



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

**“Efecto de la exposición a Fluoruro en el transporte de glutamato en células de  
riñón”**

Tesis que presenta:

**Q.F.B. ANDREA YETLANETZI OCHARÁN MERCADO**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE TOXICOLOGÍA**

Director de Tesis

Dr. Arturo Ortega Soto

Ciudad de México, Agosto de 2020.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurotoxicología del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Dr. Arturo Ortega Soto. Esta tesis se financió con el número de proyecto 255087 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del CONACYT a través de la beca de maestría con No. de registro 932963.

## Agradecimientos

- A mi director de tesis, el **Dr. Arturo Ortega Soto**, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su guía, sus enseñanzas, su paciencia y por motivarme a mejorar como profesional, pero sobre todo agradezco su empatía y apoyo en momentos delicados de mi vida.
- A mis Asesores, a la **Dra. Emma S. Calderón Aranda** y al **Dr. Jorge Rodríguez Antolín**, por las recomendaciones realizadas al presente trabajo.
- A todos los profesores del departamento de Toxicología, en especial al **Dr. Olivier Christophe Barbier** y al **Dr. Adolfo Sierra Santoyo**.
- Al **CINVESTAV-IPN** al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por la oportunidad y por el apoyo económico otorgado para realizar este trabajo de investigación.
- A los auxiliares de investigación la **M. en C. Luisa Clara Regina Hernández Kelly**, al **I.B.Q. Luis Cid Cid**, a la **Q.F.B Ma. de Lourdes López González** y al técnico **Blanca Rocío Ibarra López** por sus enseñanzas en las técnicas realizadas.
- A mis compañeros del Laboratorio de Neurotoxicología, **Fredy, Janisse, Ana, Isabel, Laura, Catya, Jazmín** y **Ada** por su apoyo y enseñanzas cuando los necesité.
- A mis compañeros de generación, **Vanessa, Karen, Estheisy, Nuria, Rebeca, Andrea, Ángel, Leticia** y **Adrián**.
- A mis excompañeros del Laboratorio de Productos Naturales, el **M. en C. Víctor Hernández**, la **Dra. Norma Olguín** y la **Dra. Rosalina Hernández**, quienes me motivaron a estudiar en el CINVESTAV, y a pesar de la distancia me han apoyado en mi desarrollo profesional.
- A mis amigos de Licenciatura, **Daniela, Lucía, Guiomara** e **Issac**, por el apoyo académico y personal.
- A mi familia, mis padres, **Félix** y **Marina** por la educación, los valores, el apoyo incondicional, por darme siempre el impulso que necesito, por creer en mí por imposibles que parezcan mis aspiraciones; a mis hermanos **Mónica** y **Eduardo** quienes me han mostrado apoyo fraternal, cariño y comprensión.
- A mis tíos, **Esther Ocharán** y **Enrique Mendieta**, y a mi abuelita **Esther** quienes me han acogido como una hija más y por supuesto el cariño es recíproco.

- A mi tío **Alfredo**, quien desafortunadamente abandonó esta tierra antes de tiempo, pero cuyo carisma y alegría vivirán siempre en mis recuerdos dejándome grandes enseñanzas, reflexiones y un cambio en mi manera de ver la vida.
- Y por último, pero por supuesto no menos importante a mi esposo, **Adrián Hernández**, quien me ha brindado amor en toda la extensión de la palabra, por su característica paciencia y atención a mí persona, por su positivismo y visión para conseguir juntos más allá que solo una meta.

*“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha  
pensado”.*

Albert Szent-Györgyi (1893- 1986)

## Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Glutamato .....	1
1.1.1 Importancia del Glu como transportador de grupos amino .....	3
1.2 Transportadores de membrana.....	4
1.2.1 Sistemas de transporte de Glu.....	4
1.2.1.1 Transportador xCT .....	4
1.2.1.2 Transportadores de Aminoácidos Excitadores.....	5
1.2.1.2.1 Transportador EAAT3 .....	7
1.2.2 Importancia de los transportadores de aminoácidos fuera del sistema nervioso central .....	8
1.2.3 Mecanismos de regulación de los EAATs.....	8
1.2.3.1 Mecanismos de regulación traduccional .....	9
1.2.3.2 Modificaciones post-traduccionales .....	10
1.3 Sistema renal.....	11
1.3.1 Anatomía del riñón.....	11
1.3.1.1 Nefrona: Unidad funcional del riñón.....	11
1.3.1.2 Túbulo contorneado proximal.....	13
1.3.2 Transportadores de iones en el riñón .....	14
1.3.2.1 Cotransportadores de solutos orgánicos impulsados por Na <sup>+</sup> .....	14
1.3.2.1.1 Cotransportadores de Na <sup>+</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	14
1.3.2.2 Cotransportadores impulsados por H <sup>+</sup> .....	15
1.3.2.2.1 Intercambiador de Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> .....	15
1.3.3 Regulación renal del equilibrio ácido-base.....	16
1.3.4 Circulación renal .....	17
1.3.5 Susceptibilidad del riñón a daño tóxico .....	18
1.4 Fluoruro.....	19
1.4.1 Características generales del F <sup>-</sup> .....	19
1.4.2 Fuentes de exposición a F <sup>-</sup> .....	20
1.4.3 F <sup>-</sup> en México.....	20
1.4.4 Toxicocinética de F <sup>-</sup> .....	21
1.4.4.1 Absorción .....	21
1.4.4.2 Distribución .....	21
1.4.4.3 Eliminación.....	21
1.4.5 Efectos a la salud por exposición a F <sup>-</sup> .....	22
1.4.5.1 F <sup>-</sup> y acidosis tubular .....	23

1.4.6 Efectos celulares del F <sup>-</sup> .....	23
1.5 Especies reactivas de oxígeno.....	24
1.5.2 Participación de la mitocondria en la producción de ROS .....	25
1.5.3 Participación del Ca <sup>2+</sup> en la producción de ROS .....	26
1.5.4 Participación de NADPH oxidasas en la producción de ROS.....	27
1.6 Justificación .....	28
1.8 Objetivos .....	29
1.8.1 Objetivo General .....	29
1.8.2 Objetivos Particulares .....	29
2. Materiales y Métodos .....	30
2.1 Estrategia Experimental.....	30
2.2 Cultivo de línea celular LLC-PK1 .....	31
2.3 Tratamientos .....	31
2.4 Evaluación de viabilidad celular .....	31
2.4.1 Principio .....	31
2.4.2 Procedimiento .....	32
2.5 Inmunocitoquímica.....	32
2.5.1 Principio .....	32
2.5.2 Procedimiento .....	33
2.6 Determinación de proteínas.....	33
2.6.1 Principio .....	33
2.6.2 Procedimiento .....	34
2.7 Captura de [ <sup>3</sup> H]-D-Aspartato .....	34
2.7.1 Principio .....	34
2.7.2 Procedimiento .....	34
2.7.2.1 Función del transportador .....	34
2.7.2.2 Cinética de transporte .....	35
2.8 Análisis Estadístico .....	35
3. Resultados .....	36
3.1 Expresión del transportador EAAT3 en células LLC-PK1 .....	36
3.2 La actividad de transporte de [ <sup>3</sup> H]-D-Aspartato es dependiente de Na <sup>+</sup> .....	38
3.3 La actividad de [ <sup>3</sup> H]-D-Aspartato es independiente de EAAT2. ....	38
3.4 La exposición al F <sup>-</sup> incrementa la actividad metabólica en LLC-PK1.....	40
3.5 Efecto de diferentes concentraciones de F <sup>-</sup> en la captura de [ <sup>3</sup> H]-D-Aspartato....	42

3.6 Efecto de la exposición en diferentes tiempos de $F^-$ 10 $\mu$ M a la captura de $[^3H]$ -D-Aspartato en las células LLC-PK1. ....	44
3.7 La exposición a $F^-$ modifica los parámetros cinéticos de EAAT3. ....	45
3.8 Curso temporal de la captura de $[^3H]$ -D-Aspartato.....	46
4. Discusión.....	47
5. Conclusiones.....	55
6. Perspectivas.....	56
7. Referencias .....	57

