l de amortiguador de lisis frío (Tris Base 25 mM, DTT 1 mM, glicerol 5%, Tritón 1%). Las muestras fueron puestas 37°C de 5-10 min y fueron congeladas en hielo seco de 2-3 min. Los ciclos de congelamiento-descongelamiento se repitieron 3 veces. Posteriormente los homogenados fueron centrifugados a 5000 g durante 5 min, los sobrenadantes fueron recolectados (~200 μ L) para su posterior determinación de proteína usando el ensayo de proteína de ácido bicinonínico de Pierce. Los papeles filtros fueron empapados con una solución de acetato de plomo (II) trihidratado 20 mM por 20 min, que posteriormente fue secado en una estufa a 110°C por 30 min. El ensayo se realizó en una placa de 96-pozos con 150 μ l de solución de trabajo conteniendo: L-cisteína 100 mM y piridoxal 5'-fosfato (PLP) 10 mM disueltos en amortiguador de fosfatos (PBS), conteniendo 0–500 μ g de proteína de la muestra. Muestras de hígados de animales no tratados fueron usadas como controles positivos. El papel filtro seco embebido en acetato de plomo, se colocó directamente sobre la placa de 96 pozos, a 37 °C durante 6 h para las muestras con homogenados de hígado y 16 h para los homogenados de corteza. Las imágenes del papel filtro fueron escaneadas, para su posterior análisis con el programa ImageJ versión 1.46r (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA).

(7) Análisis de datos

Los datos fueron expresados como promedios±error estándar (EE). El número de animales fue indicado para cada caso. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía y de dos vías fueron usadas para evaluar la significancia estadística, estos análisis fueron seguidos de una prueba *post hoc* de Tukey's. Un valor de $P < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo en todos los casos.

8) RESULTADOS

(1) Efecto de la exposición a iAs sobre los niveles de GSH y Trx1 en distintas regiones cerebrales

El sistema GSH y Trx participan en la metilación oxidativa del arsénico (Figura 2). Por ello evaluamos los niveles de GSH y Trx1 en ratones expuestos a iAs. La evaluación de los cambios iniciales en los niveles de GSH, mostraron niveles disminuidos en la corteza cerebral a las 2, 6 h y 24 h para la dosis de 14 mg/kg, con un aumento significativo en el cerebelo. En cambio, los animales que recibieron una dosis menor (5 mg/kg) los niveles de GSH se ven aumentado significativo a las 24 h en la corteza, estriado y cerebelo, sugiriendo un aumento en la síntesis de GSH a este tiempo en estas regiones. En comparación, en los animales con tratamiento de 5 mg/kg semicrónico de 9 días los niveles de GSH en la corteza siguen aumentados como se observó a las 24h.

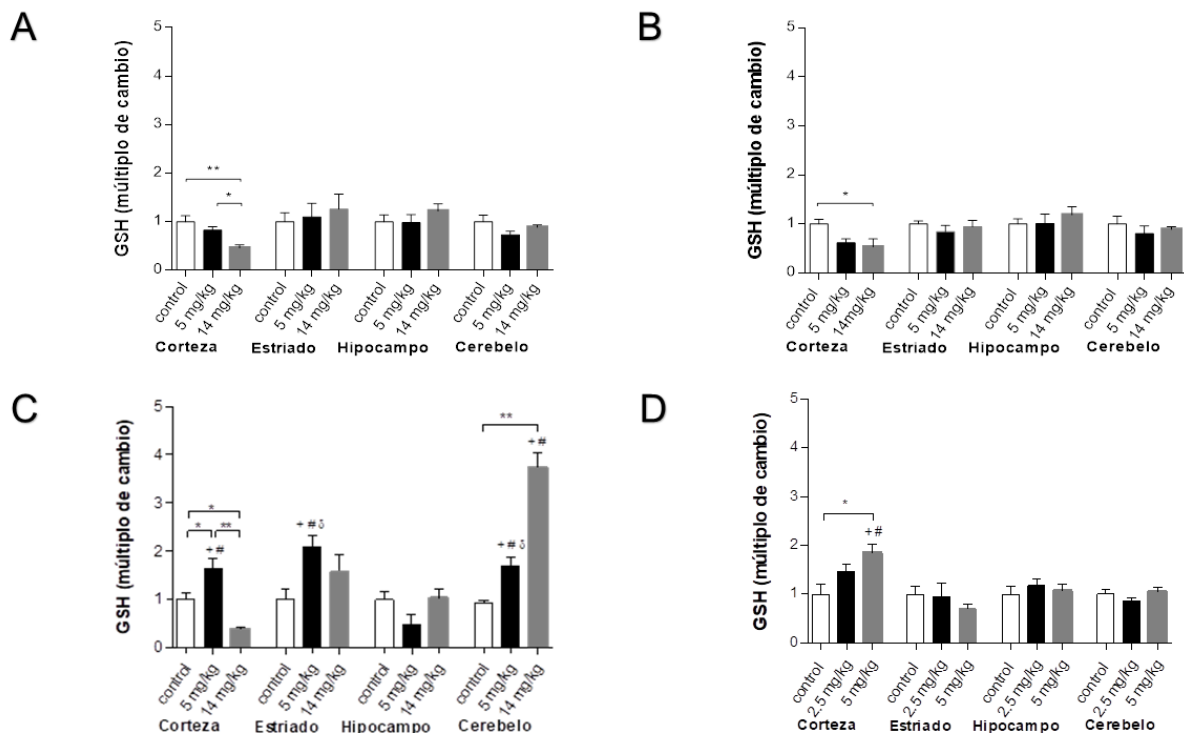


Figura 6. Niveles de glutatión (GSH) normalizados de diferentes regiones cerebrales de ratones tratados i.p. con 0 (controles), 2.5, 5 y 14 mg/kg de arsenito de sodio (NaAsO₂). Niveles normalizados de GSH de animales tratados con 5 y 14 mg/kg a 2 h (A), 6 h (B) y 24 h (C) y de animales tratados con 0, 2.5 y 5 mg/kg por 9 días (D). Los datos en el gráfico representan la media±EE, n=6. Los datos fueron analizados usando un análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías seguido de una prueba *post hoc* de Tukey. Los símbolos sobre las columnas denotan diferencias significativas; *P≤0.05 y **P≤0.01 para diferencias entre dosis; el símbolo *denota diferencias contra el grupo de 2 h, el símbolo de # denota diferencias contra el grupo de 6 h y el símbolo δ denota diferencias contra el grupo de 9 días de tratamiento.

En estudios anteriores se ha informado que el ARNm de Trx1 es modulado de manera negativa en el estriado y núcleo accumbens de ratones expuestos a iAs de manera crónica (Bardullas et al., 2009). En este trabajo observamos que los niveles en la proteína de Trx1 en la corteza aumentan únicamente 6 h después de la administración i.p. de iAs en el grupo de 14 mg/kg.

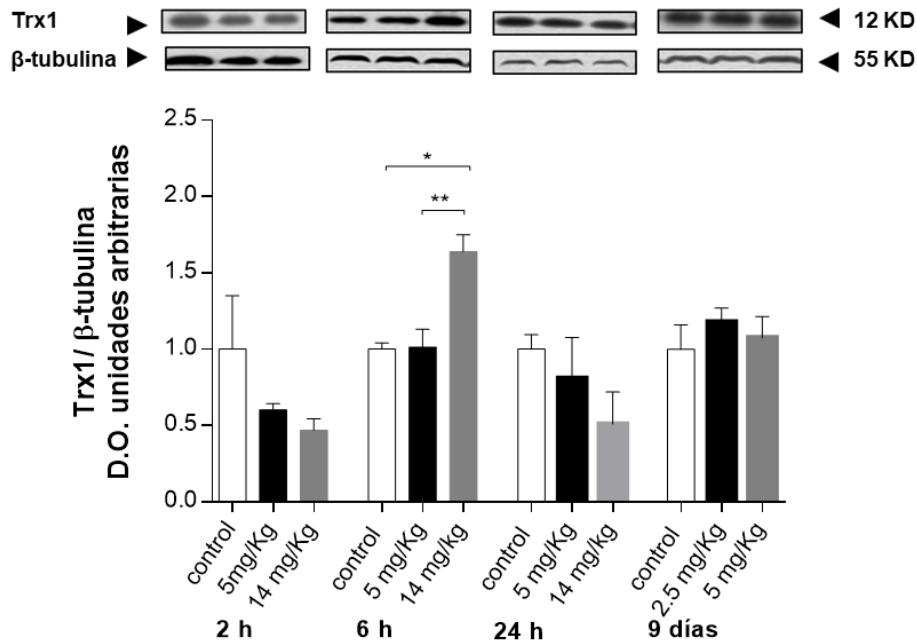


Figura 7. Expresión de la tiorredoxina 1 (Trx1) en la corteza de ratones expuestos a diferentes concentraciones y tiempos de arsénico inorgánico (iAs). Se evaluó la Trx1 en la corteza de ratones tratados con 0, 5 y 14 mg/kg a 2 h, 6 h y 24 h; y en animales tratados con 0, 2.5 y 5 mg/kg durante 9 días. Los datos en el gráfico representan la media±EE, n=6. Los datos fueron analizados usando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Tukey. Los símbolos sobre las columnas denotan diferencias significativas; *P≤0.05 y **P≤0.01. Imágenes de westerns blots representativas, se presentan en la parte superior de la figura.

(2) Expresión de transportadores de aminoácidos relacionados al transporte de precursores de la síntesis de GSH.

Para determinar si los cambios en los niveles de GSH están asociados a un aumento en la expresión de transportadores de los precursores asociados a la síntesis del GSH (L-cys, L-cys₂ y glutamato). Se evaluó la expresión de los transportadores, EAAC1, xCT, LAT1, GLT y GLAST en la corteza de ratones a 2 h, 6 h, 24 h y 9 días por la técnica de Western Blot. Se observó que la corteza cerebral es la región que presenta los mayores cambios en los niveles de GSH, es por ello que evaluamos las proteínas de transportadores asociadas a su síntesis únicamente en esta región. No se observaron cambios en

proteínas a las 2 h y 6 h después del tratamiento. Sin embargo, a las 24 h encontramos una expresión aumentada de EAAC1 para el grupo de 5 mg/kg y xCT para el grupo de 14mg/kg de iAs, comparadas con su grupo control. El incremento en la expresión de EAAC1 se mantiene en la exposición semicrónica a los 9 días. Por otro lado, como se mencionó antes, la expresión de xCT aumenta a las 24 h en los grupos de 5 mg/kg y 14 mg/kg, comparada con 2 h y 6 h. La modulación en la expresión de EAAC1 en los grupos de 5 mg/kg a las 24 h y a los 9 días, está directamente relacionada con la modulación de los niveles de GSH a esos tiempos en ese grupo, sugiriendo la importancia del transporte de L-cys por EAAC1 al interior de las células para la síntesis de GSH, principalmente en las neuronas.

A las 2 h, 6 h y 9 días no hay cambios en la expresión de GLT1 y GLAST. Sin embargo, si se observa una expresión aumentada de GLT1 y GLAST a las 24 h en el grupo de 5 mg/kg iAs, asociada aumento en los niveles extracelulares de glutamato directamente relacionada a un aumento en la expresión de xCT.

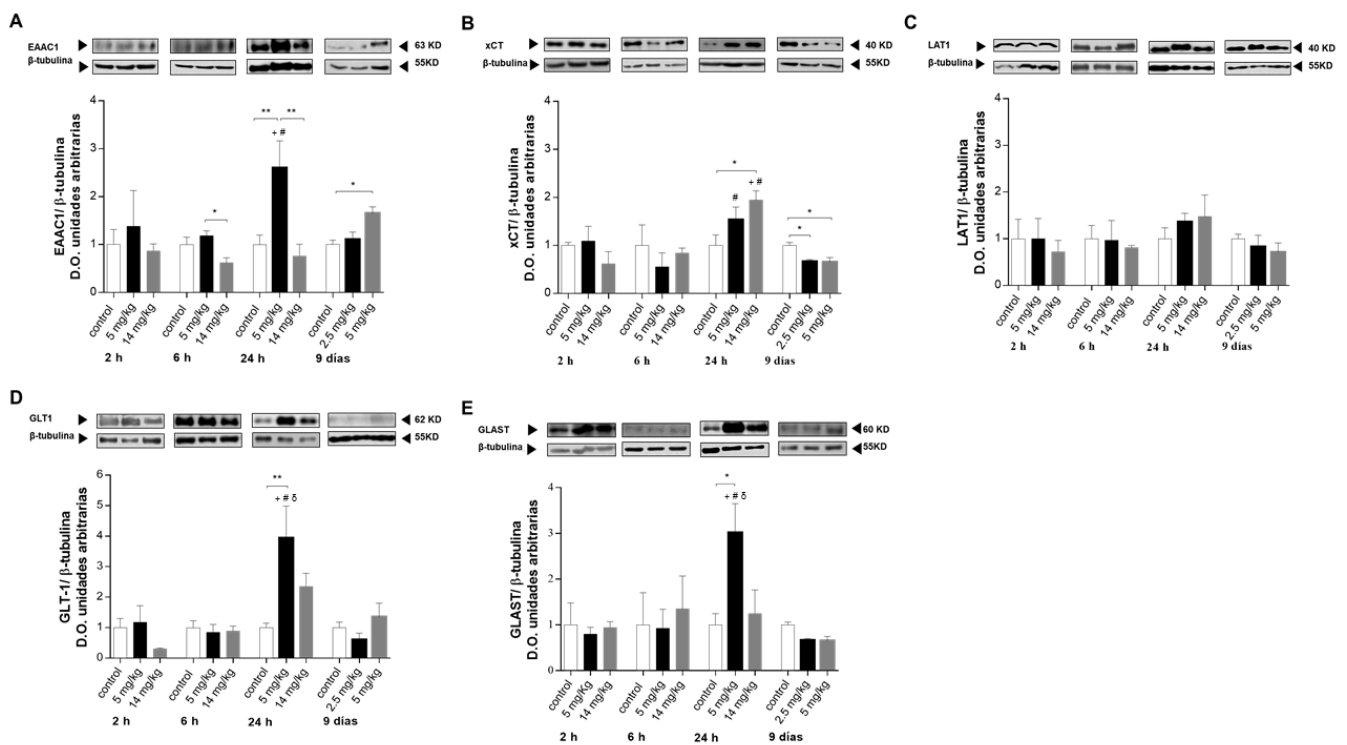


Figura 8. Expresión de los transportadores de L-cistina (L-cys)₂/ L-glutamato (L-glu), L-cisteína (L-cys) y L-glutamato (L-glu) en la corteza de ratones tratados con arsénico inorgánico (iAs) a diferentes tiempos y distintas concentraciones de iAs. Los animales fueron tratados con 0, 5 y 14 mg/kg y sacrificados a 2 h, 6 h y 24 h. También se presentan los datos de animales tratados con 0, 2.5 y 5 mg/kg durante 9 días. Se evaluaron los transportadores: acarreador de aminoácidos excitadores (EAAC1) (A), intercambiador de L-cys₂/ L-glu (xCT) (B), L-transportador ácido de aminoácidos 1 (LAT1) (C), transportador de glutamato 1 (GLT1) (D) y transportador de L-glu/ L-aspartato (GLAST) (E). Las barras representan la media±EE, n=6. Los datos fueron analizados usando un análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías seguido de una prueba *post hoc* de Tukey. Los símbolos sobre las columnas denotan diferencias significativas; *P≤0.05 y **P≤0.01 para diferencias entre dosis; el símbolo *denota diferencias

contra el grupo de 2 h, el símbolo de # denota diferencias contra el grupo de 6 h y el símbolo δ denota diferencias contra el grupo de 9 días de tratamiento. Los westerns blots representativos son mostrados en la parte superior de cada panel.

(3) Marcadores de daño oxidante a biomoléculas.

El GSH es el principal sistema antioxidante del SNC, la modulación en estos niveles podría estar llevando a un desbalance redox en el SNC y generar así daño oxidante (Chandravanshi *et al.*, 2018). Es por ello que decidimos evaluar los niveles de 2 marcadores de esta condición, el 4 hidroxinonenal (4HNA) y la 3 nitrorosina (3NT). No encontramos cambios significativos en ninguno de los grupos tratados en corteza cerebral.

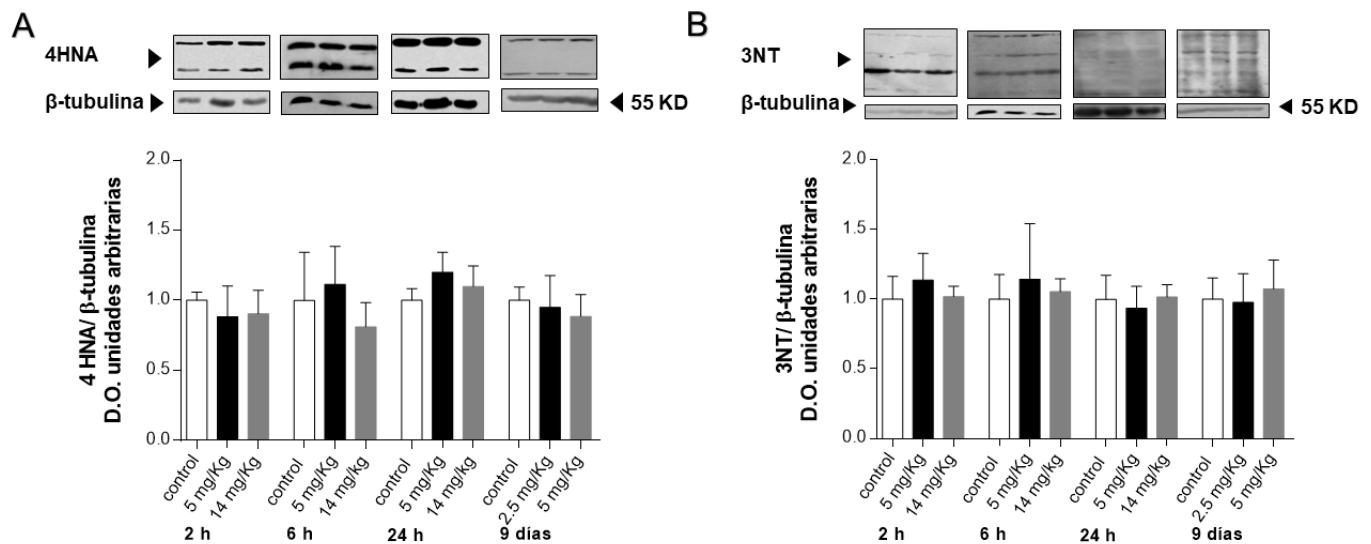


Figura 9. Efectos del arsénico inorgánico (iAs) sobre marcadores de estrés oxidante y nitrosante. Los animales fueron tratados con 0, 5 y 14 mg/kg y sacrificados a 2 h, 6 h y 24 h. También fueron administrados con 0, 2.5 y 5 mg/kg de arsenito de sodio (NaAsO₂) durante 9 días. Las barras en el gráfico representan la media ± EE, n=6. Los datos fueron analizados usando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Tukey.

(4) Modulación de las subunidades de receptores a glutamato por la exposición a iAs

La exposición a iAs se asocia al aumento en los niveles de glutamato extracelular y la modulación de la expresión y actividad de los receptores a glutamato (Ramos-Chavez *et al.*, 2015, Nelson-Mora *et al.*, 2018). Decidimos evaluar, también mediante Western blots, los niveles de la expresión a las subunidades de los receptores NMDA y AMPA, debido al aumento en la expresión de los transportadores xCT, GLAST y GLT observada, que pudieran estar sugiriendo un aumento en los niveles de glutamato extracelular. La expresión de la subunidad NR2A se ve aumentada, mientras que la expresión de NR2B

se ve disminuida, ambos efectos se observaron en el grupo de 14 mg/kg. Para las subunidades AMPA1 y AMPA2 no encontramos cambios por la exposición a iAs.

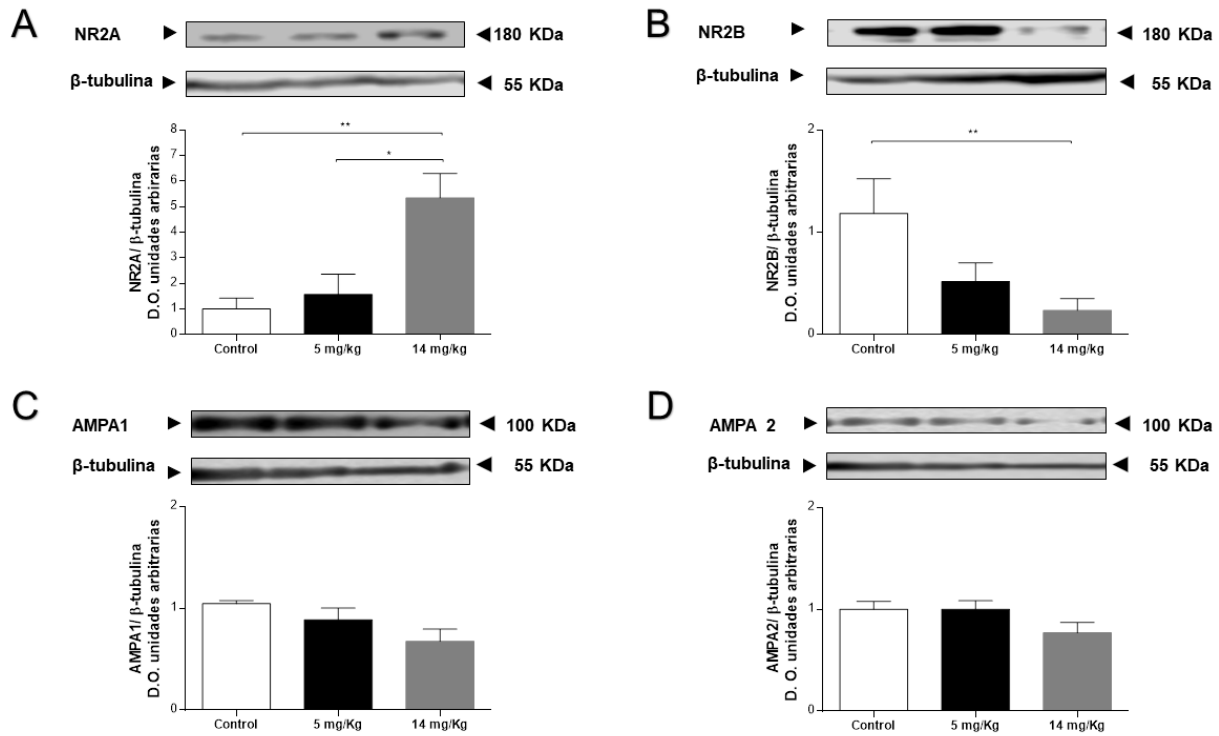


Figura 10. Efectos del arsénico inorgánico (iAs) sobre la regulación de subunidades a receptores de glutamato NR2A, NR2B, AMPA1 y AMPA2 en la corteza de ratones. Los animales fueron tratados con 0, 5 y 14 mg/kg de arsenito de sodio (NaAsO_2), y se sacrificaron 24 h después. La expresión de las subunidades del receptor glutamatérgico de tipo NMDA (NR2A, NR2B), y tipo AMPA (AMPA1 y AMPA2) se realizó por análisis de Western blots en fracciones enriquecidos de membranas. Las barras en el gráfico representan la media \pm EE, n=6. Los datos fueron analizados usando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Tukey. Los símbolos sobre las columnas denotan diferencias significativas; * $P\leq 0.05$ y ** $P\leq 0.01$. Los Westerns blots representativos son mostrados en la parte superior de cada panel.

(5) Modulación de *nfe2l2* y *ikkba* por iAs. Activación de Nrf2 y NFκB.

Se ha reportado que los genes que codifican para las proteínas xCT, LAT, GLT1 y GLAST (Valdovinos-Flores & Gonsebatt, 2012, Martínez-Lozada et al., 2016) contienen secuencias consenso para los factores de transcripción Nrf2 y NFκB. También se ha reportado que inhibidores para NFκB, disminuyen la expresión de EAAC1 en ratas (Tai et al., 2008), lo que sugiere que su expresión puede ser modulada por este factor de transcripción. La activación de Nrf2 y de NFκB va acompañada en un aumento de la transcripción de los genes *nfe2l2* y *ikkba*, respectivamente (Valdovinos-Flores & Gonsebatt, 2013, Tonelli et al., 2018). Por ello, para saber si el aumento en la transcripción de estos transportadores de aminoácidos está asociada a la activación de estos factores de transcripción y el aumento en los niveles

de GSH, medimos la transcripción de los genes *nfe2l2* y *ikkba* por PCR-RT a las 2 h , 6 h y 24 h en la corteza cerebral.

