



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto del consumo semi crónico de sulfasalazina en sistema nervioso central de ratón

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Erik Javier Castillo Pérez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Fredy Roberto Cifuentes Navarro
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dra. María Elena Ibarra Rubio
Facultad de Química

Ciudad de México. agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El siguiente trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme una formación de alta calidad y la oportunidad de continuar mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca me ayudo a subsistir durante este proyecto (No. CVU: 894598)

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo para asistir al XI Congreso Nacional de Toxicología y así contribuir a mi formación científica.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt, por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo, hace ya 5 largos años, por siempre brindarme su apoyo y guía.

A los miembros de mi comité tutor Dra. María Elena Ibarra Rubio, y Dr. Fredy Alberto Cifuentes Navarro, por el apoyo, los comentarios y asesorías que me dieron, sus comentarios siempre aportaron un gran apoyo para corregir mis errores y superarme como científico y persona.

Al Dr. Pavel Petrosyan por todo el apoyo técnico, consejos y asesorías que me dio durante mis experimentos, su apoyo fue clave en la realización de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Dra. Carla Garza, Dr. Lucio Ramos, Dra Daniela Silva, M en C Ángel Ponce y M en C. Wendy González; Que siempre me apoyaron en los sacrificios y me asesoraron con respecto al Western blot, a muchos les debo demasiado, por su amistad y guía en varios aspectos de mi vida.

A mis otros compañeros Dr. Jorge Maciel, y Viri Huitrón, el tiempo compartido con ustedes siempre fue valioso

A la Dra. Julieta Rubio por las asesorías y comentarios que siempre me brindo, su ayuda siempre fue muy valiosa para mí.

A mis grandes amigos con los cuales conté a lo largo de este proyecto, y aunque nuestros caminos a veces se han separado, siempre conté con ustedes: Alan Zarate, Alan Schubert, Cesar Huerta, David Uribe, David Rodríguez, Adrián Perez, Daniel Chávez, Mauricio Hernández , Helena Camp.

A la Biotec. Argelia García por ser la mejor amiga que pude tener, comenzamos este camino al mismo tiempo y en la cúspide de este proyecto solo puedo pensar en la cantidad de veces que escuchaste mis problemas, me brindaste tu apoyo, todo lo que hemos pasado juntos es invaluable, fuiste de mis mayores apoyos en estos últimos años de mi vida.

Dedicatoria

A mis padres:

Gracias por ser un pilar inamovible en mi vida, no sé cuán lejos hubiera llegado sin su apoyo, en todo momento han apoyado mis propósitos personales, me han ayudado a crecer como científico y el hombre que soy hoy día se los debo a ustedes por completo. Jamás podré ni expresarles lo agradecido que estoy, ni pagarles todo lo que han hecho por mí, sin embargo, lo único que puedo hacer es cumplir estas metas y recordarles que este éxito no es mío... es nuestro, Los amo.

Índice

Abreviaturas	7
Índice de Figuras	9
Resumen	10
1. Introducción	11
1.1 Sulfasalazina	11
1.2 Absorción metabolismos y distribución	12
1.3 Sistema Xc-	13
1.4 Glutación	18
1.4 Biosíntesis de cisteína	20
1.5 GSH, xCT y neurotoxicidad	21
1.6 xCT como blanco farmacológico	23
2. Planteamiento del problema	25
3. Hipótesis	26
3.1 Objetivo general	26
3.2 Objetivos particulares	26
4. Material y Método	27
4.1 Animales	27
4.2. Diseño experimental	27
4.3 Medición de niveles de GSH	28
4.4 Extracción de proteínas	28
4.5 Ensayo de Western Blot	28
4.6 Análisis estadístico	30
5. Resultados y discusión	32
5.1 Niveles de GSH y GSSG	32
5.2 Marcadores de estrés oxidante	33
5.3 Suplementación de cisteína	36
5.4 Proteínas involucradas en la síntesis y el reciclamiento de GSH	37

6. Conclusiones	46
7. Referencias	47

Abreviaturas

SAS	Sulfasalazina
SNC	Sistema Nervioso Central
GSH	Glutati3n
Cys ₂	Cistina
Cys	Cisteína
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico
LAT1	Transportador de aminoácidos L
EAAC1	Acarreador de aminoácidos excitatorios
ATF4	Factor de transcripci3n activador 4
Nrf2	nuclear liberador eritroide 2
AARE	Elementos de respuesta a aminoácidos
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
NGF	Factor de crecimiento nervioso
Glu	Glutamato
AMPA	amino-3-hidroxi-5metil-isoazol-
NMDA	receptor a ácido N metil-D- aspártico
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatorios
GSSG	Glutati3n oxidado
GR	Glutati3n reductasa
γ-GCS	γ- Glutamilcisteína sintetasa
CBS	Cistationina β-sintasa
CSE	Enzima cistationina γ-ligasa
OPA	O-phthalaldehído
4HNN	4 hidroxinonenal
3NT	3 nitrotirosina
γ-GCS	Gamma glutamil cisteína sintetasa

GCSM	Gamma glutamil-cisteína sintetasa moduladora
BSO	Butionina sulfoxamida
H ₂ S	Sulfuro de hidrogeno
MRP1	Proteína de resistencia a multidrogas 1

Índice de figuras

Fig.1. Esquema del metabolismo de la sulfasalazina. _____	11
Fig. 2. Estructura de la subunidad funcional xCT _____	14
Fig. 3. Regulación de xCT por estrés oxidante _____	15
Fig.4. Locus del gen xCT _____	15
Fig.5. Modelo de síntesis y ciclo oxido-reducción del GSH _____	19
Fig.6. Modelo de transporte de cisteína (Cys) _____	22
Fig.7. Imagen en escala de grises de tinción con Ponceau _____	30
Fig. 8. Niveles de GSH _____	32
Fig.9. Niveles de GSSG _____	33
Fig.10. Cociente GSH/GSSG _____	34
Fig.11. Detección proteínas modificadas con 3 nitrotirosina _____	35
Fig.12. Detección de proteínas modificadas con 4 hidroxinonenal _____	35
Fig. 13 Nivel de expresión de xCT _____	36
Fig. 14 Nivel de expresión de EAAC1 _____	38
Fig. 15. Nivel de expresión de LAT1 _____	39
Fig.16. Nivel de expresión de CBS _____	40
Fig. 17. Nivel de expresión de GCSM _____	41
Fig. 18. Nivel de expresión de GR _____	42
Tabla 1. Especificaciones WB _____	31
Tabla 2. Resumen resultados _____	40

Resumen

La sulfasalazina (SAS) es un fármaco antiinflamatorio usado de manera crónica para la prevención de enfermedades crónico-degenerativas inflamatorias como la artritis o colitis ulcerosa crónica intestinal. A finales de los 90's se describió que la SAS también es un inhibidor del sistema Xc^- que es uno de los principales transportadores de cisteína (Cys) en mamíferos y es importante para la síntesis de glutatión (GSH). Sin embargo el sistema Xc^- no es la única vía por la cual la célula puede obtener cisteína, existen otros transportadores capaces de importar a cisteína a la célula, como el transportador exitatorio de aminoácidos 1 (EAAC 1 por sus siglas en ingles) que se expresa en neuronas y el Transportador de aminoácidos L 1(LAT1 por sus siglas en ingles) que se expresa en múltiples tipos celulares, así como la vía de la transulfuración por la cual se sintetiza Cys a partir de metionina. Esta suplementación de Cys es muy importante en sistema nervioso central (SNC) donde se consumen altos niveles de oxígeno. En este trabajo se evaluó el efecto de la administración semicrónica de SAS 80 mg/kg sobre la respuesta antioxidante en el SNC de ratones Balb-c. Después de la exposición a SAS por 28 días, utilizando el método fluorométrico del *o*-phthalaldehído (OPA) para medir los niveles de GSH y la técnica Western Blot para determinar el nivel de expresión de ciertas proteínas y biomarcadores se encontró un aumento en los niveles de GSH en la corteza y el cerebelo fundamentalmente, así como un aumento en la expresión de EAAC1, LAT1 y glutatión reductasa, acompañados de una disminución en los niveles del marcador de estrés oxidante 4-hidroxinonenal. Esto sugiere que la SAS produce una respuesta tipo antioxidante en corteza y cerebelo a través de la activación de las mencionadas vías alternativas de toma de Cys que serían importante identificar y describir.

1. Introducción

1.1. Sulfasalazina

La sulfasalazina (SAS) es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo desarrollado en los años 50 que pertenece a la familia de los salicilatos. Se ha descrito que inhibe al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (factor NFκB por sus siglas en inglés) (Wahl et al., 1998), la motilidad leucocitaria, así como las interleucinas 1 y 2. La vía de administración principal es la oral y en el intestino es metabolizado por azoreductasas bacterianas, a sulfapiridina y a ácido 5-aminosalicílico (5 ASA), lo que alarga su vida media hasta 6 h por esta vía (Fig. 1).

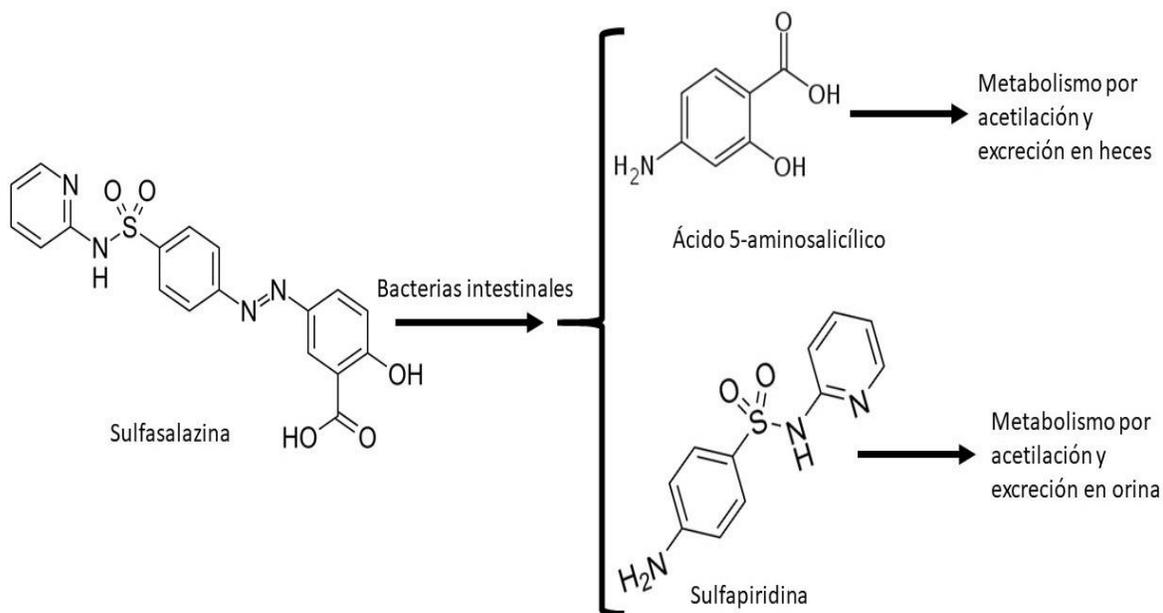


Fig.1. Esquema del metabolismo de la sulfasalazina por la vía de administración oral, la ruptura del enlace azo genera los metabolitos de sulfapiridina y ácido 5 aminosalicílico (5 ASA), sin embargo, este metabolismo procesa un 75% del total del fármaco. La mayoría de la sulfapiridina es rápidamente acetilada y excretada a través de la orina, mientras que el 5-ASA permanece más tiempo. También es sustrato de acetiltransferasas, pero es excretado a través de las heces.

La SAS es usada en México, Estados Unidos y Europa como tratamiento de inflamaciones crónicas como la colitis ulcerosa crónica intestinal, artritis y la enfermedad de Crohn, entre otras (Klotz, 1985). En México, el tratamiento convencional para las primeras etapas de padecimientos como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa crónica intestinal es el uso de amino salicilatos como el 5-ASA en dosis bajas (1g/día). Luego del diagnóstico, cuando se presenta un cuadro inflamatorio de leve a moderado se recomienda tratar al paciente con amino salicilatos orales o SAS a dosis de 4.5-6 g/día. La recaída es un problema común en los pacientes con colitis ulcerosa crónica intestinal, dando lugar a síntomas de moderados a severos, para prevenir esto se recomiendan dosis de SAS de 2-3 g/día (Yamamoto-Furusho et al., 2016).

1.2. Absorción, metabolismo y distribución

Como se mencionó antes, la SAS es metabolizada produciendo 5-ASA y sulfapiridina, por acción de bacterias intestinales que expresan enzimas con actividad de azoreductasa. Entre el 25% y 34% del fármaco metabolizado es absorbido en la parte superior del tracto intestinal. Después de 1 a 2 horas de la ingestión, tanto la molécula parental como los metabolitos se encuentran niveles detectables en sangre, que desaparecen aproximadamente a las 24 h (Das et al, 1979). Una vez roto el enlace entre la sulfapiridina y 5-ASA, la mayoría de las sulfamidas son metabolizadas a glucurónidos y derivados (Peppercorn & Goldman, 1973). La sulfapiridina se encuentra en sangre entre 4 y 5 h. después de la administración de SAS mientras que el ácido 5-ASA permanece más tiempo en el colon, sin embargo, solo una pequeña fracción es absorbida y eliminada a través de la orina, ambos compuestos son acetilados al ser metabolizados.

El elemento que se considera tiene actividad terapéutica es el 5-ASA, mientras que a la sulfapiridina se le atribuyen efectos tóxicos (Peppercorn, 1984). Esto es debatible, puesto que tras su administración coexisten tanto el compuesto original como sus dos metabolitos.

Se ha reportado que la SAS puede generar daño hepático y renal (Heidari et al., 2016), sin embargo, el mecanismo mediante el cual ocurriría aún no está claramente

descrito. Algunas investigaciones sugieren que está relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno (Nicholson et al., 2012; Linares et al., 2009) ya que se ha reportado aumento en marcadores de estrés oxidante (Linares et al., 2009) y un efecto protector cuando se suplementan antioxidantes o precursores de los mismos tales como la taurina (Heidari et al., 2016).

A finales de los años 90 se describió que la SAS tiene la capacidad de inhibir competitivamente el sistema de transporte de aminoácidos Xc^- específicamente la subunidad xCT (Gout et al. 2001). Este sistema tiene gran importancia en la respuesta antioxidante, al estar involucrado en el transporte de cisteína (Cys).

1.3. Sistema Xc^-

El sistema Xc^- es un transportador de aminoácidos que típicamente importa cistina (Cys_2) (dímero Cys) del medio y exporta glutamato (Sehm et al., 2016) en una relación 1:1 (Bridges et al., 2012 A).