## Índice de figuras

<b>Figura</b>	<b>Título de figura</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Síntesis de aminoácidos no esenciales.	1
<b>2</b>	Catabolismo de proteínas.	2
<b>3</b>	Biosíntesis de Glutati6n.	3
<b>4</b>	Estequiometría del transportador xCT y su actividad sinérgica con transportadores de aminoácidos excitadores para la síntesis de GSH	5
<b>5</b>	Estructura de los EAAT.	7
<b>6</b>	Estructura de la nefrona.	12
<b>7</b>	Túbulo contorneado proximal	13
<b>8</b>	Cotransportadores NBC	15
<b>9</b>	Intercambiador NHE	15
<b>10</b>	Regulación del equilibrio acido-base en el riñ6n	17
<b>11</b>	Túbulos y vasos sanguíneos de la nefrona	18
<b>12</b>	Mecanismo general de producción y neutralización de ROS	25
<b>13</b>	Producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria	26
<b>14</b>	Interacción de varias fuentes de ROS	27
<b>15</b>	Diagrama de flujo de la estrategia experimental	30
<b>16</b>	Expresión de EAAT3 en células LLC-PK1.	36
<b>17</b>	Efecto del sodio sobre en la captura de [ <sup>3</sup> H]-D-Aspartato en las células LLC-PK1.	39
<b>18</b>	Efecto de DHK en la captura de [ <sup>3</sup> H]-D-Aspartato en células LLC-PK1.	40
<b>19</b>	Actividad metabólica en células LLC-PK1 expuestas a F <sup>-</sup> .	41
<b>20</b>	Efecto de diferentes concentraciones de F <sup>-</sup> sobre la captura de [ <sup>3</sup> H]-D-aspartato en las células LLC-PK1.	43
<b>21</b>	Efecto de la exposición a de F <sup>-</sup> sobre el curso temporal en la captura de [ <sup>3</sup> H]-D-aspartato en células LLC-PK1.	44
<b>22</b>	Cinética de la captura de [ <sup>3</sup> H]-D-Aspartato.	45

<b>23</b>	Efecto de la co-exposición a la solución de captura y F <sup>-</sup> con [ <sup>3</sup> H]-D-Aspartato en células LLC-PK1.	46
<b>24</b>	Modelo teórico de los efectos tóxicos del F <sup>-</sup> sobre el transporte de Glu mediado por EAAT3 en células de túbulo proximal.	55

## Índice de tablas

<b>Tabla</b>	<b>Título de Tabla</b>	<b>Página</b>
1	Generalidades de los transportadores de Glu	6

## Abreviaturas

(Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> F)	Fluorapatita
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AP-1	Proteína activadora 1
Asp	Ácido D-Aspártico
ATP	Adenosín trifosfato
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CA	Anhidrasa carbónica
CaF <sub>2</sub>	Fluorita
CaM	Calmodulina
CaMKII	Calcio/calmodulina-proteína cinasa KII
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
CAT	Catalasa
Cys	Cisteína
dbAMPc	N <sup>6</sup> ,2'-O-Dibutiril-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico de sodio
DHK	Ácido Dihidrokaínico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EAAC1/EAAT3	Excitatory Amino Acid Carrier 1/Transportador de Aminoácidos Excitadores 3
EAAT4	Transportador de Aminoácidos Excitadores 4
EAAT5	Transportador de Aminoácidos Excitadores 5
EAATs	Transportadores de Aminoácidos Excitadores
eEF2	Factor de elongación 2
eEF2K	Cinasa del factor eucariótico de elongación
eIF2 $\alpha$	Factor 2 eucariótico del inicio de la traducción
eIF/ 4E-BP	Factor eucariótico del inicio de la traducción/ Proteína de unión 4E
GCN2	Cinasa de control general no reprimible 2
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GDP	Guanosín difosfato
GSH	Glutación reducido
GLAST/EAAT1	Transportador de glutamato 1/Transportador de Aminoácidos Excitadores 1
Gln	Glutamina
GLT-1/EAAT2	Transportador de glutamato 1/Transportador de Aminoácidos Excitadores 2
Glu	Glutamato
GS	Glutamina sintetasa
GTP	Guanosín trifosfato
HP1	Horquilla 1
HP2	Horquilla 2

HRI	Inhibidor regulado por hemo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LLC-PK1	Células porcinas derivadas de túbulo proximal de riñón
MDCK	Células de riñón canino Madin-Darby
mTORC1	Complejo sensible a rapamicina
Na <sub>3</sub> AlF <sub>6</sub>	Criolita
NAD(P)H	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidasa
NBC	Cotransporte Na <sup>+</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NH <sub>3</sub>	Amoniaco
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amonio
NHE3	Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
NOX	NADPH oxidasa
NRC	National Research Council
·OH	Radical hidroxilo
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
p90 <sup>RSK1</sup>	Proteína ribosomal S6 cinasa 1
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PERK	Cinasa tipo PKR del retículo endoplásmico
PFA	Paraformaldehído
Pi	Fosfato inorgánico
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PKCε	Proteína cinasa C ε
PKR	Proteína cinasa R
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PTM	Modificaciones postraduccionales
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S1	Segmento contorneado del riñón
S2	Segmento recto del riñón
S3	Segmento de unión con el asa de Henle
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SLC	Transportador acarreador de soluto
SLC1A1	Acarreador de soluto 1A1
SLC1A2	Acarreador de soluto 1A2
SLC1A3	Acarreador de soluto 1A3
SLC1A6	Acarreador de soluto 1A6
SLC1A7	Acarreador de soluto 1A7
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa

TBS	Solución salina tamponada con Tris
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TGI	Tracto gastro-intestinal
TM	Segmento transmembranal
TP	Túbulo proximal
TPA	12 - O – tetradecanoilforbol – 13 - acetato
tRNA <sup>i</sup> <sub>met</sub>	tRNA iniciador cargado con metionina
xCT	Intercambiador de Cistina / Glutamato

## Resumen

El glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitador del Sistema Nervioso Central (SNC), además está implicado en diversas vías metabólicas como precursor energético y para su ingreso a la célula son necesarios sistemas de transporte. Los transportadores de aminoácidos excitadores (EAATs) han sido bien caracterizados en SNC, pero poco estudiados en sistemas periféricos, en los cuales se conoce que EAAT3 es el más abundante. En los riñones, se ha descrito la presencia de EAAT3 y su ausencia se ha relacionado con la disminución de la reabsorción renal de los aminoácidos negativos (Glu y Asp).

El Fluoruro ( $F^-$ ) es considerado un contaminante ambiental cuyo origen puede ser antropogénico o natural. La ruta principal de exposición es el consumo de agua contaminada como consecuencia de la disolución de minerales presentes en el subsuelo. Estudios epidemiológicos y experimentales confirman que la exposición al  $F^-$  genera efectos nocivos para la salud, tanto en huesos y dientes como en órganos blandos, como hígado, páncreas, cerebro y riñones.

En este contexto, dado que EAAT3 es indispensable para el ingreso de Glu a la célula renal y que el  $F^-$  causa daño sobre este órgano, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la exposición al  $F^-$  sobre la función del transportador EAAT3 en células del túbulo proximal de riñón LLC-PK1.

Realizamos exposiciones agudas a concentraciones micromolares de  $F^-$  para evaluar el efecto en la función del transportador EAAT3 mediante la captura de [ $^3H$ ]-D-Aspartato. La exposición a concentraciones de 10, 50, 100 o 500  $\mu M$  de  $F^-$  aumenta la actividad del transportador de una manera dependiente de la dosis. La mayor actividad se muestra a los 30 minutos después de la exposición. Los ensayos en ausencia de sodio y el uso de la herramienta farmacológica DHK (inhibidor específico del transportador EAAT2) muestran que la actividad de transporte es dependiente de sodio e independiente de EAAT2. El análisis de la cinética de transporte en las células expuestas a  $F^-$  mostró un aumento del 72.6 % en  $V_{max}$ .

Si bien se desconoce el mecanismo exacto por el cual el  $F^-$  modifica la actividad de transporte de Glu en el riñón, los presentes resultados sugieren que uno de los mecanismos de la nefrotoxicidad de este ion podría estar asociada a modificaciones en la densidad de EAAT3 en la membrana plasmática y por lo tanto representar un blanco terapéutico para este contaminante ambiental.