Encontramos un aumento en el gen *ikkba* a las 2 h y 6 h, en el tratamiento de 14 mg/kg respectivamente, mientras que para el gen *nfe2l2* encontramos un aumento a las 6 h en el grupo de 5 mg/kg. A las 24 h los niveles de ARNm de ambos genes regresan a niveles basales. Estos resultados sugieren la participación de Nrf2 y NFκB en la modulación de los transportadores en la respuesta aguda a iAs.

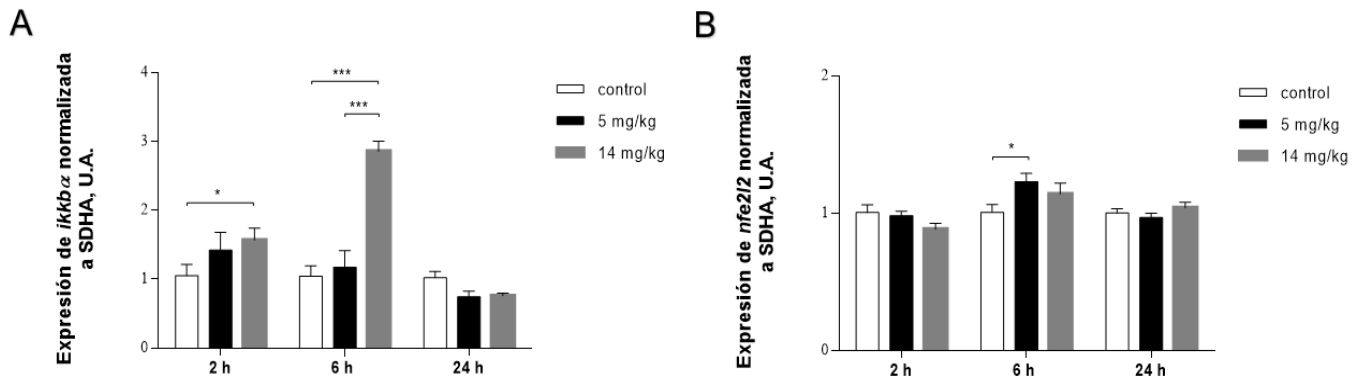


Figura 11. Efectos de arsénico inorgánico (iAs) sobre los niveles de ARNm del inhibidor alfa del factor κ B (*ikkba*) (A) y factor nuclear (derivado del eritroide 2) *nfe2l2* (B) en la corteza de cerebros de ratón tratados con 0, 5 y 14 mg/kg de NaAsO₂. Para la realización del PCR-RT, el ARN total fue extraído de la corteza cerebral. Los datos fueron normalizados con la expresión del ARNm del gen *SDHA*. Las barras verticales indican los niveles de ARNm relativos al grupo control. Las barras representan la media±EE. Los datos fueron analizados usando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Tukey. Los símbolos sobre las columnas denotan diferencias significativas; *P≤0.05 y **P≤0.01.

(6) Efecto del iAs en la producción de H₂S en la corteza cerebral e hígado de ratones.

El aumento en la producción de H₂S, por el aumento de glutamato protege a las neuronas aumentando los niveles de GSH (Kimura & Kimura, 2004) (Kimura et al., 2006). Los animales tratados con 5 y 14 mg/kg a las 24 h, un aumento en la producción en los niveles de H₂S, tanto en la corteza cerebral y como en el hígado, tejido que se usó como referencia.

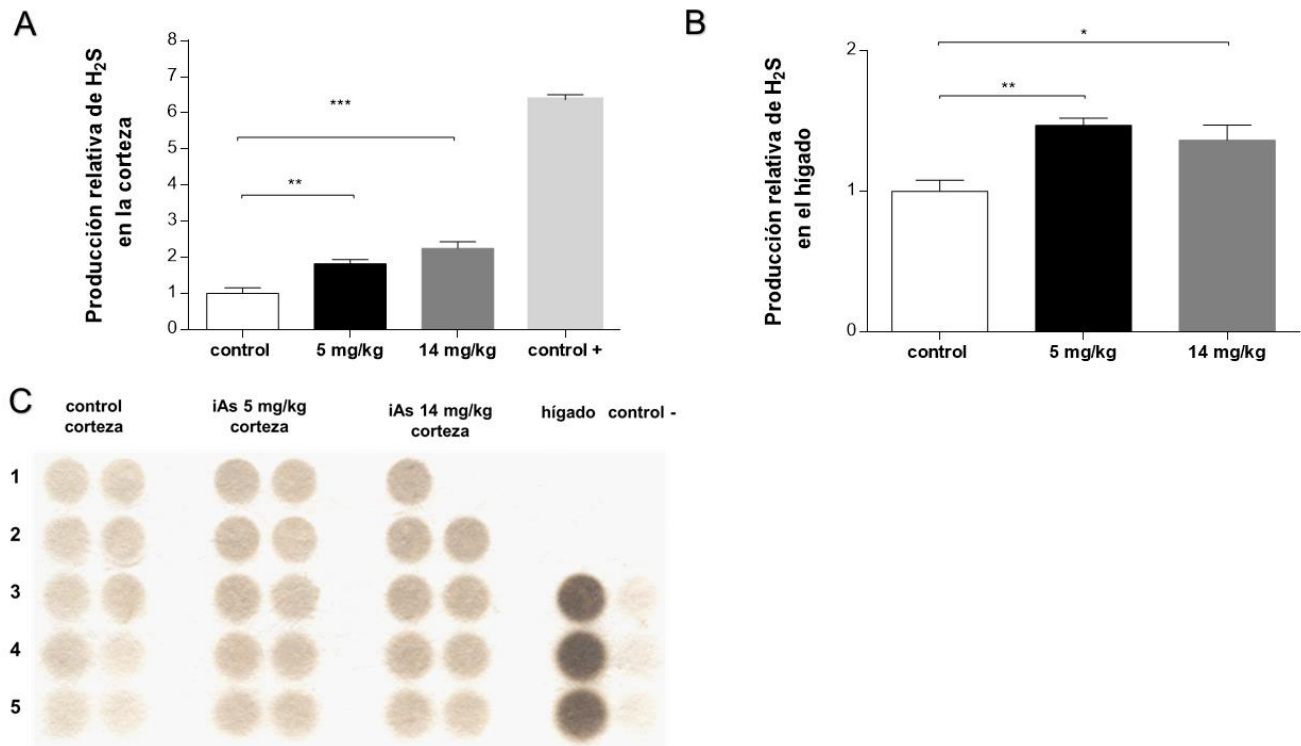


Figura 12. Capacidad de producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) en la corteza cerebral e hígado de ratones expuestos a arsénico inorgánico (iAs) a 24 h. Los cambios en la producción de H₂S, fueron evaluados por el método de producción de sulfuro de plomo en la corteza (A) y en los hígados (B) de ratones expuestos a 0, 5 y 14 mg/kg de arsenito de sodio (NaAsO₂) a las 24 h. En (C) se muestra un papel filtro representativo de la producción de sulfuro de plomo en la corteza de ratones expuestos a iAs. Las barras muestran los niveles de IntDen normalizados al grupo control, media±EE, n=7. Hígados de animales no tratados, se usaron como controles positivos. Para el control negativo se usó el medio de reacción sin tejido. Los datos fueron analizados usando un análisis de varianza (ANOVA) de una-vía seguido de una prueba de Tukey. Los símbolos sobre las columnas denotan diferencias significativas; *P≤ 0.05, **P≤0.01 y ***P≤0.001.

(7) Efecto del iAs sobre los niveles de proteína y ARNm de *cbs*.

CBS es la enzima más importante que genera H₂S en astrocitos (Lee *et al.*, 2009) lo que se asocia a un aumento en los niveles de GSH (Kimura *et al.*, 2010). Asimismo, se ha observado que el iAs induce la síntesis de GSH acompañado de la transcripción de CBS, en cultivos de células humanas (Coppin *et al.*, 2008). En este trabajo al evaluar la proteína para CBS y el mRNA de *cbs*, encontramos que los niveles de ARNm para *cbs* se encuentran disminuídos significativamente a las 2h en el grupo de 14 mg/kg. Los niveles proteicos para CBS no cambian con respecto a los controles en ninguno de los tiempos explorados. Las barras verticales indican los niveles de ARNm relativos al grupo control. Las barras representan la media ± E.E. Los datos fueron analizados usando un análisis de varianza (ANOVA) de

una vía seguido de una prueba *post hoc* de Tukey. Los símbolos sobre las columnas denotan diferencias significativas; * $P \leq 0.05$.

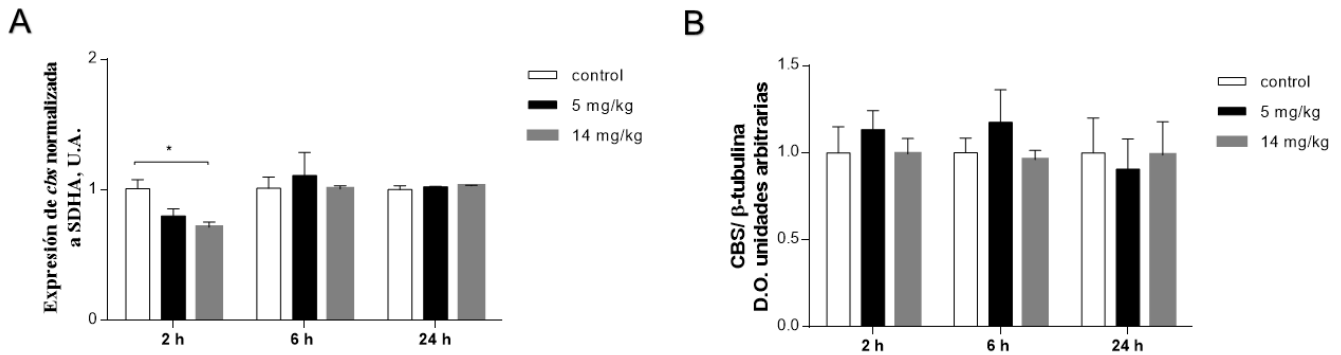


Figura 13. Niveles de proteína cistationin- β -sintasa (CBS) y ARNm *cbs* en la corteza cerebral de ratones tratados con 0, 5 y 14 mg/kg de arsenito de sodio (NaAsO_2). Cambios en los niveles de proteína en homogenados de corteza determinados por Western blot para CBS (A). Para la realización del PCR-RT, el ARN total fue extraído de la corteza cerebral (B). Los ensayos fueron realizados a las 2, 6 y 24 h después de una administración de NaAsO_2 .

9) DISCUSIÓN

El iAs es metaloide considerado el principal contaminante presente en el ambiente, por fuentes antropogénicas y naturales. Se ha reportado en México, que al menos 1.5 millones de personas ingieren agua con una concentración mayor a la norma mexicana de $0.025 \mu\text{g/L}$ de iAs, que está por encima de la recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de $0.010 \mu\text{g/L}$ (Luz María Del Razo, 2018). El iAs se acumula en distintos órganos, incluyendo el cerebro y la exposición a iAs está asociada con distintas alteraciones a nivel del SNC. Estudios epidemiológicos han reportado que la exposición crónica a iAs a través del agua de bebida resulta en alteraciones en la función cognitiva, función motora y alteraciones sensitivas en niños, mientras que en adultos la exposición aguda a altos niveles de iAs está asociada con encefalopatías, alteraciones en memoria y aprendizaje y concentración (Rodríguez et al., 2003, Wright *et al.*, 2006).

En estudios anteriores se ha reportado alteraciones de los niveles de GSH tras la exposición crónica a iAs (Ramos-Chavez et al., 2015). En el presente estudio exploramos la respuesta aguda a iAs, observamos que la exposición altera los niveles de GSH y la disposición de aminoácidos precursores de su síntesis en corteza y cerebelo. A las 24 h, principalmente en la corteza, encontramos una respuesta que podría considerarse antioxidante donde se observaron niveles aumentados de GSH asociados con

el aumento en la producción de H₂S y de la expresión de los transportadores de aminoácidos xCT, GLT1, GLAST y EAAC1, así como una alteración de las subunidades al NMDAR a la dosis mayor empleada. No observamos cambios en los niveles de Trx1 salvo a las 6 h con 14 mg/kg y tampoco en marcadores de estrés oxidante en biomoléculas.

Factores de transcripción, sensibles al estado redox de la célula, tales como NFκB y Nrf2 están involucrados en la transducción de señales de sobrevivencia y protección para la célula contra el estrés oxidativo (Valdovinos-Flores & Gonsebatt, 2012, Moldogazieva *et al.*, 2018) (Sivandzade *et al.*, 2019). Sato *et al.* (2001) reportaron que hay un sitio de unión ARE, en la secuencia de flanqueo 5' en el gen xCT (Sato *et al.*, 2001). También se ha reportado sitios de unión de NFκB para GLT1 y GLAST (Martinez-Lozada *et al.*, 2016, Pajarillo *et al.*, 2019), asimismo, se ha reportado que inhibidores de la activación de NFκB disminuyen la expresión de EAAC1 (Tai *et al.*, 2008). En nuestro caso encontramos un aumento significativo de la transcripción de genes que son modulados por estos factores de transcripción (Figura 12).

A las 2 y 6 h encontramos una disminución en los niveles de GSH de manera significativa, solo en la corteza cerebral, lo cual puede llevar a la activación de Nrf2 y NFκB observada a las 6 h, como una respuesta redox debida a la disminución de especies reductoras (GSH). La activación de NFκB, es similar a las observaciones realizadas por Valdovinos and Gonsebatt (2013), en donde la transcripción de *ngfb* a las 2 h después de la administración i.p. de iAs, está asociada a la activación de la vía TrkA/Akt/NFκB en el hígado, pero no en el estriado de ratón (Valdovinos-Flores & Gonsebatt, 2013). La activación sistémica de esta vía puede estar relacionada con un aumento en la síntesis de GSH en otras regiones, como la corteza y el cerebelo a las 24 h y los 9 días. Asimismo, la activación de ambos factores de transcripción, puede ser dada de manera local debida al desbalance redox por el descenso de la poza celular de GSH en la corteza que activa a los factores de transcripción y que lleva posteriormente al aumento en la síntesis de GSH en la corteza observado a las 24 h (Sivandzade *et al.*, 2019).

Niveles disminuidos de GSH generalmente son acompañados por estrés oxidante y nitrosante (Schulz *et al.*, 2000). A pesar de que se observó una disminución de en los niveles de GSH a 2 y 6 h, no encontramos un cambio en el daño a biomoléculas por especies reactivas de oxígeno en los grupos evaluados, al evaluar la expresión 3NT y 4HNA. Esto puede ser debido a que las pruebas no son lo suficientemente sensibles para detectar los cambios producidos por la disminución de GSH o porque el desbalance redox no es suficiente para generar daño a biomoléculas, por lo que se debieron haber incluido controles positivos de daño oxidante para el ensayo. La Trx1 pudo haber cumplido un papel

protector, pero sólo la encontramos aumentada con la dosis de 14 mg/kg a las 6 h. Es bien sabido que la exposición crónica a iAs induce daños en la corteza cerebral por estrés oxidante. Sin embargo bajas dosis de arsénico pueden proteger a células de estrés oxidante y daño a ADN (Snow *et al.*, 2005, Chappell, 2003), lo que sugiere que el As tiene el perfil bifásico propuesto por Mattson y Calabrese en el 2010, donde bajas dosis pueden activar respuestas de adaptación y proteger a las células del estrés y daño (Mattson, 2010), como son las observadas aquí al aumentar los niveles de GSH, aumento en los transportadores de aminoácidos, aumento en la síntesis de H₂S que puede ir acompañada por una mayor disponibilidad de L-cys₂, para la síntesis de GSH.

De manera similar se observó que una exposición a iAs crónica durante la gestación, va acompañado de un aumento en los niveles de GSH y de un aumento en la expresión de los transporte de L-cys/L-cys₂ para la síntesis de GSH, tales como xCT en astrocitos y EAAC1 en neuronas (Ramos-Chavez *et al.*, 2015, Nelson-Mora *et al.*, 2018). En este trabajo la sobreexpresión de EAAC1 en corteza solo en el grupo de ratones que recibieron la dosis de 5 mg/kg a las 24 h y 9 días se relaciona de manera directa con el incremento en los niveles de GSH en la misma región. Estas observaciones sugieren que la participación de EAAC1 es crucial para el mantenimiento en los niveles de GSH, tras la exposición a iAs. En el trabajo de De Bundel *et al.* (2011) observan que ratones knockout para xCT, no tienen cambios en los niveles de GSH en el hipocampo o evidencia de estrés oxidante (De Bundel *et al.*, 2011). Sin embargo animales que carecen de EAAC1 tienen niveles disminuidos de GSH, acompañados de marcadores de estrés oxidante y alteraciones en la memoria (Aoyama *et al.*, 2006).

El aumento en la expresión de xCT, va acompañada con un aumento de GLT1 y GLAST. Los transportadores GLT1 y GLAST son considerados principales reguladores de niveles extracelulares de glutamato en los astrocitos del SNC (Amara & Fontana, 2002). Las regiones promotoras para GLT1 y GLAST contienen sitios de unión para el factor de transcripción NFκB (Pajarillo *et al.*, 2019), mientras que xCT contiene sitios de unión para Nrf2 y NFκB (Valdovinos-Flores & Gonsebatt, 2012). Por lo tanto, la exportación de glutamato por xCT y su recaptura por GLT1 y GLAST son modulados por ambos factores de transcripción, y de esta manera pueden disminuir los niveles extracelulares de glutamato asociada a la sobre-expresión de xCT. Anteriormente observamos que la exposición gestacional y crónica de iAs, se ven aumentados los niveles de glutamato en el hipocampo asociados con una sobre-expresión de xCT y una disminución en la expresión de GLT1 y GLAST (Ramos-Chavez *et al.*, 2015, Nelson-Mora *et al.*, 2018).

La alteración en la concentración de glutamato extracelular, por la exposición de manera crónica a iAs se ha visto acompañada en cambios en el hipocampo en la expresión de subunidades a receptores de

glutamato (Huo *et al.*, 2015, Nelson-Mora *et al.*, 2018). El aumento en la expresión de xCT se acompañó de una modulación negativa de las subunidades a los receptores NMDA (Ramos-Chavez *et al.*, 2015, Huo *et al.*, 2015). Al evaluar nosotros la regulación de los receptores NMDA encontramos una disminución en la expresión de la subunidad NR2B asociada con el aumento en la expresión de xCT a 14 mg/kg a 24 h en la corteza, datos similares observados en el hipocampo de ratones expuestos durante la gestación a iAs (Ramos-Chavez *et al.*, 2015). Al evaluar las subunidades AMPA1 y AMPA2 no encontramos cambios en la expresión en la corteza a 24 h en ratones expuestos a iAs, datos similares los encontrados en corteza cerebral en una exposición gestacional (Nelson-Mora *et al.*, 2018).

Tanto la L-cys para síntesis de GSH y la SAM requerida para metabolizar el iAs, pueden provenir de la vía de la transulfuración (Garza-Lombo *et al.*, 2019). Estudios de Coppin *et al.* (2008) reportan que en células RWPE-1 expuestas a iAs, se observó un aumento en la cantidad de ARNm de CBS acompañada de un aumento en 5 veces la cantidad de GSH (Coppin *et al.*, 2008). En este contexto también se ha reportado en humanos que la presencia de polimorfismos de CBS, puede estar relacionada con la capacidad para metilar el iAs (Porter *et al.*, 2010). En este trabajo no vimos cambios en la expresión tanto de proteína y de ARNm para CBS a las 24 h, aunque si se observó un aumento en la generación de H₂S tanto en la corteza cerebral y en el hígado de animales tratados con iAs a las 24 h, sugiriendo un aumento en la actividad de las enzimas de la vía de la transulfuración asociada al aumento en los niveles de GSH.

Tanto CBS como CSE también son moduladas por el factor de transcripción NFκB (Huang & Moore, 2015), es posible que el aumento de la producción de H₂S se deba a la contribución de la actividad de la enzima CSE, que no exploramos.

Adicionalmente, el H₂S es un gasotransmisor que cruza las membranas celulares, modulando distintos blancos fisiológicos, a través de la S-sulfhidratación (Wang *et al.*, 2014). El aumento en la generación de H₂S podría estar asociado a la modulación de la expresión de GLT1 observada a las 24 h, incrementando el transporte de glutamato, dado por un aumento de glutamato extracelular por la actividad aumentada del antiporte de xCT. La S-sulfhidratación por H₂S de los residuos de Cys6 y Cys26 de la subunidad rvSUR1 del canal de K_{ATP}, activándolo (Jiang *et al.*, 2010). La sobre-expresión de GLT1 puede ser dado por la activación de K_{ATP} por el H₂S, ya que activadores de los canales de K_{ATP} sobre regulan los transportadores de glutamato en astrocitos (Sun *et al.*, 2008). Por lo que pensamos que H₂S puede tener efectos neuroprotectores, contra los altos niveles de glutamato que causan excitotoxicidad. Se ha observado un aumento de transporte de Lcys₂ a través de xCT, así como un mecanismo por el cual el H₂S podría estar reduciendo la L-cys₂ a L-cys en el espacio extracelular y así aumentar el

transporte de L-cys hacia dentro de las células (Kimura et al., 2010) .Por otro lado, se ha reportado que altas concentraciones de H₂S pueden tener efectos tóxicos por el incremento de flujo intracelular de Ca²⁺ por la activación receptores NMDA (Nagai *et al.*, 2004). En nuestro caso, observamos un sobre-expresión de subunidad NR2A y una disminución de la expresión de la subunidad NR2B. Aunque no medimos la actividad del receptor NMDA, los ratones expuestos de manera crónica a iAs, muestran alteraciones en la inducción de la potenciación a largo plazo en el hipocampo (Nelson-Mora et al., 2018). La exposición a compuestos contaminantes presentes en el ambiente como el iAs está presente en nuestra vida, no solo en el agua de bebida, sino en los alimentos, exposiciones laborales, accidentales etc. Pocos estudios han explorado los efectos de la exposición aguda por iAs, esta evidencia es importante, ya que los efectos sobre el cerebro no son homogéneos en todas las regiones y además la exposición a iAs compromete los niveles de antioxidantes y la disposición de aminoácidos como el L-glu, L-cys y metionina. Los efectos de la exposición a iAs sobre el SNC van a depender de la dosis y del tiempo de exposición. Este trabajo da evidencia de los efectos de la exposición al iAs sobre la producción del gasotransmisor H₂S, situación que no se había explorado anteriormente. Nuestros resultados pueden ayudar en el desarrollo de estrategias preventivas adecuadas, tales como dietas o el desarrollo de agonistas efectivos contra los efectos tóxicos del iAs en cerebro, así como también provee información para aclarar mecanismos de neurotoxicidad del iAs. Además, da evidencia de los mecanismos a través de los cual pueden impactar el SNC a lo largo de la vida y constituir un factor de riesgo para el desarrollo de padecimientos neurodegenerativos.

10) CONCLUSIONES

En resumen, los presentes resultados sugieren que la respuesta aguda a iAs genera cambios en los niveles de GSH y Trx1. Los cambios en los niveles de GSH se dan principalmente en la corteza cerebral y parecen activar a los factores de transcripción Nrf2 y NFκB los que inducen la expresión de los transportadores a L-cys₂/L-glu (xCT) y L-cys (EAAC1), y de los transportadores de L-glutamato, GLT1 y GLAST, así como las enzimas de la vía de la transulfuración CBS y CSE que aumentan los niveles de H₂S. Estas respuestas iniciales muestran las alteraciones bioquímicas que un xenobiótico como el iAs produce en el SNC.

11) PERSPECTIVAS

Este trabajo abre otras interrogantes de estudio en el modelo de agudo de exposición a iAs:

- Usar inhibidores de los transportadores a xCT y EAAC1 y evaluar su importancia en proveer precursores para síntesis de GSH en este modelo.
- Evaluar con otros marcadores más sensibles para estrés oxidante y así poder asociarlo a la activación de los factores de transcripción NFκB y Nrf2, sensibles al estado redox de la célula.
- Determinar los niveles de CSE en proteína y ARNm, y medir la actividad de CBS relacionarla con el aumento en la síntesis de H₂S, a través de la vía de la transulfuración.
- Verificar los niveles de glutamato extracelular y relacionarlos con el aumento en el transporte por GLT1 y GLAST, así como la alteración en la expresión de las subunidades de receptores NMDA.
- Valorar la expresión de ARNm de los receptores y transportadores, utilizando inhibidores de la activación de los factores de transcripción.

12) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abernathy, C. O., D. J. Thomas and R. L. Calderon, 2003: Health effects and risk assessment of arsenic. *The Journal of nutrition*, **133**, 1536S-1538S.
- Ahmad, S., K. T. Kitchin and W. R. Cullen, 2000: Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Archives of biochemistry and biophysics*, **382**, 195-202.
- Alfaro De La Torre M.C., e. a., 2018: Concentraciones de arsénico y fluoruro en agua subterránea. *Arsénico y fluoruro en agua: riesgos y perspectivas desde la sociedad civil y la academia en México*.
- Amara, S. G. and A. C. Fontana, 2002: Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochemistry international*, **41**, 313-318.
- Aoyama, K. and T. Nakaki, 2013: Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. *International journal of molecular sciences*, **14**, 21021-21044.
- Aoyama, K., S. W. Suh, A. M. Hamby, J. Liu, W. Y. Chan, Y. Chen and R. A. Swanson, 2006: Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nature neuroscience*, **9**, 119-126.
- ATSDR, 2007: Resumen de Salud Pública Arsénico.
- ATSDR, 2017: ATSDR's Substance Priority List.
- Bardullas, U., J. H. Limon-Pacheco, M. Giordano, L. Carrizales, M. S. Mendoza-Trejo and V. M. Rodriguez, 2009: Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. *Toxicology and applied pharmacology*, **239**, 169-177.
- Brigelius-Flohe, R., 1999: Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free radical biology & medicine*, **27**, 951-965.
- Calderon, J., M. E. Navarro, M. E. Jimenez-Capdeville, M. A. Santos-Diaz, A. Golden, I. Rodriguez-Leyva, V. Borja-Aburto and F. Diaz-Barriga, 2001: Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environmental research*, **85**, 69-76.
- Challenger, F., 1951: Biological methylation. *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry*, **12**, 429-491.
- Chandravanshi, L. P., R. Gupta and R. K. Shukla, 2018: Developmental Neurotoxicity of Arsenic: Involvement of Oxidative Stress and Mitochondrial Functions. *Biological trace element research*, **186**, 185-198.
- Chappell, W. R., 2003: *Arsenic exposure and health effects V : proceedings of the International Conference on Arsenic Exposure and Health Effects, July 14-18, 2002, San Diego, California*, p. xx, 533 p. Elsevier, Amsterdam ; Boston, Mass.
- Cobley, J. N., M. L. Fiorello and D. M. Bailey, 2018: 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox biology*, **15**, 490-503.
- Coppin, J. F., W. Qu and M. P. Waalkes, 2008: Interplay between cellular methyl metabolism and adaptive efflux during oncogenic transformation from chronic arsenic exposure in human cells. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 19342-19350.
- Cornford, E. M., L. D. Braun, P. D. Crane and W. H. Oldendorf, 1978: Blood-brain barrier restriction of peptides and the low uptake of enkephalins. *Endocrinology*, **103**, 1297-1303.
- Currais, A. and P. Maher, 2013: Functional consequences of age-dependent changes in glutathione status in the brain. *Antioxidants & redox signaling*, **19**, 813-822.
- Danbolt, N. C., 2001: Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, **65**, 1-105.
- De Bundel, D., A. Schallier, E. Loyens, R. Fernando, H. Miyashita, J. Van Liefferinge, K. Vermoesen, S. Bannai, H. Sato, Y. Michotte, I. Smolders and A. Massie, 2011: Loss of system x(c)- does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and

- limbic seizure susceptibility. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **31**, 5792-5803.
- Dringen, R., J. M. Gutterer and J. Hirrlinger, 2000: Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European journal of biochemistry / FEBS*, **267**, 4912-4916.
- Enokido, Y., E. Suzuki, K. Iwasawa, K. Namekata, H. Okazawa and H. Kimura, 2005: Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **19**, 1854-1856.
- Escudero-Lourdes, C., E. E. Uresti-Rivera, C. Oliva-Gonzalez, M. A. Torres-Ramos, P. Aguirre-Banuelos and A. J. Gandolfi, 2016: Cortical Astrocytes Acutely Exposed to the Monomethylarsonous Acid (MMA(III)) Show Increased Pro-inflammatory Cytokines Gene Expression that is Consistent with APP and BACE-1: Over-expression. *Neurochemical research*, **41**, 2559-2572.
- Firdaus, F., M. F. Zafeer, M. Waseem, R. Ullah, M. Ahmad and M. Afzal, 2018: Thymoquinone alleviates arsenic induced hippocampal toxicity and mitochondrial dysfunction by modulating mPTP in Wistar rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, **102**, 1152-1160.
- Flora, S. J., 1999: Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-acetylcysteine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, **26**, 865-869.
- Flora, S. J., S. Bhadauria, S. C. Pant and R. K. Dhaked, 2005: Arsenic induced blood and brain oxidative stress and its response to some thiol chelators in rats. *Life sciences*, **77**, 2324-2337.
- Flora, S. J., K. Bhatt and A. Mehta, 2009: Arsenic moiety in gallium arsenide is responsible for neuronal apoptosis and behavioral alterations in rats. *Toxicology and applied pharmacology*, **240**, 236-244.
- Fridovich, I., 1989: Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *The Journal of biological chemistry*, **264**, 7761-7764.
- G, S. B., S. Choi, J. Krishnan and R. K., 2017: Cigarette smoke and related risk factors in neurological disorders: An update. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, **85**, 79-86.
- Garcia-Chavez, E., A. Santamaria, F. Diaz-Barriga, P. Mandeville, B. I. Juarez and M. E. Jimenez-Capdeville, 2003: Arsenite-induced formation of hydroxyl radical in the striatum of awake rats. *Brain research*, **976**, 82-89.
- Garza-Lombo, C., A. Pappa, M. I. Panayiotidis, M. E. Gonsbatt and R. Franco, 2019: Arsenic-induced neurotoxicity: a mechanistic appraisal. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, **24**, 1305-1316.
- Gonsbatt, M. E. y. D. R., L. M., 2018: Efectos a la salud por exposición a arsénico *Arsénico y fluoruro en agua: riesgos y perspectivas desde la sociedad civil y la academia en México*. México.
- Gu, F., V. Chauhan and A. Chauhan, 2015: Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, **18**, 89-95.
- Halliwell, B., 1992: Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of neurochemistry*, **59**, 1609-1623.
- Halliwell, B., 2006: Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry*, **97**, 1634-1658.
- Hine, C. and J. R. Mitchell, 2017: Endpoint or Kinetic Measurement of Hydrogen Sulfide Production Capacity in Tissue Extracts. *Bio-protocol*, **7**.
- Hirano, S., Y. Kobayashi, X. Cui, S. Kanno, T. Hayakawa and A. Shraim, 2004: The accumulation and toxicity of methylated arsenicals in endothelial cells: important roles of thiol compounds. *Toxicology and applied pharmacology*, **198**, 458-467.
- Huang, C. W. and P. K. Moore, 2015: H₂S Synthesizing Enzymes: Biochemistry and Molecular Aspects. *Handbook of experimental pharmacology*, **230**, 3-25.

- Huo, T. G., W. K. Li, Y. H. Zhang, J. Yuan, L. Y. Gao, Y. Yuan, H. L. Yang, H. Jiang and G. F. Sun, 2015: Excitotoxicity Induced by Realgar in the Rat Hippocampus: the Involvement of Learning Memory Injury, Dysfunction of Glutamate Metabolism and NMDA Receptors. *Molecular neurobiology*, **51**, 980-994.
- Janaky, R., V. Varga, A. Hermann, P. Saransaari and S. S. Oja, 2000: Mechanisms of L-cysteine neurotoxicity. *Neurochemical research*, **25**, 1397-1405.
- Jiang, B., G. Tang, K. Cao, L. Wu and R. Wang, 2010: Molecular mechanism for H₂S-induced activation of K(ATP) channels. *Antioxidants & redox signaling*, **12**, 1167-1178.
- Jomova, K., Z. Jenisova, M. Feszterova, S. Baros, J. Liska, D. Hudecova, C. J. Rhodes and M. Valko, 2011: Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of applied toxicology : JAT*, **31**, 95-107.
- Kabil, O., V. Vitvitsky, P. Xie and R. Banerjee, 2011: The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H₂S production in murine tissues. *Antioxidants & redox signaling*, **15**, 363-372.
- Kanai, Y. and M. A. Hediger, 2003: The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *European journal of pharmacology*, **479**, 237-247.
- Kim, M., S. Seo, K. Sung and K. Kim, 2014: Arsenic exposure in drinking water alters the dopamine system in the brains of C57BL/6 mice. *Biological trace element research*, **162**, 175-180.
- Kimura, Y., R. Dargusch, D. Schubert and H. Kimura, 2006: Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, **8**, 661-670.
- Kimura, Y., Y. Goto and H. Kimura, 2010: Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxidants & redox signaling*, **12**, 1-13.
- Kimura, Y. and H. Kimura, 2004: Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **18**, 1165-1167.
- Kobayashi, Y., X. Cui and S. Hirano, 2005: Stability of arsenic metabolites, arsenic triglutathione [As(GS)₃] and methylarsenic diglutathione [CH₃As(GS)₂], in rat bile. *Toxicology*, **211**, 115-123.
- Lee, M., C. Schwab, S. Yu, E. McGeer and P. L. McGeer, 2009: Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide. *Neurobiology of aging*, **30**, 1523-1534.
- Leslie, E. M., A. Haimeur and M. P. Waalkes, 2004: Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 32700-32708.
- Li, J., X. Duan, D. Dong, Y. Zhang, L. Zhao, W. Li, J. Chen, G. Sun and B. Li, 2017: Tissue-specific distributions of inorganic arsenic and its methylated metabolites, especially in cerebral cortex, cerebellum and hippocampus of mice after a single oral administration of arsenite. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*, **43**, 15-22.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen, 2001: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Luo, J. H., Z. Q. Qiu, W. Q. Shu, Y. Y. Zhang, L. Zhang and J. A. Chen, 2009: Effects of arsenic exposure from drinking water on spatial memory, ultra-structures and NMDAR gene expression of hippocampus in rats. *Toxicology letters*, **184**, 121-125.
- Luz María Del Razo, J. M. L. a. M. N. V., 2018: *Arsénico y fluoruro en agua: riesgos y perspectivas desde la sociedad civil y la academia en México*. México
- Mandal, P. K., A. Seiler, T. Perisic, P. Kolle, A. Banjac Canak, H. Forster, N. Weiss, E. Kremmer, M. W. Lieberman, S. Bannai, P. Kuhlencordt, H. Sato, G. W. Bornkamm and M. Conrad, 2010: System x(c)- and thioredoxin reductase 1 cooperatively rescue glutathione deficiency. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 22244-22253.
- Mao, J., J. Yang, Y. Zhang, T. Li, C. Wang, L. Xu, Q. Hu, X. Wang, S. Jiang, X. Nie and G. Chen, 2016: Arsenic trioxide mediates HAPI microglia inflammatory response and subsequent neuron apoptosis through p38/JNK MAPK/STAT3 pathway. *Toxicology and applied pharmacology*, **303**, 79-89.

- Maragakis, N. J. and J. D. Rothstein, 2004: Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiology of disease*, **15**, 461-473.
- Markand, S., A. Tawfik, Y. Ha, J. Gnana-Prakasam, S. Sonne, V. Ganapathy, N. Sen, M. Xian and S. B. Smith, 2013: Cystathionine beta synthase expression in mouse retina. *Current eye research*, **38**, 597-604.
- Martinez-Lozada, Z., A. M. Guillem and M. B. Robinson, 2016: Transcriptional Regulation of Glutamate Transporters: From Extracellular Signals to Transcription Factors. *Advances in pharmacology*, **76**, 103-145.
- Martinez, L., V. Jimenez, C. Garcia-Sepulveda, F. Ceballos, J. M. Delgado, P. Nino-Moreno, L. Doniz, V. Saavedra-Alanis, C. G. Castillo, M. E. Santoyo, R. Gonzalez-Amaro and M. E. Jimenez-Capdeville, 2011: Impact of early developmental arsenic exposure on promoter CpG-island methylation of genes involved in neuronal plasticity. *Neurochemistry international*, **58**, 574-581.
- Mattson, M. P., & Calabrese, E. J., 2010: *Hormesis: What it is and why it matters*. In *Hormesis: A Revolution in Biology*.
- McBean, G. J., 2012: The transsulfuration pathway: a source of cysteine for glutathione in astrocytes. *Amino acids*, **42**, 199-205.
- McBean, G. J., 2017: Cysteine, Glutathione, and Thiol Redox Balance in Astrocytes. *Antioxidants*, **6**.
- Moldogazieva, N. T., I. M. Mokhosoev, N. B. Feldman and S. V. Lutsenko, 2018: ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free radical research*, **52**, 507-543.
- Monaco, N. M., M. Bartos, S. Dominguez, C. Gallegos, C. Bras, M. D. C. Esandi, C. Bouzat, L. Giannuzzi, A. Minetti and F. Gumilar, 2018: Low arsenic concentrations impair memory in rat offspring exposed during pregnancy and lactation: Role of alpha7 nicotinic receptor, glutamate and oxidative stress. *Neurotoxicology*, **67**, 37-45.
- Nagai, Y., M. Tsugane, J. Oka and H. Kimura, 2004: Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **18**, 557-559.
- Nelson-Mora, J., M. L. Escobar, L. Rodriguez-Duran, L. Massieu, T. Montiel, V. M. Rodriguez, K. Hernandez-Mercado and M. E. Gonsebatt, 2018: Gestational exposure to inorganic arsenic (iAs3+) alters glutamate disposition in the mouse hippocampus and ionotropic glutamate receptor expression leading to memory impairment. *Archives of toxicology*, **92**, 1037-1048.
- Ng, J. C., A. Juhasz, E. Smith and R. Naidu, 2015: Assessing the bioavailability and bioaccessibility of metals and metalloids. *Environmental science and pollution research international*, **22**, 8802-8825.
- Olney, J. W., C. Zorumski, M. T. Price and J. Labruyere, 1990: L-cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin. *Science*, **248**, 596-599.
- OMS, 2018: Arsénico.
- Pajarillo, E., A. Rizor, J. Lee, M. Aschner and E. Lee, 2019: The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology*, **161**, 107559.
- Patel, M., 2016: Targeting Oxidative Stress in Central Nervous System Disorders. *Trends in pharmacological sciences*, **37**, 768-778.
- Paul, B. D., J. I. Sbodio and S. H. Snyder, 2018: Cysteine Metabolism in Neuronal Redox Homeostasis. *Trends in pharmacological sciences*, **39**, 513-524.
- Porter, K. E., A. Basu, A. E. Hubbard, M. N. Bates, D. Kalman, O. Rey, A. Smith, M. T. Smith, C. Steinmaus and C. F. Skibola, 2010: Association of genetic variation in cystathionine-beta-synthase and arsenic metabolism. *Environmental research*, **110**, 580-587.
- Ramos-Chavez, L. A., C. R. Rendon-Lopez, A. Zepeda, D. Silva-Adaya, L. M. Del Razo and M. E. Gonsebatt, 2015: Neurological effects of inorganic arsenic exposure: altered cysteine/glutamate transport, NMDA expression and spatial memory impairment. *Frontiers in cellular neuroscience*, **9**, 21.

- Rao, M. V. and G. Avani, 2004: Arsenic induced free radical toxicity in brain of mice. *Indian journal of experimental biology*, **42**, 495-498.
- Rao, P., M. M. Yallapu, Y. Sari, P. B. Fisher and S. Kumar, 2015: Designing Novel Nanoformulations Targeting Glutamate Transporter Excitatory Amino Acid Transporter 2: Implications in Treating Drug Addiction. *Journal of personalized nanomedicine*, **1**, 3-9.
- Ren, X., L. Zou, X. Zhang, V. Branco, J. Wang, C. Carvalho, A. Holmgren and J. Lu, 2017: Redox Signaling Mediated by Thioredoxin and Glutathione Systems in the Central Nervous System. *Antioxidants & redox signaling*, **27**, 989-1010.
- Rhee, S. G., H. Z. Chae and K. Kim, 2005: Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free radical biology & medicine*, **38**, 1543-1552.
- Rios, R., M. E. Santoyo, D. Cruz, J. M. Delgado, S. Zarazua and M. E. Jimenez-Capdeville, 2012: Methyl group balance in brain and liver: role of choline on increased S-adenosyl methionine (SAM) demand by chronic arsenic exposure. *Toxicology letters*, **215**, 110-118.
- Rodriguez, V. M., L. M. Del Razo, J. H. Limon-Pacheco, M. Giordano, L. C. Sanchez-Pena, E. Uribe-Querol, G. Gutierrez-Ospina and M. E. Gonshebbatt, 2005: Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **84**, 157-166.
- Rodriguez, V. M., M. E. Jimenez-Capdeville and M. Giordano, 2003: The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicology letters*, **145**, 1-18.
- Rodriguez, V. M., J. H. Limon-Pacheco, L. Carrizales, M. S. Mendoza-Trejo and M. Giordano, 2010: Chronic exposure to low levels of inorganic arsenic causes alterations in locomotor activity and in the expression of dopaminergic and antioxidant systems in the albino rat. *Neurotoxicology and teratology*, **32**, 640-647.
- Rosen, B. P. and Z. Liu, 2009: Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environment international*, **35**, 512-515.
- Salud, S. d., 2000: NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano.
- Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". Diario Oficial de la Federación
- Sanchez-Pena, L. C., P. Petrosyan, M. Morales, N. B. Gonzalez, G. Gutierrez-Ospina, L. M. Del Razo and M. E. Gonshebbatt, 2010: Arsenic species, AS3MT amount, and AS3MT gene expression in different brain regions of mouse exposed to arsenite. *Environmental research*, **110**, 428-434.
- Sato, H., K. Kuriyama-Matsumura, T. Hashimoto, H. Sasaki, H. Wang, T. Ishii, G. E. Mann and S. Bannai, 2001: Effect of oxygen on induction of the cystine transporter by bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal macrophages. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 10407-10412.
- Schindler, J., S. Jung, G. Niedner-Schatteburg, E. Friauf and H. G. Nothwang, 2006: Enrichment of integral membrane proteins from small amounts of brain tissue. *Journal of neural transmission*, **113**, 995-1013.
- Schulz, J. B., J. Lindenau, J. Seyfried and J. Dichgans, 2000: Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European journal of biochemistry*, **267**, 4904-4911.
- Schwerdtle, T., I. Walter, I. Mackiw and A. Hartwig, 2003: Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA. *Carcinogenesis*, **24**, 967-974.
- Senft, A. P., T. P. Dalton and H. G. Shertzer, 2000: Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Analytical biochemistry*, **280**, 80-86.
- Shila, S., M. Subathra, M. A. Devi and C. Panneerselvam, 2005: Arsenic intoxication-induced reduction of glutathione level and of the activity of related enzymes in rat brain regions: reversal by DL-alpha-lipoic acid. *Archives of toxicology*, **79**, 140-146.

- Silva-Adaya, D., M. E. Gonsebatt and J. Guevara, 2014: Thioredoxin system regulation in the central nervous system: experimental models and clinical evidence. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2014**, 590808.
- Singh, S., D. Padovani, R. A. Leslie, T. Chiku and R. Banerjee, 2009: Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *The Journal of biological chemistry*, **284**, 22457-22466.
- Sivandzade, F., S. Prasad, A. Bhalarao and L. Cucullo, 2019: NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. *Redox biology*, **21**, 101059.
- Snow, E. T., P. Sykora, T. R. Durham and C. B. Klein, 2005: Arsenic, mode of action at biologically plausible low doses: what are the implications for low dose cancer risk? *Toxicology and applied pharmacology*, **207**, 557-564.
- Srivastava, P., R. S. Yadav, L. P. Chandravanshi, R. K. Shukla, Y. K. Dhuriya, L. K. S. Chauhan, H. N. Dwivedi, A. B. Pant and V. K. Khanna, 2014: Unraveling the mechanism of neuroprotection of curcumin in arsenic induced cholinergic dysfunctions in rats. *Toxicology and applied pharmacology*, **279**, 428-440.
- Stefanson, A. L. and M. Bakovic, 2014: Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: focus on plant-derived compounds and trace minerals. *Nutrients*, **6**, 3777-3801.
- Styblo, M., L. M. Del Razo, L. Vega, D. R. Germolec, E. L. LeCluyse, G. A. Hamilton, W. Reed, C. Wang, W. R. Cullen and D. J. Thomas, 2000: Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Archives of toxicology*, **74**, 289-299.
- Sun, X. L., X. N. Zeng, F. Zhou, C. P. Dai, J. H. Ding and G. Hu, 2008: KATP channel openers facilitate glutamate uptake by GluTs in rat primary cultured astrocytes. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, **33**, 1336-1342.
- Sun, Y., G. Liu and Y. Cai, 2016: Thiolated arsenicals in arsenic metabolism: Occurrence, formation, and biological implications. *Journal of environmental sciences*, **49**, 59-73.
- Tai, Y. H., R. Y. Tsai, Y. H. Wang, C. H. Cherng, P. L. Tao, T. M. Liu and C. S. Wong, 2008: Amitriptyline induces nuclear transcription factor-kappaB-dependent glutamate transporter upregulation in chronic morphine-infused rats. *Neuroscience*, **153**, 823-831.
- Thomas, D. J., 2007: Molecular processes in cellular arsenic metabolism. *Toxicology and applied pharmacology*, **222**, 365-373.
- Thomas, D. J., J. Li, S. B. Waters, W. Xing, B. M. Adair, Z. Drobna, V. Devesa and M. Styblo, 2007: Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. *Experimental biology and medicine*, **232**, 3-13.
- Thomas, D. J., S. B. Waters and M. Styblo, 2004: Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicology and applied pharmacology*, **198**, 319-326.
- Tonelli, C., I. I. C. Chio and D. A. Tuveson, 2018: Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & redox signaling*, **29**, 1727-1745.
- Turrens, J. F., 2003: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, **552**, 335-344.
- Vahter, M., 2002: Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, **181-182**, 211-217.
- Valdovinos-Flores, C. and M. E. Gonsebatt, 2012: The role of amino acid transporters in GSH synthesis in the blood-brain barrier and central nervous system. *Neurochemistry international*, **61**, 405-414.
- Valdovinos-Flores, C. and M. E. Gonsebatt, 2013: Nerve growth factor exhibits an antioxidant and an autocrine activity in mouse liver that is modulated by buthionine sulfoximine, arsenic, and acetaminophen. *Free radical research*, **47**, 404-412.
- Valdovinos-Flores, C., J. H. Limon-Pacheco, R. Leon-Rodriguez, P. Petrosyan, C. Garza-Lombo and M. E. Gonsebatt, 2019: Systemic L-Buthionine -S-R-Sulfoximine Treatment Increases Plasma NGF and

- Upregulates L-cys/L-cys2 Transporter and gamma-Glutamylcysteine Ligase mRNAs Through the NGF/TrkA/Akt/Nrf2 Pathway in the Striatum. *Frontiers in cellular neuroscience*, **13**, 325.
- Wang, J. F., Y. Li, J. N. Song and H. G. Pang, 2014: Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury. *Neurochemistry international*, **64**, 37-47.
- Wang, X. F. and M. S. Cynader, 2000: Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *Journal of neurochemistry*, **74**, 1434-1442.
- Watanabe, T. and S. Hirano, 2013: Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Archives of toxicology*, **87**, 969-979.
- Wright, R. O., C. Amarasiriwardena, A. D. Woolf, R. Jim and D. C. Bellinger, 2006: Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese, and cadmium levels in school-age children residing near a hazardous waste site. *Neurotoxicology*, **27**, 210-216.
- Zarazua, S., R. Rios, J. M. Delgado, M. E. Santoyo, D. Ortiz-Perez and M. E. Jimenez-Capdeville, 2010: Decreased arginine methylation and myelin alterations in arsenic exposed rats. *Neurotoxicology*, **31**, 94-100.

13) ANEXOS

(1) Artículos publicados como parte del proyecto de doctorado



Early Neurotoxic Effects of Inorganic Arsenic Modulate Cortical GSH Levels Associated With the Activation of the Nrf2 and NFκB Pathways, Expression of Amino Acid Transporters and NMDA Receptors and the Production of Hydrogen Sulfide

Daniela Silva-Adaya^{1,2}, Lucio Antonio Ramos-Chávez³, Pavel Petrosyan¹, Wendy Leslie González-Alfonso¹, Alegna Pérez-Acosta¹ and Maria E. Gensebatt^{1*}

¹Departamento de Medicina Genómica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Mexico, ²Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México, Mexico, ³Departamento de Neuroquímica, Subdirección de Investigaciones Clínicas, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, Ciudad de México, México, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Rocío Martínez De Pablos,
University of Seville, Spain

Reviewed by:

Fawaz Alasmari,
King Saud University, Saudi Arabia
Koji Aoyama,
Teikyo University, Japan

*Correspondence:

Maria E. Gensebatt
margen@unam.mx

Received: 01 November 2019

Accepted: 21 January 2020

Published: 25 February 2020

Citation:

Silva-Adaya D, Ramos-Chávez LA, Petrosyan P, González-Alfonso WL, Pérez-Acosta A and Gensebatt ME (2020) Early Neurotoxic Effects of Inorganic Arsenic Modulate Cortical GSH Levels Associated With the Activation of the Nrf2 and NFκB Pathways, Expression of Amino Acid Transporters and NMDA Receptors and the Production of Hydrogen Sulfide. *Front. Cell. Neurosci.* 14:17. doi: 10.3389/fncel.2020.00017

Exposure to toxic metals and metalloids is an important cause of preventable diseases worldwide. Inorganic arsenic (iAs) affects several organs and tissues, causing neurobehavioral alterations in the central nervous system (CNS) that might lead to neurodegeneration. In this work, we wanted to explore the time- and dose-related changes on glutathione (GSH) levels in several regions of the CNS, such as the cortex, striatum, hippocampus, and cerebellum, to identify the initial cellular changes associated to GSH depletion due to iAs exposure. Mice received a single intraperitoneal injection containing 5 or 14 mg/kg sodium arsenite. Animals were killed at 2, 6, and 24 h. Significant depletion of GSH levels was observed in the cortex at 2 and 6 h, while on the striatum, hippocampus, or cerebellum regions, no significant changes were observed. GSH depletion in the cortex was associated with the activation of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and nuclear factor kappa B (NFκB) pathways, which led to the upregulation of xCT, excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1), glutamate/aspartate transporter (GLAST), and glial glutamate transporter 1 (GLT-1), and the activation of the transsulfuration pathways, which led to the overproduction of H₂S in the cortex and increased levels of GSH in the cortex and cerebellum at 24 h. In the cortex, the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits NR2A and NR2B were also altered at 24 h. These early effects were not homogeneous among different brain regions and indicate early neurotoxic alterations in the cortex and cerebellum.