Es un heterodímero compuesto por la subunidad 4F2hc de 529 aminoácidos y la subunidad xCT de 501 residuos de aminoácidos en humanos y 502 en ratones. La primera, cumple la función de acarrear y fijar a la subunidad xCT a la membrana, mientras que xCT tiene la actividad de transporte (Bridges et al., 2012 B). El transportador, cuenta con un total de 12 dominios transmembranales (Fig.2) con el amino y carboxilo terminal intracelular (Gasol et al., 2004), la región entre los dominios 2 y 3 parece participar en la unión con el sustrato o con la permeabilidad al mismo, la unión con 4F2hc es a partir de un enlace disulfuro con la segunda Cys^{158} del amino terminal (Sato et al., 1999).

Experimentos *in vitro* en los cuales se muta a este dímero han demostrado que la subunidad menor xCT es totalmente funcional en ausencia de la subunidad mayor, sin embargo, en Oocitos de *Xenopus* el intercambio glu-(Cys_2) solo es funcional con ambas subunidades, ya que si bien 4F2hc, no cumple una función en el intercambio de estos aminoácidos, es relevante para el tráfico de xCT hacia la membrana plasmática.

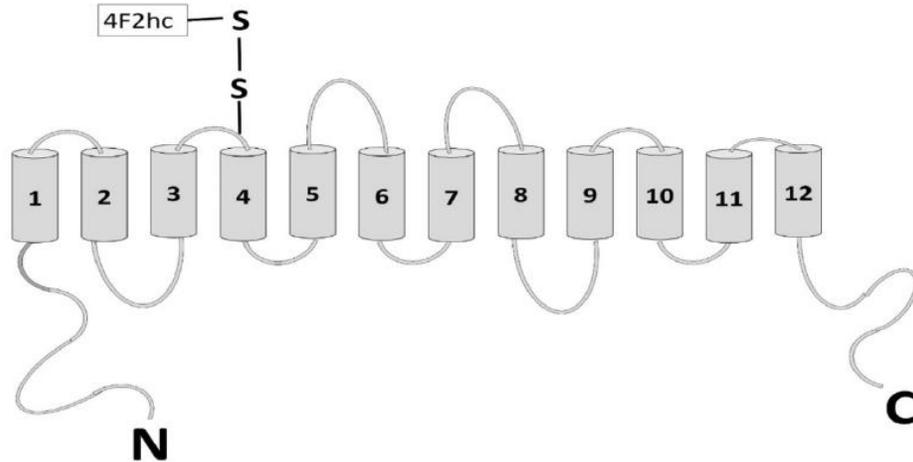


Fig. 2. Estructura de la subunidad funcional xCT que cuenta con 12 dominios transmembranales, con el amino y carboxilo terminal intracelularmente dispuestos, la Cys 158 haciendo un puente disulfuro con la subunidad 4F2hc. Gasol et al., 2004

Este transportador se expresa en una gran variedad de células fuera (hepatocitos, fibroblastos, macrófagos, etc.) y dentro del sistema nervioso central (SNC) (astrocitos, microglía, oligodendrocitos, células retinales de Müller, neuronas inmaduras corticales) (Bridges et al., 2012 A, Soria et al., 2016). Parece estar expresado de manera constitutiva principalmente en el SNC y sistema inmune, mientras que en órganos como riñón e hígado puede participar en la respuesta contra el daño oxidante (Conrad & Sato., 2012).

La expresión del sistema Xc- es modulada por la exposición a xenobióticos como el As inorgánico (Ramos-Chavez et al., 2015). En ratón, se ha descrito que en el promotor de xCT hay 2 sitios de unión al factor de transcripción activador 4 (ATF4 del inglés: Activating Transcription Factor 4) que inducen los elementos de respuesta a aminoácidos (AARE por sus siglas en inglés) ubicados a -64 y -90 pb, así como un sitio de unión al factor nuclear liberador eritroide 2 (Nrf2 por sus siglas en inglés) que induce los elementos de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en inglés) (Fig.3) ubicados a -113 pb, esto está conservado en humanos. Además, en humanos se ha descrito un sitio ARE interintrónico, después del segundo exón a +6,654 pb (fig.4) (Ye et al.,2014), así como un sitio para la unión a los sitios AARE (Patel et al., 2015).

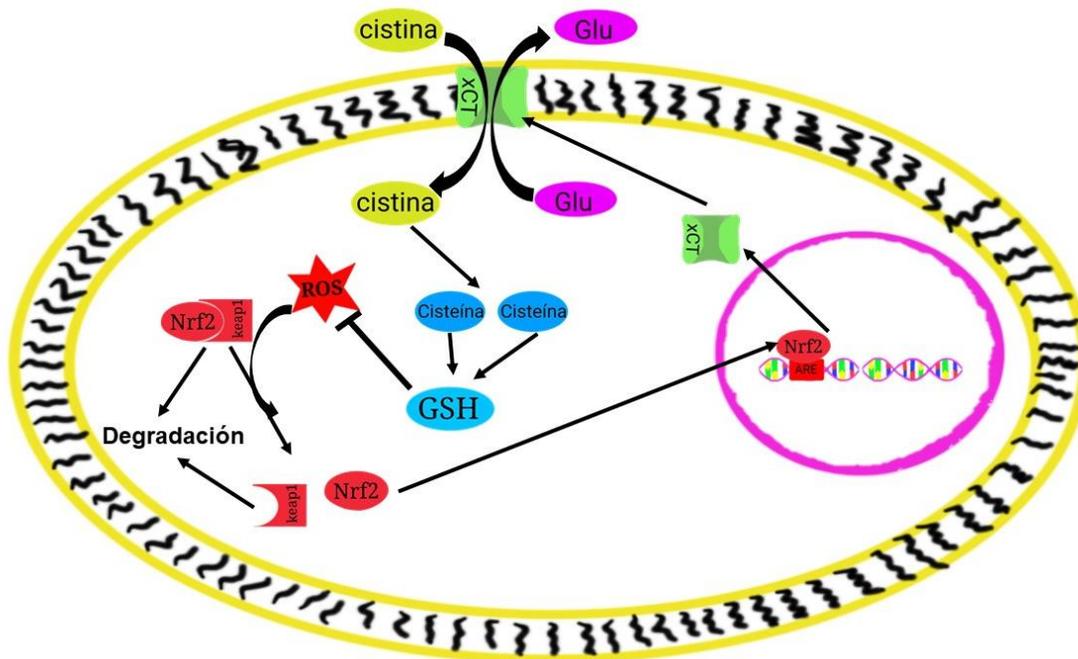


Fig. 3. Regulación de xCT por estrés oxidante. La proteína KEAP1 se une al factor de transcripción Nrf2- y promueve su ubiquitinización y su degradación proteosómica. En presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), la Cys 273 y Cys 288 se oxidan, esto genera un cambio conformacional de KEAP1 y libera Nrf2, una vez que Nrf2 está libre se transloca al núcleo y se une a los sitios ARE, induciendo así la síntesis de xCT (y de otros genes de la respuesta antioxidante). Ello hace que aumente el ingreso de Cys2 para la síntesis de GSH.

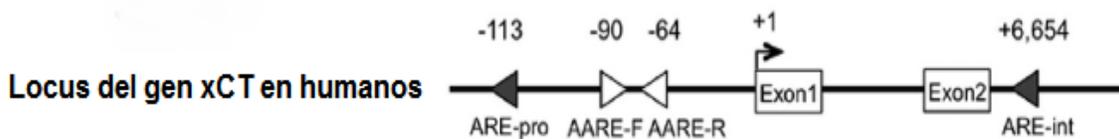


Fig.4. Locus del gen xCT, el cual cuenta con 2 sitios AARE ubicados en el promotor y 2 sitios de unión ARE ubicados uno en el promotor y el otro inter intrónico ubicado +6,654 pb que sirve para responder a estímulos de estrés oxidante y ausencia de aminoácidos.

Sin embargo, otros trabajos sugieren que el sistema Xc^- también responde a la ausencia de aminoácidos, al AMPc, a factores de transcripción y replicación como: Factor de iniciación de eucariontes 2, a NFkB y la proteína activadora 1 e incluso a factores de crecimiento como el factor de crecimiento nervioso (NGF del inglés nerver growth factor) (Valdovinos-Flores & Gonsebatt., 2013) o factor de crecimiento insulínico, pero muchas de estas vías no están bien descritas o conocidas (Patel et al., 2015).

Este transportador, cumple dos papeles importantes, por un lado, participa en la defensa antioxidante ya que el importe de Cys_2 y su posterior reducción a Cys, aumenta la biodisponibilidad de este aminoácido limitante en la síntesis de Glutación (GSH) (Lewerenz et al., 2012). Este péptido, es el principal antioxidante en el SNC (Dringen & Hirrliger, 2003). Acoplada a la importación de Cys_2 , xCT exporta una molécula de glutamato (Glu), que es el principal neurotransmisor excitatorio (Bridge et al., 2012 B), que participa en la plasticidad neuronal. La homeostasis glutamatérgica resulta relevante en el SNC ya que un aumento de los niveles extracelulares de Glu se ha asociado a excitotoxicidad, hiper o hipo excitabilidad, neurodegeneración, neuro inflamación y desmielinización (Pal, 2018), cabe resaltar que en el hipocampo el 90% de las sinapsis son glutamatérgicas.

Es por ello que el sistema Xc^- es considerado como una fuente importante de liberación no vesicular de Glu en el SNC.

Como se mencionó antes, el Glu es descrito como el principal neurotransmisor excitador, estando presente en más del 90% de las sinapsis en el SNC (Bridges et al., 2012 A), juega un papel importante en la plasticidad neuronal, el aprendizaje, la memoria y otros procesos cognitivos (Mehta et al., 2013). En los mamíferos el SNC tiene altas concentraciones de glutamato intracelular, en el rango de 1-2 milimoles, mientras que en el líquido extracelular se encuentra concentraciones en rango de 1-2 μM (Benveniste et al., 1984).

La señalización excitatoria por Glu requiere de la actividad coordinada de los astrocitos y las neuronas. Cuando el Glu es liberado en la terminal presináptica, las vesículas que lo contienen liberan de 3,000 a 10,000 moléculas de Glu por potencial de acción. Ello representa una concentración sináptica de 0.5 a 1 mM. En la membrana postsináptica se estimulan algunos receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato como el receptor a amino-3-hidroxi-5metil-isoazol- (AMPA), el receptor a ácido N metil-D- aspártico (NMDA) y los mGluR1, R2 y R3 respectivamente (Bridges et al., 2012 A; Nelson-Mora et al., 2018; Pal, 2018).

La recaptura del Glu liberado durante la transmisión sináptica es realizada principalmente por los astrocitos, aunque las neuronas también tienen una capacidad de recaptura, aunque en menor medida. Esta recaptura se debe principalmente a la acción de una familia de transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT) siendo EAAT 1 , EAAT2 y EAAT 3 (EAAC1) los más abundantes en el SNC (Sattler & Rothstein, 2006).

Cuando existe una liberación exagerada de Glu o una falla en su recaptura, la sobre-activación de los receptores AMPA, desbloquea a los receptores NMDA lo que permite una entrada masiva de Ca^{2+} a la neurona postsináptica (Bridges et al., 2012; Nelson-Mora et al., 2018; Pal, 2018; Sattler & Rothstein, 2006) que puede llevar la muerte neuronal conocida como excitotoxicidad. Este proceso está relacionado con varias enfermedades crónico-neurodegenerativas como por ejemplo en la enfermedad de Parkinson. En presencia del péptido Beta-amiloide, se ha observado la inducción de xCT, lo que provocaría un aumento en los niveles de Glu extracelular y excitotoxicidad.

El bloqueo de xCT reduce los niveles extracelulares de glutamato entre un 60 y 80%, lo que indica que un gran aporte del Glu extracelular es no vesicular (Baker et al., 2002), por esta misma razón se sugiere una relación entre las enfermedades anteriormente mencionadas y el sistema Xc- lo que convierte xCT en un blanco farmacológico importante.

1.4. Glutación

El GSH es un péptido que consta de 3 aminoácidos: L-glutamato-L-cisteína-L-glicina. Es el antioxidante no enzimático celular más abundante y participa además en el metabolismo de los xenobióticos. Se encuentra presente en las células de prácticamente todos los órganos y resulta esencial para la vida (Limón-Pacheco & Gonsebatt., 2009).

Existe en 2 formas: como tiol reducido (GSH) y como disulfuro-oxidado (GSSG). El GSH es la forma predominante y representa entre el 90-98% del GSH total mientras que el GSSG sólo se encuentra entre el 10-20%. (Limón-Pacheco & Gonsebatt., 2009).

La función principal del GSH (más no la única) es como antioxidante y en la desintoxicación de xenobióticos y/o sus metabolitos. Los compuestos electrofílicos forman conjugados con el GSH ya sea espontáneamente o a través de reacciones catalizadas por las GSH-S transferasas (Fig. 5). En los hepatocitos, estos metabolitos conjugados con GSH, son eliminados comúnmente a través de la bilis. El GSH se oxida a GSSG que puede ser reducido por la glutación reductasa (GR). El GSH es activamente exportado de las células por lo que el estrés oxidante severo agota las reservas de GSH si su síntesis no alcanza a compensar la disminución que sufre la poza celular.

La síntesis de GSH se da en el citosol a partir de los aminoácidos constituyentes y de dos pasos enzimáticos dependientes de ATP. El primer paso en la síntesis de GSH se considera el paso limitante en la velocidad de síntesis de GSH porque depende de la importación de Cys (Lu, 2009). Este paso se lleva a cabo por la enzima γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS) que forma un enlace tipo γ peptídico entre el Glu y la Cys, el segundo paso es por el glutación sintetasa que forma un enlace entre γ -glutamilcisteína y glicina formando así el GSH (Aoyama & Nakaki, 2013). El mantenimiento de los niveles de GSH en células de mamíferos es crítico para la desintoxicación de xenobióticos y la prevención de daño por estrés oxidante, especialmente relevante en el SNC que consume altos niveles de oxígeno,

posee una elevada cantidad de lípidos susceptibles de peroxidación y tiene una capacidad antioxidante limitada (Halliwell, 2006).