**Palabras clave:** Glutamato, Transportador de Aminoácidos Excitadores 3 (EAAT3), Fluoruro ( $F^-$ ), Riñón.

## Abstract

Glutamate (Glu) is the main excitatory neurotransmitter of Central Nervous System (CNS). It is also involved in various metabolic pathways as an energy precursor. It is dependent of transport systems for its entry into the cell. Excitatory amino acid transporters (EAATs) have been well characterized in the CNS, but less studied in peripheral systems, where the EAAT3 is known to be the most abundant. In the kidney, the presence of EAAT3 has been described and its absence has been related to the decrease in renal reabsorption of negatively charged amino acids (Glu and Asp).

Fluoride (F<sup>-</sup>) is considered an environmental pollutant of natural or anthropogenic origin. The main route of exposure is the consumption of contaminated water as a result of the dissolution of minerals present in the subsoil. Epidemiological and experimental studies confirm that exposure to fluoride generates harmful health effects, both in bones and teeth and in soft organs, such as the liver, pancreas, brain and kidneys.

In this context, since EAAT3 is essential for the entry of Glu into the renal cells and that F<sup>-</sup> causes damage to this organ, the aim of this work was to evaluate the effect of F<sup>-</sup> exposure on the function and protein levels of the EAAT3 glutamate transporter in LLC-PK1 renal proximal tubule cells.

We performed acute treatments of micromolar concentrations of F<sup>-</sup> to evaluate the function EAAT3 through [<sup>3</sup>H]-D-Aspartate uptake. Exposure to 10, 50, 100 or 500 μM F<sup>-</sup> concentrations, increases the activity of the transporter, observed by the modification of [<sup>3</sup>H]-D-Aspartate uptake, in a dose-dependent manner. The peak of activity is present after 30 minutes post-exposure. As expected, experiments in the absence of sodium and the use of the EAAT2 specific transporter blocker, dihydrokainate (DHK) demonstrate that the transport activity is sodium dependent and independent of EAAT2. The analysis of transport kinetics in cells exposed to F<sup>-</sup>, showed an increase of 72 % in V<sub>max</sub> associated with a decrease in affinity of the EAAT3 transporter.

Although the exact mechanism by which F<sup>-</sup> modifies the glutamate transport activity in the kidney is unknown, the present results suggest that the nephrotoxicity of this ion could be associated with modifications in the density of EAAT3 in the plasma membrane, which may represent a therapeutic target for this environmental pollutant.

**Keywords:** Glutamate, Excitatory Amino Acid Transporter 3 (EAAT3), Fluoride (F<sup>-</sup>), Kidney.

# 1. Introducción

## 1.1 Glutamato

El glutamato (Glu) es el principal aminoácido excitador, activa una amplia variedad de cascadas de transducción de señales en el SNC. Además, participa en diversas vías metabólicas como: en el metabolismo energético, en la desintoxicación del amoníaco y la síntesis de proteínas (**Bianchi y cols., 2014**).

El ácido glutámico o su forma iónica, Glu es el aminoácido más abundante de la naturaleza, forma parte estructural de numerosas proteínas animales y vegetales. Como se indica Figura 1, este aminoácido no esencial es sintetizado a través de metabolitos intermediarios del ciclo del Ciclo de Krebs también llamado ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y en el catabolismo de proteínas derivado de reacciones de desaminación y de cetoácidos intermediarios del TCA (alfacetoglutarato, oxalacetato, piruvato) (**Pradera, 2016; Pérez y Noriega, 2019**).

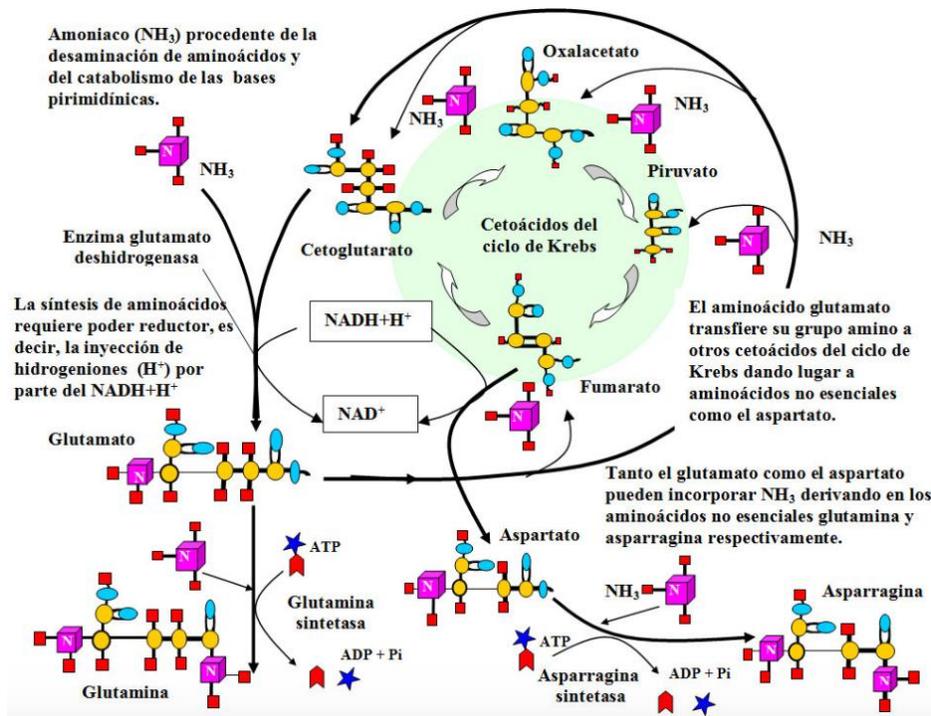
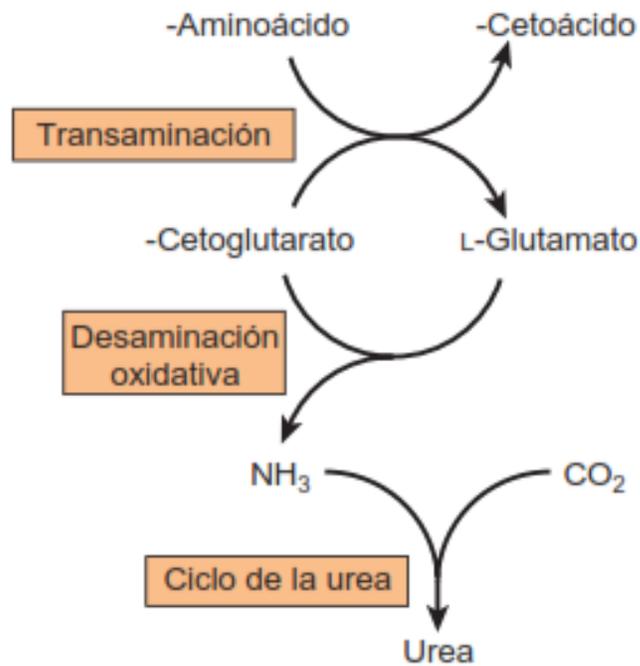


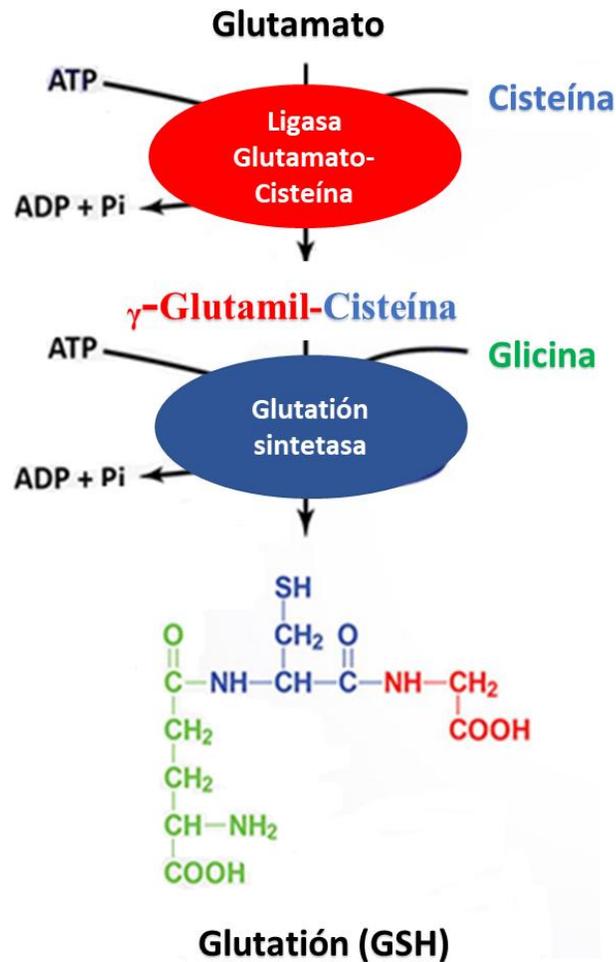
Figura 1. Síntesis de aminoácidos no esenciales

Además, los esqueletos carbonados del Glu pueden ser oxidados en el TCA y generar energía en forma de ATP y el nitrógeno remanente se utiliza en el ciclo de la urea (Figura 2).