Keywords: arsenic, GSH, Nrf2, NFκB, CNS cysteine/glutamate transporters, H₂S

INTRODUCTION

Improvements in the quality of life of humans is reflected in the increase in our life span; however, environmental pollution continues to be the largest cause of disease and premature death worldwide (Landrigan et al., 2018). The overexploitation of water resources exposes a continuously increasing number of people to toxic elements such as pesticides, nitrites, and metals (Kurwadkar, 2017). Arsenic is an element widely distributed on earth in soil and minerals that, naturally or due to anthropogenic activities, might enter the air, water, or food. Today, human exposure to this toxic element occurs mainly through drinking water or food and represents a worldwide problem affecting over 200 million people. Cardiovascular, endocrine, immune, and neurotoxic effects and several types of cancer have been associated with inorganic arsenic (iAs) exposure (Hong et al., 2014).

Acute neurotoxic effects after oral doses include mild to severe encephalopathy, depending on the dose. Symptoms include confusion, hallucinations, reduced memory, and emotional lability (exaggerated changes in mood or affect; Garza-Lombó et al., 2018a,b, 2019). On the other hand, chronic exposure to iAs is associated with the development of peripheral neuropathies (Garza-Lombó et al., 2019). Furthermore, in children exposed to iAs concentrations ranging from 5 to 50 ppb in drinking water, neurobehavioral alterations such as impaired cognitive functions, verbal abilities, and long-term memory, and decreased motor skills have been reported (Calderón et al., 2001; Parvez et al., 2011). However, it is not clear when the initial effects are observed in the central nervous system (CNS; Garza-Lombó et al., 2019).

iAs crosses the blood-brain barrier and accumulates in different brain regions where it is methylated by As^{3+} methyltransferase, a process that requires thioredoxin or glutathione (GSH) as a reductive agent and S-adenosyl methionine (SAM) as the methyl donor (Thomas et al., 2004; Sánchez-Peña et al., 2010). The SAM pathway and GSH production are linked through the transsulfuration pathway (Rodríguez et al., 2005). In addition, regions with higher energy demand, such as the cortex and CA3/CA4 regions of the hippocampus or cerebellum, show the highest GSH levels and thioredoxin immunoreactivity (Sánchez-Peña et al., 2010).

Owing to its high oxygen consumption and low levels of antioxidant enzymes, the brain is vulnerable to the harmful effects of reactive oxygen species (ROS). GSH is the most important endogenous antioxidant in the CNS and plays an important role in the maintenance of the intracellular redox balance and the detoxification of xenobiotics (Gu et al., 2015), being also considered a cysteine and glutamate reservoir in the brain. Intracellular GSH synthesis requires the availability of its precursor amino acids: L-cysteine (L-cys), L-glutamate (L-glu), and L-glycine (L-gly; Robert et al., 2014). Cysteine is the limiting amino acid for GSH; thus, it is continuously imported or synthesized, depending on the cell type. For example, cystine (the oxidized form of cysteine) is taken up into glial cells by the antiporter system xc⁻ (Xc⁻), which is a Na⁺-independent, Cl⁻-dependent cystine/glutamate exchanger

composed of the catalytic subunit xCT and the structural heavy chain 4F2 cell surface antigen (4F2hc). In the brain, the Xc⁻ system is predominately expressed in astrocytes (Bannai, 1986; Robert et al., 2014). On the other hand, a member of the family of excitatory amino acid transporters (EAAT), mainly EAAT3 [excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1) in mouse], is an important importer of L-cys in neurons that is present at much lower levels than glutamate or glycine (Aoyama et al., 2012). Therefore, EAAT3/EAAC1 supplies the rate-limiting substrate for GSH synthesis in neurons, while other members of this family, such as EAAT1 or glutamate/aspartate transporter (GLAST) and EAAT2 or glial glutamate transporter 1 (GLT-1), are expressed in glia and participate in the uptake of L-glu (Valdovinos-Flores and Gonsebatt, 2012). Aoyama et al. (2006) reported that EAAC1-knockout mice have decreased neuronal GSH and increased neuronal oxidative stress. These effects were reversed when the animals received the membrane-permeable L-cys precursor N-acetylcysteine (Aoyama et al., 2006). We have observed that gestational exposure to iAs through drinking water induced the upregulation of xCT, which was associated with increased levels of GSH in the cortex and hippocampus (Ramos-Chávez et al., 2015; Nelson-Mora et al., 2018). In addition, the overexpression of xCT leads to increased extracellular glutamate and to the downregulation of both N-methyl-D-aspartate (NMDA) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) ionotropic glutamate receptors, with significant negative effects on learning and memory (Ramos-Chávez et al., 2015; Nelson-Mora et al., 2018).

The L-cys required for GSH synthesis in astrocytes can also be generated from methionine through the transsulfuration pathway by the action of cystathionine- β -synthase (CBS) and cystathionine- γ -lyase (CSE; McBean, 2017). In this respect, Coppin et al. (2008) reported CBS upregulation in transformed cultured cells after protracted exposure to iAs that led to increased GSH levels. Moreover, CBS, CSE, and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (Chen et al., 2004; Singh et al., 2009) are producers of endogenous hydrogen sulfur (H_2S), a neuromodulator present in the brain that, in excess, could have detrimental effects. CBS is predominantly expressed in the brain and has been associated with the modulation of NMDA receptor (NMDAR)-mediated responses (Huang and Moore, 2015).

Here, we wanted to investigate the early time- and dose-related changes on GSH levels in several regions of the CNS such as the cortex, striatum, hippocampus, and cerebellum, identifying initial cellular changes associated to GSH depletion due to iAs exposure.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Antibodies

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless otherwise indicated. For Western blots, primary rabbit antibodies against xCT, EAAC1, GLAST, GLT-1, and CBS (Abcam Cat# ab37185, RRID:AB_778944; Abcam Cat# ab124802, RRID:AB_10974334; Abcam Cat# ab416, RRID:AB_304334; Abcam Cat# ab41621, RRID:AB_941782;

Abcam Cat# ab135626, RRID:AB_2814659, respectively) were obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA). Primary anti-NR2A and anti-NR2B (Millipore Cat# AB1555P, RRID:AB_90770; Millipore Cat# AB1557P, RRID:AB_90772, respectively) antibodies were purchased from Millipore, Bedford, MA, USA. Primary anti-L-type amino acid transporter 1 (anti-LAT1; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-34554, RRID:AB_2270583) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Rabbit antimouse β -tubulin (Sigma-Aldrich Cat# T4026, RRID:AB_477577) was purchased from Sigma-Aldrich.

Animals and Treatment

Five- to six-week-old male CD-1 mice were obtained from the Animal Care Facility at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM and were maintained at 23–25°C under a 12-h light/dark cycle and relative humidity of 50–60%. Animals had free access to standard food (Harlan 2018S Diet; Harlan, Indianapolis, IN, USA) and water.

Animals were divided into different working groups. To study the acute response, they received an intraperitoneal (i.p.) injection (100 μ l) containing 0, 5, or 14 mg of sodium arsenite per kilogram of body weight. Controls received an i.p. injection of 100 μ l of isotonic saline solution. Animals were killed at 2, 6, and 24 h after i.p. injection. A semichronic treatment group to compare the acute response was designed. In this group, the animals received i.p. injections containing 0, 2.5, and 5 mg of sodium arsenite per kilogram of body weight per day for 9 days. Sodium arsenite solutions were prepared daily and dissolved in injectable water.

Animals were killed by cervical dislocation, followed by decapitation. Different brain regions were dissected for immunoblotting determination. To determine GSH and/or to generate the membrane-enriched integral protein fractions and to measure H₂S, tissue samples were immediately homogenized in their respective buffers and kept frozen at –80°C until analysis.

The experiments were performed following the guidelines stated in the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication #85-23, revised 1985) and “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Clave NOM-062-ZOO-1999)” of the “Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)” (published in August 2001).

GSH Level Determination

The levels of reduced GSH were measured in the cortex, hippocampus, striatum, and cerebellum using a microplate-adapted fluorometric o-phthalaldehyde (OPA) method (Ramos-Chávez et al., 2015). The method is based on the GSH reaction with o-phthalaldehyde (OPA) to form a highly stable and fluorescent isoindole derivative. Briefly, wet tissue was homogenized in 10 volumes of ice-cold buffer (154 mM KCl, 5 mM diethylenetriaminepentaacetic acid, and 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.8). Immediately thereafter, equal volumes of cold acid buffer [40 mM HCl, 10 mM DTPA, 20 mM ascorbic acid, and 10% trichloroacetic acid (TCA)] were added

to one volume of homogenate. Two microliters of supernatant was used for GSH determination. Fluorescence was determined with 365 nm excitation and 430 nm emission filters in a DTX 800/880 Multimode Detector (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Western Blotting

Western blot assays for CBS determination were performed as follows. Total tissue was homogenized in ice-cold lysis buffer [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM glycerol-2-phosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and inhibitor protease cocktail], containing protease inhibitor cocktail. The homogenates were centrifuged at 15,000 \times g for 15 min at 4°C. Membrane-enriched integral protein fractions were obtained from frozen tissue samples as described by Schindler et al. (2006) for the Western blot analysis of xCT, EAAC1, LAT1, GLAST, GLT-1, NR2A, and NR2B. Frozen tissues were homogenized in 20 volumes of CLB buffer containing 10 mM HEPES, 10 mM NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 5 mM EDTA, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, and inhibitor protease cocktail. The homogenates were centrifuged at 6,300 \times g for 15 min at 4°C. The supernatants were recovered and centrifuged at 100,000 \times g for 30 min at 4°C. The pellets were finally suspended in 150 μ l of 40 mM Tris-HCl at pH 9.5, 8 M urea, and 4% (w/v) Triton X-100. Protein concentrations were quantified using a Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

The samples (20–40 μ g of protein per well) were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Germany). The membranes were blocked with Tris-buffered saline (TBS) containing 5% Blotto and 0.1% Tween-20 and incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibodies (CBS, 1:1,000; xCT, 1:2,000; EAAC1, 1:2,000; LAT1, 1:1,000; GLAST, 1:2,000; GLT-1, 1:2,000). The blots were probed with mouse anti- β -tubulin (1:5,000) after stripping, which was used as a loading control. The protein bands were visualized with appropriate horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibodies using the ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA). Images were captured, and densitometric analysis was performed with ImageJ software version 1.46r software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Quantitative RT-PCR Analysis of *nfe2l2* and *ikkba*

Total RNA from the cortex of mice was isolated using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The RNA integrity of the samples was assessed by electrophoresis in 1% agarose gels. The absorbance indices A_{260/280} and A_{260/230} were used to assess the purity of the isolated RNA. RNA concentrations were determined by measuring the absorbance at 260 nm. One microgram of total RNA from successful individual samples

was reverse transcribed to complementary DNA (cDNA) at 37°C using Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase and oligo(dT)15 primer (Promega, Madison, WI, USA). For quantitative PCR analysis, the cDNA of individual samples was diluted to 20 ng of input total RNA in a reaction mixture containing 0.5 μ M of each respective forward and reverse primer and 1 \times KAPA SYBR FAST Universal Mix (Kapa Biosystems, Cape Town, South Africa). A Rotor-Gene Q PCR cycler (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) was used to quantify PCR products. The PCR conditions were an initial heating at 94°C for 3 min, followed by 40 cycles of 94°C for 1 s, 63°C for 10 s, and 72°C for 12 s. Finally, melting curves were generated from 73 to 93°C for each PCR run. Succinate dehydrogenase (*SDHA*) was used as the reference gene. The mean amplification efficiency calculated in each PCR run for *nfe2l2*, *ikkba*, and *SDHA* from fivefold dilution curves was 1.017 ± 0.035 (standard deviation), with R^2 being 0.993 ± 0.005 (all above 0.982). The primers used were as follows: 5'-caccagtggatccgccagctca-3' and 5'-tatccagggcaagcgactca-3' for *nfe2l2* (Valdovinos-Flores et al., 2019); 5'-aaatctccagatgctaccgagag-3' and 5'-ataatgtcagacgtgctccca-3' for *ikkba* (Valdovinos-Flores and Gonsebatt, 2013); and 5'-caaatgctgagaagaatcggt-3' and 5'-catcgacttctgcatgtttaggc-3' for *SDHA*. The results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) and expressed as the mean normalized *nrf2* and *ikkba* values \pm SD.

Measurement of Hydrogen Sulfide Production

We followed the protocol described by Hine and Mitchell (2017) with some adaptations. Briefly, \sim 100 mg of frozen cortex or liver samples was homogenized in 250 μ l of ice-cold lysis buffer (25 mM Tris Base, 1 mM DTT, 5% glycerol, 1% Triton) after homogenization. The samples were placed at 37°C for 5–10 min and frozen again in dry ice for 2–3 min. The freeze–thaw cycle was repeated three times. Supernatants (\sim 200 μ l) were removed after the homogenates were centrifuged at $5,000\times g$ for 5 min at 4°C. Protein concentration was determined using the Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Filter papers were soaked in 20 mM lead (II) acetate trihydrate for 20 min and subsequently dried in an oven set at 110°C for 30 min. The assay was run in a 96-well plate with 150 μ l of the L-cysteine [100 mM in phosphate-buffered solution (PBS)] and pyridoxal 5'-phosphate (PLP; 10 mM in PBS) working solutions and 0–500 μ g of sample protein. Liver samples from untreated animals were used as positive controls. The dry lead acetate-embedded filter paper was placed directly over the 96-well plate and incubated at 37°C for 6 h for liver homogenates and 16 h (overnight) for cortex homogenates. The images were scanned, and densitometric analysis was performed with ImageJ software version 1.46r software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Data Analysis

The data are expressed as the mean \pm standard error. The number of animals tested is indicated in each case. One- and two-way analysis of variance (ANOVA) were used to

assess statistical significance followed by Tukey's *post hoc* test, as indicated in the corresponding figures. A $P < 0.05$ was considered statistically significant in all cases.

RESULTS

GSH Levels in the Cortex, Striatum, and Cerebellum Are Affected by iAs

Mice with prolonged exposure to iAs show increased levels of GSH (Ramos-Chávez et al., 2015). Here, significantly decreased levels of GSH were observed in the brain cortex region at 2 and 6 h for both doses of iAs and at 24 h in the animals treated with the highest dose (Figures 1A–C), while animals treated with 5 mg/kg showed upregulated GSH synthesis at 24 h (Figure 1C) in both the cortex, striatum, and cerebellum, suggesting that GSH was actively synthesized in these regions at that time. Animals treated with the highest dose also showed increased levels of GSH in the cerebellum at 24 h (Figure 1C). We measured the levels of GSH in the cortex of animals that received iAs for 9 days and observed a similar dose-related increase in the GSH levels in the cortex (Figure 1D). In the cerebellum, the increase in GSH levels at 9 days was higher than that observed at 2 and 6 h, respectively.

Expression of xCT and EAAC1 in the Cortex Is Related to GSH Synthesis and to GLT-1 and GLAST Upregulation

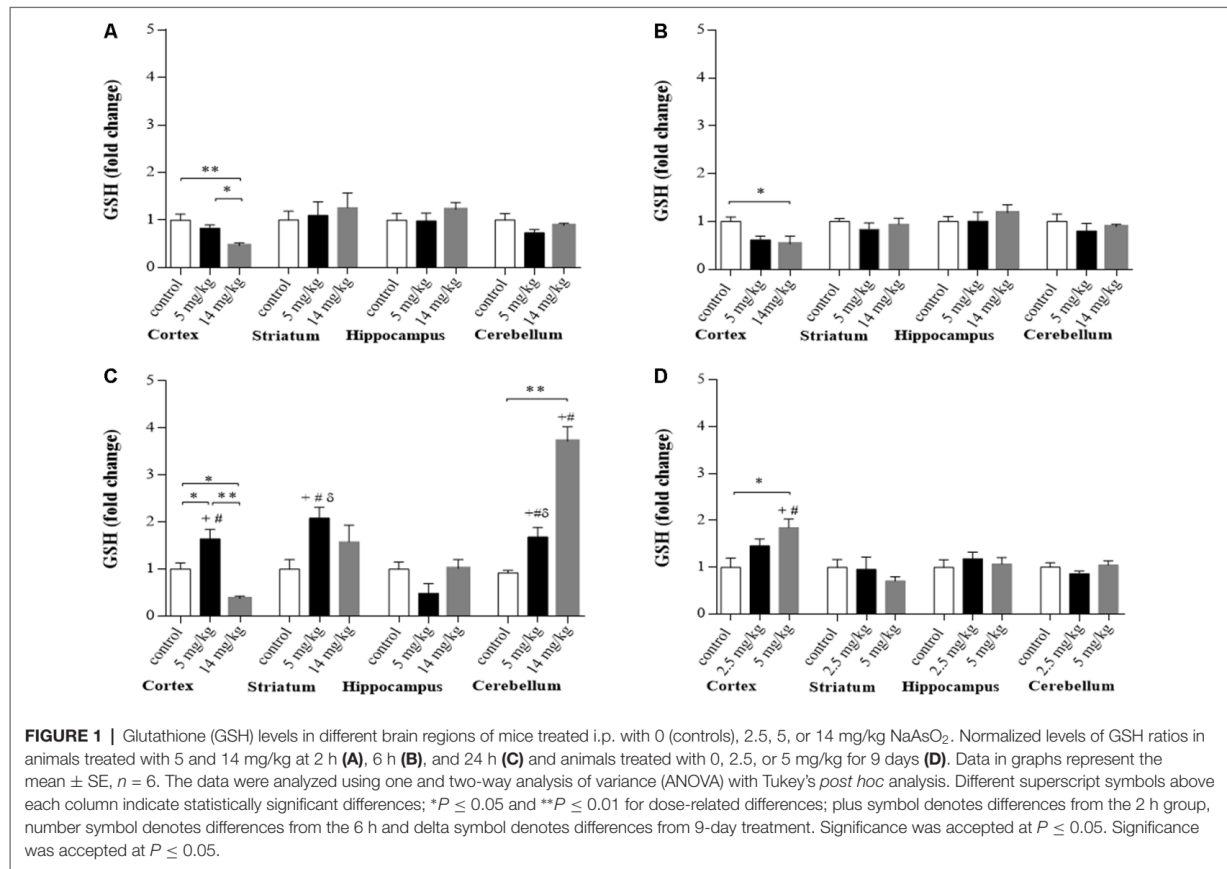
At the times tested, the cortex was the brain region where significant changes in protein expression were observed. No changes in the expression of LAT1, EAAC1, or xCT were observed at 2 and 6 h after treatment (Figures 2A–C). However, at 24 h, enhanced expression of EAAC1 and xCT was observed in the 5 and 14 mg/kg iAs-treated groups, respectively (Figures 2A,B). The upregulation of EAAC1 expression was maintained in the 9-day 5 mg/kg (Figure 2A) semichronic iAs treatment group, while xCT expression in both chronic treatment groups decreased (Figure 2B).

The modulation of EAAC1 expression in both the 5 mg/kg group 24 h after injection and in the 9-day 5 mg/kg chronic iAs treatment group was directly related to the modulation of GSH levels (Figures 1, 2A), suggesting the importance of cystine uptake by EAAC1 into the cells to synthesize GSH, mainly in neurons.

No changes in the expression of GLT-1 and GLAST were observed at 2 or 6 h or in the 9-day treatment group (Figures 2D,E). However, enhanced expression of GLT-1 and GLAST (Figures 2D,E) was associated with xCT and EAAC1 upregulation at 24 h in 5 mg/kg iAs-treated animals (Figures 2A,B).

Modulation of NR2A and NR2B Expression

Chronic exposure to iAs was associated with increased extracellular glutamate and the negative modulation of the expression and activity of the NMDAR subunits NR2A and NR2B (Luo et al., 2009, 2012; Ramos-Chávez et al., 2015; Nelson-Mora et al., 2018). In the cortex, NMDAR acts as a detector for activity-dependent plasticity and associative learning (Hasan et al., 2013). We decided to evaluate the expression of



these subunits at 24 h because the expression of GLT-1 and GLAST transporters was enhanced at this timepoint. NR2A subunit expression was increased, while NR2B subunit levels were decreased (Figure 3) only in those animals receiving the highest dose (14 mg/kg group).

CBS Protein Expression

CBS is the dominant enzyme of the transsulfuration pathway in astrocytes, which provides cysteine for GSH synthesis (Lee et al., 2009; McBean, 2012; Niu et al., 2015). In addition, Coppin et al. (2008) showed that iAs induces GSH synthesis and the transcription of CBS in cultured human cells. In our model, CBS protein levels (Figure 4) were not upregulated in the cortex at any of the times explored, even though GSH levels increased at 24 h in this region (Figure 1).