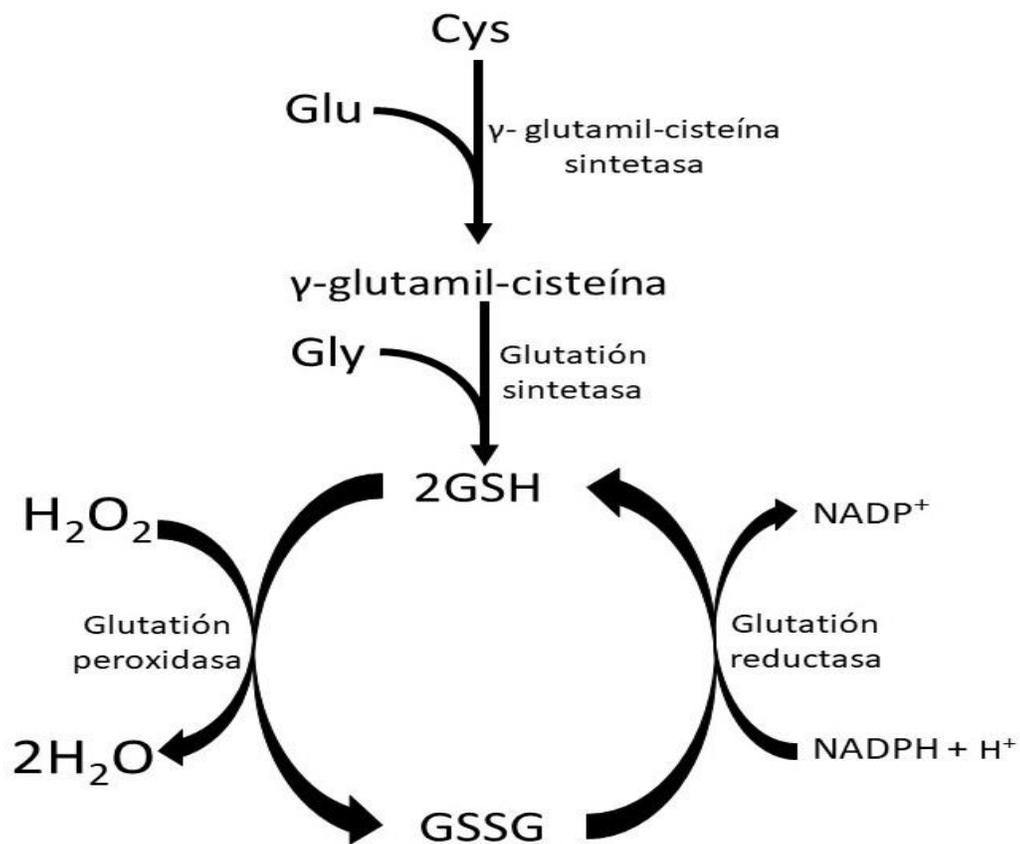


Fig.5. Modelo de síntesis y ciclo oxido-reducción del GSH, la síntesis se lleva a cabo por dos pasos enzimáticos dependientes de ATP, uniendo así los 3 aminoácidos glutamato (Glu), cisteína (Cys) y glicina (Gly). Puede catalizar la reducción de peróxidos a través de la enzima glutación peroxidasa formando glutación oxidado GSSG, el cual puede ser reducido por la enzima glutación reductasa utilizando el poder reductor de NADPH+.

La Cys es el aminoácido limitante para la síntesis de GSH, es constantemente importado al interior celular, ya que sus niveles son muy bajos o inexistentes. Usualmente se incorpora al organismo a través de la dieta o por la degradación de

proteínas. En el hígado y en otros tejidos existen rutas metabólicas asociadas a la síntesis de Cys, las cuales veremos posteriormente.

Uno de los sistemas más importantes para la importación de Cys es el sistema Xc⁻ del cual ya se describió anteriormente. Otro de los transportadores que participan en la importación de Cys es el sistema XAG también conocido como EAAT3 o EAAC1. Este transportador neuronal también transporta Glu y aspartato, sin embargo, algunos autores sugieren que tiene más relevancia en el transporte de Cys, que en la recaptura de Glu por su mayor afinidad por la Cys (Aoyama & Nakaki, 2015). Prueba de ello es que los ratones que carecen de EAAC1 presentan una disminución de GSH neuronal y muestran neurodegeneración de manera edad-dependiente, pérdida de dopamina y altos niveles de marcadores a daño oxidante (Paul et al., 2018).

El sistema L pertenece a la misma familia de transportadores que el sistema Xc⁻-SLC7. Consiste en una cadena ligera que le confiere la especificidad y una cadena pesada que ayuda al soporte con la membrana (Gasol. et al., 2001). Este sistema consiste en 2 subunidades funcionales: LAT1 y LAT2 las cuales se unen a la cadena pesada 4F2hc por un puente disulfuro.

La subunidad LAT2 no ha sido encontrado en la barrera hematoencefálica, ni en SNC, sin embargo, la subunidad LAT 1 se ha reportado en barrera hematoencefálica y en células endoteliales cerebrales. LAT1 transporta aminoácidos esenciales principalmente neutrales y pequeños tal como L-Leu, L-Val, L-Ile (Verrey, 2003), sin embargo, también puede tener de sustrato a L-Cys, la dirección neta del transporte depende indirectamente de los otros transportadores que estén co-expresados en la célula

1.5. Biosíntesis Cys

La Cys es considerado un aminoácido semi esencial, ya que puede ser obtenido de la dieta o través de una vía de síntesis endógena a partir de metionina, por la vía de la transulfuración inversa. En esta vía la metionina es metabolizada a S-adenosilmetionina, posteriormente a S-adenosilcisteína, y posteriormente a

homocisteína, una vez que se encuentra en esta forma se condensa con serina por acción de la enzima cistationina β -sintasa (CBS), para dar lugar a la cistationina, la cual es sustrato de la enzima cistationina γ -ligasa (CSE), que genera Cys. Esta enzima es la única conocida con la capacidad de biosintetizar Cys en mamíferos (Paul et al., 2018).

La CSE está altamente expresada en tejidos periféricos tales como el hígado o tracto intestinal (Gaull et al., 1972) sin embargo trabajos recientes sugieren que es una vía posible también en el SNC cumpliendo un papel neuro protector importante (Aoyama & Nakaki, 2013).

1.6. GSH, xCT y neurotoxicidad

EL GSH no atraviesa la barrera hematoencefálica y es sintetizado en el SNC por astrocitos y neuronas. Aquí la subunidad xCT cumple un papel importante para proveer a los astrocitos de la Cys necesaria para la síntesis de GSH. Resulta importante recordar que los astrocitos son las células más abundantes en el SNC que cumplen una serie de funciones claves de sostén para las neuronas, la barrera hematoencefálica y controlan el paso de oxígeno, metabolitos y nutrientes.

En el SNC los niveles de Cys₂ son relativamente bajos, pero los niveles de Cys₂ y GSH son mayores que en sangre, ya que se cree que una vez que pasa al SNC son utilizado para generar Cys, y la mayoría de este proceso parece ocurrir en astrocitos gracias a la presencia de xCT para transportar la Cys₂, donde una vez internalizada se reducirá a Cys (Aoyama & Nakaki, 2013).

Las neuronas contienen niveles inferiores de GSH con respecto a las células astrogliales (Cooper, 1997), por ello dependen importantemente de astrocitos para sintetizar GSH. Los astrocitos exportan GSH principalmente por la proteína de resistencia a múltiples drogas MRP1 (Hirrlinger et al., 2001; Hirrlinger et al., 2002) posteriormente es degradado por la enzima extracelular del astrocito γ -glutamyl transpeptidasa, y por la enzima neuronal aminopeptidasa, de manera que la neurona puede transportar Cys y Glu a través de EAAC1 (Johnson et al., 2012) como se observa en la Fig. 6.

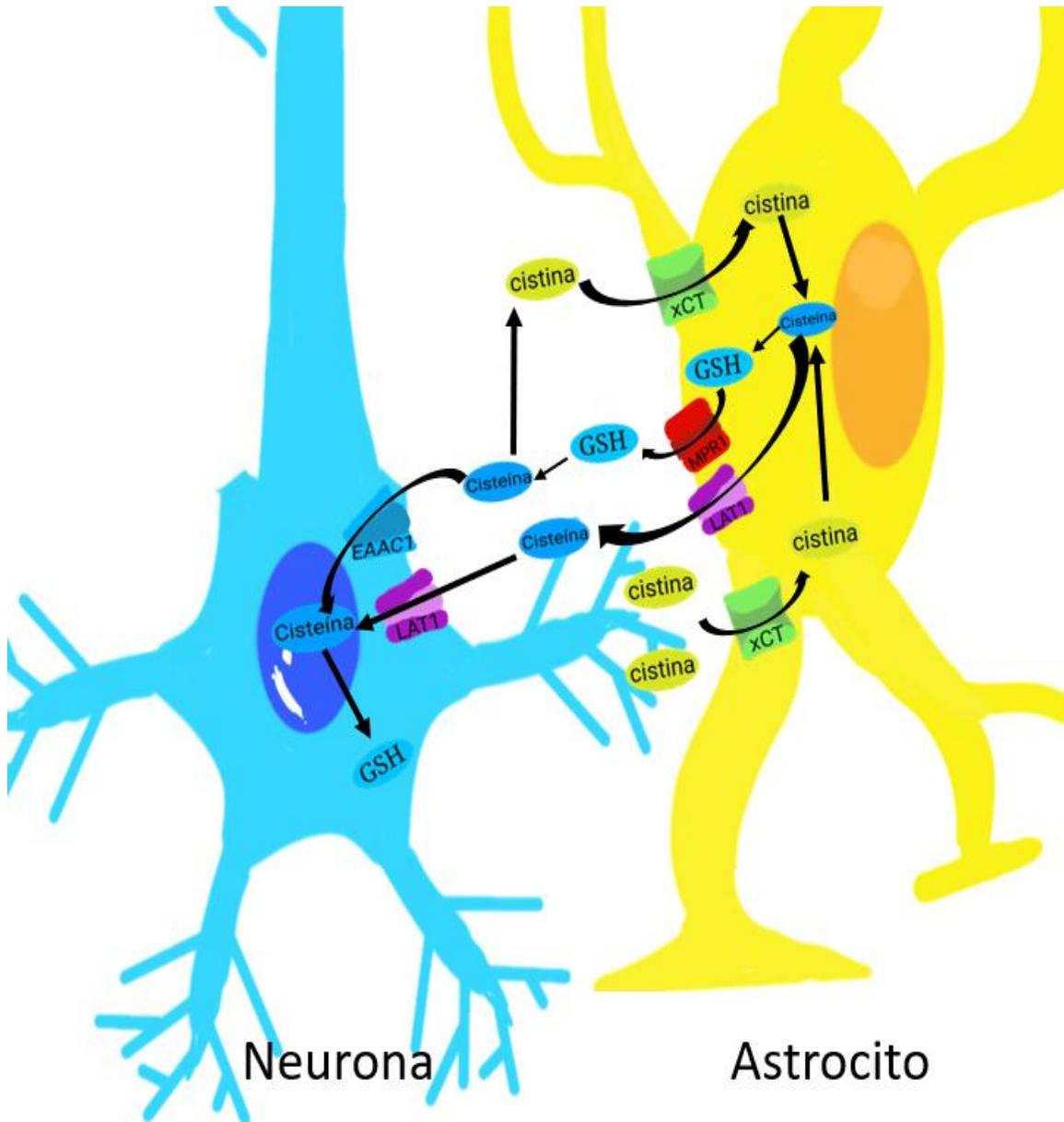


Fig.6. Modelo de transporte de cisteína (Cys) en el sistema nervioso central, así como la interacción de los astrocitos y las neuronas: La Cys es transportada por el sistema circulatorio, hasta llegar a la barrera hematoencefálica, donde es tomada por los astrocitos de 2 posibles maneras, como cistina (Cys₂) por el sistema Xc- o como L-Cys por LAT1. Una vez en el espacio intracelular la Cys₂ se reduce a Cys donde se usa de precursor para la síntesis de glutatión (GSH) o por el mismo LAT1 es exportado al medio extracelular, pero ya dentro del sistema nervioso central. El GSH puede ser exportado por las MRP1, y es degradado para liberar aminoácidos precursores disponibles para ser transportados a las neuronas a través de EAAC1 y sintetizar su propio GSH.

1.7. xCT como blanco farmacológico

Por las actividades que desempeña, xCT se considera un blanco farmacológico, ya que se piensa que la elevada respuesta antioxidante de algunos tumores se debe entre otros factores, a una elevada expresión de xCT (Habib et al., 2015; Sharma et al., 2010; Ungard et al., 2014). Esto podría explicar en parte la generación de resistencia a las terapias anticancerígenas, ya que se ha demostrado que inhibidores de xCT puede administrarse como un cotratamiento aumentando la efectividad de terapias con agentes como el cisplatino (Habib et al., 2015). El silenciamiento de xCT ya sea a nivel RNA o por fármacos puede inducir ferroptosis en ciertos tipos celulares tal como gliomas (Dixon et al., 2014; Sehm et al 2016), 2016). Actualmente se considera a la sobreexpresión de xCT como un predictor del pronóstico para varios tipos de cáncer como el colorrectal.

Por otro lado, la manipulación de xCT podría tener aplicaciones en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas a un elevado daño oxidante o excitotoxicidad de Glu, como Parkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple, depresión, entre otras (Patel et al., 2015).

xCT parece jugar un papel positivo en la respuesta antioxidante que ocurre cuando los organismos se exponen a agentes xenobióticos, como por ejemplo algunos plaguicidas o metales como el As (Kobayashi et al., 2012; Nelson-Mora et al., 2018). En este caso la sobre expresión de xCT se ha asociado con la síntesis de GSH que ocurriría para compensar el estrés oxidante generado por el agente o por el agotamiento de las pozas de GSH al reaccionar con el mismo xenobiótico. Esta sobre expresión puede incluso aumentar los niveles intracelulares de GSH.

Los ratones knockout para xCT presentan una disminución en los niveles de Glu extracelular lo que causa alteraciones en la memoria y coordinación espacial sin embargo no hay diferencia significativa en los niveles de GSH (De Bundel et al., 2011), sugiriendo que existen otros transportadores encargados de la importación de Cys. Por otro lado, la pérdida de xCT parece tener un efecto neuro protector contra la 6 hidroxidopamina al disminuir la liberación de Glu (Massie et al., 2011).

Ambos trabajos sugieren que en ausencia de xCT hay vías alternativas para el ingreso de Cys, sin embargo, se cree que la disminución en los niveles de Glu puede tener un efecto protector importante por la relación de xCT con algunas enfermedades neurodegenerativas (Lewerenz & Maher, 2009; Domercq et al., 2007). La ausencia o inhibición de xCT induce degeneración de mielina por toxicidad en los oligodendrocitos (Hamashima et al., 2017) debido a la importancia del sistema Xc^- en el SNC. En el sistema reproductivo, xCT es importante para el transporte de Cys al interior celular, que participa en el ultra empaquetamiento del DNA en el esperma. Se ha informado que SAS puede generar infertilidad, la cual es reversible con la remoción del fármaco (Alonso et al., 2009). Por otro lado, los efectos de SAS no han sido suficientemente estudiados en el SNC

2. Planteamiento del problema

La SAS es un fármaco que inhibe la actividad del transportador xCT y es utilizado en tratamientos crónicos. A nivel del SNC, los efectos de la inhibición de xCT son poco claros; algunos trabajos sugieren que puede generar neurotoxicidad asociada a la inhibición de la importación de Cys y por tanto de la síntesis de GSH, mientras que otros trabajos sugieren que la ausencia de xCT puede ser compensada por otras vías. Por lo cual, en este trabajo, se buscó investigar el efecto del consumo semi crónico de SAS en el sistema nervioso central.