**Figura 2. Catabolismo de proteínas**

En el enterocito, el Glu además de participar como precursor de aminoácidos y a nivel metabólico, es precursor citosólico en el para la síntesis de glutatión (GSH), un antioxidante celular (Figura 3); en el hígado, es liberado a la circulación portal para ser metabolizado a  $\alpha$ -cetoglutarato mediante la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) para posteriormente transformarse en malato, un metabolito intermediario de la gluconeogénesis.



**Figura 3. Biosíntesis de Glutión**

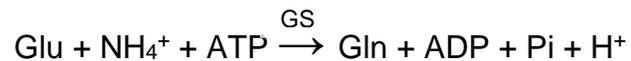
Por otra parte, en el riñón, participa en la regulación del equilibrio ácido/básico (Ver sección 1.3.3)

#### 1.1.1 Importancia del Glu como transportador de grupos amino

En la mayoría de los aminoácidos, el grupo amino procede del Glu mediante una reacción de transaminación. El Glu se sintetiza a partir de  $\text{NH}_4^+$  y  $\alpha$ -cetoglutarato, metabolito del ciclo del ácido cítrico, en una reacción de aminación directa catalizada por GDH.



Mediante la glutamina sintetasa (GS) se realiza una segunda reacción de aminación sobre el Glu obteniendo la glutamina.



Esta reacción es muy importante ya que la glutamina (Gln) sintetizada es uno de los principales sustratos empleados por las transaminasas o aminotransferasas, fungiendo como donante de nitrógeno en los mamíferos **(King, 2016)**.

## 1.2 Transportadores de membrana

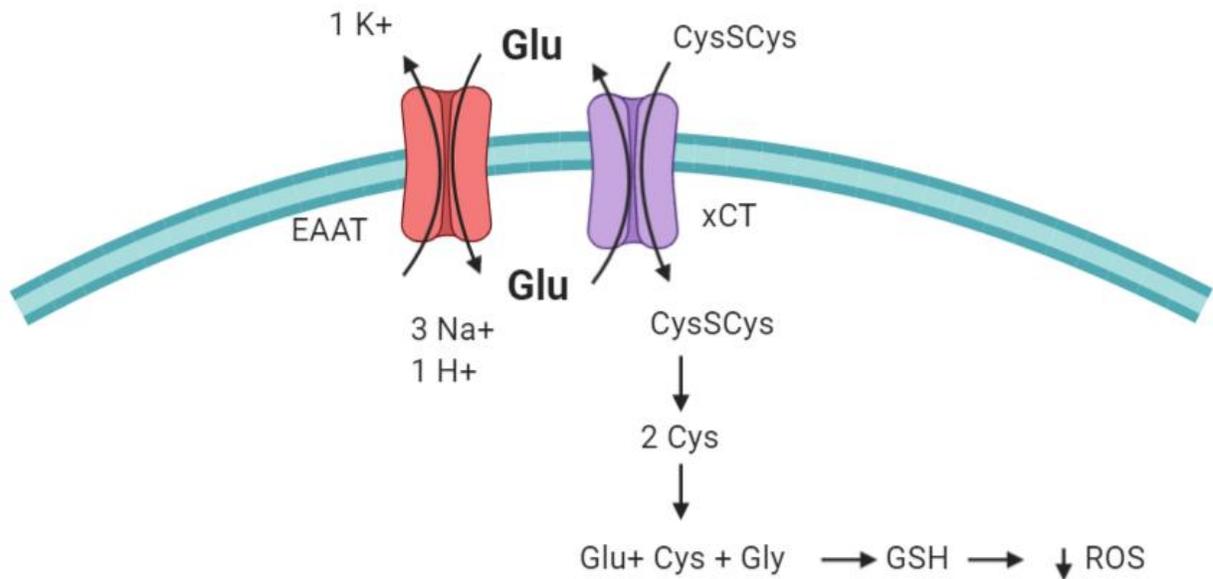
El movimiento de casi todos los solutos a través de la membrana plasmática está mediado por proteínas transportadoras de membrana, conformadas por canales/bombas que son capaces de transportar selectivamente moléculas, fármacos o sustancias tóxicas **(Sabater-Tobella, 2018)**.

### 1.2.1 Sistemas de transporte de Glu

#### 1.2.1.1 Transportador xCT

El transportador xCT, codificado por el gen *SLC7A11*, es un intercambiador de cistina / Glu independiente de Na<sup>+</sup> descrito en células de cerebro, duodeno y riñón **(Burdo y cols., 2006; Chase y cols., 2001; Pow, 2001)**. Como se muestra en la Figura 4, la incorporación de cistina a través de xCT es resultado del trabajo sinérgico con transportadores de la familia de los transportadores de aminoácidos excitadores (EAATs), los cuales después de internalizar Glu proporcionan el aminoácido indispensable para el co-transporte de la cistina a razón de 1:1 **(Bannai, 1984)**, una vez internalizada, es reducida a cisteína (Cys), sustrato limitante de la velocidad para la síntesis del antioxidante GSH **(Lu, 2008; McBean, 2012)**.

De acuerdo con Chase y colaboradores, el estrés oxidante, desencadena la traslocación del transportador xCT a la membrana plasmática y reduce su tasa de internalización después de 10 minutos de exposición a isoflurano y la sobre-expresión membranal fue persistente hasta normalizar las concentraciones de GSH intracelular **(Chase y cols., 2019)**.



**Figura 4. Estequiometría del transportador xCT y su actividad sinérgica con transportadores de aminoácidos excitadores para la síntesis de GSH**

#### 1.2.1.2 Transportadores de Aminoácidos Excitadores

La remoción del Glu del espacio extracelular se lleva a cabo a través de una familia de transportadores conocidos como transportadores de aminoácidos excitadores (EAATs). A la fecha, se conocen 5 subtipos de estos transportadores: GLAST/EAAT1, GLT-1/EAAT2, EAAC1/EAAT3, EAAT4 y EAAT5 (Kanai y Hediger, 1998; López-Bayghen y Ortega, 2010; Pines y cols., 1992; Storck y cols., 2006). En la Tabla 1 se muestran algunas características de los transportadores de Glu como el subtipo de transportador y el gen por el que es codificado su distribución y el tipo celular en el que se encuentran mayormente expresadas.

**Tabla 1.** Generalidades de los transportadores de Glu

Subtipo	Gen	Distribución	Tipo celular	Familia de transportador	Transporte
EAAT1 (GLAST)	SLC1A3	SNC Tejidos periféricos	Glía		
EAAT2 (GLT1)	SLC1A2	SNC Placenta	Glía	SLC1	Co-transporte
EAAT3 (EAAC1)	SLC1A1	SNC Tejidos periféricos	Neuronas		
EAAT4	SLC1A6	Cerebelo	Neuronas		
EAAT5	SLC1A7	Retina	Neuronas, Glía		

Modificado de Bjørn-Yoshimoto & Underhill, 2016.