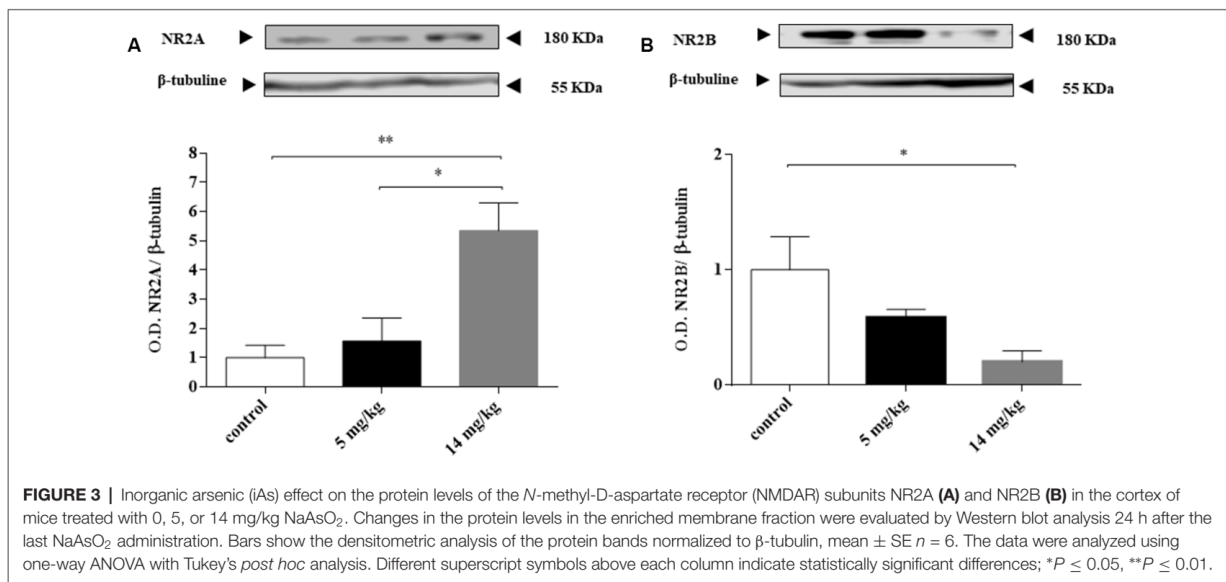
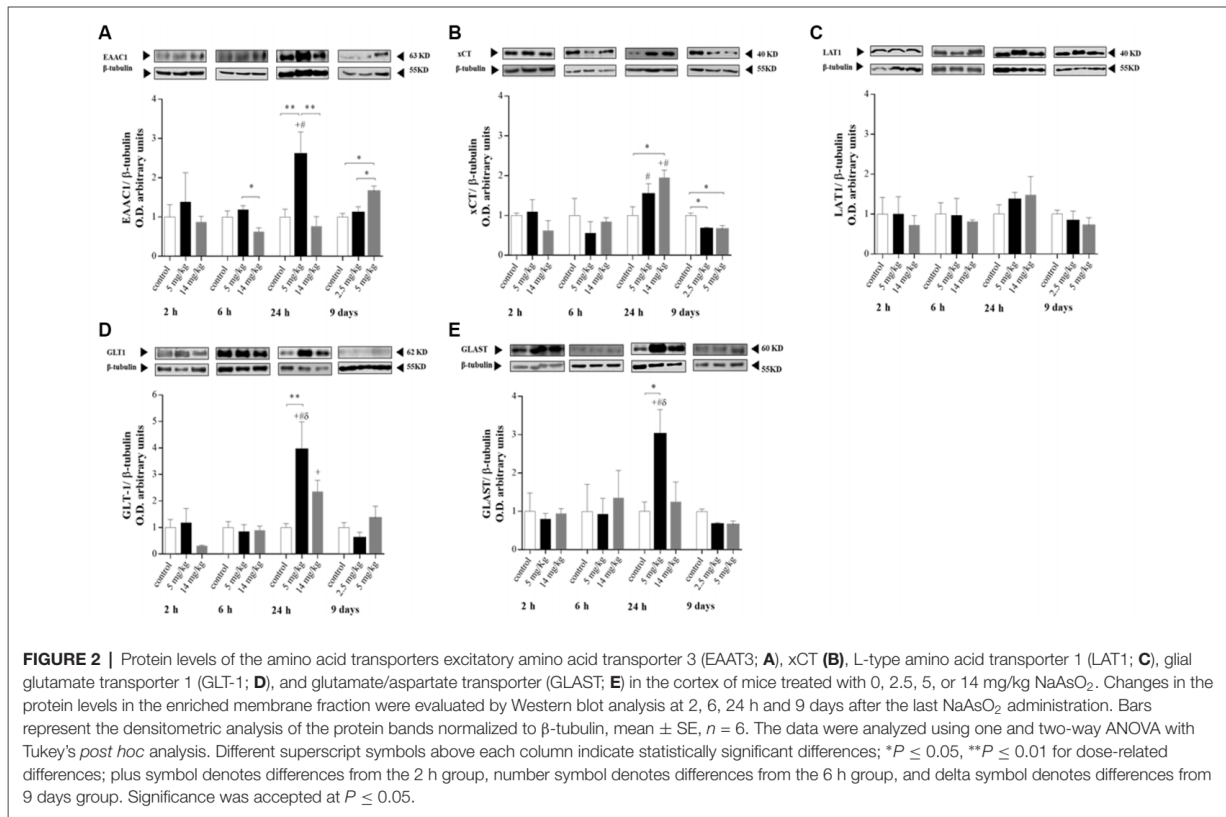
Increased Transcription of *nfe2l2* and *ikkbα* at 6 h Suggests Nrf2 and NFκB Activation Is Associated with Diminished GSH Pools and Upregulated Amino Acid Transporters

Putative nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and nuclear factor kappa B (NFκB) binding sites have been reported for xCT, LAT, GLT-1, and GLAST (Valdovinos-Flores and

Gonsebatt, 2012; Martinez-Lozada et al., 2016). In addition, there is evidence that NFκB inhibitors diminish the expression of EAAC1 in rats (Tai et al., 2008). Nrf2 and NFκB upregulate the transcription of the *nfe2l2* and *ikkbα* genes, respectively (Valdovinos-Flores and Gonsebatt, 2013; Tonelli et al., 2018) and are considered redox-sensitive switches that activate cellular responses to oxidative stress (Moldogazieva et al., 2018). To investigate whether the activation of these transcription factors was associated with increased amino acid transporter expression and increased GSH levels at 24 h, we measured the transcription of the *nfe2l2* and *ikkbα* genes by quantitative reverse transcription PCR (RT-PCR) at 2, 6 and 24 h in the cortex region. A significant increase in the levels of *ikkbα* messenger RNA (mRNA) was observed at 6 h, while only *nfe2l2* mRNA was significantly increased by the 5 mg/kg dose at this time. At 24 h, the transcription of both genes returned to control levels or below control levels (Figures 5A,B), suggesting the participation of both transcription factors in this acute response to iAs.

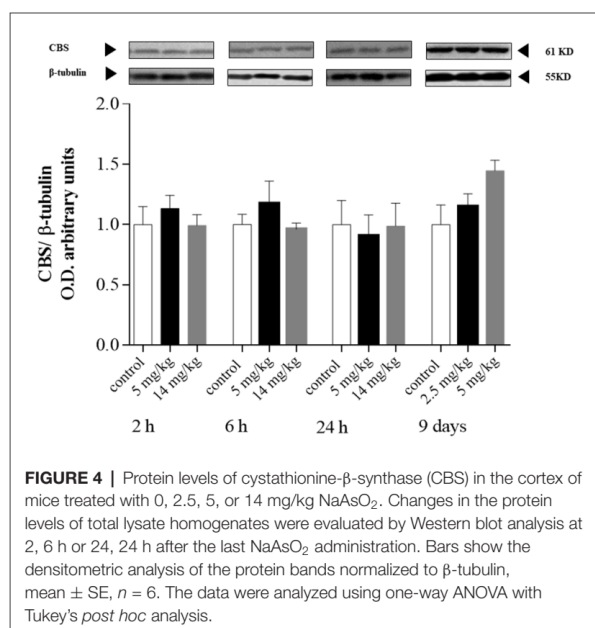
H₂S Production

Cortex homogenates were assayed for H₂S production at 24 h, since CBS was not upregulated at this time. H₂S production



has been directly related to the activity of CBS in the brain, providing L-cys for GSH synthesis *via* transsulfuration from methionine sources (Kandil et al., 2010). IAs-treated animals

(5 and 14 mg/kg) showed a significantly higher production of the neuromodulator than did the control animals (**Figure 6**), suggesting that enhanced CBS (and or CSE) enzymatic activity



is associated with the increased GSH synthesis observed in the 5-mg/kg treated animals.

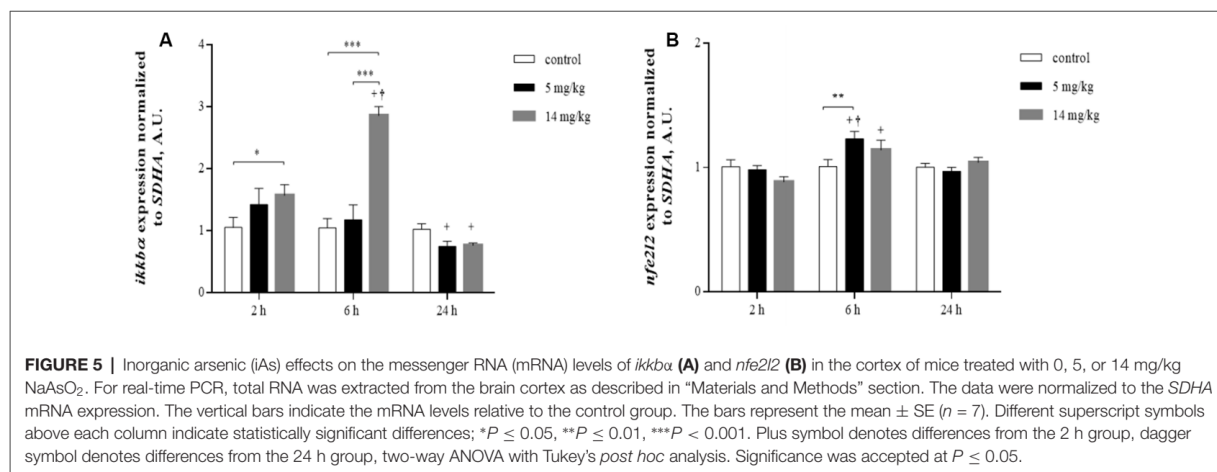
DISCUSSION

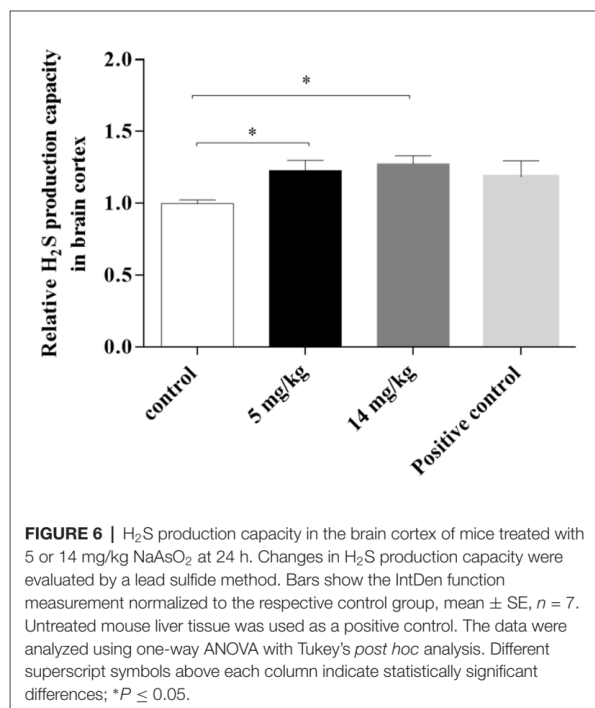
In this acute exposure study, we observed that iAs exposure altered GSH levels and the disposition of key amino acids and their transporters in the cortex and cerebellum. At 24 h, a redox response, probably activated by Nrf2 and NFκB (Figure 5), was observed mainly in the cortex region with increased GSH levels that were associated with the increased production of H₂S and the upregulation of xCT, GLT-1, GLAST, and EAAC1. In addition, the expression of NMDA subunits was altered at the highest dose employed.

Sato et al. (2001) reported a putative NFκB binding site in the 5'-flanking region of the xCT gene. In addition, NFκB binding sites have been reported for GLT-1 and GLAST (Martinez-Lozada et al., 2016; Pajarillo et al., 2019), and NFκB inhibitors diminished EAAC1 expression (Tai et al., 2008). Evidence shows that both transcription factors are key molecules in redox signal transduction pathways (Valdovinos-Flores and Gonsbatt, 2012; Moldogazieva et al., 2018).

The effects of iAs could be observed as early as 2 and 6 h when GSH levels were diminished significantly, mainly in the cortex region (Figure 1A), which could activate the redox response observed at 6 h by the activation of Nrf2 and NFκB (Figure 5). Valdovinos-Flores and Gonsbatt (2013) observed significant transcription of *ngfb* at 2 h after a 14-mg/kg iAs i.p. injection, which was associated with the activation of the TrkA/Akt/NFκB signaling pathway in the liver but not in the striatum of mice (Valdovinos-Flores et al., 2019). However, systemic activation of this pathway could induce GSH synthesis in other brain regions such as the cortex and cerebellum at 24 h and 9 days (Figures 1C,D). Increased levels of GSH were observed in mouse brain homogenates (Limón-Pacheco et al., 2007) and in the cerebellum at 2 h after the administration of L-buthionine-S-R-sulfoximine (BSO), a systemic inhibitor of GSH synthesis, which diminished GSH levels in the liver and kidneys (Limón-Pacheco et al., 2007; Valdovinos-Flores and Gonsbatt, 2013; Garza-Lombó et al., 2018b).

CD1 mice that received iAs for 9 days showed GSH reductase inhibition in the liver and brain at 10 mg/kg (Rodríguez et al., 2005). This enzyme is key for the reduction in oxidized GSH. Thus, we used lower doses to compare the early effects on GSH and amino acid transporters with those observed after a prolonged exposure. Similar to what has been observed in mice exposed during gestation, the augmentation of GSH levels in the brain was directly related to the expression of amino acid transporters involved in the import of cystine/cysteine for GSH synthesis, such as xCT in astrocytes and EAAC1 in neurons (Figures 1A–D, 2A,B; Ramos-Chávez et al., 2015; Nelson-Mora et al., 2018). However, the upregulation of EAAC1 was





maintained only in the group of mice that received the higher dose of iAs for 9 days (5 mg/kg), which was positively associated with increased levels of GSH in that region (Figures 1D, 2A). These observations suggest that the participation of EACC1 might be crucial for maintaining GSH homeostasis after iAs exposure. In this respect, De Bundel et al. (2011) demonstrated that xCT knockout mice do not have a lower hippocampal GSH content or increased oxidative stress. In contrast, mice lacking EAAC1 (Aoyama et al., 2006) have decreased neuronal GSH contents, accompanied by increased neuronal oxidative stress markers and severe spatial reference memory deficits with aging. The L-cys for GSH synthesis in this case, could also be provided by the transsulfuration pathway, although we did not test for the production of H₂S at this time point.

GLT-1 and GLAST expression was only increased in the cortex at 24 h, at the same time as xCT upregulation. The transporters GLT-1 and GLAST are considered the primary astrocyte regulators that mediate extracellular glutamate clearance in the CNS (Amara and Fontana, 2002). The promoter regions of both GLT-1 and GLAST contain multiple NFκB binding sites (Pajarillo et al., 2019), while for xCT, Nrf2 and NFκB binding sites have been proposed (Valdovinos-Flores and Gonsebatt, 2013). Thus, both the export (xCT) and uptake (GLT-1 and GLAST) of glutamate could be modulated by these transcription factors, which would diminish extracellular glutamate release by the upregulation of xCT at this same time (Figures 2D,E). Previously, we observed that the gestational and chronic exposure of mice to iAs resulted in increased glutamate levels in the hippocampus associated with the upregulation of

xCT and the downregulation of GLT1 and GLAST (Ramos-Chávez et al., 2015; Nelson-Mora et al., 2018).

With respect to altered glutamate receptor subunit expression (Figure 3), mechanistic studies in rodent models chronically exposed to iAs (Huo et al., 2014; Ramos-Chávez et al., 2015) showed that the negative modulation of the NMDAR subunits NR2A and NR2B was associated with the upregulation of xCT. In our case, the altered expression of NMDA subunits (Figure 3) agrees with the upregulation of xCT at 24 h, suggesting that the increased extracellular glutamate exported by the increased xCT could downregulate the NR2B subunit, similar to what was observed in the hippocampus of mice exposed during gestation (Ramos-Chávez et al., 2015). The AMPA receptor subunits GLUA1 and 2 were also tested, but we did not observe changes (data not shown). A similar observation was made by Nelson-Mora et al. (2018) when AMPA modulation was reported at the hippocampus but not in the cortex of mice gestationally exposed to iAs.

The cysteine required for GSH synthesis and iAs metabolism (Garza-Lombó et al., 2019) can be provided through the transsulfuration pathway, which links the SAM pathway and GSH production, both main factors involved in iAs methylation. Coppin et al. (2008) showed that the adaptation of RWPE-1 cells to arsenic includes increased mRNA expression of CBS and GSH production genes, which results in a fivefold increase in GSH. In addition, the presence of CBS polymorphisms in human populations might influence arsenic metabolism (Porter et al., 2010). Here, we did not observe changes in the expression of CBS protein (Figure 4) and mRNA in the cortex at 24 h (data not shown), but we observed increased H₂S production (Figure 6) in cortex and liver homogenates (see Supplementary Figures S1, S2), suggesting that the activity of the transsulfuration pathway was increased. Since both CBS and CSE are modulated by NFκB (Huang and Moore, 2015), it is possible that the increased production of H₂S could also be due to CSE.

In addition, H₂S is a gasotransmitter that can pass through cell membranes, modulating cellular targets at physiological levels by S-sulfhydration (Wang et al., 2014). The increased generation of H₂S at 24 h might also participate in the modulation of GLT-1 expression observed at this time, increasing the uptake of glutamate interchanged by the input of cystine during xCT overexpression (Lu et al., 2008; Nelson-Mora et al., 2018). It has been reported that H₂S activates K_{ATP} channels by the S-sulfhydration of the Cys6 and Cys26 residues of the rvSUR1 subunit of the K_{ATP} channel complex (Jiang et al., 2010). The upregulation of GLT-1 could also be due to the activation of K_{ATP} channels by H₂S since Sun et al. (2008) reported that K_{ATP} activators in astrocytes can upregulate glutamate transporters. It has been suggested that, at physiological levels, H₂S can exert neuroprotective effects, whereas high concentrations of H₂S may cause neurotoxicity in part by enhancing NMDAR-mediated calcium overload. In our case, we observed an upregulation of NR2A and downregulation of NR2B subunit expression but did not measure NMDA activity, although mice chronically exposed to iAs showed impaired long-term potentiation (LTP) induction in the hippocampus (Nelson-Mora et al., 2018).

Exposure to hazardous environmental metalloids such as iAs throughout our lifetime is almost unavoidable because not only drinking water but also many types of foods might be contaminated with different levels of iAs. Few studies have explored the acute effects of iAs exposure, which are important to elucidate since the early effects were not homogeneous among different brain regions and because iAs exposure compromised antioxidant levels and important amino acid disposition such as glutamate, cysteine, and methionine. The impact of these changes in the CNS might contribute to premature aging and/or to earlier neurodegenerative manifestations. Our results can help in the development of adequate preventive strategies, such as appropriate diets and the development of effective agonists.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/[supplementary material](#).

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Institute of Biomedical Research CICUAL committee.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DS-A designed the study, performed the experiments, and prepared the manuscript draft. PP helped with the RT-PCR

study and LR-C helped with the Western blot analysis. WG-A and AP-A performed the hydrogen sulfur determination and contributed in the discussion. MG designed the study, applied for approval from the Research Ethics Board, and reviewed the manuscript draft.

FUNDING

This research was funded by Programa Salud y Ambiente and Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Renato León for his technical support in animal handling, Patricia De la Torre for amplicon sequencing and Unidad de Modelos Biológicos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM for supplying the animals. DS-A wants to thank the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM for its support. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree in the Posgrado en Ciencias Biológicas at the Universidad Nacional Autónoma de México.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2020.00017/full#supplementary-material>.

REFERENCES

- Amara, S. G., and Fontana, A. C. (2002). Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.* 41, 313–318. doi: 10.1016/s0197-0186(02)00018-9
- Aoyama, K., Suh, S. W., Hamby, A. M., Liu, J., Chan, W. Y., Chen, Y., et al. (2006). Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nat. Neurosci.* 9, 119–126. doi: 10.1038/nn1609
- Aoyama, K., Watabe, M., and Nakaki, T. (2012). Modulation of neuronal glutathione synthesis by EAAC1 and its interacting protein GTRAP3-18. *Amino Acids* 42, 163–169. doi: 10.1007/s00726-011-0861-y
- Bannai, S. (1986). Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261, 2256–2263.
- Calderón, J., Navarro, M. E., Jimenez-Capdeville, M. E., Santos-Diaz, M. A., Golden, A., Rodriguez-Leyva, I., et al. (2001). Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ. Res.* 85, 69–76. doi: 10.1006/enrs.2000.4106
- Chen, X., Jhee, K. H., and Kruger, W. D. (2004). Production of the neuromodulator H2S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *J. Biol. Chem.* 279, 52082–52086. doi: 10.1074/jbc.c400481200
- Coppin, J. F., Qu, W., and Waalkes, M. P. (2008). Interplay between cellular methyl metabolism and adaptive efflux during oncogenic transformation from chronic arsenic exposure in human cells. *J. Biol. Chem.* 283, 19342–19350. doi: 10.1074/jbc.m802942200
- De Bundel, D., Schallier, A., Loyens, E., Fernando, R., Miyashita, H., Van Liefferinge, J., et al. (2011). Loss of system x(c)- does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *J. Neurosci.* 31, 5792–5803. doi: 10.1523/jneurosci.5465-10.2011
- Garza-Lombó, C., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., Gonsébat, M. E., and Franco, R. (2019). Arsenic-induced neurotoxicity: a mechanistic appraisal. *J. Biol. Inorg. Chem.* 24, 1305–1316. doi: 10.1007/s00775-019-01740-8
- Garza-Lombó, C., Petrosyan, P., Tapia-Rodríguez, M., Valdovinos-Flores, C., and Gonsébat, M. E. (2018a). Systemic L-buthionine-S-R-sulfoximine administration modulates glutathione homeostasis via NGF/TrkA and mTOR signaling in the cerebellum. *Neurochem. Int.* 121, 8–18. doi: 10.1016/j.neuint.2018.10.007
- Garza-Lombó, C., Posadas, Y., Quintanar, L., Gonsébat, M. E., and Franco, R. (2018b). Neurotoxicity linked to dysfunctional metal ion homeostasis and xenobiotic metal exposure: redox signaling and oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 28, 1669–1703. doi: 10.1089/ars.2017.7272
- Gu, F., Chauhan, V., and Chauhan, A. (2015). Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 18, 89–95. doi: 10.1097/mco.0000000000000134
- Hasan, M. T., Hernandez-Gonzalez, S., Dogbevia, G., Trevino, M., Bertocchi, I., Gruart, A., et al. (2013). Role of motor cortex NMDA receptors in learning-dependent synaptic plasticity of behaving mice. *Nat. Commun.* 4:2258. doi: 10.1038/ncomms3258
- Hine, C., and Mitchell, J. R. (2017). Endpoint or kinetic measurement of hydrogen sulfide production capacity in tissue extracts. *Bio Protoc.* 7:e2382. doi: 10.21769/BioProtoc.2382
- Hong, Y. S., Song, K. H., and Chung, J. Y. (2014). Health effects of chronic arsenic exposure. *J. Prev. Med. Public Health* 47, 245–252. doi: 10.3961/jpmph.14.035
- Huang, C. W., and Moore, P. K. (2015). H2S synthesizing enzymes: biochemistry and molecular aspects. *Handb. Exp. Pharmacol.* 230, 3–25. doi: 10.1007/978-3-319-18144-8_1
- Huo, T., Zhang, Y., Li, W., Yang, H., Jiang, H., and Sun, G. (2014). Effect of realgar on extracellular amino acid neurotransmitters in hippocampal CA1 region determined by online microdialysis-dansyl chloride derivatization-high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 28, 1254–1262. doi: 10.1002/bmc.3154
- Jiang, B., Tang, G., Cao, K., Wu, L., and Wang, R. (2010). Molecular mechanism for H(2)S-induced activation of K(ATP) channels. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 1167–1178. doi: 10.1089/ars.2009.2894