3. Hipótesis

La inhibición de xCT por la SAS no afectará los niveles de GSH en distintas regiones del cerebro de ratón ya que modulará positivamente la expresión de EAAC1, LAT1 y xCT de Cys.

3.1. Objetivo general

cuantificar los niveles de GSH en distintas regiones del SNC del ratón después de un tratamiento semicrónico con sulfasalazina,

3.2. Objetivos particulares

Cuantificar la expresión de algunos transportadores de Cys: xCT, LAT1 y EAAC1, enzimas relacionadas con el metabolismo de GSH: γ -GCS y GR, y una enzima involucrada en la vía de la transulfuración: CBS.

Cuantificar la presencia de biomarcadores de estrés oxidante: 4 HNN y 3-NT

4. Método

4.1 Animales

Se utilizaron 20 ratones machos de la cepa Balb-c, de 5 semanas de edad, obtenidos y mantenidos en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAnhM. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de 12-12 h. de luz y oscuridad, respectivamente y estuvieron a 23-25 °C y humedad relativa del 50-60%. Los experimentos y tratamientos de los animales fueron realizados con base a las guías 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, UNAM.

4.2 Diseño experimental

Se montaron 2 tratamientos con 10 ratones cada uno, el primer tratamiento consistió una dosis diaria de SAS de 80 mg/kg, en amortiguador de fosfatos 1 M, pH=8.2. El segundo tratamiento consistió los controles a los cuales se les administro únicamente el vehículo. La vía de administración fue oral utilizando sonda intragástrica. La SAS se administró diariamente en un horario entre las 12:00 y 14:00 h durante 28 días. Transcurridos los 28 días se sacrificaron los ratones por dislocación cervical. Se extrajeron las siguientes regiones del cerebro: corteza, hipocampo, estriado y cerebelo. Para el GSH se utilizaron la mitad del cerebro de los 20 ratones, para la extracción de proteínas se utilizaron 10 mitades de cerebros 5 tratados y 5 controles, y las otras 10 mitades de cerebro se guardaron para otros experimentos no incluidos en esta tesis.

4.3 Medición de los niveles de GSH

La mitad del tejido de los 20 ratones se utilizó para medir los niveles de GSH, el homogenizado tisular y las mediciones se realizaron mediante la metodología del ensayo fluorométrico con *o*-phthalaldehído (OPA) (Senft et al., 2000) El ensayo fue adaptado a microplaca (Greiner high and medium binding 96 well plattes M4686-40EA Sigma-Aldrich). La fluorescencia se determinó con filtros de excitación de 365nm y emisión de 430 nm (Beckman Coulter, Fullerton CA, USA). Los niveles de GSH y GSSG se expresan en nmol/g de tejido, se usó como referencia una curva estándar de GSH y GSSG. El método de OPA, se basa en la formación de un derivado fluorescente, isoindol, para el caso del GSH. Para la determinación de GSSG en un primer paso se inhibe esta reacción y posteriormente el GSSG es reducido a GSH para la posterior derivación del isoindol con OPA.

4.4 Extracción de proteínas

La otra mitad de 10 cerebros se utilizó para el protocolo de extracción de proteínas de membranas en muestras pequeñas (Schindler et al., 2006). En breve a la extracción, el tejido fue homogenizado en 10 volúmenes de amortiguador de extracción BCL (HEPES 10 mM, NaCl 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, NaHCO₃ 35 mM EDTA, 5 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0.5 mM, PMSF 1 mM, y aprotinin y leupeptin 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 40 mM Tris-HCl, pH 9.5, 8 M urea y Triton X-100 4% (w/v). La concentración de proteína fue determinada usando Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, Meridian Rd, Rockford, EUA).

4.5 Ensayo de Western blot

Para determinar los cambios de expresión en las proteínas de interés, se empleó la técnica de Western blot. Las muestras se corrieron en una electroforesis vertical en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS). Se colocaron 35 µg de proteína en

geles de acrilamida la concentración varió dependiendo de la proteína, se usó una concentración de 6% de poliacrilamida para proteínas entre 100 y 300 kDa, una concentración de 10% de poliacrilamida para proteínas entre 40 y 150 kDa, mientras que de 15% de poliacrilamida para proteínas de 5 a 40 kDa. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad®). Las membranas se tiñeron con colorante de Ponceau, se retiró el exceso de Ponceau con agua y las proteínas teñidas se escanearon en escala de negros y grises para usar como control de carga.

Posteriormente, las membranas se bloquearon con BSA (Sigma) en una concentración al 5% preparada en TBS 1X (Tris pH 7.6, NaCl y Tween 20 [0.1 %]). Después se llevó a cabo la incubación con anticuerpo primario; Los tiempos de incubación y dilución varían entre cada proteína véase Tabla 1, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween. A continuación, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Cell Signaling Technology) diluido también en solución de bloqueo en una concentración de 1:2000. Al terminar la incubación, las membranas se sometieron a 3 lavados de 15 min con TBS-Tween y 1 lavado de 15 min con TBS.

Las proteínas se detectaron a través de una reacción quimioluminiscente en la que se empleó el estuche Amersham™ ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit (GE Life Sciences, RPN2232) empleando placas fotográficas Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Life Sciences, 28-9068-40) o el software Image Studio acoplado al detector de luminiscencia Li-cor.

Posteriormente se realizaron densitometrías utilizando el programa Image J, para llevar a cabo la densitometría del barrido de proteínas con Ponceau, se buscaba la mejor imagen cambiando el brillo y el contraste. Posteriormente los carriles se señalaban tomando lo más completos posibles a lo alto, pero el ancho total de la banda cabe mencionar que todas debían tomarse con el mismo tamaño como se observa en la Fig 7., los valores obtenidos se usaron para normalizar las proteínas blanco.

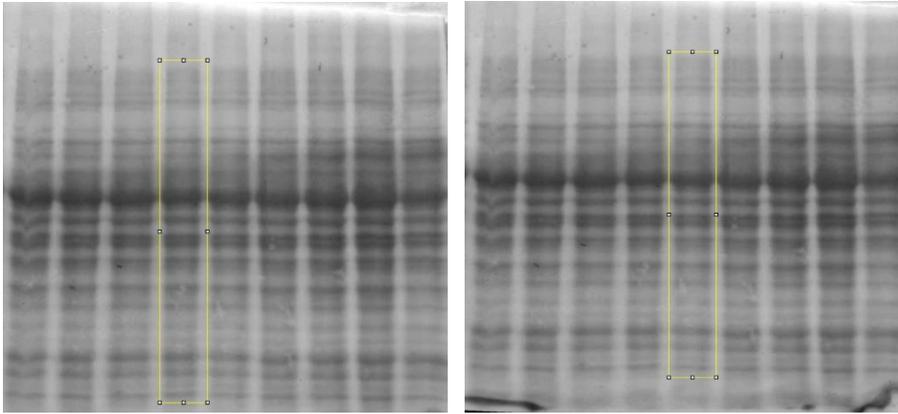


Fig.7. Imagen en escala de grises de tinción con Ponceau, en el panel izquierdo se ejemplifica con un cuadro amarillo la manera en la que se toma la mayor parte de un carril para hacer una densitometría, en el panel de la derecha se usa la misma medida del cuadro del panel anterior para medir siguiente carril y hacer la densitometría usando el programa ImageJ.

4.6 Análisis estadístico

Para comparar los efectos del tratamiento con SAS se hicieron diferentes pruebas estadísticas. A todos los datos en este trabajo se les determinó normalidad usando el test de normalidad de D'Agostino & Pearson ómnibus y el test de normalidad de Shapiro-Wilk. Los únicos datos que mostraron normalidad fueron los datos de GSH.

Para el GSH se usó una prueba de “t” de Student entre los datos obtenidos en los organismos controles vs los tratados para cada región. Una $p \leq 0.05$ se consideró como significativa en todos los casos. Para el GSSG, GSH/GSSG y los western blot se utilizó una prueba de Mann-Whitney entre los datos obtenidos en los organismos controles vs los tratados para cada región. Una $p \leq 0.05$ se consideró como significativa en todos los casos. Los resultados se presentan como medias \pm desviación estándar

Tabla 1. Especificaciones de peso de la proteína, % de acrilamida para gel, anticuerpo, dilución, incubación, de los diferentes ensayos de WB.

Proteína	Peso kDa	% gel	Anticuerpo	Dilución	Tiempo de incubación
xCT	37	10	Abcam 37185	1:2000	36 h a 4°C
Acarreador de aminoácidos excitatorios (EAAC1)	62	10	Abcam 124802	1:2000	36 h a 4°C
Transportador de aminoácidos L 1 (LAT1)	40	10	Santa cruz biotechnology 374232	1:1000	12 h a 4°C
4 hidroxinonenal (4-HNN)	80,100 y 60	10	Abcam 46545	1:2000	36 h a 4°C
3 nitrotirosina (3-NT)	Todas las proteínas	10	Milipore 06-284	1:2000	2 h Temperatura ambiente
cistationina β -sintasa (CBS)	60	10	Abcam 135626	1:1000	12 h a 4°C
Gamma glutamil-cisteína sintetasa moduladora (GCSM)	28	15	Santa cruz biotechnology 22754	1:1000	12 h a 4°C
Glutación reductasa (GR)	55	10	Thermo Fisher LF-PA 0056	1:2000	1 noche a 4°C

5.0 Resultados y Discusión

5.1. Niveles de GSH y GSSG

Uno de los principales importadores de Cys para la síntesis de GSH, es el sistema Xc- (xCT-4f2hc), por lo cual una manera de evaluar la inhibición de xCT, es a través de la medición de los niveles de GSH.

Tras 28 días de tratamiento con 80 mg/kg de SAS, el GSH se moduló positivamente en las diferentes regiones del cerebro aquí estudiadas, con excepción del estriado (Fig. 8). Estos resultados son inesperados debido a que en trabajos previos una dosis de 200mg/kg de SAS por 1 día disminuyó de manera significativa el GSH en la corteza y el hipocampo (Castillo-Pérez 2018), por lo cual se esperaba que no se modulara o que disminuyeran los niveles de GSH.

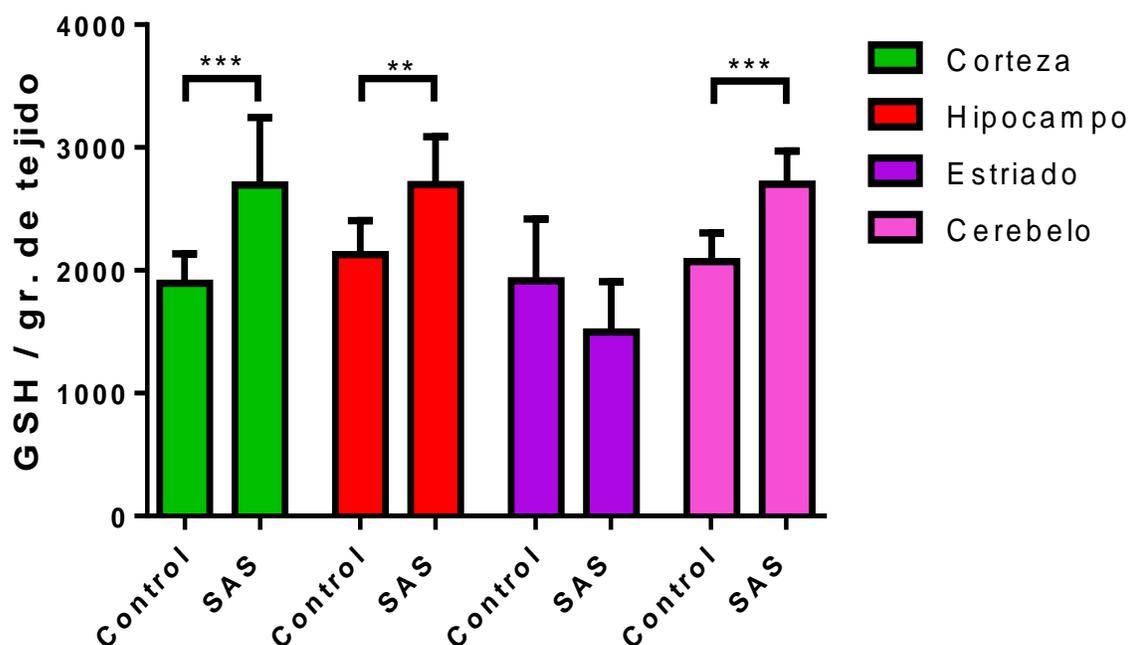


Fig. 8. Niveles de GSH detectados por reacción con o-phthalaldehído en las diferentes regiones del cerebro, corteza (verde), hipocampo (rojo), estriado (morado) y Cerebelo (Rosa), t de Student **= $p \leq 0.01$, ***= $p \leq 0.001$. (n=10)

Adicionalmente se midieron los niveles de GSSG; a diferencia del GSH, el GSSG solo presentó un aumento significativo en el hipocampo (Fig. 9), sin embargo, los valores encontrados en los animales tratados con SAS son similares a los usualmente informados en la literatura.

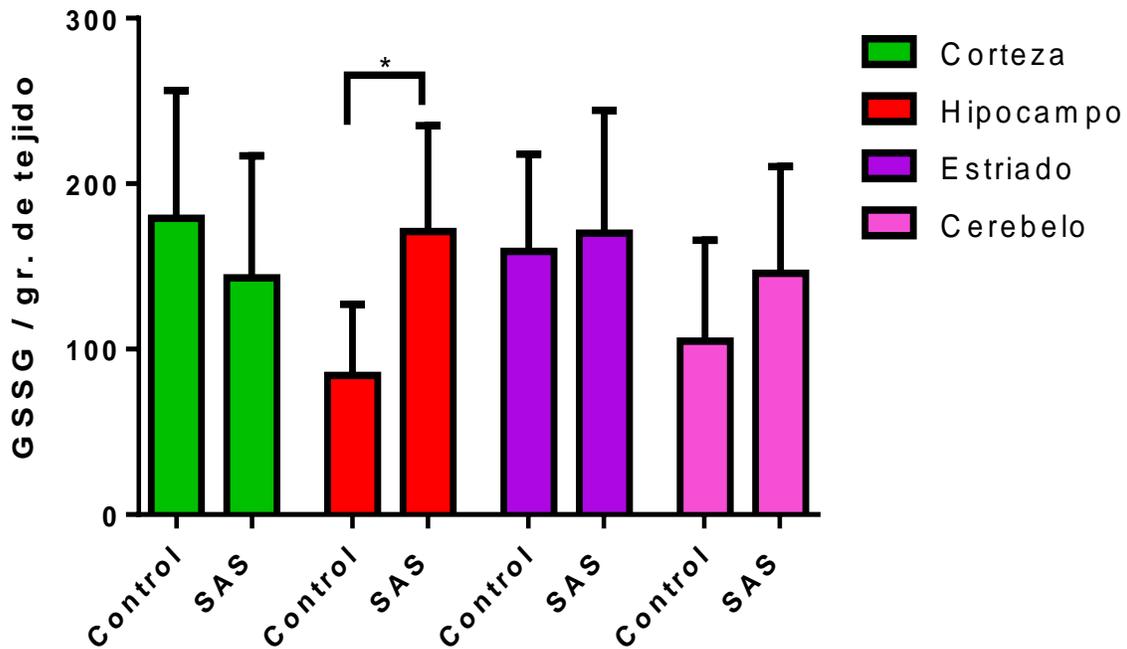


Fig.9. Niveles de GSSG detectados por reacción con o-phthalaldehído en las diferentes regiones del cerebro, corteza (verde), hipocampo (rojo), estriado (morado) y Cerebelo (Rosa), Mann-Whitney * = $p \leq 0.05$. (n=5).