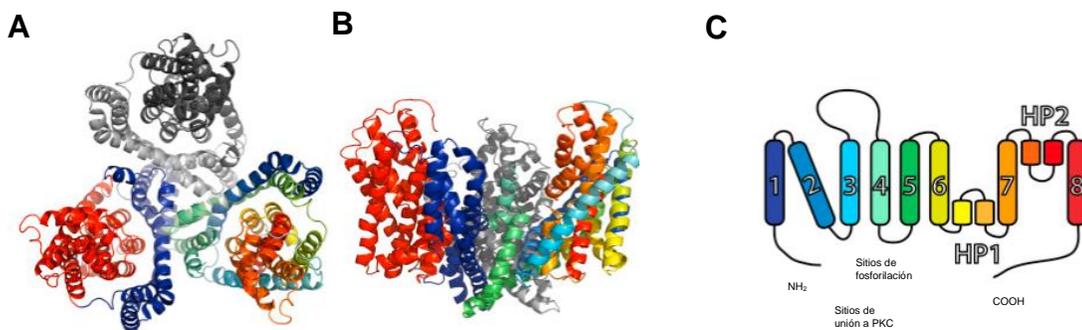
Los cinco subtipos de transportadores se denominan transportadores de Glu de alta afinidad por su constante  $K_m$  que oscila entre 40 y 100  $\mu\text{M}$  y son capaces de transportar ácido L-Glutámico, ácido L-Aspártico y ácido D-Aspártico y D-Cisteína. Los EAATs son glicoproteínas membranales de aproximadamente 60 kDa que se organizan formando oligómeros (**Arriza y cols., 1994**).

La estequiometría de este transporte es: una molécula de Glu es transportada al citoplasma junto con dos iones  $\text{Na}^+$ , mientras que un ion  $\text{K}^+$  es liberado fuera de la célula (**Camacho y Massieu, 2006**). De esta manera, el  $\text{K}^+$  es esencial para el transporte y el  $\text{Na}^+$  es necesario para la unión del Glu con el transportador. Esta estequiometría permite generar un gradiente de concentración de hasta un millón de veces a través de la membrana lo que proporciona la fuerza impulsora energética para transportar Glu contra su gradiente electroquímico (**Zerangue y Kavanaugh, 1996**).

Los EAATs presentan una topografía de 8-10 hélices transmembrana (TM) con terminaciones N y C intracelulares (**Grunewald y Kanner, 1995; Grunewald y Kanner, 2000; Seal y cols., 2000; Slotboom y cols., 1999; Yernool y cols., 2003**). La proteína se cristalizó como un homotrímero (**Gendreau y cols., 2004; Grewer y cols., 2005**). El transportador se puede dividir en subdominios funcionales, con TM1, -2, -4 y -5 como

dominio de andamiaje relativamente estático, mientras que TM3, -6, -8 y horquilla 1 (HP1) y horquilla 2 (HP2) son parte del dominio de transporte (Figura 5).

La secuencia de aminoácidos entre los residuos 390 y 413, que se localiza en el exón 7, está muy conservada dentro de la familia de los transportadores glutamatérgicos (**Slotboom y cols., 1999**), y es esencial para la actividad del transportador, participando probablemente en la unión con el ion Na<sup>+</sup>. En los subtipos EAAT1, 2 y 3 se han descrito varios lugares de glicosilación, que se localizan extracelularmente entre los segmentos TM3 y 4 (**Seal y Amara, 1999**). Además, el subtipo EAAT3 tiene un tercer lugar de glicosilación entre TM1 y 2 (**Kanai y Hediger, 1998**).



**Figura 5. Estructura de los EAATs.** A) Estructura de cristalina vista desde el espacio extracelular B) Estructura de cristalina vista desde el plano de la membrana; la parte superior es extracelular. C) Topología de EAATs. Las hélices transmembrana, así como las horquillas están numeradas; HP1 corresponde al dominio de andamiaje y HP2 al dominio de transporte; los dominios N y C terminal son intracelulares. Las estructuras propuestas incluyen secuencias consenso para la fosforilación intracelular por PKA y PKC, así como sitios de glicosilación extracelulares que pueden ser factores clave para la regulación del transporte.

#### 1.2.1.2.1 Transportador EAAT3

El Transportador de Aminoácidos Excitadores 3 (EAAT3) de humano, consta de 525 aminoácidos, un peso molecular de 57.2 kDa y 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de transportador de conejo denominada EAAC1 (Excitatory Amino Acid Carrier 1), 66% de homología con GLAST y el 61% con GLT-1 (**Malandro y Kilberg, 1996**) y 92.6 % de identidad de secuencia de aminoácidos EAAC1 con la del transportador de cerdo salvaje "*Sus scrofa*" (**NCBI, BLAST**).

A diferencia de otros transportadores pertenecientes a la familia EAAT, la expresión de EAAT3/EAAC1 es principalmente intracelular; solo una pequeña parte de los transportadores están en la membrana plasmática, mientras que la mayoría está asociada con vesículas citoplásmicas.

EAAT3 es ampliamente expresado en el encéfalo y localizado principalmente en el soma y las dendritas **(Hu y cols., 2018; Kanai y Hediger, 1998; Rothstein y cols., 1994; Shashidharan y cols., 1997)**.

### 1.2.2 Importancia de los transportadores de aminoácidos fuera del sistema nervioso central

Mientras que la distribución de los diferentes EAATs en el SNC ahora se conoce en gran medida, pocos estudios han sido publicados sobre la distribución de transportadores glutamatérgicos en órganos periféricos. Fuera del cerebro, EAAT3 parece ser el principal transportador de Glu y Asp en muchos tipos de células. Por ejemplo, en las células del músculo esquelético, es responsable de mantener los niveles de Glu intracelular libre **(Li y cols., 2015)**, en la placenta, participa en una lanzadera Glu/Gln fetal-placentaria que suministra nitrógeno al feto **(Matthews y cols., 1998; Velaz-Faircloth y cols., 1996)** en el riñón, participa en la reabsorción de Glu **(Kanai y Hediger, 1998)**.

En 1992, Kanai y colaboradores fueron pioneros en identificar mRNA de EAAC1 en tejidos periféricos de conejo, más recientemente un estudio realizado por Hu en 2018 muestra la expresión de altos niveles de proteína EAAT3 en los bordes del cepillo tanto del intestino delgado distal como de los túbulos proximales renales.

### 1.2.3 Mecanismos de regulación de los EAATs

Los transportadores de Glu se encuentran altamente regulados a distintos niveles, tales como la transcripción, maduración y estabilización de su mRNA, modificaciones postraduccionales y fosforilación de proteínas accesorias que modulan el tráfico de los transportadores hacia y desde la membrana plasmática **(Bjørn-Yoshimoto y Underhill, 2016; Martinez-Lozada y Robinson, 2016)**.

### 1.2.3.1 Mecanismos de regulación traduccional

El proceso de traducción en las células eucariontes está dividido en tres etapas: inicio, elongación y terminación. Se consideran al inicio y la elongación como puntos de regulación del control traduccional **(López-Bayghen y Ortega, 2010)**.

El inicio de la traducción es regulado por dos vías, la primera de ellas es mediante la fosforilación del factor 2 eucariótico del inicio de la traducción (eIF2 $\alpha$ ) **(Proud, 2005)**, donde la fosforilación de esta subunidad impide su reciclaje al bloquear el intercambio de Guanosín difosfato (GDP) por Guanosín trifosfato (GTP) inhibiendo la síntesis de proteínas al impedir la formación del complejo ternario tRNA iniciador cargado con metionina - Guanosín trifosfato - Factor de iniciación de la traducción eucariota 2 (tRNA<sup>Met</sup>- GTP- eIF2). La fosforilación de eIF2 $\alpha$  es llevada a cabo por una familia de cuatro cinasas, proteína cinasa R (PKR), cinasa tipo PKR del retículo endoplásmico (PERK), cinasa de control general no reprimible 2 (GCN2) e inhibidor regulado por hemo (HRI), las cuales son activadas en respuesta a diversos estímulos estresantes **(Donnelly y Samali, 2013; Proud, 2005)**. Flores-Méndez en 2013 realizó un estudio en el cual expuso a células gliales de Bergmann a ligandos glutamatérgicos, evidenciando un aumento en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  dependiente del tiempo y la dosis. La segunda vía de regulación es mediante la fosforilación de factor de iniciación de la traducción 4E (eIF4E) también llamado proteína de unión 4E (4E-BPs), un complejo trimérico conformado por 4E-BP1, 4E-BP2 y 4E-BP3 regulado por la activación del complejo sensible a rapamicina (mTORC1). La fosforilación 4E-BP mediada por mTORC1 interrumpe la interacción inhibitoria de este factor permitiendo la formación de eIF4E promoviendo el inicio de la síntesis proteica **(Telleman, 2015; So y cols., 2016)**.