- Kandil, S., Brennan, L., and McBean, G. J. (2010). Glutathione depletion causes a JNK and p38MAPK-mediated increase in expression of cystathionine-gamma-lyase and upregulation of the transsulfuration pathway in C6 glioma cells. *Neurochem. Int.* 56, 611–619. doi: 10.1016/j.neuint.2010.01.004
- Kurwadkar, S. (2017). Groundwater pollution and vulnerability assessment. *Water Environ. Res.* 89, 1561–1579. doi: 10.2175/106143017X15023776270584
- Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J. R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N. N., et al. (2018). The lancet commission on pollution and health. *Lancet* 391, 462–512. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32345-0
- Lee, M., Schwab, C., Yu, S., McGeer, E., and McGeer, P. L. (2009). Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide. *Neurobiol. Aging* 30, 1523–1534. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.06.001
- Limón-Pacheco, J. H., Hernandez, N. A., Fanjul-Moles, M. L., and Gonshebbat, M. E. (2007). Glutathione depletion activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways that display organ-specific responses and brain protection in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 1335–1347. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.028
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lu, M., Hu, L. F., Hu, G., and Bian, J. S. (2008). Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1705–1713. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.014
- Luo, J. H., Qiu, Z. Q., Shu, W. Q., Zhang, Y. Y., Zhang, L., and Chen, J. A. (2009). Effects of arsenic exposure from drinking water on spatial memory, ultra-structures and NMDAR gene expression of hippocampus in rats. *Toxicol. Lett.* 184, 121–125. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.10.029
- Luo, J. H., Qiu, Z. Q., Zhang, L., and Shu, W. Q. (2012). Arsenite exposure altered the expression of NMDA receptor and postsynaptic signaling proteins in rat hippocampus. *Toxicol. Lett.* 211, 39–44. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.02.021
- Martinez-Lozada, Z., Guillem, A. M., and Robinson, M. B. (2016). Transcriptional regulation of glutamate transporters: from extracellular signals to transcription factors. *Adv. Pharmacol.* 76, 103–145. doi: 10.1016/bs.apha.2016.01.004
- McBean, G. J. (2012). The transsulfuration pathway: a source of cysteine for glutathione in astrocytes. *Amino Acids* 42, 199–205. doi: 10.1007/s00726-011-0864-8
- McBean, G. J. (2017). Cysteine, glutathione and thiol redox balance in astrocytes. *Antioxidants* 6:E62. doi: 10.3390/antiox6030062
- Moldogazieva, N. T., Mokhsoev, I. M., Feldman, N. B., and Lutsenko, S. V. (2018). ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free Radic. Res.* 52, 507–543. doi: 10.1080/10715762.2018.1457217
- Nelson-Mora, J., Escobar, M. L., Rodriguez-Duran, L., Massieu, L., Montiel, T., Rodriguez, V. M., et al. (2018). Gestational exposure to inorganic arsenic (iAs³⁺) alters glutamate disposition in the mouse hippocampus and ionotropic glutamate receptor expression leading to memory impairment. *Arch. Toxicol.* 92, 1037–1048. doi: 10.1007/s00204-017-2111-x
- Niu, W. N., Yadav, P. K., Adamec, J., and Banerjee, R. (2015). S-glutathionylation enhances human cystathionine beta-synthase activity under oxidative stress conditions. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 350–361. doi: 10.1089/ars.2014.5891
- Pajarillo, E., Rizzor, A., Lee, J., Aschner, M., and Lee, E. (2019). The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology* 161:107559. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.03.002
- Parvez, F., Wasserman, G. A., Factor-Litvak, P., Liu, X., Slavkovich, V., Siddique, A. B., et al. (2011). Arsenic exposure and motor function among children in Bangladesh. *Environ. Health Perspect.* 119, 1665–1670. doi: 10.1289/ehp.1103548
- Porter, K. E., Basu, A., Hubbard, A. E., Bates, M. N., Kalman, D., Rey, O., et al. (2010). Association of genetic variation in cystathionine-beta-synthase and arsenic metabolism. *Environ. Res.* 110, 580–587. doi: 10.1016/j.envres.2010.05.001
- Ramos-Chávez, L. A., Rendon-Lopez, C. R., Zepeda, A., Silva-Adaya, D., Del Razo, L. M., and Gonshebbat, M. E. (2015). Neurological effects of inorganic arsenic exposure: altered cysteine/glutamate transport, NMDA expression and spatial memory impairment. *Front. Cell. Neurosci.* 9:21. doi: 10.3389/fncel.2015.00021
- Robert, S. M., Ogunrinu-Babarinde, T., Holt, K. T., and Sontheimer, H. (2014). Role of glutamate transporters in redox homeostasis of the brain. *Neurochem. Int.* 73, 181–191. doi: 10.1016/j.neuint.2014.01.001
- Rodriguez, V. M., Del Razo, L. M., Limon-Pacheco, J. H., Giordano, M., Sanchez-Pena, L. C., Uribe-Querol, E., et al. (2005). Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver. *Toxicol. Sci.* 84, 157–166. doi: 10.1093/toxsci/kfi057
- Sánchez-Peña, L. C., Petrosyan, P., Morales, M., Gonzalez, N. B., Gutierrez-Ospina, G., Del Razo, L. M., et al. (2010). Arsenic species, AS3MT amount and AS3MT gene expression in different brain regions of mouse exposed to arsenite. *Environ. Res.* 110, 428–434. doi: 10.1016/j.envres.2010.01.007
- Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Hashimoto, T., Sasaki, H., Wang, H., Ishii, T., et al. (2001). Effect of oxygen on induction of the cystine transporter by bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 276, 10407–10412. doi: 10.1074/jbc.m007216200
- Schindler, J., Jung, S., Niedner-Schatteburg, G., Friauf, E., and Nothwang, H. G. (2006). Enrichment of integral membrane proteins from small amounts of brain tissue. *J. Neural Transm.* 113, 995–1013. doi: 10.1007/s00702-006-0508-4
- Singh, S., Padovani, D., Leslie, R. A., Chiku, T., and Banerjee, R. (2009). Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *J. Biol. Chem.* 284, 22457–22466. doi: 10.1074/jbc.m109.010868
- Sun, X. L., Zeng, X. N., Zhou, F., Dai, C. P., Ding, J. H., and Hu, G. (2008). KATP channel openers facilitate glutamate uptake by GluTs in rat primary cultured astrocytes. *Neuropsychopharmacology* 33, 1336–1342. doi: 10.1038/sj.npp.1301501
- Tai, Y. H., Tsai, R. Y., Wang, Y. H., Cherng, C. H., Tao, P. L., Liu, T. M., et al. (2008). Amitriptyline induces nuclear transcription factor-kappaB-dependent glutamate transporter upregulation in chronic morphine-infused rats. *Neuroscience* 153, 823–831. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.02.055
- Thomas, D. J., Waters, S. B., and Styblo, M. (2004). Elucidating the pathway for arsenic methylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 319–326. doi: 10.1016/j.taap.2003.10.020
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., and Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 1727–1745. doi: 10.1089/ars.2017.7342
- Valdivinos-Flores, C., and Gonshebbat, M. E. (2012). The role of amino acid transporters in GSH synthesis in the blood-brain barrier and central nervous system. *Neurochem. Int.* 61, 405–414. doi: 10.1016/j.neuint.2012.05.019
- Valdivinos-Flores, C., and Gonshebbat, M. E. (2013). Nerve growth factor exhibits an antioxidant and an autocrine activity in mouse liver that is modulated by buthionine sulfoximine, arsenic and acetaminophen. *Free Radic. Res.* 47, 404–412. doi: 10.3109/10715762.2013.783210
- Valdivinos-Flores, C., Limon-Pacheco, J. H., Leon-Rodriguez, R., Petrosyan, P., Garza-Lombo, C., and Gonshebbat, M. E. (2019). Systemic L-buthionine -S-R-sulfoximine treatment increases plasma NGF and upregulates L-cys/L-cys2 transporter and gamma-glutamylcysteine ligase mRNAs through the NGF/TrkA/Akt/Nrf2 pathway in the striatum. *Front. Cell. Neurosci.* 13:325. doi: 10.3389/fncel.2019.00325
- Wang, J. F., Li, Y., Song, J. N., and Pang, H. G. (2014). Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury. *Neurochem. Int.* 64, 37–47. doi: 10.1016/j.neuint.2013.11.002

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Silva-Adaya, Ramos-Chávez, Petrosyan, González-Alfonso, Pérez-Acosta and Gonshebbat. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Review Article

Thioredoxin System Regulation in the Central Nervous System: Experimental Models and Clinical Evidence

Daniela Silva-Adaya,¹ María E. Gonsbatt,² and Jorge Guevara³

¹Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 14269 México City, DF, Mexico

²Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México City, DF, Mexico

³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México City, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Daniela Silva-Adaya; dan04siad@hotmail.com

Received 11 October 2013; Revised 21 January 2014; Accepted 23 January 2014; Published 27 February 2014

Academic Editor: Sathyaikumar V. Korrapati

Copyright © 2014 Daniela Silva-Adaya et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The reactive oxygen species produced continuously during oxidative metabolism are generated at very high rates in the brain. Therefore, defending against oxidative stress is an essential task within the brain. An important cellular system against oxidative stress is the thioredoxin system (TS). TS is composed of thioredoxin, thioredoxin reductase, and NADPH. This review focuses on the evidence gathered in recent investigations into the central nervous system, specifically the different brain regions in which the TS is expressed. Furthermore, we address the conditions that modulate the thioredoxin system in both, animal models and the postmortem brains of human patients associated with the most common neurodegenerative disorders, in which the thioredoxin system could play an important part.

1. Introduction

The thioredoxin system (TS) consists of an electron donor and two types of antioxidant oxidoreductase proteins: thioredoxin (Trx) and thioredoxin reductase (TrxR) and NADPH as the electron donor. Trx was first identified as a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in *Escherichia coli* [1]. Trx is a small 12 kD protein that has an active conserved site, Cys-Pro-Gly-Cys, which is essential for its function as both an active oxidoreductase and an electron donor of some peroxiredoxins that are important molecules for the reduction of peroxides [2]. Trx is also a regulator of cellular functions in response to redox signals and stress, modulating various signaling pathways, transcription factors, and immunological responses [3]. Trx is an important regulator of redox balance in the cell and has been implicated as playing a role in cell survival in many conditions including cancer and neurodegenerative diseases [4]. Human cells contain 3 different thioredoxins [5]. Trx1 has been reported as cytoplasmic, Trx2 as a mitochondrial form, and a third

variant highly expressed in spermatozoa. Trx1 has been located in several cell compartments such as the nucleus and the plasma membrane or as a secreted protein [6, 7]. Posttranslational modifications to cysteine on Trx1 appear critical to its localization and function in different cell types [7]. Organelles such as the mitochondrion and nucleus require Trx to preserve a local reducing environment to minimize damage from ROS leakage during mitochondrial respiration [8]. In the nucleus the activation of transcription factor requires the presence of reduced Trx [9]. Cytosolic Trx1 is important in the control of growth and apoptosis and during chronic inflammation; likewise Trx1 is also secreted as a cocytokine and for chemokine activities [5].

TrxR is a homodimer, first described in bovine tissue by Holmgren and Luthman in 1978 [10], which catalyzes the reduction of the disulfide at the Trx active site, using NADPH with one FAD cofactor per subunit and a selenocysteine active site [5, 8]. There are three distinct genes in mammals that encode three different TrxRs: the cytosolic TrxR (TrxR1), mitochondrial TrxR (TrxR2), and thioredoxin-glutaredoxin

reductase (TGR or TrxR3). TrxR1 and TrxR2 are expressed in all mammalian cells and tissues, while TrxR3 is expressed in the testicles [11].

Besides Trx, TrxR can directly reduce the number of other substrates, such as peroxides (including lipid hydroperoxides), hydrogen peroxide [12, 13], and protein disulfide isomerases, which participate in the posttranslational folding and processing of cellular proteins [14]. TrxR also participates in the regeneration of some antioxidant molecules with antioxidant activity such as dehydroascorbate [15, 16], lipoic acid [17], and ubiquinone [18].

The brain is more susceptible to oxidative damage compared with other organs, due to several factors that promote the formation of reactive species: high oxygen consumption, high iron levels found in some brain regions, and high fat content of unsaturated fatty acids, accompanied by low levels and low activities of some antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase (Gpx) [19]. Both Trx and TrxR are widely expressed in tissues and organs; their distribution seems to be tissue and cell specific [20], including the brain tissue in which Trx and TrxR are found.

This review discusses the expression of the TS in different brain regions and cells and the participation of the TS in neurotoxic insults and the variety of neurodegenerative disorders where oxidative stress plays a key role.

2. Protein or mRNA Expression of Trx and TrxR in the Nervous System

The identification and localization of Trx and TrxR in the different brain regions have been made possible mostly through the use of immunocytochemistry techniques using monoclonal and polyclonal antibodies and by *in situ* hybridization techniques. Differentiation between the different isoforms is not always mentioned in the reports (Table 1). However, Trx, probably Trx1, due to its cytoplasmic localization, has been detected in the human brain and that of several mammal species including the rat, gerbil, cow (a yearling calf, more precisely), and mouse [10, 21–24]. Trx and TrxR were first identified in the sciatic nerve of the rat, in which both proteins showed strong cytoplasmic immunoreactivity in the Schwann cells at the Ranvier nodes and neuronal cells [20, 21]. Studies in rats demonstrate high levels of Trx mRNA in regions with high energy demands and high activity that involves redox reactive metabolites including the substantia nigra and the subthalamic nucleus. According to the authors, this suggests that the TS participates in the maintenance of the redox homeostasis in these regions. At the same time, the CA1 area of the hippocampal formation shows very small expression in contrast to CA2/CA3 and the dentate gyrus of the hippocampus. These are regions in contact with peripheral blood such as the choroid plexus which expresses a significant quantity of Trx mRNA [25]. Godoy et al. (2011) reported immunoreactivity to Trx1 in the Purkinje cell layer of the rat, as well as the motor neurons of the spinal cord, ependymal cell layer, and the cells of the choroid plexus. In contrast with Trx1, TrxR1 was abundantly expressed in the

glial cells of the cerebellar white matter. Trx2 (mitochondrial Trx) was detected in the axonal fibers of the cerebral cortex, striatum, cerebellar white matter, and spinal cord, while TrxR2 expression was pronounced in the cell bodies of neurons found in the Purkinje and molecular cell layers in the cerebellum [24]. Godoy also evaluated the expression of Trx1, Trx2, TrxR1, and TrxR2 in the mouse brain, assessing the presence of the protein semiquantitatively (see Table 1) [26]. The mRNA and protein localization of Trx2 and Trx1 differ in some regions such as the hippocampus, and it is proposed that posttranscriptional regulation of Trxs may occur in this region. Another important observation is that in the rat Trx1 and Trx2 expression occurs predominately in brain neurons [25, 27], while TrxR protein levels are higher in glial cells than in neurons in both rat and mice cell cultures [20, 28]. These findings suggest that the functional needs and requirements of the TS molecules are different in each type of cell [25, 27].

Immunoreactivity of rabbit antiserum against rat liver Trx is found in the epithelial cells and secreting cells of the rat choroid plexus [20]. A human Trx homologue, adult T leukemia-derived factor (ADF/TRX), has been found to be widely expressed in the central nervous system (CNS); this includes the subcommissural organs, ependymal, tanycytes, and endothelial cells, as well as in the neuronal cell bodies of gerbils, albeit weakly [22], and the white matter astrocytes and Schwann cells in the posterior root of the human brain [23]. A truncated Trx1, thioredoxin 80 (Trx80), is present in the human brain in an aggregated form, principally in neurons [29]. The main role described for Trx80 is to activate monocytes, cause proliferation, and secrete pro- and anti-inflammatory cytokines [30].

Despite its function as an intracellular disulfide reducing protein, Trx has been found in extracellular components, secreted mainly by activated T and B lymphocytes [31]. Studies have established that different forms of stimulation can cause different cells including nerve and glial cells to secrete Trx [32]. TrxmRNA has been localized also in epithelial cells of the choroid plexus and the ependymal cells of the ventricle and the secreting cells of the choroid plexus [25, 28]. The secretion of Trx into the cerebrospinal fluid may help protect nerve cells from oxidation by environmental influences maintaining a protective microenvironment [25]. Stemme et al. (1985) [21] and LoPachin and Barber (2006) [33] showed anterograde and retrograde axoplasmic transport of Trx and TrxR in stressed rat sciatic nerve cells; this transport to synaptic terminals may be involved in thiol redox reactions related to synaptic transmission, such as membrane pore formation by the participation of specific cysteine residues that modulate regulatory proteins. These observations are indirectly supported by the evidence showing the high sensitivity of the synaptic process to modifying nucleophilic sulfhydryl groups with different electrophilic neurotoxicants. Astrocytoma cells exposed to H₂O₂ release Trx1 into the culture medium. The addition of this medium to neuron cultures promotes their survival in the absence of serum [34]. These observations support the view that glial cells provide neurotrophic and antioxidant support for the neurons. The levels of Trx that are secreted by cells depend on their stage of metabolic activity (Figure 1) [25].

TABLE 1: TS expression in different species and brain regions.

Species	Protein	Findings (localization/expression)	Detection method	Reference
Calf	Trx	↑ Kidney, liver, brain, thymus	Radio immunoassay, rabbit antiserum, calf liver Trx and ¹²⁵ I-labeled Trx	[10]
Rat sciatic nerve	Trx	↑ Cytoplasm of Schwann cells Nodes of Ranvier	Immunofluorescence with specific rabbit antisera.	[21]
	TrxR	↓ Axoplasm of myelinated axons		
Gerbil brain	ADF/Trx	↓ Ependyma, tanocytes Endothelial cells Neuronal cell bodies	Immunochemistry anti-human ADF antibody	[22]
Rat brain	Trx	↑ Paraventricular hypothalamic Nucleus Locus coeruleus Nucleus of the solitary tract	<i>In situ</i> hybridization Human Trx mRNA	[25]
		↓ Frontoparietal cortex Caudate/putamen Magnocellular preoptic nucleus		
Human brain	ADF/Trx	White matter astrocytes Schwann cells of posterior root White matter astrocytes	Immunochemistry <i>In situ</i> hybridization and semiquantitative mRNA	[23]
		Nucleus of granular cells in hippocampus Golgi cells of substantia nigra Purkinje cells Motor neurons of the spinal cord	Anti-mouse Trx1	
Mouse	Trx1	Golgi cells of Substantia nigra Axonal staining in cerebral cortex Axons in striatum Axonal staining in cortex Axon-bundles in striatum Golgi cells of substantia nigra	Anti-human Trx2	[24]
	Trx2	Faint staining in hippocampus pyramidal cells Golgi cells of substantia nigra		
	TR1	Strong staining in Purkinje cells Moleccular layer in cerebellum		
	TR2			
Rat brain	Trx1	↑ Cerebellum Cortex Substantia nigra Retinal Spinal cord ↓ Striatum hippocampus	Anti-mouse Trx1	[26]
		↑ Striatum Substantia nigra ↓ Cerebellum Hippocampus Cortex, Retinal Spinal cord		
		↑ Cerebellum Hippocampus Striatum		
		↓ Cortex Substantia nigra Spinal cord Retina		
	Trx2	↑ Cerebellum Hippocampus Striatum	Anti-human Trx2	
		↓ Cortex Substantia nigra Spinal cord Retina		
		↑ Cerebellum Hippocampus Striatum		
		↓ Cortex Substantia nigra Spinal cord Retina		
TR1	↑ Cerebellum Hippocampus Striatum	Anti-rat TrxR1		
	↓ Cortex Substantia nigra Spinal cord Retina			
TR2	↑ Cerebellum Hippocampus Striatum	Anti-rabbit TrxR2 (Santa Cruz Bio. sc-67127)		
	↓ Striatum			

↑: high protein content; ↓: low protein content. The origin of the antibodies employed is mentioned when provided in the reference cited.

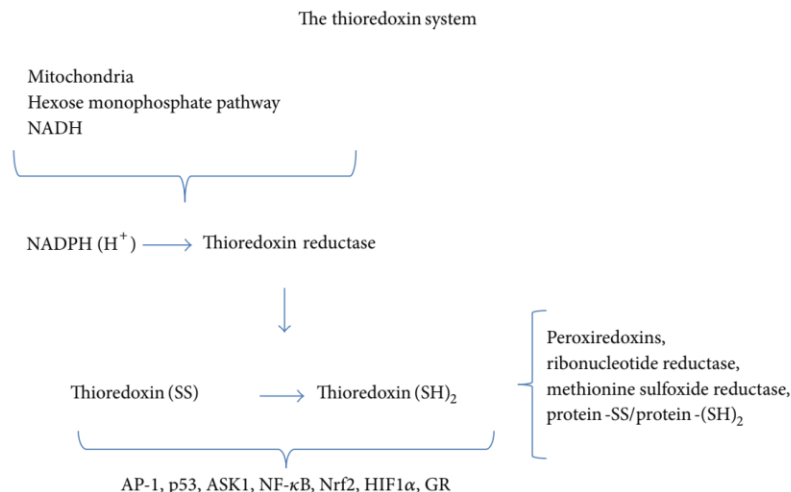


FIGURE 1: TS components are NADPH, TrxR, and Trx. NADPH is the electron donor for TrxR. Cytosolic NADPH generation principally occurs in the hexose monophosphate pathway, with mitochondrial NADPH production depending on specific dehydrogenases and the transference of electrons from NADH to NADP⁺ [35]. Trx acts as the reducing agent for peroxiredoxins, ribonucleotide reductase, methionine sulfoxide reductase, and disulfides in proteins including activating protein 1 (AP-1), tumour suppressor p53, apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), hypoxia inducible factor 1α (HIF1α), nuclear factor κB (NF-κB), and glucocorticoid receptor (GR) [36].

3. TS Modulation by Stress and Chemical Compounds

Trx expression is induced by stress, such as that produced by infectious agents, UV radiation, or O₂ [37]. Furthermore, also many physicochemical agents and stimuli induce Trx gene expression, including hormones and nontoxic agents. CNS studies report a close association between the increased expression of Trx and TrxR and cell damage where oxidative stress is implicated. For example TS is upregulated in postmortem examination of AD where also oxidative stress has been documented [23, 38]. Mechanical nerve injury, such as sciatic nerve crush, induces TS components in rats [21]; as well middle cerebral artery occlusion [39, 40], hypoglossal nerve axotomy [41], and transient focal ischemia do so in both rats and gerbils [22, 42]. Exposure to several toxic chemicals that induce oxidative stress upregulates TS proteins. Enhanced immunoreactivity to Trx in the hippocampus and striatum is induced when rats are exposed to 3-nitropropionic acid, a mitochondrial complex II toxin [43]. The environmental pollutant formaldehyde has toxic effects on the CNS [44]. Trx1 expression increases in PC12 cells exposed to formaldehyde. This upregulation decreases if the exposure time increases [45]. Morphine, the most effective opioid analgesic, has pharmacological effects associated with cellular redox state [46]. SH-SY5Y cells exposed to morphine show augmented expression of Trx1, activating the opioid receptor and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and extracellular signal-regulated kinases (ERK) signaling pathways [47]. Trx expression is also induced without stressor components such as compounds present in dietary intake; for example, fish oil increases the activity of TrxR in rat brain [48]. While t-bhq (t-butyl hydroquinone)

increases the expression and activity of TrxR1 and TrxR2 in astrocytes, it does not in neurons [49]. Also, 17-β estradiol induces Trx protein expression in SH-SY5Y cells, while the estrogen receptor activation is ligated to the upregulation of cytoprotective genes, including Trx via a cyclic guanosine monophosphate (cGMP) mediated signaling pathway [50].

Other studies have reported a downregulation or inhibition of the TS proteins. The effect may depend on the exposure time, dose, or the nature of the compound. Mice exposed to different concentrations of arsenic for four months showed that diminished Trx1 mRNA levels were in male striatum and the female nucleus accumbens [51]. Tellurium is present in optic and electronic technology, in batteries, and as an environment contaminant [52]. Diphenyl telluride induced prominent effects in mouse brain, including decreased TrxR activity [53]. Mercury compounds are accumulated in seafood and fish and readily cross the blood brain barrier [54]. Exposure to mercury compounds reduced TrxR activity in zebra fish brains, causing neurotoxicity through oxidative stress in this target organ and other organs such as the kidney [55]. The upregulation of the TS in response to different stressors is associated with neuronal survival mechanisms, which can protect against cell or tissue damage, while the inhibition or downregulation of TS leads to increased damage and cell death.

The promoter region for the constitutive expression of Trx1 contains various transcription factor binding sites, such as transcription factor SP1, GC-rich sequence DNA-binding factor (GCF), and wild type zinc finger (WT-ZFP), while the promoter regions for the inducible expression binding sites are AP-1, activating protein 2 (AP-2), NF-κB, octamer

binding transcription factor (Oct-1), polyoma enhancer activator 3 (PEA-3), myeloblastosis transcription factor (Myb), and the antioxidant-responsive element (ARE) [56]. The augmented expression of Trx1 and the activation of Nrf2 were observed in the peri-infarct regions of rats after middle artery occlusion [57] and prevented light-induced photoreceptor degeneration [58]. The presence of ARE is required for the induction of Trx1 in SH-SY5Y cells after hemin exposure and requires Nrf2 nuclear translocation downstream PI3K [59].

4. TS and Neuroprotection

Trx induction contributes to brain tolerance for and protection from toxic insults. Rats treated with selenium after receiving quinolinic acid treatment, a potent neurotoxin, show increased levels of protein and increased activity of TrxRL, ameliorating quinolinic acid damage [60]. Pretreatment with beta estradiol 3-benzoate ameliorates the injury induced by ferrous citrate in female rat brain. This protective effect is accompanied by increased Trx levels and activity [61]. The use of electroacupuncture produces clinically beneficial effects in stroke patients [62] and induces Trx expression in ischemic-reperfused rat brain [63]. Selegiline improves behavioral and cognitive functions in AD and PD. Selegiline protects SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced neurotoxicity through the induction of the Trx gene via protein kinase A mediated by mitogen-activated protein kinases/extracellular signal regulated protein kinase 1/2 (MAP Erk1/2) and protooncogene protein c-Myc [64]. Microtubule associated protein-2 (MAP-2) and Tau protein are important in promoting and maintaining the neuronal cytoskeleton [65]. NOO⁻ and H₂O₂ induce thiol oxidation and disulfide formation in Tau and MAP-2, thus altering the ability of proteins to improve the assembly of microtubules *in vitro* from purified porcine tubulin. Treatment with TrxR restores the ability of MAPs to promote microtubule assembly [66]. Trx2 prevents the neurotoxicity that results from protein misfolding, due to the protein refolding effect of Trx on scrambled (mispaired disulfide-containing) RNase A and protein disulfide isomerase activity [67, 68].

Other experimental approaches enhanced the levels of Trxs expression *in vivo* and *in vitro*. Transgenic mice that overexpress human Trxs show enhanced levels of this protein in the brain. These mice show attenuated focal cerebral ischemic damage [40], seizures, and excitotoxicity induced by kainate [69], delayed retinal neurodegeneration in Tubby mice (a mouse model for retinal degeneration and loss of visual function). Tubby mice protection occurred via Akt survival signal pathways and by increasing both the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). In this experimental model, Trx overexpression inhibits the ASK1/JNK pathway [70, 71]. The overexpression or administration of human recombinant Trx (rTrx) on PC12 cells attenuates MPP⁺ neurotoxicity [72, 73]. Overexpression of human Trx1 and Trx2 protects retinal ganglion cells against oxidative stress-induced neurodegeneration [74]. Trx2 human overexpression in SH-SY5Y neuroblastoma cells prevents apoptosis and loss

of the mitochondrial membrane potential induced by tert-butyl hydroperoxide [75]. The use of human rTrx has a protective effect in which the generation of reactive oxygen species (ROS) is involved in cytotoxic mechanisms [76]. Exogenously administered human rTrx ameliorates neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion in mice [42], reduces oxidative/nitrative stress and neuronal apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury in mice [77], and augments neurogenesis following brain ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats [78]. Studies *in vitro* demonstrate that the administration of rTrx increased neuronal cell survival in murine primary cultured neurons [34].