5.2. Marcadores de estrés oxidante

Los niveles de GSH y GSSG pueden servir como un marcador del estado redox de la célula. No obstante, el cociente GSH/GSSG constituye un marcador más acertado sobre las de alteraciones en el estado redox, el cual de manera basal es aproximadamente de 10 en cerebro (Giustarini et al., 2009). Interesantemente, pese a haber encontrado alteraciones en el nivel de GSH en varias regiones, el cociente GSH/GSSG solo se encontró aumentado en la corteza (Fig.10). Un aumento en este índice sugiere un ambiente reductor.

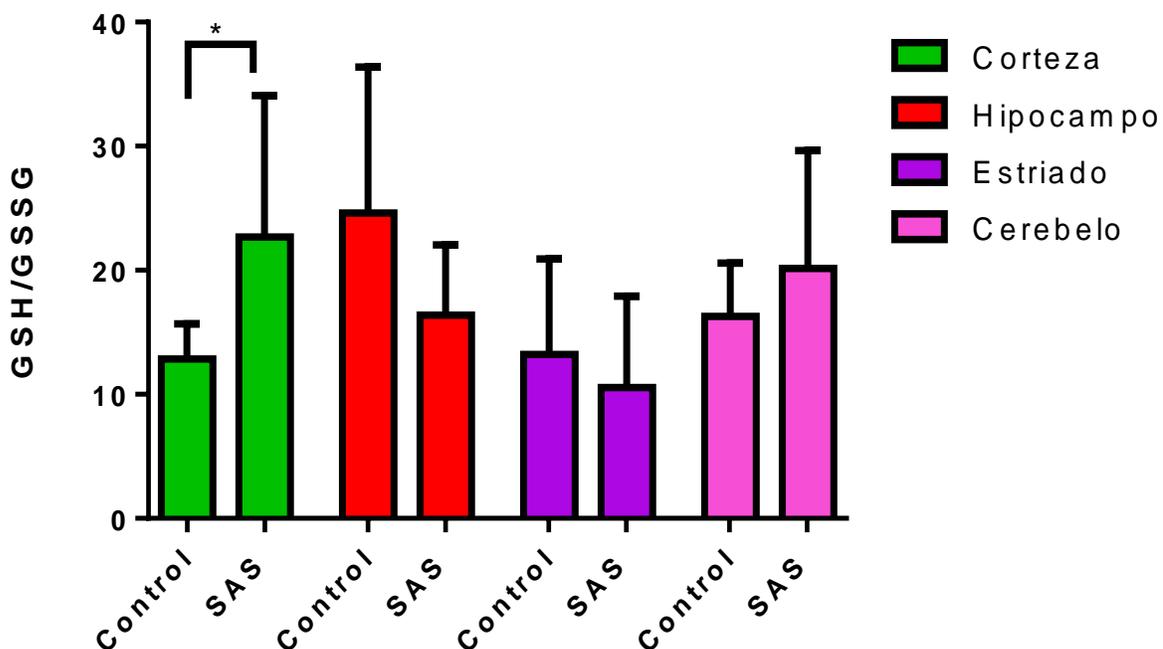


Fig.10. Cociente GSH/GSSG en las diferentes regiones del cerebro, corteza (verde), hipocampo (rojo), estriado (morado) y Cerebelo (Rosa), Mann-Whitney * = $p \leq 0.05$. (n=5).

Otros marcadores de daño oxidante empleados ampliamente en la literatura son los niveles de 3 nitrotirosina (3NT) y de 4 hidroxinonenal (4HNN). Cuando el óxido nítrico incrementa puede dar lugar a especies reactivas de nitrógeno tal como el peroxinitrito (Byun et al., 1999) La nitrosilación de tirosina es una reacción del aminoácido tirosina con ONOO^- que puede afectar la estructura y función de las proteínas (Shahani & Sawa, 2012) Cuando estas especies reaccionan con los grupos tioles de los residuos de Cys de las proteínas, se le conoce como S-nitrosilación (Bharath & Andersen, 2005). En nuestras muestras, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las regiones evaluadas (Fig. 11). El 4HNN es producto de la peroxidación lipídica, el cual puede reaccionar y conjugarse con proteínas (Dalleau et al., 2013).

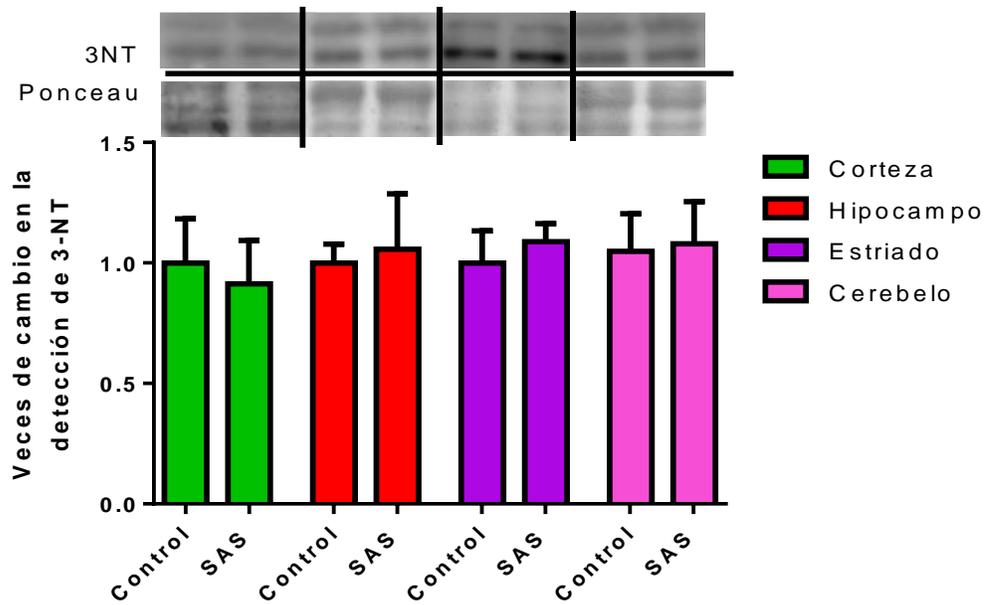


Fig.11. Detección proteínas modificadas con 3 nitrotirosina, se analizó el barrido de proteínas modificadas, de manera similar al Ponceau, medición normalizada con Ponceau en las diferentes regiones del cerebro, corteza (verde), hipocampo (rojo), estriado (morado) y Cerebelo (Rosa) Mann-Whitney (n=5)

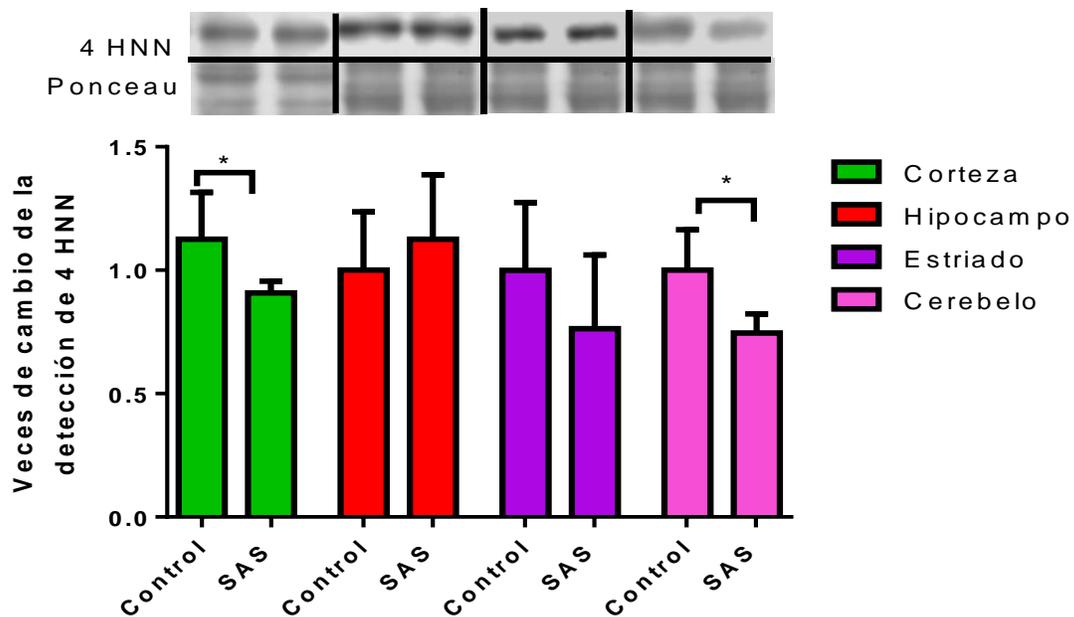


Fig.12. Detección de proteínas modificadas con 4 hidroxinonenal normalizado con Ponceau en las diferentes regiones del cerebro, corteza (verde), hipocampo (rojo), estriado (morado) y Cerebelo (Rosa), Mann-Whitney * = $p \leq 0.05$. (n=5)

Este marcador es consistente con los resultados observados en los niveles de GSH, ya que se encontró una disminución significativa en la corteza y el cerebelo (Fig. 12), siendo estas dos regiones las que mostraron un aumento en los niveles de GSH, sin alteración en los niveles de GSSG.

5.3. Suplementación de cisteína

El factor limitante en la síntesis de GSH es la Cys. Debido a que el tratamiento con SAS aumentó los niveles de GSH en corteza, hipocampo y cerebelo, decidimos evaluar si se estuvieran activando vías alternativas de captura de Cys y que pudieran contribuir al aumento en los niveles de GSH a través de la síntesis *de novo*.

Primero, evaluamos la expresión de xCT, con la intención de describir si había algún tipo de respuesta compensatoria a la inhibición de xCT, debido a que su expresión proteica puede ser modulada positivamente al aumentar la demanda de aminoácidos o a la presencia de estrés oxidante (Wang et al., 2016). Sin embargo, no encontramos cambios en la expresión del transportador en ninguna de las regiones estudiadas (Fig. 13) Posteriormente medimos los niveles de expresión de EAAC1 y LAT1 que son los principales transportadores involucrados en la captura de Cys en su forma reducida.

La expresión de EAAC1 se moduló positivamente, en corteza y cerebelo en los animales expuestos a SAS (Fig. 14). Por otro lado, LAT1 también se moduló positivamente, aunque este cambio en la expresión solo se encontró en cerebelo (Fig. 15). El hipocampo y el estriado no mostraron modulación en los niveles de expresión de estos transportadores.

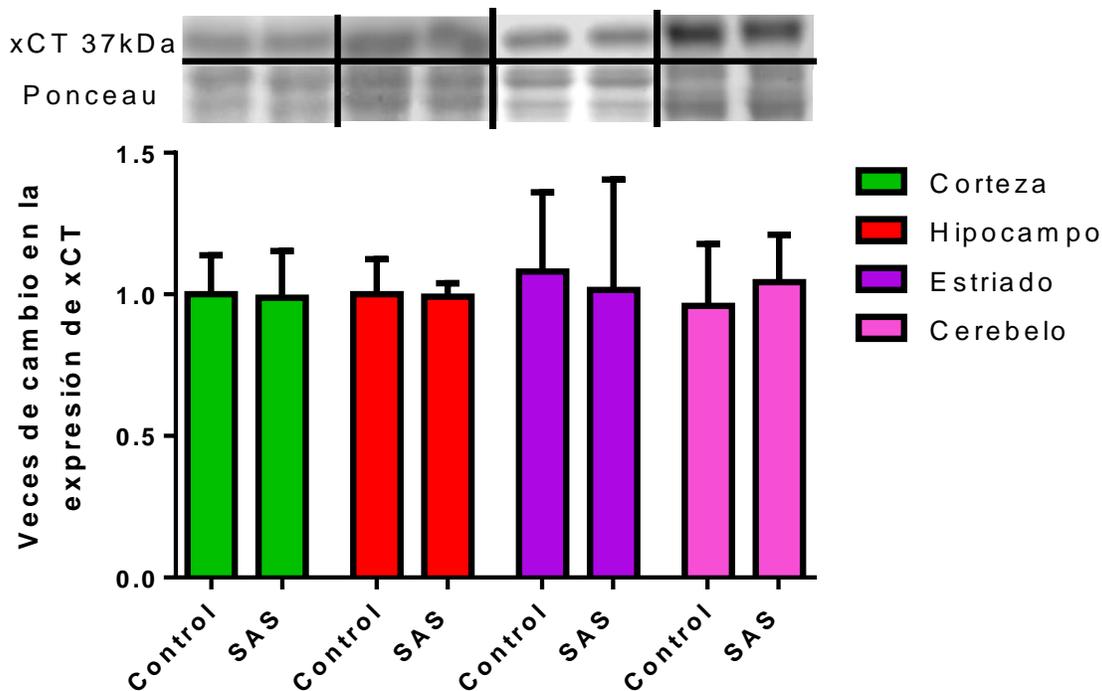


Fig. 13 Nivel de expresión de xCT normalizada con Ponceau en las diferentes regiones del cerebro, corteza (verde), hipocampo (rojo), estriado (morado) y Cerebelo (Rosa), Mann-Whitney

LAT1 está involucrado en el transporte tanto de Cys como de metionina. En órganos como el hígado la vía de la transulfuración (conversión de metionina a Cys), está relacionada con la síntesis de GSH, en los últimos años la vía de la transulfuración ha ganado importancia en el cerebro. Por ello evaluamos los niveles de expresión de la CBS, una de las proteínas involucradas en esta vía (McBean, 2017). No encontramos diferencia significativa en los niveles de expresión (Fig. 16), no obstante, se ha descrito que la actividad de la transulfuración no necesariamente se modula por niveles de proteína, si no por su actividad, por lo cual sería interesante hacer un ensayo de actividad de la CBS.