Por otra parte, el control de la traducción puede presentarse también durante el proceso de la elongación de la cadena polipeptídica. Esto ocurre mediante la fosforilación del factor de elongación 2 (eEF2) **(Barrera y Ortega, 2008; Horman y cols., 2002)**. Este factor está involucrado en la traslocación del peptidil-tRNA del sitio aminoacil al sitio peptidil del ribosoma. La cinasa involucrada es la del factor eucariótico de elongación (eEF2K), la cual es dependiente de calcio/calmodulina (Ca<sup>2+</sup>/CaM). Esta enzima es regulada a su vez por mTORC1, que la fosforila cerca del sitio de unión de CaM inhibiendo su función cuando es fosforilada por la proteína cinasa A (PKA), por la proteína ribosomal S6 cinasa de 70 kDa (p70<sup>S6k</sup>) y la proteína ribosomal S6 cinasa 1 de 90 kDa (p90<sup>RSK1</sup>) **(Proud, 2007)**.

En 2012, Ramírez-Islas reportó que la exposición a  $F^-$  en células gliales de Bergmann reduce la síntesis de proteínas debido a la fosforilación del factor de elongación 2 (eEF2); este efecto es dependiente de la concentración de  $F^-$  a concentraciones que no comprometen la viabilidad celular. En 2014, Flores-Méndez confirmó que la disminución en la síntesis de proteínas es el resultado de un decremento en la fase de elongación de la traducción, mediada por un aumento de la fosforilación del fosforilación de eEF2. Estos resultados demuestran que las células gliales son blanco de toxicidad de  $F^-$ .

### 1.2.3.2 Modificaciones post-traduccionales

Mientras que la transcripción del DNA y los eventos de expresión de proteínas requieren horas para reflejar los efectos sobre la actividad del transportador, las modificaciones postraduccionales pueden ocurrir en minutos. Es probable que una combinación de todos estos mecanismos de regulación sea esencial para una eficiente actividad de captura de Glu **(Olivares-Bañuelos y cols., 2019)**.

Por otra parte, la fosforilación de los transportadores o de algunas proteínas accesorias es un evento que está implicado en la modulación del tráfico de dichos transportadores **(Guillet y cols., 2005)**.

Un estudio realizado por Davis en 1998 demuestra que EAAC1 se inserta en la membrana plasmática de las células del glioma C6 después de la activación de la proteína cinasa C (PKC). Posteriormente, en 2003, González obtuvo evidencia que  $PKC\alpha$  regula la redistribución de EAAC1, mientras que la proteína cinasa  $\epsilon$  ( $PKC\epsilon$ ) regula la eficiencia catalítica de EAAC1. Estas observaciones indican que la activación de la PKC aumenta la captura mediada por EAAC1 al aumentar el número de moléculas transportadoras presentes en la membrana celular y / o al alterar la eficiencia catalítica del transportador.

Además el dibutiril adenosín monofosfato cíclico (dbAMPc), que es un análogo no metabolizable del adenosín monofosfato cíclico (AMPc), aumenta el transporte de Glu en cultivos de astrocitos cuando se realizan exposiciones largas **(Hertz y cols., 1978)**, incrementa los niveles de mRNA y proteína de EAAT1 a través de la vía de señalización de AMPc, en un efecto bloqueado por inhibidores de PKA dependiente de AMPc **(Schlag y cols., 1997)**.

Existen dos tipos de modificaciones postraduccionales de los transportadores de Glu que pueden modular su funcionalidad: la fosforilación y la glicosilación. La fosforilación del subtipo EAAT2 a través de PKC aumenta la capacidad de transporte, caracterizado por un aumento en la  $V_{max}$  y ausencia de variación en la  $K_m$  (**Casado y cols., 1993**). Sin embargo, la fosforilación del subtipo EAAT1 a través de PKC inhibe la actividad del transportador (**Conradt y cols., Stoffel, 1995**). El sitio de fosforilación se encuentra en el residuo serina 113 de EAAT2.

Debido a la importancia que tienen estos transportadores para la captura de Glu, y este a su vez como regulador metabólico, la regulación de EAAC1/EAAT3 podría ser un blanco potencial para la acción de compuestos nefrotóxicos tales como el  $F^-$ .

### 1.3 Sistema renal

Para mantener la homeostasis, el riñón lleva a cabo tres procesos básicos: la filtración glomerular, la reabsorción tubular, y la secreción tubular. La reabsorción tubular consiste en el transporte de sustancias de lumen tubular al torrente sanguíneo, las sustancias reabsorbidas son agua, iones ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ ), metabolitos (glucosa y aminoácidos) algunos productos de desecho (urea y ácido úrico) (**Rhoades y Bell, 2009**). Adicionalmente, este sistema regula la presión arterial, la producción de hormonas y participa en el equilibrio ácido-base (**Guyton y Hall, 2011; Henry y cols., 2007**).

#### 1.3.1 Anatomía del riñón

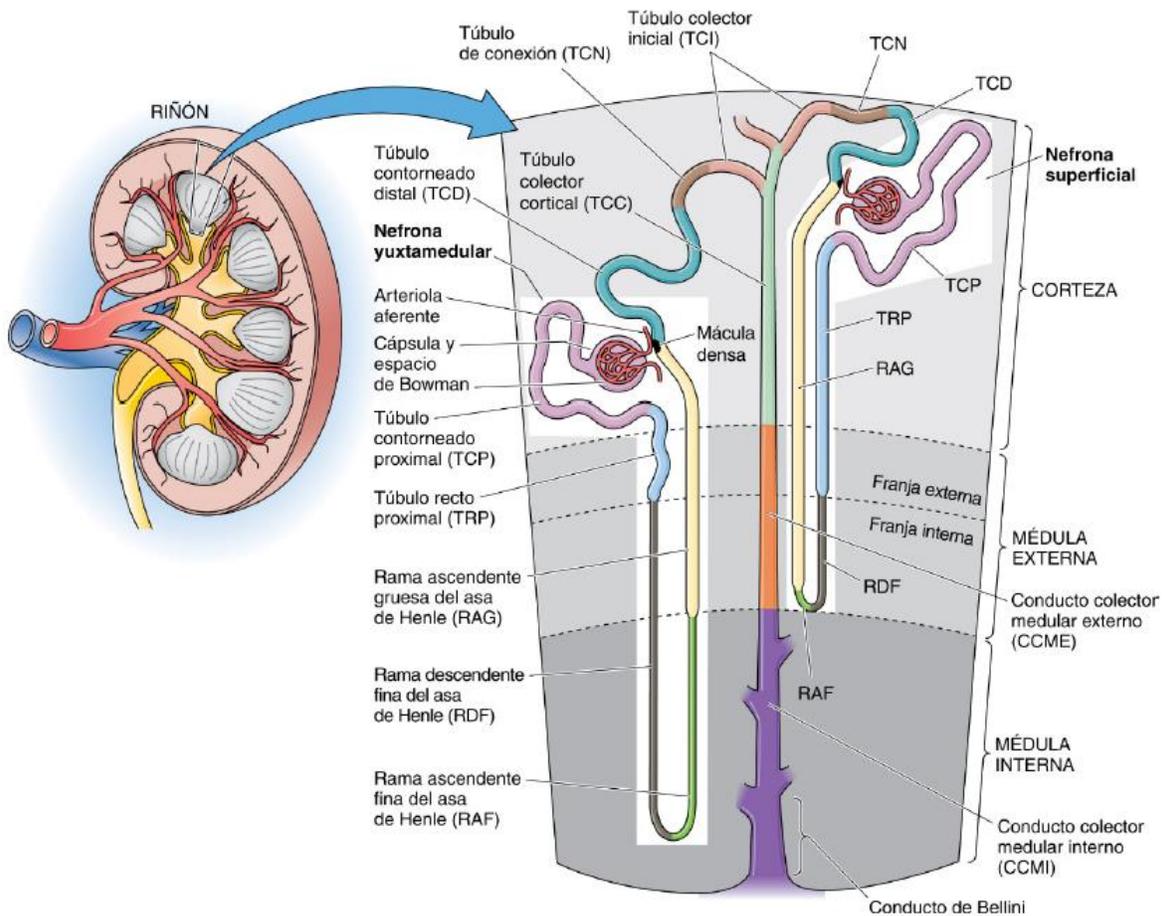
Los riñones son dos órganos retroperitoneales situados en la parte posterior del abdomen. Posee dos capas básicas, la corteza (región externa) y la médula (región interna). La granularidad de la corteza se debe a la presencia de glomérulos y a un gran número de estructuras epiteliales contorneadas en forma de túbulos. La médula carece de glomérulos y consta de túbulos dispuestos y vasos sanguíneos (**Boron y Boulpaep, 2017**).