Other studies have described the preconditioning mechanisms as neuroprotection strategies that induce TS proteins and other antioxidant proteins. *In vivo* studies, in rats, show that hypobaric hypoxia preconditioning enhances Trx1 and Trx2 protein expression [79, 80]. *In vitro* studies show that the transient serum depletion of SH-SY5Y cells produces a hormetic response increasing Trx1 levels [81], which contributes to neuronal tolerance and protection against a posterior oxidative stress exposure. This type of Trx induction belongs to adaptive group of cytoprotective responses, allowing potentially recurrent stressors the survival to potentially recurrent stressors.

Mitochondrion is considered an important source of ROS, and the antioxidants systems play a significant role in this organelle. The two major scavenging systems in this organelle are GSH and Trx2. Trx2, together with GSH, plays an important role in the detoxification of H₂O₂ in the mitochondria of different types of brain cells in the rat hippocampus, to a greater extent even than other enzymes such as catalase [82]. Cellular GSH concentration ranges from ~2 to 10 mM depending on cell type in different species [19, 83], while Trx (isoform not specified) baboon tissues concentrations tend to be around ≤10 μM, specifically in the brain 381 ± 110 pg/mg of protein [84]. Trx2 plays an important role in reducing other antioxidants, including peroxiredoxin 3 (Prx3), which is an antioxidant enzyme found exclusively in mitochondria [85]. Changes in Trx2 and Prx3 expression in the gerbil hippocampus after ischemic reperfusion may be associated with delayed neuronal death. The administration of Prx3 and Trx2 in ischemic brains shows substantial neuroprotective effects that reduce the oxidative stress induced by ischemia [86]. Trx2 plays an important role in the control of oxidative stress in mitochondria. Neurons with mitochondrial dysfunction (complex IV inhibition) show low levels of Trx mRNA and protein and are thus more vulnerable to H₂O₂. This vulnerability could be associated with the downregulation in the TS [87].

5. TS in Neuronal Development and Protection

Trx-2 and Trx-1 knockout mice present early embryonic lethality. Trx (isoform not specified) knockout mice embryos die shortly after implantation, and the concepti were resorbed prior to gastrulation, due a failed proliferation [88]. Studies *in*

vivo and *in vitro*, deficient in Trx2, display increased cellular ROS, apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality [89, 90]. This evidence demonstrates that both Trx isoforms have essential roles in neuronal differentiation, proliferation, and survival. TS maintains a reductive environment in cells. Trx not only works as an antioxidant but also has other key biological activities, including growth control and antiapoptotic functions [91].

The nerve growth factor (NGF) is a neurotrophic factor playing an essential role in the development and promotion of survival and function of the CNS [92]. Likewise, Trx has protective effects that enhance the action of nerve growth factor via the regulation of antiapoptotic signaling and Trx's antioxidant activity. NGF induces Trx mRNA and protein levels via cyclic AMP responsive element (CREB) as well the nuclear translocation of Trx. The overexpression of the dominant negative type of Trx expression vector resulted in suppression of NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells, playing a critical regulatory role in NGF-mediated signaling transduction and outgrowth in PC12 cells [93, 94], via ERK [95]. Thus, Trx is a neurotrophic cofactor that augments the effect of NGF on neuronal differentiation and regeneration, showing neurotrophic activity in cholinergic neurons [96]. Trx is beneficial in cases of neurodegenerative disease, promoting neural-cell growth and aiding recovery [94].

Mechanisms by which thioredoxin regulates cell growth include binding to signaling molecules such as ASK-1 and thioredoxin-interacting protein (Txnip). ASK1 activates the c-Jun N terminal kinase (JNK) and p38 MAP kinase pathways and requires tumor necrosis factor (TNF- α) to induce apoptosis. Reduced Trx prevents apoptosis via an inhibitory binding to ASK1, which is lost when Trx is oxidized, which is mentioned later in this review. Trxip is an endogenous regulator of Trx that, with high affinity, binds to Trx and inhibits its ability to reduce sulfhydryl groups via NADPH oxidation and reduces the binding of Trx with ASK1 promoting an ASK1 apoptosis mediated pathway [97]. Evidence has established Trxip as a potent metabolic control protein [98, 99]. Several studies describe the control of the expression of Trxip during different conditions in the brain. Diabetic rat brains showed enhanced levels of Trxip mRNA, while Trx1 protein expression is enhanced after exercise in normal rats but not in diabetic rats [100, 101]. Trxip protein expression is induced in hyperglycemic-ischemic mice brains after middle cerebral artery occlusion [102]. Intravitreal NMDA injection augmented the expression of Trxip in rats, which was accompanied by both the release of inflammatory mediators TNF α and interleukin-1 β (IL-1 β) via ASK1 and the activation of the proapoptotic p38 MAPK/JNK pathway [103]. Exposure to silver nanoparticles induces the expression of the Trxip gene in different regions of the mouse brain [104]. The activation of ASK1 and the increase of Trxip levels produce apoptosis and neurotoxicity, making the cell more vulnerable to death. Hardingham and Bading [105] demonstrate that synaptic NMDAR activity inactivates Trxip via Forkhead box protein O (FOXO) transcription factor, enhancing Trx activity. NMDA receptor

overactivity named "excitotoxicity" increased Ca²⁺ uptake by the mitochondria inducing ROS production. Thus Trx enhanced activity by NMDA receptor activity could reduce cell vulnerability to oxidative damage [105–107].

6. TS and Alzheimer's Disease

A common feature of Alzheimer's Disease (AD), Parkinson's Disease (PD), and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is the extensive evidence of oxidative stress, which might be responsible for the dysfunction and death of neuronal cells that contribute to the pathogenesis of these diseases [108].

AD is the most common form of adult onset dementia. It is characterized by the presence of interneuronal filamentous inclusions, known as neurofibrillary tangles (NFT), and extracellular senile plaques (SP). Hyperphosphorylated Tau is the major protein involved in NFT. Amyloid beta peptide (A β), derived from the amyloid precursor protein, is the major protein in SP and amyloid angiopathy [109].

There is direct evidence that supports the theory of increased oxidative stress in the AD brain: (1) increased brain mercury, iron, and aluminum, capable of stimulating free radical generation, (2) increased lipid peroxidation, (3) increased protein and DNA oxidation, (4) diminished energy metabolism and decreased cytochrome c oxidase, (5) advanced glycation end products, malondialdehyde, carbonyls, peroxyxynitrite, heme oxygenase 1, and SOD-1 in NFT and SP, and (6) A β capability to generate free radicals. Overall, evidence suggests that free radicals are possibly involved in the pathogenesis of neuron death in AD and that the antioxidant systems could have an important role in the prevention and control of AD [110].

In AD brains, the ADF/Trx expression in astrocytes of white matter increased (Table 2) [23], while it was found to decrease in some regions of AD brains, in comparison with the controls [38, 111]. Trx80 is also drastically decreased in AD brains. Trx80 inhibits A β aggregation and protects against its toxicity, reducing neuronal vulnerability [29]. In amnesic mild cognitive impairment (AMCI, a transition stage between normal aging and AD), brains examined postmortem were characterized by diminished Trx-1 levels in the hippocampus and cerebellum [112]. Rats exposed to chronic intermittent hypoxia exposure, a reversible cause of cognitive loss in patients with AD [113], show impaired spatial learning and memory that are negatively correlated with Trx protein and ARN levels in the hippocampus [114]. Nevertheless, TrxR activity was increased in the cerebellum and amygdala of AD brains, suggesting that TrxR activities increase, perhaps as a compensatory mechanism in the face of increased oxidative stress that is limited by the substrate Trx, and could contribute to the general increase in oxidative stress and subsequent neurodegeneration seen in AD [38].

In vitro studies demonstrated augmented levels of oxidized Trx1 and an increase in the levels of apoptosis in SH-SY5Y cells exposed to A β [111]. Reduced Trx is a negative regulator of apoptosis via ASK1 [115]. Studies also show that ASK1 participates in A β induced neuronal cell death [116]. The overexpression of Trx1 protects SH-SY5Y cells against A β

TABLE 2: TS and CNS disorders.

Disorder	Cell type studied	TS expression	Reference	
AD	AD human brain	↑ ADF/Trx (p, mRNA) astrocytes in white matter	[23]	
		↓ Trx1 (p) amygdala, hippocampus, and frontal cortex	[38, 111]	
		↓ Trx80 (p) neurons of hippocampus and cortex ↓ Trx80 (p) in CSF	[29]	
	AMCI human brain SH-SY5Y cells exposed to A β	↑ TR (a) hippocampus and cerebellum ↑ Trx1 oxidized	[112] [111]	
PD	PC12 cells exposed to MPP ⁺	↓ Trx1 ↓ Trx2 ↑ Oxidized Trx1 Trx1-SS ↑ Oxidized Trx2-SS	[132]	
		SK-DAT cells exposed to paraquat SK-DAT cells exposed to rotenone and MPP ⁺	Oxidizes Trx1 Oxidizes Trx2	[131]
	SH-SY5Y cells exposed to paraquat SH-SY5Y cells exposed to Maneb	Oxidizes Trx2 ↑ TR1 (mRNA)	[133]	
	HD	HD patients	↓ Trx plasma and erythrocytes ↓ TR plasma and erythrocytes	[142]
	Schizophrenia	First episode psychosis Long-term schizophrenic	↑ Trx serum or plasma levels ↑ Trx serum or plasma levels	[144–146]
ALS	Spinal cord of ALS	↑ Trx (mRNA)	[148]	
FALS	FALS erythrocytes stable form of mutant SOD-1	↑ Trx (p)	[147]	

(p): protein expression; (a): activity; ↑: upregulation; ↓: downregulation.

[111]. Furthermore, Trx and TrxR treatments protect primary hippocampal cultures from A β toxicity, acting as radical scavenger that inhibits the neuronal injury induced by A β [38]. A β has a critical methionine residue at position 35 [117]. The reversible product of methionine oxidation is methionine sulfoxide and can be reduced by methionine sulfoxide reductases based on TrxR regulation, while the irreversible oxidation to methionine sulfone is rare and only takes place in the presence of strong oxidants [118]. Methionine sulfoxide modulates oxidative stress and the neurotoxic properties of A β , and methionine sulfoxide reductase activity is reduced in the AD brain [119]. A β is related to the pathogenesis of other disorders like macular degeneration and glaucoma in mice via the impairment of the TS [120]. A β modifications depend on the TS, and the diminished levels of this protein system make the cell more vulnerable to neurotoxic A β .

7. TS and Parkinson's Disease

Idiopathic PD is characterized clinically by tremor, rigidity, bradykinesia, and posture instability [121]. PD is diagnosed pathologically by the loss of neurons in the substantia nigra pars compacta of the midbrain, in association with the widespread occurrence of Lewy bodies (intracytoplasmic filamentous aggregates of α -synuclein present in neurons and

axons) [122]. Oxidative stress is present in PD, probably due to factors such as increased iron levels, low GSH levels and the impairment of mitochondrial complex I function in the substantia nigra [123].

In patients with sporadic PD, oxidative forms of DJ-1 protein were found [124]. DJ-1 acts as an antioxidant and transcription factor, having been observed in studies as protecting the culture cells and substantia nigra of mice from oxidative stress by inducing Trx1 expression via the transcription factor Nrf2 [125]. Nrf2 transcription factor is related to the expression of antioxidant and detoxifying enzymes, including Trx and TrxR [126]. α -Synuclein inclusions are common in PD, where its methionines and tyrosines are susceptible to oxidation [127]. The oxidation of synuclein methionines stabilizes soluble oligomers, while hetero-oligomers composed of synuclein and oxidized synuclein could have a toxic impact on the cellular environment [128].

Paraquat, MPP⁺, and rotenone are chemical compounds that mimic PD in animals and exert their toxic actions through the inhibition of mitochondrial complex I, inducing dopaminergic degeneration, as found in rodents. These compounds have been used for the study of neurotoxic mechanisms in PD [129, 130]. Ramachandiran et al. (2007) reported that, in SK-DAT cells, a different mechanism of cell damage operates in the TS, in which paraquat oxidizes Trx1 while rotenone and MPP⁺ oxidize Trx2. Chen et al. (2010) reported that in PC12 cells exposed to MPP⁺ decreased

expressions of Trx1 and Trx2, although MPP⁺ decreased the expressions of both Trxs, the ratio of oxidized versus reduced Trx1 and Trx2 was relatively increased. This could explain how each toxin works at different levels within the cell, with rotenone and MPP⁺ working at a mitochondrial level and Paraquat at a cytosol level in relation to the TS [131, 132]. Another CNS toxin used in PD animal models is the fungicide Maneb, which is a mitochondrial complex III inhibitor. Roede et al. (2011) probed Paraquat and Maneb in SH-SY5Y neuroblastoma cells, finding that Paraquat oxidizes Trx2, whereas Maneb induces the expression of TrxR1, which correlated with the abundant nucleus increase of the transcription factor Nrf2 [133]. Consistently, studies have shown that Trx also protects both SH-SY5Y and PC12 cells against the severe oxidative stress and damage caused by the parkinsonism-producing neurotoxin MPP⁺ [81, 85, 134]. In mice exposed to MPP⁺, the activation of both ASK1 and its downstream target JNK was observed, which implicates Trx in the ASK1-mediated redox signaling in the pathogenesis of PD [135, 136].

Mitochondria are the major source of ROS, which are implicated in the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as PD [137]. The TS has a significant role in H₂O₂ detoxification and the consequent cell death in dopaminergic cells. In dopaminergic cells exposed to 6-hydroxydopamine and paraquat, the inhibition of TrxR, induced mitochondrial dysfunction, increased H₂O₂ levels and cell death through oxidative stress [138]. Studies of the nigral DA cell line after H₂O₂ using microarray analysis to identify several groups of genes regulated by oxidative stress and related to functional mitochondrial complex I molecules, exocytosis, membrane trafficking, and Trx1 [139].

8. Other Neurodegenerative Diseases

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder, most of whose clinical features can be attributed to CNS neurodegeneration, with up to 95% loss of GABAergic neurons from striatum [140]. Oxidative stress has been proposed as either a causative event or as a secondary constituent of the cell death cascade in HD [141]. The reported reduction of Trx1 and TrxR1 in the plasma and erythrocytes in blood samples from HD patients [142] evidenced an oxidative stress peripheral response to this neurodegeneration. Schizophrenia has a range of cognitive deficits that may involve oxidative stress and possibly contribute to cognitive deficits during aging and in neurodegenerative disorders [143]. Various studies have shown increased levels of Trx in plasma and serum in first episode schizophrenia patients and enhanced Trx levels in the plasma of long-term schizophrenic patients [144–146].

Postmortem of spinal cords presenting amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and the erythrocytes of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS) with stable forms of mutant SOD-1 proteins show that Trx genes and protein expression are upregulated [147, 148]. Both studies suggest the involvement of Trx in the etiology and progression of the disease.

9. Concluding Remarks

Evidence shows that the presence of TS proteins is differential in the brain. Since the activity of Trx and TrxR is related to the activation of genes, the cellular cycle, and, especially, cell protection and survival, this differential expression suggests that some brain regions have different requirements for TS proteins for cell functions or against ROS damage. We have revised the modulation of the TS in different animal models, discussing the various mechanisms activating the TS and the mechanisms through which it exercises its functions. These studies demonstrate that the upregulation of TS proteins is accompanied by cell protection against damage, while the downregulation makes cells more vulnerable to death. Research in postmortem brains from different neurodegenerative disorders shows a differential modulating pattern in these disorders. It may depend on disease's stage, which makes the TS a therapeutic target for the treatment and retardation of several neurodegenerative processes. The role on antioxidant functions is important but even more than the antioxidant activity; TS proteins by their redox properties modulate the function and expression of other proteins, including different transcription factors essential for the development and for the control of cell survival or death. Elucidation of specific functions and mechanism of regulation of TS is required in different brain cell types. The role of Trx secretion and the functions as a brain cocytokine and chemokine is needed as well; this will be helpful for the study in pathogenesis of different neurodegenerative diseases.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgments

This work was partially supported by a Grant from CONACYT no. 102287. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the Doctorado en Ciencias Biológicas for Daniela Silva Adaya at the Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- [1] T. C. Laurent, E. C. Moore, and P. Reichard, "Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *escherichia coli* B," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 239, pp. 3436–3444, 1964.
- [2] H. Z. Chae, H. J. Kim, S. W. Kang, and S. G. Rhee, "Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 45, no. 2-3, pp. 101–112, 1999.
- [3] C. H. Lillig and A. Holmgren, "Thioredoxin and related molecules—from biology to health and disease," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 9, no. 1, pp. 25–47, 2007.
- [4] A. Burke-Gaffney, M. E. J. Callister, and H. Nakamura, "Thioredoxin: friend or foe in human disease?" *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 26, no. 8, pp. 398–404, 2005.

- [5] E. S. J. Arnér and A. Holmgren, "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase," *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, no. 20, pp. 6102–6109, 2000.
- [6] K. Pekkari and A. Holmgren, "Truncated thioredoxin: physiological functions and mechanism," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 6, no. 1, pp. 53–61, 2004.
- [7] R. B. Carilho Torrao, I. H. Dias, S. J. Bennett, C. R. Dunston, and H. R. Griffiths, "Healthy ageing and depletion of intracellular glutathione influences T cell membrane thioredoxin-1 levels and cytokine secretion," *Chemistry Central Journal*, vol. 7, no. 1, p. 150, 2013.
- [8] J. Nordberg and E. S. J. Arnér, "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 31, no. 11, pp. 1287–1312, 2001.
- [9] X. S. Zeng, J. J. Jia, Y. Kwon, S. D. Wang, and J. Bai, "The role of thioredoxin-1 in suppression of endoplasmic reticulum stress in Parkinson disease," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 67, pp. 10–18, 2013.
- [10] A. Holmgren and M. Luthman, "Tissue distribution and subcellular localization of bovine thioredoxin determined by radioimmunoassay," *Biochemistry*, vol. 17, no. 19, pp. 4071–4077, 1978.
- [11] J. Soerensen, C. Jakupoglu, H. Beck et al., "The role of thioredoxin reductases in brain development," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 3, Article ID e1813, 2008.
- [12] M. B. Jornstedt, S. Kumar, and A. Holmgren, "Selenite and selenodiglutathione: reactions with thioredoxin systems," *Methods in Enzymology*, vol. 252, pp. 209–219, 1995.
- [13] L. Zhong, E. S. J. Arnér, and A. Holmgren, "Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenothiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 11, pp. 5854–5859, 2000.
- [14] J. Lundstrom and A. Holmgren, "Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 16, pp. 9114–9120, 1990.
- [15] J. M. May, S. Mendiratta, K. E. Hill, and R. F. Burk, "Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 36, pp. 22607–22610, 1997.
- [16] J. M. May, C. E. Cobb, S. Mendiratta, K. E. Hill, and R. F. Burk, "Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 36, pp. 23039–23045, 1998.
- [17] E. S. J. Arnér, J. Nordberg, and A. Holmgren, "Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 225, no. 1, pp. 268–274, 1996.
- [18] L. Xia, M. Björnstedt, T. Nordman, L. C. Eriksson, and J. M. Olsson, "Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase: an antioxidant regenerating pathway," *European Journal of Biochemistry*, vol. 268, no. 5, pp. 1486–1490, 2001.
- [19] R. Dringen, J. M. Gutterer, and J. Hirrlinger, "Glutathione metabolism in brain: metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species," *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, no. 16, pp. 4912–4916, 2000.
- [20] B. Rozell, H.-A. Hansson, M. Luthman, and A. Holmgren, "Immunohistochemical localization of thioredoxin and thioredoxin reductase in adult rats," *European Journal of Cell Biology*, vol. 38, no. 1, pp. 79–86, 1985.
- [21] S. Stemme, H.-A. Hansson, A. Holmgren, and B. Rozell, "Axoplasmic transport of thioredoxin and thioredoxin reductase in rat sciatic nerve," *Brain Research*, vol. 359, no. 1–2, pp. 140–146, 1985.
- [22] H. Tomimoto, I. Akiguchi, H. Wakita, J. Kimura, K. Hori, and J. Yodoi, "Astroglial expression of ATL-derived factor, a human thioredoxin homologue, in the gerbil brain after transient global ischemia," *Brain Research*, vol. 625, no. 1, pp. 1–8, 1993.
- [23] M. Asahina, T. Yamada, Y. Yoshiyama, and J. Yodoi, "Expression of adult T cell leukemia-derived factor in human brain and peripheral nerve tissues," *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, vol. 9, no. 4, pp. 181–185, 1998.
- [24] J. R. Godoy, M. Funke, W. Ackermann et al., "Redox atlas of the mouse. Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1810, no. 1, pp. 2–92, 2011.
- [25] A. Lippoldt, C. A. Padilla, H. Gerst et al., "Localization of thioredoxin in the rat brain and functional implications," *Journal of Neuroscience*, vol. 15, no. 10, pp. 6747–6756, 1995.
- [26] M. L. Aon-Bertolino, J. I. Romero, P. Galeano et al., "Thioredoxin and glutaredoxin system proteins-immunolocalization in the rat central nervous system," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1810, no. 1, pp. 93–110, 2011.
- [27] E. Rybnikova, A. E. Damdimopoulos, J.-Å. Gustafsson, G. Spyrou, and M. Peltó-Huikko, "Expression of novel antioxidant thioredoxin-2 in the rat brain," *European Journal of Neuroscience*, vol. 12, no. 5, pp. 1669–1678, 2000.
- [28] A. Rubartelli, A. Bajetto, G. Allavena, E. Wollman, and R. Sitia, "Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 34, pp. 24161–24164, 1992.
- [29] F. Gil-Bea, S. Akterin, T. Persson et al., "Thioredoxin-80 is a product of alpha-secretase cleavage that inhibits amyloid-beta aggregation and is decreased in Alzheimer's disease brain," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 4, no. 10, pp. 1097–1111, 2012.
- [30] K. Pekkari, M. T. Goodarzi, A. Scheynius, A. Holmgren, and J. Avila-Cariño, "Truncated thioredoxin (Trx80) induces differentiation of human CD14 + monocytes into a novel cell type (TAMs) via activation of the MAP kinases p38, ERK, and JNK," *Blood*, vol. 105, no. 4, pp. 1598–1605, 2005.
- [31] N. Wakasugi, Y. Tagaya, H. Wakasugi et al., "Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 21, pp. 8282–8286, 1990.
- [32] D. Schubert, F. Herrera, R. Cumming et al., "Neural cells secrete a unique repertoire of proteins," *Journal of Neurochemistry*, vol. 109, no. 2, pp. 427–435, 2009.
- [33] R. M. LoPachin and D. S. Barber, "Synaptic cysteine sulfhydryl groups as targets of electrophilic neurotoxins," *Toxicological Sciences*, vol. 94, no. 2, pp. 240–255, 2006.
- [34] K. Hori, M. Katayama, N. Sato, K. Ishii, S. Waga, and J. Yodoi, "Neuroprotection by glial cells through adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin (ADF/TRX)," *Brain Research*, vol. 652, no. 2, pp. 304–310, 1994.
- [35] E. S. J. Arnér, "Focus on mammalian thioredoxin reductases—important selenoproteins with versatile functions," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1790, no. 6, pp. 495–526, 2009.
- [36] A. Bindoli and M. P. Rigobello, "Principles in: from chemistry to functional significance," *Redox Signaling/Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 18, no. 13, pp. 1557–1593, 2013.