5.4. Proteínas involucradas en la síntesis y el reciclamiento de GSH

Posteriormente evaluamos si la síntesis de *novo* de GSH se encontraba afectada por el tratamiento con SAS. Para ello, medimos la expresión γ -GCS, enzima encargada de la unión de cisteína-glicina durante la síntesis de GSH. Esta proteína

está conformada por 2 subunidades siendo la glutamil-cisteina sintetasa moduladora (GCSM) la subunidad que generalmente cambia sus niveles de expresión. En este caso, no se encontró un aumento significativo de la expresión de GCSM (Fig. 17).

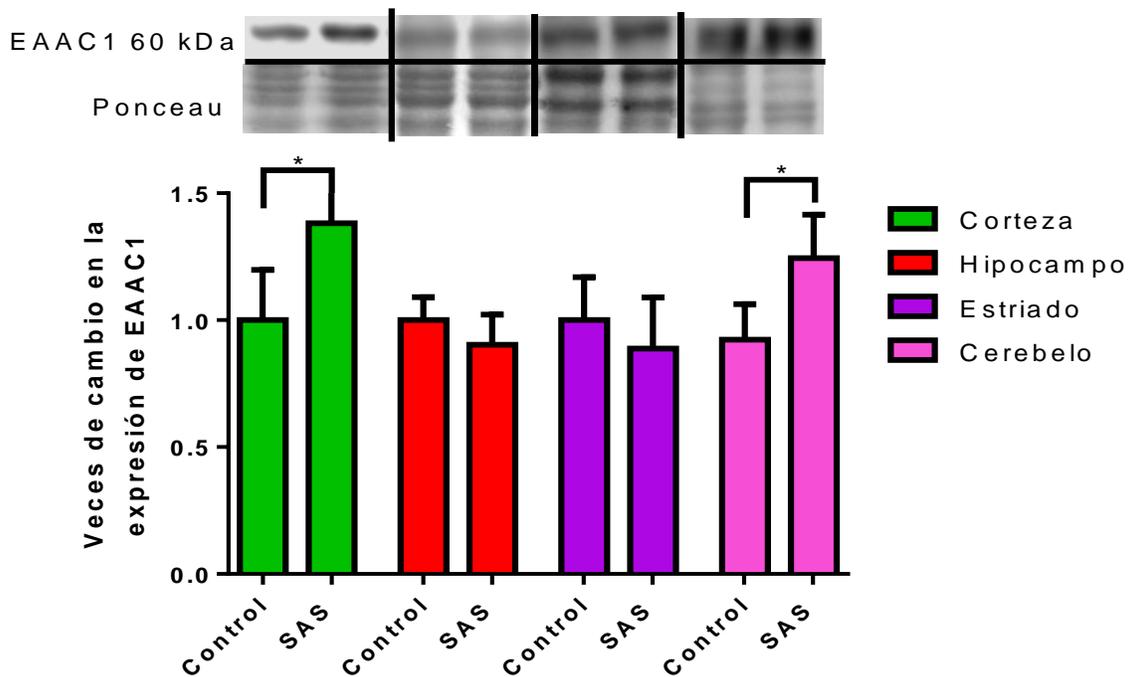


Fig. 14 Nivel de expresión del acarreador de aminoácidos excitatorios 1 (EAAAC1) normalizada con Ponceau en las diferentes regiones del cerebro, corteza (verde), hipocampo (rojo), estriado (morado) y Cerebelo (Rosa), Mann-Whitney * = $p \leq 0.05$. (n=5).

Por otro lado, también nos interesaba analizar si por el tratamiento estaba afectado el reciclamiento del GSSG a GSH, por ello se midieron los niveles de la GR, se observó un aumento estadísticamente significativo en la corteza y el cerebelo (Fig. 18) que hasta el momento parecen ser las 2 regiones que reaccionaron de manera más clara al tratamiento semicrónico de SAS.

El tratamiento oral por un mes con SAS no disminuyó los niveles de GSH ni su síntesis en corteza, hipocampo, estriado y cerebelo de ratón. Por el contrario, los niveles de GSH el cociente GSH/GSSG y el 4-HNN sugiere un aumento no solo en los niveles de GSH, sino una respuesta antioxidante general del SNC. En línea con estos resultados en estudios previos observé que la administración de SAS genera estrés oxidante a las 24 h del inicio de su administración (Castillo-Pérez 2018). La corteza fue la región que respondió positivamente en la mayoría de los marcadores estudiados, mostrando el aumento en los niveles de GSH y el cociente GSH/GSSG, y una disminución en el nivel de 4-HNN. En cerebelo los resultados fueron similares, con la diferencia de que el cociente GSH/GSSG no se afectó. El hipocampo únicamente mostró un aumento los niveles el GSH. El estriado no se afectó por el tratamiento con SAS, o por lo menos en los parámetros aquí estudiados. En la tabla 2 se resumen todos los hallazgos de este trabajo

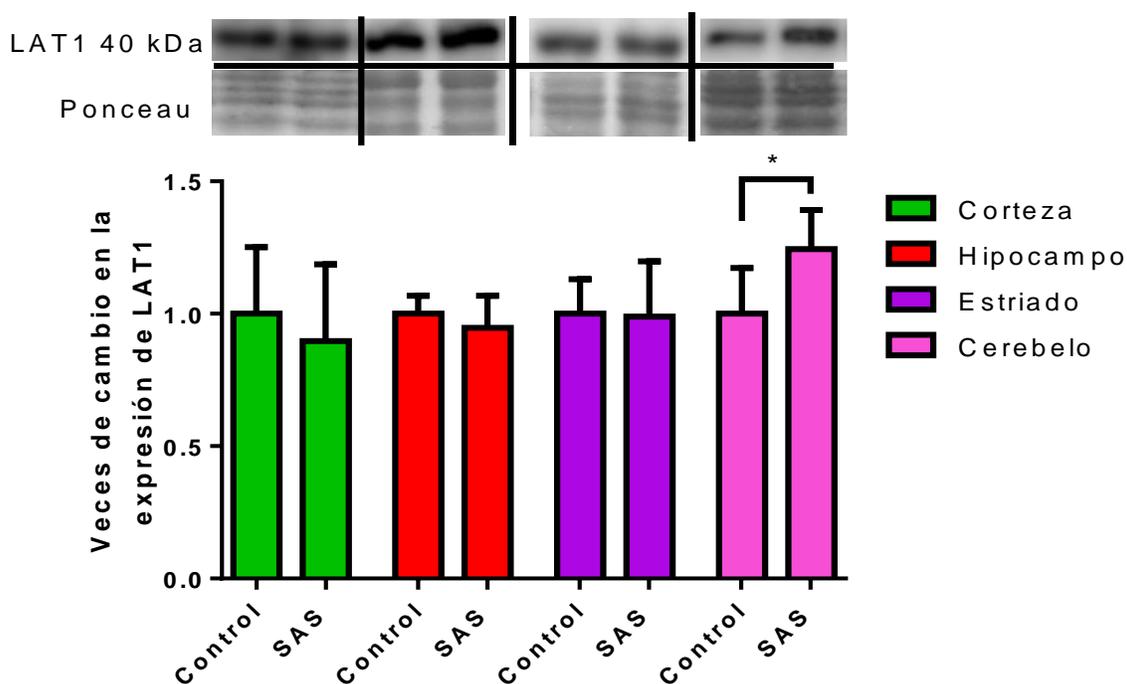


Fig. 15. Nivel de expresión del transportador de aminoácidos L 1 (LAT1) normalizada con Ponceau en las diferentes regiones del cerebro, corteza (verde), hipocampo (rojo), estriado (morado) y Cerebelo (Rosa), Mann-Whitney * = $p \leq 0.05$. (n=5).

Tabla 2 Resumen de los resultados en este trabajo:

Región	GSH	GSSG	GSH/GSSG	3NT	4HN	xCT	EAACI	LAT1	CBS	GCSM	GSR
Corteza	↑	—	↑	—	↓	—	↑	—	—	—	↑
Hipocampo	↑	↑	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Estriado	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cerebelo	↑	—	—	—	↓	—	↑	↑	—	—	↑

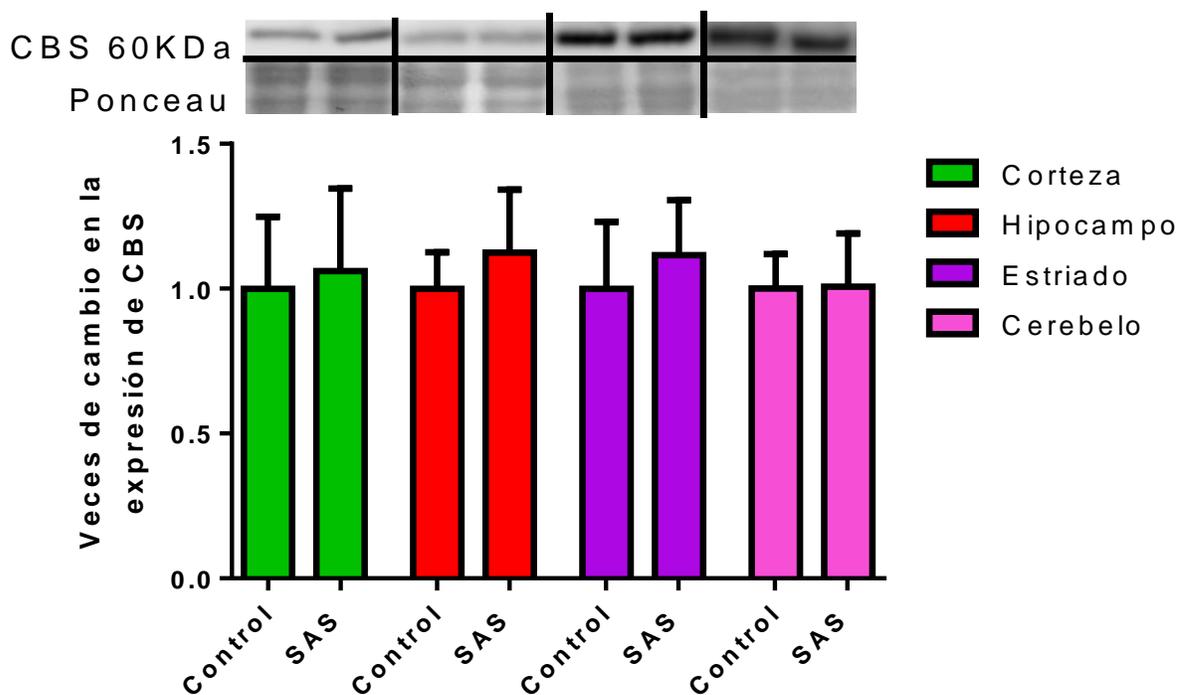


Fig.16. Nivel de expresión Cistationina β -sintasa (CBS) normalizado con Ponceau en las diferentes regiones del cerebro, corteza (verde), hipocampo (rojo), estriado (morado) y Cerebelo (Rosa), Mann-Whitney.

Un aumento de la respuesta antioxidante en el SNC puede ser en consecuencia de estrés oxidante sistémico previo. Como se ha descrito previamente, en trabajos con butionina sulfoxamida (BSO), acetaminofén o arsénico. En estos trabajos, se observa un aumento en la respuesta antioxidante en algunas regiones del cerebro tales como corteza, hipocampo y cerebelo (Garza-Lombo et al., 2018; Ramos-Chavez et al., 2015; Wang et al., 2016). Las regiones en las que se han observado

una respuesta antioxidante son consistentes con las descritas en este trabajo, siendo también consistente que el estriado es una región donde no se ha descrito una respuesta a los tratamientos que generan estos efectos.

Este daño sistémico se ha descrito y asociado principalmente al hígado, específicamente a los niveles de GSH, por lo cual se ha postulado una vía de señalización basada en la liberación del NGF en condiciones de bajos niveles de GSH. Este NGF puede viajar por sistema circulatorio hasta llegar a SNC y reaccionar con la cinasa receptora de tripomiosina A y promover una respuesta antioxidante (Valdovinos-Flores & Gonsebatt., 2013).

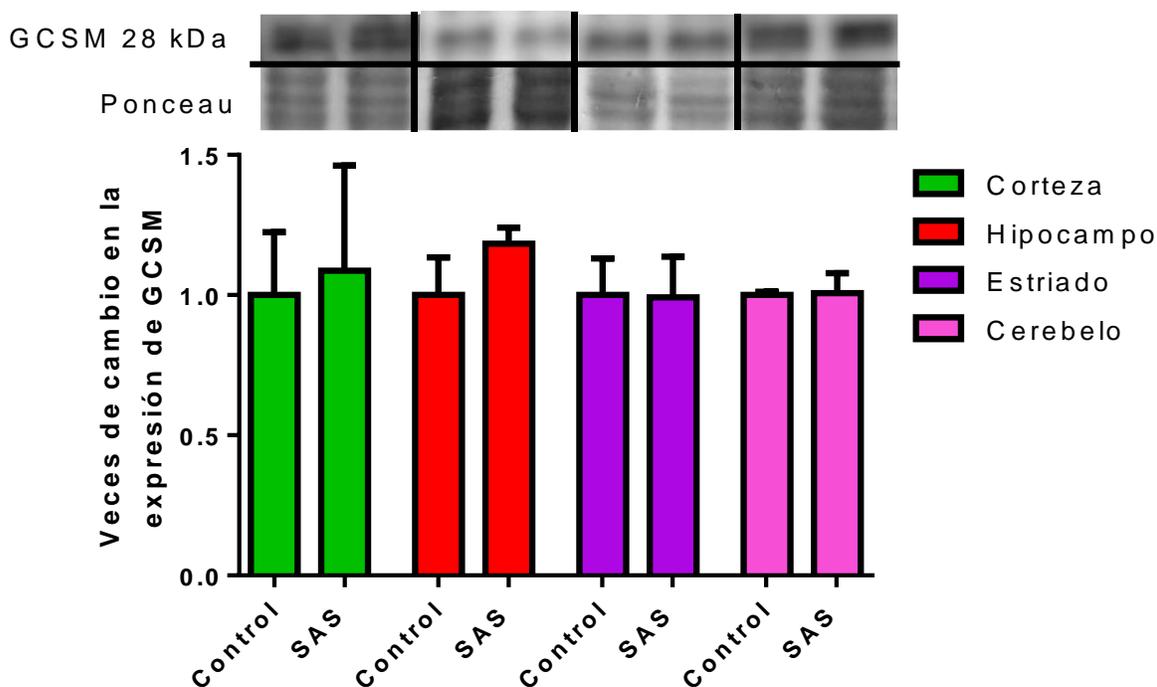


Fig. 17. Nivel de expresión de la γ -glutamyl-cisteína sintetasa moduladora (GCSM) normalizado con Ponceau en las diferentes regiones del cerebro, corteza (verde), hipocampo (rojo), estriado (morado) y Cerebelo (Rosa), Mann-Whitney.