##### 1.3.1.1 Nefrona: Unidad funcional del riñón

La unidad funcional del riñón es la nefrona (Figura 6), cada riñón humano contiene aproximadamente de 800 000 a 1 200 000 nefronas. Cada nefrona consta de un glomérulo y un túbulo. El glomérulo es un conglomerado de vasos sanguíneos a partir del cual se origina el filtrado plasmático. El túbulo es una estructura epitelial que consta de numerosas subdivisiones que convierten el filtrado en orina. Estas dos estructuras, vascular y epitelial,

se unen en el extremo del epitelio del túbulo que recibe el nombre de cápsula de Bowman, donde el filtrado pasa desde el sistema vascular al sistema tubular (**Boron y Boulpaep, 2017, Guyton y Hall 2011**).

El resto de la nefrona consta de subdivisiones del túbulo. Los elementos epiteliales de la nefrona son la cápsula de Bowman, el túbulo proximal, la rama descendente fina y ascendente fina del asa de Henle, la rama ascendente gruesa del asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el túbulo de conexión. Las nefronas superficiales tienen asas cortas que se extienden hasta el límite entre la médula interna y la externa. Las nefronas yuxtamedulares son las encargadas de la producción de orina concentrada, tienen asas largas que se extienden hasta la punta de la médula (**Boron y Boulpaep, 2017**).

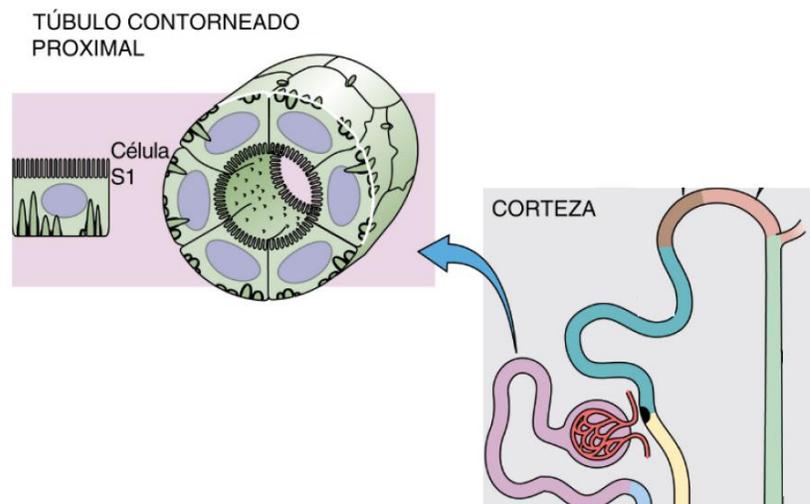


**Figura 6. Estructura de la nefrona**

### 1.3.1.2 Túbulo contorneado proximal

Las células epiteliales del túbulo proximal constituyen la primera porción del túbulo renal y es donde se inicia la reabsorción tienen gran actividad metabólica por lo que constan de abundantes mitocondrias que sostienen procesos de transporte activo (**Casarett y Doulls´s, 2008**), Consta de 3 segmentos: S1 (contorneado), S2 (recto) y S3 (unión con el asa de Henle). Este borde en cepillo es abundante en S1 y va disminuyendo a lo largo del túbulo proximal (**Guyton y Hall 2011**).

En su parte apical (luminal), las células del túbulo proximal poseen microvellosidades muy desarrolladas denominadas borde en cepillo, con lo cual aumenta su superficie de contacto (Figura 7), permitiendo reabsorber la mayor cantidad del líquido filtrado y devolverlo a circulación, de no ser así, el riñón excretaría el 100 % del volumen de plasma sanguíneo en menos de media hora. La mayor parte de la reabsorción del filtrado glomerular tiene lugar en el túbulo proximal, que reabsorbe,  $\text{NaHCO}_3$ , nutrimentos (glucosa y aminoácidos), iones divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HPO}_4^{-2}$  y  $\text{SO}_4^{-2}$ ), iones monovalentes ( $\approx 70\%$  de  $\text{Na}^+$ , la mayor parte de  $\text{K}^+$ ) y agua (**Boron y Boulpaep, 2017**) Además, el túbulo proximal es un sitio importante de gluconeogénesis y como órgano endocrino, libera eritropoyetina y renina a la circulación sistémica dando lugar a una gran cantidad de hormonas localmente activas, como dopamina, endotelina, renina, angiotensina II, entre otras (**Curthoys y Orson, 2014**).



**Figura 7. Túbulo contorneado proximal**

### 1.3.2 Transportadores de iones en el riñón

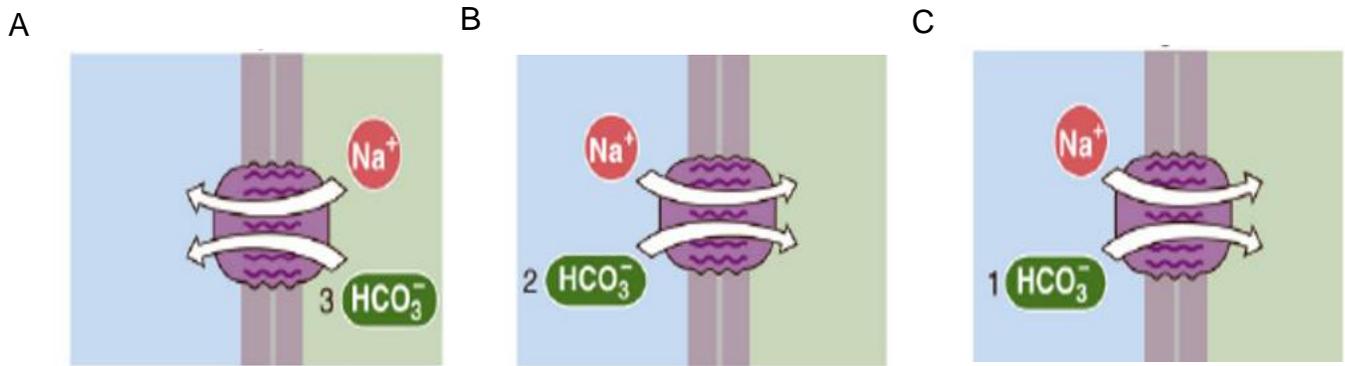
Existen dos clases de transportadores activos secundarios presentes en riñón: los cotransportadores (o simportadores) y los intercambiadores (o antiportadores). Los cotransportadores desplazan tanto al soluto impulsor (cuyo gradiente proporciona la energía) y el soluto impulsado (el que va en contra de gradiente) en el mismo sentido. Los antiportadores desplazan a ambos solutos en sentido opuesto (**Boron y Boulpaep, 2017**).

#### 1.3.2.1 Cotransportadores de solutos orgánicos impulsados por $\text{Na}^+$

En el túbulo proximal y el intestino delgado existen varios cotransportadores de  $\text{Na}^+$  funcionalmente similares, pero estructuralmente distintos. Los transportadores de aminoácidos impulsados por  $\text{Na}^+$  pertenecen a las familias SLC6 y SLC38.

##### 1.3.2.1.1 Cotransportadores de $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$

Los cotransportadores de  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBC) pertenecen a la familia SLC4 y son transportadores ácido-base. En las membranas basolaterales de algunas células epiteliales, los NBC electrógenos (NBCe1/e2) actúan con una estequiometría  $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-$  de 1:3 (Figura 8A) y están encargados de mediar la absorción de  $\text{HCO}_3^-$  a la sangre. En la mayoría de las células, estos mismos dos transportadores actúan con una estequiometría de 1:2 y median la entrada electrógena de  $\text{HCO}_3^-$  (Figura 8B). Por último, los NBC electroneutros (NBCn1/n2) actúan con una estequiometría  $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-$  de 1:1 (Figura 8C) y también median la entrada de  $\text{HCO}_3^-$ . En estos dos últimos casos, el gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  impulsa la acumulación contra gradiente de  $\text{HCO}_3^-$ , importante para la secreción epitelial de  $\text{HCO}_3^-$  y para la regulación del pH intracelular (**Boron y Boulpaep, 2017**).