- [37] K. Hirota, H. Nakamura, H. Masutani, and J. Yodoi, "Thioredoxin superfamily and thioredoxin-inducing agents," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 957, pp. 189–199, 2002.
- [38] M. A. Lovell, C. Xie, S. P. Gabbita, and W. R. Markesbery, "Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 28, no. 3, pp. 418–427, 2000.
- [39] Y. Takagi, F. Horikawa, K. Nozaki, T. Sugino, N. Hashimoto, and J. Yodoi, "Expression and distribution of redox regulatory protein, thioredoxin during transient focal brain ischemia in the rat," *Neuroscience Letters*, vol. 251, no. 1, pp. 25–28, 1998.
- [40] Y. Takagi, A. Mitsui, A. Nishiyama et al., "Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 7, pp. 4131–4136, 1999.
- [41] K. Mansur, Y. Iwahashi, S. Kiryu-Seo et al., "Up-regulation of thioredoxin expression in motor neurons after nerve injury," *Molecular Brain Research*, vol. 62, no. 1, pp. 86–91, 1998.
- [42] I. Hattori, Y. Takagi, H. Nakamura et al., "Intravenous administration of thioredoxin decreases brain damage following transient focal cerebral ischemia in mice," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 6, no. 1, pp. 81–87, 2004.
- [43] T. Sugino, K. Nozaki, Y. Takagi, I. Hattori, N. Hashimoto, and J. Yodoi, "Expression and distribution of redox regulatory protein, thioredoxin after metabolic impairment by 3-nitropropionic acid in rat brain," *Neuroscience Letters*, vol. 275, no. 2, pp. 145–148, 1999.
- [44] F.-A. Pitten, A. Kramer, K. Herrmann, J. Bremer, and S. Koch, "Formaldehyde neurotoxicity in animal experiments," *Pathology Research and Practice*, vol. 196, no. 3, pp. 193–198, 2000.
- [45] F.-C. Luo, J. Zhou, T. Lv et al., "Induction of endoplasmic reticulum stress and the modulation of thioredoxin-1 in formaldehyde-induced neurotoxicity," *NeuroToxicology*, vol. 33, no. 3, pp. 290–298, 2012.
- [46] H. S. Smith, "The role of genomic oxidative-reductive balance as predictor of complex regional pain syndrome development: a novel theory," *Pain Physician*, vol. 13, no. 1, pp. 79–90, 2010.
- [47] F. C. Luo, Y. M. Feng, L. Zhao et al., "Thioredoxin-1 expression regulated by morphine in SH-SY5Y cells," *Neuroscience Letters*, vol. 523, no. 1, pp. 50–55, 2012.
- [48] K. M. Denny Joseph and M. Muralidhara, "Fish oil prophylaxis attenuates rotenone-induced oxidative impairments and mitochondrial dysfunctions in rat brain," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 5, pp. 1529–1537, 2012.
- [49] E. Eftekharpour, A. Holmgren, and B. H. Juurlink, "Thioredoxin reductase and glutathione synthesis is upregulated by t-butylhydroquinone in cortical astrocytes but not in cortical neurons," *Glia*, vol. 31, no. 3, pp. 241–248, 2000.
- [50] S. Y. Lee, T. Andoh, D. L. Murphy, and C. C. Chiueh, "17 β -estradiol activates ICI 182,780-sensitive estrogen receptors and cyclic GMP-dependent thioredoxin expression for neuroprotection," *The FASEB Journal*, vol. 17, no. 8, pp. 947–948, 2003.
- [51] U. Bardullas, J. H. Limón-Pacheco, M. Giordano, L. Carrizales, M. S. Mendoza-Trejo, and V. M. Rodriguez, "Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 239, no. 2, pp. 169–177, 2009.
- [52] L. Heimfarth, S. O. Loureiro, K. P. Reis et al., "Diphenyl ditelluride induces hypophosphorylation of intermediate filaments through modulation of DARPP-32-dependent pathways in cerebral cortex of young rats," *Archives of Toxicology*, vol. 86, no. 2, pp. 217–230, 2012.
- [53] B. Comparsi, D. F. Meinerz, J. L. Franco et al., "Diphenyl ditelluride targets brain selenoproteins in vivo: inhibition of cerebral thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in mice after acute exposure," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 370, no. 1-2, pp. 173–182, 2012.
- [54] T. W. Clarkson and L. Magos, "The toxicology of mercury and its chemical compounds," *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 36, no. 8, pp. 609–662, 2006.
- [55] V. Branco, J. Canário, J. Lu, A. Holmgren, and C. Carvalho, "Mercury and selenium interaction in vivo: effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 52, no. 4, pp. 781–793, 2012.
- [56] A. Patenaude, M. R. V. Murthy, and M.-E. Mirault, "Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 62, no. 10, pp. 1063–1080, 2005.
- [57] N. Tanaka, Y. Ikeda, Y. Ohta et al., "Expression of Keap1-Nrf2 system and antioxidative proteins in mouse brain after transient middle cerebral artery occlusion," *Brain Research*, vol. 1370, pp. 246–253, 2011.
- [58] M. Tanito, M.-P. Agbaga, and R. E. Anderson, "Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 42, no. 12, pp. 1838–1850, 2007.
- [59] K. Nakaso, H. Yano, Y. Fukuhara, T. Takeshima, K. Wada-Isoe, and K. Nakashima, "PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells," *FEBS Letters*, vol. 546, no. 2-3, pp. 181–184, 2003.
- [60] P. D. Maldonado, V. Pérez-De la Cruz, M. Torres-Ramos et al., "Selenium-induced antioxidant protection recruits modulation of thioredoxin reductase during excitotoxic/pro-oxidant events in the rat striatum," *Neurochemistry International*, vol. 61, no. 2, pp. 195–206, 2012.
- [61] T.-Y. Chen, K.-L. Tsai, T.-Y. Lee, C. C. Chiueh, W.-S. Lee, and C. Hsu, "Sex-specific role of thioredoxin in neuroprotection against iron-induced brain injury conferred by estradiol," *Stroke*, vol. 41, no. 1, pp. 160–165, 2010.
- [62] P. Zhao, Z.-N. Huang, G. Chen, and J.-S. Cheng, "Electroacupuncture attenuates nitric oxide release from rat striatum after transient middle cerebral artery occlusion," *Acupuncture and Electro-Therapeutics Research*, vol. 25, no. 2, pp. 101–107, 2000.
- [63] F. K. W. Siu, S. C. L. Lo, and M. C. P. Leung, "Electroacupuncture potentiates the disulphide-reducing activities of thioredoxin system by increasing thioredoxin expression in ischemia-reperused rat brains," *Life Sciences*, vol. 77, no. 4, pp. 386–399, 2005.
- [64] T. Andoh, P. Boon Chock, D. L. Murphy, and C. C. Chiueh, "Role of the redox protein thioredoxin in cytoprotective mechanism evoked by (-)-deprenyl," *Molecular Pharmacology*, vol. 68, no. 5, pp. 1408–1414, 2005.
- [65] M. L. Garcia and D. W. Cleveland, "Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 13, no. 1, pp. 41–48, 2001.
- [66] L. M. Landino, T. E. Skreslet, and J. A. Alston, "Cysteine oxidation of tau and microtubule-associated protein-2 by peroxynitrite: modulation of microtubule assembly kinetics by the thioredoxin reductase system," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 33, pp. 35101–35105, 2004.

- [67] H. C. Hawkins, E. C. Blackburn, and R. B. Freedman, "Comparison of the activities of protein disulphide-isomerase and thioredoxin in catalysing disulphide isomerization in a protein substrate," *Biochemical Journal*, vol. 275, part 2, pp. 349–353, 1991.
- [68] A. Mitsui, T. Hirakawa, and J. Yodoi, "Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 186, no. 3, pp. 1220–1226, 1992.
- [69] Y. Takagi, I. Hattori, K. Nozaki et al., "Excitotoxic hippocampal injury is attenuated in thioredoxin transgenic mice," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 20, no. 5, pp. 829–833, 2000.
- [70] L. Kong, M. Tanito, Z. Huang et al., "Delay of photoreceptor degeneration in tubby mouse by sulforaphane," *Journal of Neurochemistry*, vol. 101, no. 4, pp. 1041–1052, 2007.
- [71] L. Kong, X. Zhou, F. Li, J. Yodoi, J. McGinnis, and W. Cao, "Neuroprotective effect of overexpression of thioredoxin on photoreceptor degeneration in Tubby mice," *Neurobiology of Disease*, vol. 38, no. 3, pp. 446–455, 2010.
- [72] J. Bai, H. Nakamura, I. Hattori, M. Tanito, and J. Yodoi, "Thioredoxin suppresses 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity in rat PC12 cells," *Neuroscience Letters*, vol. 321, no. 1–2, pp. 81–84, 2002.
- [73] S. B. Hee, W. C. Eun, S. K. Jin et al., "Thioredoxin overexpression in HT-1080 cells induced cellular senescence and sensitization to gamma radiation," *FEBS Letters*, vol. 579, no. 19, pp. 4055–4062, 2005.
- [74] Y. Munemasa, H. K. Seok, H. A. Jae, J. M. K. Kwong, J. Caprioli, and N. Piri, "Protective effect of thioredoxins 1 and 2 in retinal ganglion cells after optic nerve transection and oxidative stress," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 49, no. 8, pp. 3535–3543, 2008.
- [75] Y. Chen, M. Yu, D. P. Jones, J. T. Greenamyre, and J. Cai, "Protection against oxidant-induced apoptosis by mitochondrial thioredoxin in SH-SY5Y neuroblastoma cells," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 216, no. 2, pp. 256–262, 2006.
- [76] T. Nakamura, H. Nakamura, T. Hoshino, S. Ueda, H. Wada, and J. Yodoi, "Redox regulation of lung inflammation by thioredoxin," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 7, no. 1–2, pp. 60–71, 2005.
- [77] Y. H. Ma, N. Su, X. D. Chao et al., "Thioredoxin-1 attenuates post-ischemic neuronal apoptosis via reducing oxidative/nitrative stress," *Neurochemistry International*, vol. 60, no. 5, pp. 475–483, 2012.
- [78] F. Zhou, P. P. Liu, G. Y. Ying, X. D. Zhu, H. Shen, and G. Chen, "Effects of thioredoxin-1 on neurogenesis after brain ischemia/reperfusion injury," *CNS Neuroscience & Therapeutics*, vol. 19, no. 3, pp. 204–205, 2013.
- [79] S. A. Stroev, T. S. Gluschenko, E. I. Tjulkova et al., "Preconditioning enhances the expression of mitochondrial antioxidant thioredoxin-2 in the forebrain of rats exposed to severe hypobaric hypoxia," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 78, no. 4, pp. 563–569, 2004.
- [80] S. A. Stroev, E. I. Tjulkova, T. S. Gluschenko, E. A. Rybnikova, M. O. Samoilov, and M. Pelto-Huikko, "The augmentation of brain thioredoxin-1 expression after severe hypobaric hypoxia by the preconditioning in rats," *Neuroscience Letters*, vol. 370, no. 2–3, pp. 224–229, 2004.
- [81] T. Andoh, P. Boon Chock, and C. C. Chiueh, "The roles of thioredoxin in protection against oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 12, pp. 9655–9660, 2002.
- [82] A. P. Kudin, B. Augustynek, A. K. Lehmann, R. Kovács, and W. S. Kunz, "The contribution of thioredoxin-2 reductase and glutathione peroxidase to H₂O₂ detoxification of rat brain mitochondria," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1817, no. 10, pp. 1901–1906, 2012.
- [83] S. Uhlig and A. Wendel, "The physiological consequences of glutathione variations," *Life Sciences*, vol. 51, no. 14, pp. 1083–1094, 1992.
- [84] K. C. Das and C. W. White, "Detection of thioredoxin in human serum and biological samples using a sensitive sandwich ELISA with digoxigenin-labeled antibody," *Journal of Immunological Methods*, vol. 211, no. 1–2, pp. 9–20, 1998.
- [85] T. Andoh, C. C. Chiueh, and P. B. Chock, "Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates the expression of thioredoxin and thioredoxin peroxidase-1 during hormesis in response to oxidative stress-induced apoptosis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 2, pp. 885–890, 2003.
- [86] I. K. Hwang, K.-Y. Yoo, D. W. Kim et al., "Changes in the expression of mitochondrial peroxiredoxin and thioredoxin in neurons and glia and their protective effects in experimental cerebral ischemic damage," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 48, no. 9, pp. 1242–1251, 2010.
- [87] J. Gao, Z.-R. Zhu, H.-Q. Ding, Z. Qian, L. Zhu, and Y. Ke, "Vulnerability of neurons with mitochondrial dysfunction to oxidative stress is associated with down-regulation of thioredoxin," *Neurochemistry International*, vol. 50, no. 2, pp. 379–385, 2007.
- [88] M. Matsui, M. Oshima, H. Oshima et al., "Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene," *Developmental Biology*, vol. 178, no. 1, pp. 179–185, 1996.
- [89] T. Tanaka, F. Hosoi, Y. Yamaguchi-Iwai et al., "Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis," *The EMBO Journal*, vol. 21, no. 7, pp. 1695–1703, 2002.
- [90] L. Nonn, R. R. Williams, R. P. Erickson, and G. Powis, "The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 23, no. 3, pp. 916–922, 2003.
- [91] J. Yoshioka, E. R. Schreiter, and R. T. Lee, "Role of thioredoxin in cell growth through interactions with signaling molecules," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 8, no. 11–12, pp. 2143–2151, 2006.
- [92] E. J. Huang and L. F. Reichardt, "Neurotrophins: roles in neuronal development and function," *Annual Review of Neuroscience*, vol. 24, pp. 677–736, 2001.
- [93] J. Bai, H. Nakamura, Y.-W. Kwon et al., "Critical roles of thioredoxin in nerve growth factor-mediated signal transduction and neurite outgrowth in PC12 cells," *Journal of Neuroscience*, vol. 23, no. 2, pp. 503–509, 2003.
- [94] H. Masutani, J. Bai, Y.-C. Kim, and J. Yodoi, "Thioredoxin as a neurotrophic cofactor and an important regulator of neuroprotection," *Molecular Neurobiology*, vol. 29, no. 3, pp. 229–242, 2004.
- [95] S. Impey, K. Obrietan, S. T. Wong et al., "Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation," *Neuron*, vol. 21, no. 4, pp. 869–883, 1998.
- [96] M. Endoh, T. Kunishita, and T. Tabita, "Thioredoxin from activated macrophages as a trophic factor for central cholinergic

- neurons in vitro," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 192, no. 2, pp. 760–765, 1993.
- [97] T. Y. Hui, S. S. Sheth, J. M. Diffley et al., "Mice lacking thioredoxin-interacting protein provide evidence linking cellular redox state to appropriate response to nutritional signals," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 23, pp. 24387–24393, 2004.
- [98] J. S. Bodnar, A. Chatterjee, L. W. Castellani et al., "Positional cloning of the combined hyperlipidemia gene *Hyp1pl1*," *Nature Genetics*, vol. 30, no. 1, pp. 110–116, 2002.
- [99] S.-I. Oka, W. Liu, H. Masutani et al., "Impaired fatty acid utilization in thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)-deficient mice: a unique animal model of Reye syndrome," *The FASEB Journal*, vol. 20, no. 1, pp. 121–123, 2006.
- [100] Z. Lappalainen, J. Lappalainen, N. K. J. Oksala et al., "Diabetes impairs exercise training-associated thioredoxin response and glutathione status in rat brain," *Journal of Applied Physiology*, vol. 106, no. 2, pp. 461–467, 2009.
- [101] A. Nishiyama, H. Masutani, H. Nakamura, Y. Nishinaka, and J. Yodoi, "Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins," *IUBMB Life*, vol. 52, no. 1-2, pp. 29–33, 2001.
- [102] G. S. Kim, J. E. Jung, P. Narasimhan, H. Sakata, and P. H. Chan, "Induction of thioredoxin-interacting protein is mediated by oxidative stress, calcium, and glucose after brain injury in mice," *Neurobiology of Disease*, vol. 46, no. 2, pp. 440–449, 2012.
- [103] M. M. H. Al-Gayyar, M. A. Abdelsaid, S. Matragoon, B. A. Pillai, and A. B. El-Remessy, "Thioredoxin interacting protein is a novel mediator of retinal inflammation and neurotoxicity," *British Journal of Pharmacology*, vol. 164, no. 1, pp. 170–180, 2011.
- [104] M. F. Rahman, J. Wang, T. A. Patterson et al., "Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles," *Toxicology Letters*, vol. 187, no. 1, pp. 15–21, 2009.
- [105] G. E. Hardingham and H. Bading, "Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 11, no. 10, pp. 682–696, 2010.
- [106] A. C. Rego and C. R. Oliveira, "Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases," *Neurochemical Research*, vol. 28, no. 10, pp. 1563–1574, 2003.
- [107] S. Papadia, F. X. Soriano, F. Léveillé et al., "Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses," *Nature Neuroscience*, vol. 11, no. 4, pp. 476–487, 2008.
- [108] K. J. Barnham, C. L. Masters, and A. I. Bush, "Neurodegenerative diseases and oxidative stress," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 3, no. 3, pp. 205–214, 2004.
- [109] Z. S. Khachaturian, "Diagnosis of Alzheimer's disease," *Archives of Neurology*, vol. 42, no. 11, pp. 1097–1105, 1985.
- [110] W. R. Markesbery, "Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 23, no. 1, pp. 134–147, 1997.
- [111] S. Akterin, R. F. Cowburn, A. Miranda-Vizuete et al., "Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in β -amyloid toxicity and Alzheimer's disease," *Cell Death and Differentiation*, vol. 13, no. 9, pp. 1454–1465, 2006.
- [112] F. di Domenico, R. Sultana, G. F. Tiu et al., "Protein levels of heat shock proteins 27, 32, 60, 70, 90 and thioredoxin-1 in amnesic mild cognitive impairment: an investigation on the role of cellular stress response in the progression of Alzheimer disease," *Brain Research*, vol. 1333, pp. 72–81, 2010.
- [113] S. Ancoli-Israel, B. W. Palmer, J. R. Cooke et al., "Cognitive effects of treating obstructive sleep apnea in Alzheimer's disease: a randomized controlled study," *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 56, no. 11, pp. 2076–2081, 2008.
- [114] X. H. Yang, H. G. Liu, X. Liu, and J. N. Chen, "Thioredoxin and impaired spatial learning and memory in the rats exposed to intermittent hypoxia," *Chinese Medical Journal*, vol. 125, no. 17, pp. 3074–3080, 2012.
- [115] J. J. Song and Y. J. Lee, "Differential role of glutaredoxin and thioredoxin in metabolic oxidative stress-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1," *Biochemical Journal*, vol. 373, part 3, pp. 845–853, 2003.
- [116] H. Kadowaki, H. Nishitoh, F. Urano et al., "Amyloid β induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation," *Cell Death and Differentiation*, vol. 12, no. 1, pp. 19–24, 2005.
- [117] D. A. Butterfield and D. Boyd-Kimball, "The critical role of methionine 35 in Alzheimer's amyloid β -peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1703, no. 2, pp. 149–156, 2005.
- [118] Q.-A. Sun, Y. Wu, F. Zappacosta et al., "Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 35, pp. 24522–24530, 1999.
- [119] S. P. Gabbita, M. Y. Aksenov, M. A. Lovell, and W. R. Markesbery, "Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain," *Journal of Neurochemistry*, vol. 73, no. 4, pp. 1660–1666, 1999.
- [120] F. Lamoke, G. Ripandelli, S. Webster et al., "Loss of thioredoxin function in retinas of mice overexpressing amyloid beta," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 53, no. 3, pp. 577–588, 2012.
- [121] M. M. Hoehn and M. D. Yahr, "Parkinsonism: onset, progression, and mortality. 1967," *Neurology*, vol. 57, no. 10, supplement 3, pp. S11–S26, 2001.
- [122] D. J. Gelb, E. Oliver, and S. Gilman, "Diagnostic criteria for Parkinson disease," *Archives of Neurology*, vol. 56, no. 1, pp. 33–39, 1999.
- [123] P. Jenner, "Oxidative stress and Parkinson's disease," *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 83, pp. 507–520, 2007.
- [124] J. Choi, M. C. Sullards, J. A. Olzmann et al., "Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 16, pp. 10816–10824, 2006.
- [125] J. Y. Im, K. W. Lee, J. M. Woo, E. Junn, and M. M. Mouradian, "DJ-1 induces thioredoxin 1 expression through the Nrf2 pathway," *Human Molecular Genetics*, vol. 21, no. 13, pp. 3013–3024, 2012.
- [126] C. M. Clements, R. S. McNally, B. J. Conti, T. W. Mak, and J. P.-Y. Ting, "DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 41, pp. 15091–15096, 2006.
- [127] C. Chavarria and J. M. Souza, "Oxidation and nitration of alpha-synuclein and their implications in neurodegenerative diseases," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 533, no. 1-2, pp. 25–32, 2013.
- [128] V. N. Uversky, G. Yamin, P. O. Souillac, J. Goers, C. B. Glaser, and A. L. Fink, "Methionine oxidation inhibits fibrillation of human α -synuclein in vitro," *FEBS Letters*, vol. 517, no. 1-3, pp. 239–244, 2002.
- [129] R. Betarbet, T. B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A. V. Panov, and J. T. Greenamyre, "Chronic systemic pesticide

- exposure reproduces features of Parkinson's disease," *Nature Neuroscience*, vol. 3, no. 12, pp. 1301–1306, 2000.
- [130] M. Thiruchelvam, B. J. Brockel, E. K. Richfield, R. B. Baggs, and D. A. Cory-Slechta, "Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease?" *Brain Research*, vol. 873, no. 2, pp. 225–234, 2000.
- [131] S. Ramachandiran, J. M. Hansen, D. P. Jones, J. R. Richardson J.R., and G. W. Miller, "Divergent mechanisms of paraquat, MPP+, and rotenone toxicity: oxidation of thioredoxin and caspase-3 activation," *Toxicological Sciences*, vol. 95, no. 1, pp. 163–171, 2007.
- [132] V. T. K. Chen, C.-L. Huang, Y.-C. Lee, W.-C. Liao, and N.-K. Huang, "The roles of the thioredoxin system and peroxiredoxins in 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma cells," *Toxicology in Vitro*, vol. 24, no. 6, pp. 1577–1583, 2010.
- [133] J. R. Roede, J. M. Hansen, Y.-M. Go, and D. P. Jones, "Maneb and paraquat-mediated neurotoxicity: involvement of peroxiredoxin/thioredoxin system," *Toxicological Sciences*, vol. 121, no. 2, pp. 368–375, 2011.
- [134] A. G. Estévez, N. Spear, J. Anthony Thompson et al., "Nitric oxide-dependent production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with brain-derived neurotrophic factor," *Journal of Neuroscience*, vol. 18, no. 10, pp. 3708–3714, 1998.
- [135] G. Fujino, T. Noguchi, K. Takeda, and H. Ichijo, "Thioredoxin and protein kinases in redox signaling," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 16, no. 6, pp. 427–435, 2006.
- [136] S. Karunakaran, L. Diwakar, U. Saeed et al., "Activation of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) and translocation of death-associated protein, Daxx, in substantia nigra pars compacta in a mouse model of Parkinson's disease: protection by α -lipoic acid," *The FASEB Journal*, vol. 21, no. 9, pp. 2226–2236, 2007.
- [137] P. Jenner and C. W. Olanow, "Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease," *Neurology*, vol. 47, no. 6, supplement 3, pp. S161–S170, 1996.
- [138] P. Lopert, B. J. Day, and M. Patel, "Thioredoxin reductase deficiency potentiates oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cell death in dopaminergic cells," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 11, Article ID e50683, 2012.
- [139] M. S. Yoo, H. S. Chun, J. J. Son et al., "Oxidative stress regulated genes in nigral dopaminergic neuronal cells: correlation with the known pathology in Parkinson's disease," *Molecular Brain Research*, vol. 110, no. 1, pp. 76–84, 2003.
- [140] C. A. Ross and S. J. Tabrizi, "Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment," *The Lancet Neurology*, vol. 10, no. 1, pp. 83–98, 2011.
- [141] S. E. Browne, R. J. Ferrante, and M. F. Beal, "Oxidative stress in Huntington's disease," *Brain Pathology*, vol. 9, no. 1, pp. 147–163, 1999.
- [142] F. Sánchez-López, I. Tasset, E. Agüera et al., "Oxidative stress and inflammation biomarkers in the blood of patients with Huntington's disease," *Journal of Neurology Research*, vol. 34, no. 7, pp. 721–724, 2012.
- [143] D. Kapogiannis and M. P. Mattson, "Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease," *The Lancet Neurology*, vol. 10, no. 2, pp. 187–198, 2011.
- [144] X. Y. Zhang, D. C. Chen, M. H. Xiu et al., "The novel oxidative stress marker thioredoxin is increased in first-episode schizophrenic patients," *Schizophrenia Research*, vol. 113, no. 2-3, pp. 151–157, 2009.
- [145] B. Owe-Larsson, K. Ekdahl, T. Edbom et al., "Increased plasma levels of thioredoxin-1 in patients with first episode psychosis and long-term schizophrenia," *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 35, no. 4, pp. 1117–1121, 2011.
- [146] X. Y. Zhang, C. Chen da, M. H. Xiu et al., "Thioredoxin, a novel oxidative stress marker and cognitive performance in chronic and medicated schizophrenia versus healthy controls," *Schizophrenia Research*, vol. 143, no. 2-3, pp. 301–306, 2013.
- [147] Y. Ogawa, H. Kosaka, T. Nakanishi et al., "Stability of mutant superoxide dismutase-1 associated with familial amyotrophic lateral sclerosis determines the manner of copper release and induction of thioredoxin in erythrocytes," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 241, no. 2, pp. 251–257, 1997.
- [148] A. Malaspina, N. Kaushik, and J. de Bellerocche, "Differential expression of 14 genes in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord detected using gridded cDNA arrays," *Journal of Neurochemistry*, vol. 77, no. 1, pp. 132–145, 2001.