En este trabajo no exploramos el efecto de la SAS en órganos periféricos debido a que ya está descrito que dosis altas (400-600 mg/kg) agudas o crónicas generan daño hepático y renal asociado principalmente a estrés oxidante (Alonso et al.,

2009; Heidari, 2016; Linares et al., 2011; Niknahad et al., 2017), por lo cual, pese a no haber medido los niveles de GSH o marcadores de estrés oxidante en el hígado, basándonos en la literatura podemos sugerir que la vía de NGF/TrkA puede estar relacionada con los hallazgos de este trabajo.

El funcionamiento y la expresión de los transportadores aún está sujeto a debate, de manera general se considera que solo los astrocitos expresan xCT (Albretch et al 2010.), mientras que las neuronas solo expresan EAAC1 (Bianchi et al 2014), sin embargo, hay trabajos tanto *in vitro* como *in vivo* que muestran que, en ciertas condiciones oligodendrocitos, astrocitos y neuronas pueden expresar los transportadores por igual (Soria et al., 2016; Shanker et al 2001; Yang et al., 2018),

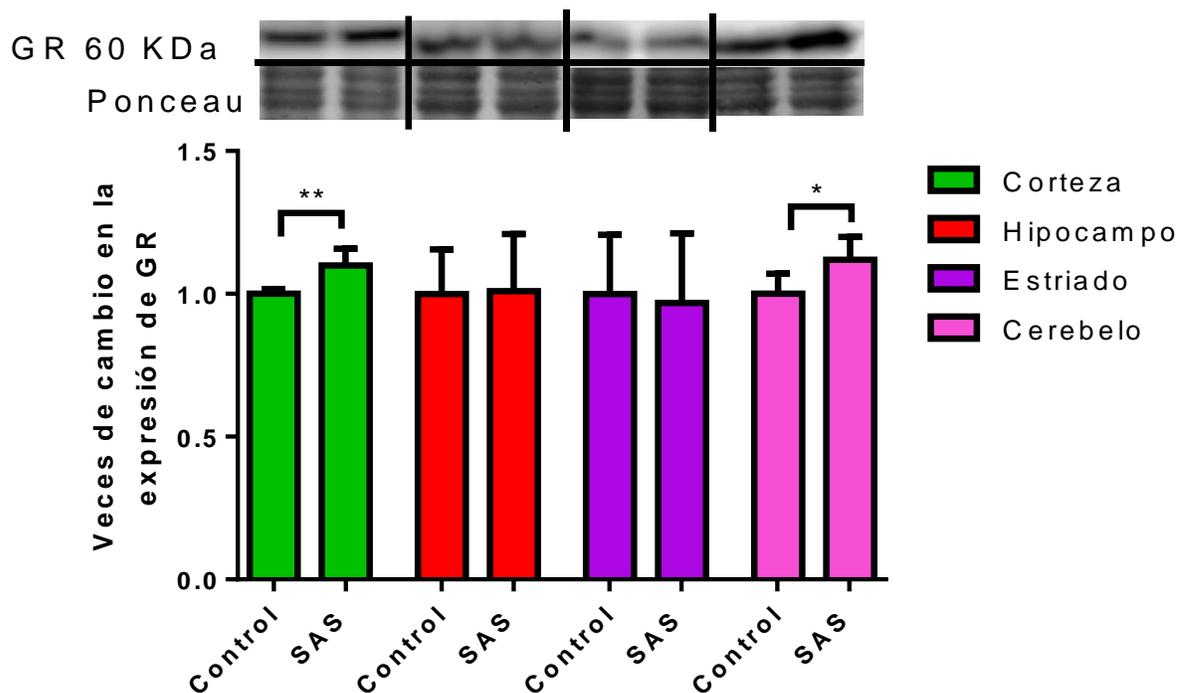


Fig. 18. Nivel de expresión de la glutatión reductasa (GR) normalizada con Ponceau en las diferentes regiones del cerebro, corteza (verde), hipocampo (rojo), estriado (morado) y Cerebelo (Rosa) Mann-Whitney ** = $p \leq 0.01$, * = $p \leq 0.05$. (n=5).

Sugiriendo que la función y expresión de los transportadores puede cambiar cuando el organismo recibe un reto. En este trabajo encontramos una modulación positiva de EAAC1 y LAT1, esto cobra relevancia tomando en cuenta que el tratamiento con SAS inhibe la actividad de xCT que es la vía principal para importar de Cys, por lo

cual estas vías alternativas de toma de Cys son necesarias. Es posible que EAAC1 y LAT1 tengan un efecto suficiente para compensar la inhibición de xCT como importador de Cys e incluso aumentar la síntesis de GSH. Ambos transportadores se modularon positivamente, sin embargo, en cultivos de astrocitos y neuronas se ha demostrado que entre el 80-90% de la toma de Cys en su forma reducida es a partir de EAAC1, y solo entre el 10-20% por los otros transportadores de Cys tal como LAT1 (Shanker et al., 2001).

El transportador LAT1 tiene una mayor afinidad por transportar metionina que Cys, el cual es el sustrato de la vía de la transulfuración. No obstante expresión de la CBS no se encontro modificada, por lo que podemos sugerir que la modulación de LAT1 no tiene un impacto significativo en la síntesis de GSH.

La modulación del transportador EAAC1 se ha asociado a cambios en los niveles de GSH y Los ratones knockout para este transportador presentan problemas relacionados con el neurodesarrollo, respuesta antioxidante, y atrofia cerebral (Aoyama & Nakaki 2015; Choi et al., 2016, Choi et al., 2018), lo que sugiere que su papel como importador de Cys es fundamental. Consistente con nuestros resultados, ratones tratados con As y BSO, en los cuáles los niveles de GSH están aumentados, el transportador EAAC1 se encuentra modulado positivamente en la corteza y el cerebelo (Garza Lombo et al., 2018; Silva-Adaya et al., 2020). Por otro lado, en animales expuestos a Manganeso, con dosis que inhíben la expresión xCT y EAAC1, se observa una disminución importante en los niveles de GSH (Yang et al., 2018), sugiriendo que la expresión de EAAC1 esta correlacionada positivamente con los niveles de GSH. La coactividad de los trasportadores es sumamente importante para la homeostasis del GSH. En los animales tratados con Manganeso, la inhibición de GSH es consecuencia de la disminución tanto de xCT como de EAAC1(Yang et al., 2018). En cultivo de astrocitos en los que se agota el GSH con BSO, la recuperación de los niveles de GSH es afectada solo cuando se inhíben simultáneamente xCT, LAT1 y EAAC1 (Garza Lombo 2019), esto nos indica que si alguno de los transportadores esta inhibido, los demás pueden tener un efecto compensatorio, y normalizar la toma de Cys. Lo anterior y lo encontrado en este

trabajo demuestra que el aumento en los niveles de GSH se debe principalmente a la modulación positiva de los transportadores, dándole mayor peso a la modulación de EAAC1 (Aoyama & Nakaki, 2015).

Lo anterior no podría explicar del todo el aumento de los niveles de GSH en corteza hipocampo y cerebelo, debido a que se sabe que EAAC1 importa únicamente Cys, la cual no es abundante en el espacio extra celular, ya que en el espacio extra celular la Cys rápidamente se oxida dando lugar a Cys₂, por lo anterior decidimos explorar la vía de la transulfuración, ya que por un lado puede generar Cys a partir de metionina, y en ese proceso se produce sulfuro de hidrogeno (H₂S), el cual al ser liberado genera un microambiente reductor, favoreciendo la reducción de Cys₂ a Cys en el espacio extracelular (Kimura et al., 2010), y permitiendo la incorporación de Cys por EAAC1. En este trabajo no encontramos modulación de CBS, sin embargo, se ha demostrado que la vía de la transulfuración, así como la síntesis de H₂S no se modula necesariamente por el nivel de expresión de las enzimas CBS y CSE, sino que es modulada a partir de la actividad de estas enzimas (Silva-Adaya et al 2020), por lo cual sería importante evaluar no solo la expresión sino también la actividad de estas enzimas.

En la literatura aún no está claro si la SAS logra permear barrera hematoencefálica. Trabajos con modelos *in vivo*, dosis intraperitoneal menores a las que usamos (de 4 a 16 mg/kg y 30 mg/kg), muestran disminución en los niveles de glutamato extracelular, sugiriendo que la SAS administrada de manera sistémica inhibe xCT (Haryu et al., 2018; Lutgen et al., 2014). Esto sugiere que la SAS puede permear la barrera hematoencefálica, contrariamente en el trabajo de Liu et al., 2012 estudian la capacidad de diferentes compuestos para atravesar la barrera hematoencefálica entre ellos la SAS; La SAS se encontró por debajo del límite detectable en SNC, asimismo en ese estudio la detección de SAS fue reportada cerca del límite inferior de detección incluso en sangre, debido posiblemente a que la dosis que usaron fue baja (1 mg/kg). Por lo que la mayoría de las pruebas apuntan a que la sulfasalazina puede permear por la vía I.P., no obstante, la biodisponibilidad de la SAS es muy diferente entre la vía de administración I.P. y la oral, ya que en la oral la liberación

del compuesto ocurre de manera paulatina. Adicionalmente, la dosis de SAS empleada en este trabajo fue 4 mayor, por lo cual la literatura sugiere que la SAS pudo llegar al SNC, sin embargo, es necesario comprobar que la SAS llega al SNC y que es capaz de inhibir total o parcialmente xCT, esto podría comprobarse midiendo los niveles de Glu extracelular.

En este trabajo encontramos una disminución en los niveles de 4-HNN en la corteza y el cerebelo, esto es consistente con los niveles de GSH, tanto 3NT, como 4-HNN, han sido reportados como buenos bioindicadores del estado redox celular, incluso hay trabajos en los cuales estos marcadores responden de manera inversa a los niveles de GSH, cuando se depleta GSH con BSO aumentan los niveles de 3NT y 4 HNN, mientras que si se suplementa N-acetilcisteína y aumentan niveles de GSH disminuyen los niveles de 3NT y 4-HNN (Wang et al ., 2015), esto es consistente con nuestro trabajo donde la respuesta compensatoria de los transportadores, indujo la síntesis de GSH y este ambiente disminuye la generación de 4-HNN.

6. Conclusiones.

La SAS moduló positivamente los niveles de GSH en varias regiones del SNC

En corteza y cerebelo se moduló negativamente 4 HNN, un marcador de estrés oxidante, sugiriendo una respuesta antioxidante protectora.

En corteza y cerebelo se moduló positivamente la expresión del transportador EAAC1.

El tratamiento semi crónico de SAS indujo una respuesta antioxidante en el SNC

7. Referencias

- Albrecht P, Lewerenz J, Dittmer S, Noack R, Maher P, Methner A. 2010. Mechanisms of oxidative glutamate toxicity: The glutamate/cystine antiporter system xc- as a neuroprotective drug target. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9:373–382
- Alonso, V., Linares, V., Belles, M., Albina, M. L., Sirvent, J. J., Domingo, J. L., & Sanchez, D. J. (2009). Sulfasalazine induced oxidative stress: a possible mechanism of male infertility. *Reprod Toxicol*, 27(1), 35-40. doi:10.1016/j.reprotox.2008.10.007
- Aoyama, K., & Nakaki, T. (2013). Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. *Int J Mol Sci*, 14(10), 21021-21044. doi:10.3390/ijms141021021
- Aoyama, K., & Nakaki, T. (2015). Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1). *Molecules*, 20(5), 8742-8758. doi:10.3390/molecules20058742
- Baker, D. A., Xi, Z. X., Shen, H., Swanson, C. J., & Kalivas, P. W. (2002). The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *J Neurosci*, 22(20), 9134-9141.
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., & Diemer, N. H. (1984). Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem*, 43(5), 1369-1374.
- Bharath, S., & Andersen, J. K. (2005). Glutathione depletion in a midbrain-derived immortalized dopaminergic cell line results in limited tyrosine nitration of mitochondrial complex I subunits: implications for Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 7(7-8), 900-910. doi:10.1089/ars.2005.7.900
- Bianchi, M. G., Bardelli, D., Chiu, M., & Bussolati, O. (2014). Changes in the expression of the glutamate transporter EAAT3/EAAC1 in health and disease. *Cell Mol Life Sci*, 71(11), 2001-2015. doi:10.1007/s00018-013-1484-0

- Bridges, R., Lutgen, V., Lobner, D., & Baker, D. A. (2012). Thinking outside the cleft to understand synaptic activity: contribution of the cystine-glutamate antiporter (System xc-) to normal and pathological glutamatergic signaling. *Pharmacol Rev*, 64(3), 780-802. doi:10.1124/pr.110.003889
- Bridges, R. J., Natale, N. R., & Patel, S. A. (2012). System xc(-) cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *Br J Pharmacol*, 165(1), 20-34. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01480.x
- Byun, J., Henderson, J. P., Mueller, D. M., & Heinecke, J. W. (1999). 8-Nitro-2'-deoxyguanosine, a specific marker of oxidation by reactive nitrogen species, is generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system of activated human phagocytes. *Biochemistry*, 38(8), 2590-2600. doi:10.1021/bi9822980
- Castillo Pérez, E., 2018. PARTICIPACIÓN DEL TRANSPORTADOR Xct EN LOS NIVELES DE GLUTATIÓN EN CEREBRO DE RATÓN. Licenciatura. UNAM.
- Choi, B. Y., Kim, I. Y., Kim, J. H., Lee, B. E., Lee, S. H., Kho, A. R., . . . Suh, S. W. (2016). Decreased cysteine uptake by EAAC1 gene deletion exacerbates neuronal oxidative stress and neuronal death after traumatic brain injury. *Amino Acids*, 48(7), 1619-1629. doi:10.1007/s00726-016-2221-4
- Choi, B. Y., Won, S. J., Kim, J. H., Sohn, M., Song, H. K., Chung, T. N., . . . Suh, S. W. (2018). EAAC1 gene deletion reduces adult hippocampal neurogenesis after transient cerebral ischemia. *Sci Rep*, 8(1), 6903. doi:10.1038/s41598-018-25191-4
- Cooper, A. J., & Kristal, B. S. (1997). Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol Chem*, 378(8), 793-802.
- Conrad, M., & Sato, H. (2012). The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-) : cystine supplier and beyond. *Amino Acids*, 42(1), 231-246. doi:10.1007/s00726-011-0867-5

- Dalleau, S., Baradat, M., Gueraud, F., & Huc, L. (2013). Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ*, 20(12), 1615-1630. doi:10.1038/cdd.2013.138
- Das, K. M., Chowdhury, J. R., Zapp, B., & Fara, J. W. (1979). Small bowel absorption of sulfasalazine and its hepatic metabolism in human beings, cats, and rats. *Gastroenterology*, 77(2), 280-284.
- De Bundel, D., Schallier, A., Loyens, E., Fernando, R., Miyashita, H., Van Liefferinge, J., . . . Massie, A. (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(15), 5792-5803. doi:10.1523/JNEUROSCI.5465-10.2011
- Dixon, S. J., Patel, D. N., Welsch, M., Skouta, R., Lee, E. D., Hayano, M., . . . Stockwell, B. R. (2014). Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *Elife*, 3, e02523. doi:10.7554/eLife.02523
- Domercq, M., Sanchez-Gomez, M. V., Sherwin, C., Etxebarria, E., Fern, R., & Matute, C. (2007). System xc- and glutamate transporter inhibition mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *J Immunol*, 178(10), 6549-6556.
- Dringen, R., & Hirrlinger, J. (2003). Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem*, 384(4), 505-516. doi:10.1515/BC.2003.059
- Garza-Lombo, C., Petrosyan, P., Tapia-Rodriguez, M., Valdovinos-Flores, C., & Gonsebatt, M. E. (2018). 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
- Gasol, E., Jimenez-Vidal, M., Chillaron, J., Zorzano, A., & Palacin, M. (2004). Membrane topology of system xc- light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restricted accessibility. *J Biol Chem*, 279(30), 31228-31236. doi:10.1074/jbc.M402428200

- Gaull, G., Sturman, J. A., & Raiha, N. C. (1972). Development of mammalian sulfur metabolism: absence of cystathionase in human fetal tissues. *Pediatr Res*, 6(6), 538-547. doi:10.1203/00006450-197206000-00002
- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Tsikas, D., & Rossi, R. (2009). Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 46(5-6), 241-281. doi:10.3109/10408360903142326
- Gout, P. W., Buckley, A. R., Simms, C. R., & Bruchovsky, N. (2001). Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x(c)- cystine transporter: a new action for an old drug. *Leukemia*, 15(10), 1633-1640
- Habib, E., Linher-Melville, K., Lin, H. X., & Singh, G. (2015). Expression of xCT and activity of system xc(-) are regulated by NRF2 in human breast cancer cells in response to oxidative stress. *Redox Biol*, 5, 33-42. doi:10.1016/j.redox.2015.03.003
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 97(6), 1634-1658. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03907.
- Hamashima, S., Homma, T., Kobayashi, S., Ishii, N., Kurahashi, T., Watanabe, R., . . . Fujii, J. (2017). Decreased reproductive performance in xCT-knockout male mice. *Free Radic Res*, 51(9-10), 851-860. doi:10.1080/10715762.2017.1388504
- Haryu, S., Saito, R., Jia, W., Shoji, T., Mano, Y., Sato, A., . . . Tominaga, T. (2018). Convection-enhanced delivery of sulfasalazine prolongs survival in a glioma stem cell brain tumor model. *J Neurooncol*, 136(1), 23-31. doi:10.1007/s11060-017-2621-7
- Heidari, R., Rasti, M., Shirazi Yeganeh, B., Niknahad, H., Saeedi, A., & Najibi, A. (2016). Sulfasalazine-induced renal and hepatic injury in rats and the protective role of taurine. *Bioimpacts*, 6(1), 3-8. doi:10.15171/bi.2016.01
- Hirrlinger, J., König, J., Keppler, D., Lindenau, J., Schulz, J. B., & Dringen, R. (2001). The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of

glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress. *J Neurochem*, 76(2), 627-636.

- Hirrlinger, J., Schulz, J. B., & Dringen, R. (2002). Glutathione release from cultured brain cells: multidrug resistance protein 1 mediates the release of GSH from rat astroglial cells. *J Neurosci Res*, 69(3), 318-326. doi:10.1002/jnr.10308
- Johnson, W. M., Wilson-Delfosse, A. L., & Mielal, J. J. (2012). Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients*, 4(10), 1399-1440. doi:10.3390/nu4101399
- Kimura, Y., Goto, Y., & Kimura, H. (2010). Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid Redox Signal*, 12(1), 1-13. doi:10.1089/ars.2008.2282
- Klotz, U. (1985). Clinical pharmacokinetics of sulphasalazine, its metabolites and other prodrugs of 5-aminosalicylic acid. *Clin Pharmacokinet*, 10(4), 285-302. doi:10.2165/00003088-198510040-00001
- Kobayashi, S., Kuwata, K., Sugimoto, T., Igarashi, K., Osaki, M., Okada, F., . . . Sato, H. (2012). Enhanced expression of cystine/glutamate transporter in the lung caused by the oxidative-stress-inducing agent paraquat. *Free Radic Biol Med*, 53(12), 2197-2203. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.040
- Lewerenz, J., & Maher, P. (2009). Basal levels of eIF2alpha phosphorylation determine cellular antioxidant status by regulating ATF4 and xCT expression. *J Biol Chem*, 284(2), 1106-1115. doi:10.1074/jbc.M807325200
- Lewerenz, J., Maher, P., & Methner, A. (2012). Regulation of xCT expression and system x (c) (-) function in neuronal cells. *Amino Acids*, 42(1), 171-179. doi:10.1007/s00726-011-0862-x
- Limon-Pacheco, J., & Gonshebat, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res*, 674(1-2), 137-147. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.09.015
- Linares, V., Alonso, V., Albina, M. L., Belles, M., Sirvent, J. J., Domingo, J. L., & Sanchez, D. J. (2009). Lipid peroxidation and antioxidant status in kidney

and liver of rats treated with sulfasalazine. *Toxicology*, 256(3), 152-156. doi:10.1016/j.tox.2008.11.010

- Linares, V., Alonso, V., & Domingo, J. L. (2011). Oxidative stress as a mechanism underlying sulfasalazine-induced toxicity. *Expert Opin Drug Saf*, 10(2), 253-263. doi:10.1517/14740338.2011.529898
- Liu, X., Ding, X., Deshmukh, G., Liederer, B. M., & Hop, C. E. (2012). Use of the cassette-dosing approach to assess brain penetration in drug discovery. *Drug Metab Dispos*, 40(5), 963-969. doi:10.1124/dmd.111.044420
- Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, 30(1-2), 42-59. doi:10.1016/j.mam.2008.05.005
- Lutgen, V., Resch, J., Qualmann, K., Raddatz, N. J., Panhans, C., Olander, E. M., . . . Baker, D. A. (2014). Behavioral assessment of acute inhibition of system xc⁻ in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(24), 4637-4647. doi:10.1007/s00213-014-3612-4
- Massie, A., Schallier, A., Kim, S. W., Fernando, R., Kobayashi, S., Beck, H., Michotte, Y. (2011). Dopaminergic neurons of system x(c)⁻-deficient mice are highly protected against 6-hydroxydopamine-induced toxicity. *FASEB J*, 25(4), 1359-1369. doi:10.1096/fj.10-177212
- McBean, G. J. (2017). Cysteine, Glutathione, and Thiol Redox Balance in Astrocytes. *Antioxidants (Basel)*, 6(3). doi:10.3390/antiox6030062
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., & Sharma, P. L. (2013). Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol*, 698(1-3), 6-18. doi:10.1016/j.ejphar.2012.10.032
- Nelson-Mora, J., Escobar, M. L., Rodriguez-Duran, L., Massieu, L., Montiel, T., Rodriguez, V. M., . . . Gonsebatt, M. E. (2018). Gestational exposure to inorganic arsenic (iAs³⁺) alters glutamate disposition in the mouse hippocampus and ionotropic glutamate receptor expression leading to memory impairment. *Arch Toxicol*, 92(3), 1037-1048. doi:10.1007/s00204-017-2111-x

- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086), 1262-1267. doi:10.1126/science.1223813
- Niknahad, H., Heidari, R., Mohammadzadeh, R., Ommati, M. M., Khodaei, F., Azarpira, N., . . . Najibi, A. (2017). Sulfasalazine induces mitochondrial dysfunction and renal injury. *Ren Fail*, 39(1), 745-753. doi:10.1080/0886022X.2017.1399908
- Pal, B. (2018). Involvement of extrasynaptic glutamate in physiological and pathophysiological changes of neuronal excitability. *Cell Mol Life Sci*. doi:10.1007/s00018-018-2837-5
- Patel, D., Kharkar, P. S., & Nandave, M. (2015). Emerging roles of system [Formula: see text] antiporter and its inhibition in CNS disorders. *Mol Membr Biol*, 32(4), 89-116. doi:10.3109/09687688.2015.1096972
- Paul, B. D., Sbodio, J. I., & Snyder, S. H. (2018). Cysteine Metabolism in Neuronal Redox Homeostasis. *Trends Pharmacol Sci*, 39(5), 513-524. doi:10.1016/j.tips.2018.02.007
- Peppercorn, M. A. (1984). Sulfasalazine. Pharmacology, clinical use, toxicity, and related new drug development. *Ann Intern Med*, 101(3), 377-386.
- Peppercorn, M. A., & Goldman, P. (1973). Distribution studies of salicylazosulfapyridine and its metabolites. *Gastroenterology*, 64(2), 240-245.
- Ramos-Chavez, L. A., Rendon-Lopez, C. R., Zepeda, A., Silva-Adaya, D., Del Razo, L. M., & Gonsebatt, M. E. (2015). Neurological effects of inorganic arsenic exposure: altered cysteine/glutamate transport, NMDA expression and spatial memory impairment. *Front Cell Neurosci*, 9, 21. doi:10.3389/fncel.2015.00021
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., & Bannai, S. (1999). Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem*, 274(17), 11455-11458.
- Sattler, R., & Rothstein, J. D. (2006). Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handb Exp Pharmacol*(175), 277-303.

- Schindler, J., Jung, S., Niedner-Schatteburg, G., Friauf, E., & Nothwang, H. G. (2006). Enrichment of integral membrane proteins from small amounts of brain tissue. *J Neural Transm (Vienna)*, 113(8), 995-1013. doi:10.1007/s00702-006-0508-4
- Sehm, T., Fan, Z., Ghoochani, A., Rauh, M., Engelhorn, T., Minakaki, G., . . . Savaskan, N. (2016). Sulfasalazine impacts on ferroptotic cell death and alleviates the tumor microenvironment and glioma-induced brain edema. *Oncotarget*, 7(24), 36021-36033. doi:10.18632/oncotarget.8651
- Senft, A. P., Dalton, T. P., & Shertzer, H. G. (2000). Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Anal Biochem*, 280(1), 80-86. doi:10.1006/abio.2000.4498
- Shahani, N., & Sawa, A. (2012). Protein S-nitrosylation: role for nitric oxide signaling in neuronal death. *Biochim Biophys Acta*, 1820(6), 736-742. doi:10.1016/j.bbagen.2011.07.010
- Shanker, G., Allen, J. W., Mutkus, L. A., & Aschner, M. (2001). The uptake of cysteine in cultured primary astrocytes and neurons. *Brain Res*, 902(2), 156-163. doi:10.1016/s0006-8993(01)02342-3
- Sharma, M. K., Seidlitz, E. P., & Singh, G. (2010). Cancer cells release glutamate via the cystine/glutamate antiporter. *Biochem Biophys Res Commun*, 391(1), 91-95. doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.168
- Soria, F. N., Zabala, A., Pampliega, O., Palomino, A., Miguelez, C., Ugedo, L., Domercq, M. (2016). Cystine/glutamate antiporter blockage induces myelin degeneration. *Glia*, 64(8), 1381-1395. doi:10.1002/glia.23011
- Silva-Adaya D., Ramos-Chavez L. A., Petrosyan P., González-Alfonso W. L., Pérez-Acosta A. & Gonsebatt.M. E. (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. *Flornetiers in Cellular Neuroscience*. Vol 14 DOI=10.3389/fncel.2020.00017. ISSN=1662-5102
- Ungard, R. G., Seidlitz, E. P., & Singh, G. (2014). Inhibition of breast cancer-cell glutamate release with sulfasalazine limits cancer-induced bone pain. *Pain*, 155(1), 28-36. doi:10.1016/j.pain.2013.08.030

- Valdovinos-Flores, C., & Gonsebatt, 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(5), 404-412. doi:10.3109/10715762.2013.783210
- Verrey, F. (2003). System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflugers Arch*, 445(5), 529-533. doi:10.1007/s00424-002-0973-z
- Wang, S. F., Chen, M. S., Chou, Y. C., Ueng, Y. F., Yin, P. H., Yeh, T. S., & Lee, H. C. (2016). Mitochondrial dysfunction enhances cisplatin resistance in human gastric cancer cells via the ROS-activated GCN2-eIF2alpha-ATF4-xCT pathway. *Oncotarget*, 7(45), 74132-74151. doi:10.18632/oncotarget.12356
- Wang, Y., Chen, M., Zhang, Y., Huo, T., Fang, Y., Jiao, X., . . . Jiang, H. (2016). Effects of realgar on GSH synthesis in the mouse hippocampus: Involvement of system XAG(-), system XC(-), MRP-1 and Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol*, 308, 91-101. doi:10.1016/j.taap.2016.07.006
- Wang, Y. N., Zhou, L., Li, Y. H., Wang, Z., Li, Y. C., Zhang, Y. W., . . . Shen, Y. (2015). Protein Interacting with C-Kinase 1 Deficiency Impairs Glutathione Synthesis and Increases Oxidative Stress via Reduction of Surface Excitatory Amino Acid Carrier 1. *J Neurosci*, 35(16), 6429-6443. doi:10.1523/JNEUROSCI.3966-14.2015
- Wahl C, Liptay S, Adler G, and Schmid RM (1998) Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Investig* 101:1163–1174
- Yamamoto-Furusho J.K., Bosques-Padilla F., de Paula J., Galiano M.T., Ibañez P., Kotze P.G., Rocha J. L., Steinwurz F, Veitia G. y Zaltman C. (2016) Diagnostico y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal: Primer Consenso Latinoamericano de la Pan American Crohn's and Colitis Organisation *Revista de Gastroenterología De México*.
- Yang, X., Yang, H., Wu, F., Qi, Z., Li, J., Xu, B., Deng, Y. (2018). Mn Inhibits GSH Synthesis via Downregulation of Neuronal EAAC1 and Astrocytic xCT

to Cause Oxidative Damage in the Striatum of Mice. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 4235695. doi:10.1155/2018/4235695

- Ye, P., Mimura, J., Okada, T., Sato, H., Liu, T., Maruyama, A., . . . Itoh, K. (2014). Nrf2- and ATF4-dependent upregulation of xCT modulates the sensitivity of T24 bladder carcinoma cells to proteasome inhibition. *Mol Cell Biol*, 34(18), 3421-3434. doi:10.1128/MCB.00221-14