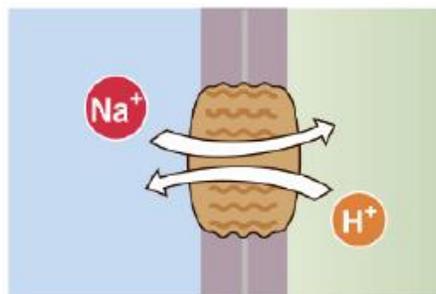
**Figura 8. Cotransportadores NBC**

### 1.3.2.2 Cotransportadores impulsados por H<sup>+</sup>

Aunque la mayoría de los cotransportadores conocidos en las células animales están impulsados por la entrada de Na<sup>+</sup>, algunos son impulsados por la entrada de gradiente de H<sup>+</sup>.

#### 1.3.2.2.1 Intercambiador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>

Los intercambiadores de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE) pertenecientes a la familia SLC9, median el intercambio 1:1 de Na<sup>+</sup> extracelular por H<sup>+</sup> intracelular a través de la membrana plasmática (Figura 9). El NHE es ubicuo por lo que prácticamente todas las células del cuerpo poseen en su membrana plasmática uno o más de los nueve NHE conocidos, está presente en células no epiteliales y en las membranas basolaterales de los epitelios. Gracias a la acción de los NHE, el gradiente electroquímico entrante de Na<sup>+</sup> impulsa la expulsión contra gradiente de H<sup>+</sup> desde la célula y eleva el pH intracelular (**Boron y Boulpaep, 2017**). Además de H<sup>+</sup>, NHE3 también transporta directamente NH<sub>4</sub><sup>+</sup> formado en la célula a la luz tubular. (**Curthoys y Moe, 2014**).



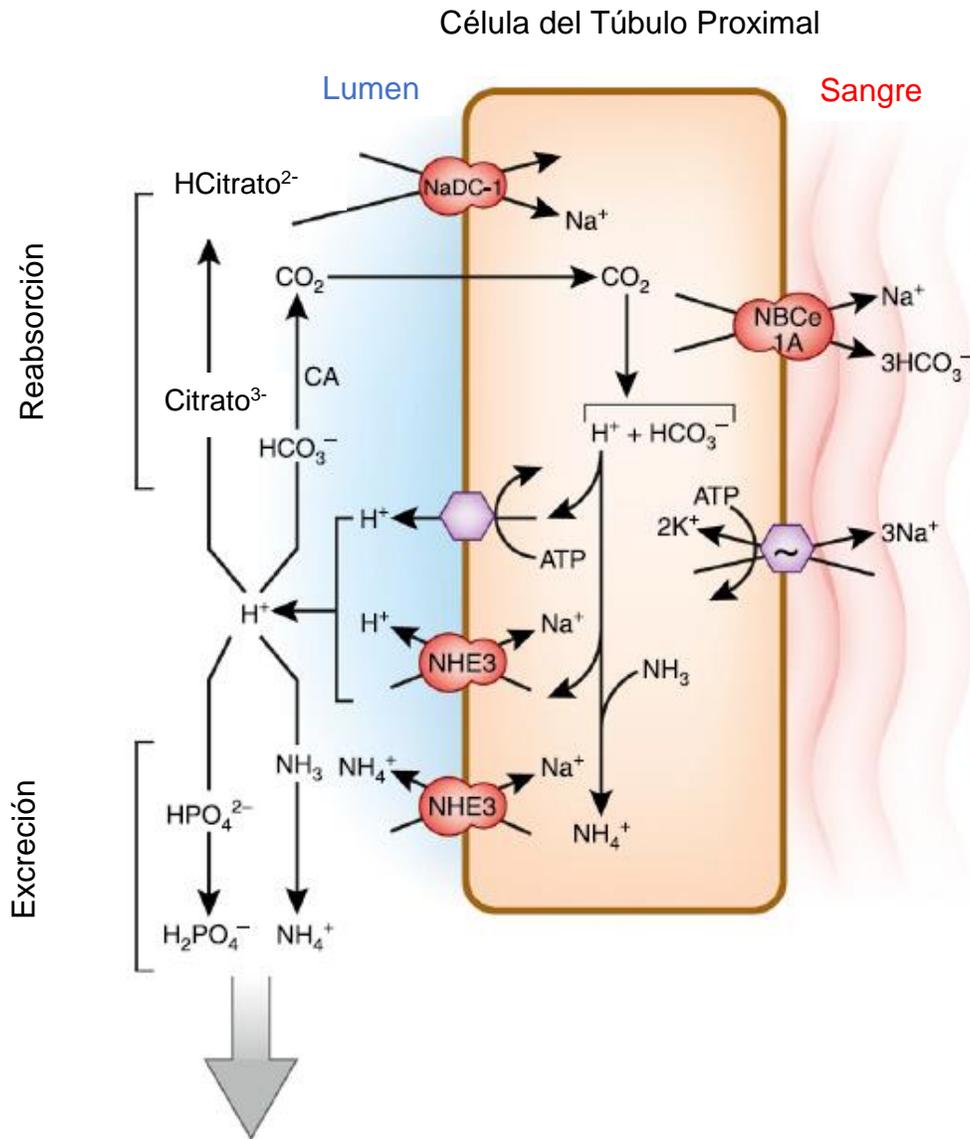
**Figura 9. Intercambiador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>**

### 1.3.3 Regulación renal del equilibrio ácido-base

Los riñones intervienen regulando el equilibrio ácido-base (Figura 10) mediante el ajuste de la cantidad de  $\text{HCO}_3^-$  que se excreta o es reabsorbido. La reabsorción de  $\text{HCO}_3^-$  es equivalente a la excreción de  $\text{H}^+$  libre. Todo el  $\text{HCO}_3^-$  en el suero se filtra a medida que pasa a través del glomérulo, la reabsorción de  $\text{HCO}_3^-$  se realiza principalmente en el túbulo proximal (TP). El  $\text{H}_2\text{O}$  dentro de la célula tubular distal se disocia en  $\text{H}^+$  e hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ); en presencia de anhidrasa carbónica, el  $\text{OH}^-$  se combina con  $\text{CO}_2$  formando  $\text{HCO}_3^-$ , que regresa al capilar peritubular, mientras que el  $\text{H}^+$  se secreta hacia la luz tubular y se une con el  $\text{HCO}_3^-$  filtrado libremente formando  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , que también se reabsorben (**Lewis, 2018**).

En el metabolismo de las proteínas, y, en menor grado de los lípidos, se produce 1-1.5 mEq/kg de peso de ácidos orgánicos (Ácido sulfúrico:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y ácido fosfórico:  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) que salen de la célula. En el fluido extracelular (ECF) se disocian y el  $\text{H}^+$  es titulado por el  $\text{HCO}_3^-$ . El  $\text{CO}_2$  generado es eliminado por la ventilación. El  $\text{HCO}_3^-$  consumido es regenerado por el riñón (**Jaramillo y Rodríguez, 2006**). Este proceso se realiza secretando hidrogeniones a lo largo del túbulo, mecanismo por el que secuencialmente: a) del 70 al 90 % de  $\text{HCO}_3^-$  es reabsorbido mediante del transportador NBCe1A, y b) se regenera el  $\text{HCO}_3^-$  consumido en el ECF titulando aniones de ácidos débiles y excretando  $\text{NH}_4^+$  a través del transportador NHE3 (**Guyton y Hall, 2011, Curthoys y Moe, 2014**).

Adicionalmente, la membrana apical expresa una ATPasa que intercambia  $\text{H}^+ / \text{K}^+$  pero que funciona especialmente en la reabsorción de  $\text{K}^+$ . Su activación es importante en la contribución del mantenimiento de la alcalosis metabólica en la depleción del  $\text{K}^+$ . En esta etapa el amortiguador urinario más importante es el  $\text{NH}_4^+$ , producido como  $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+$ . El amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) se sintetiza en las mitocondrias del TP, sobre todo por desaminación de la Gln (**Karet, 2009**).

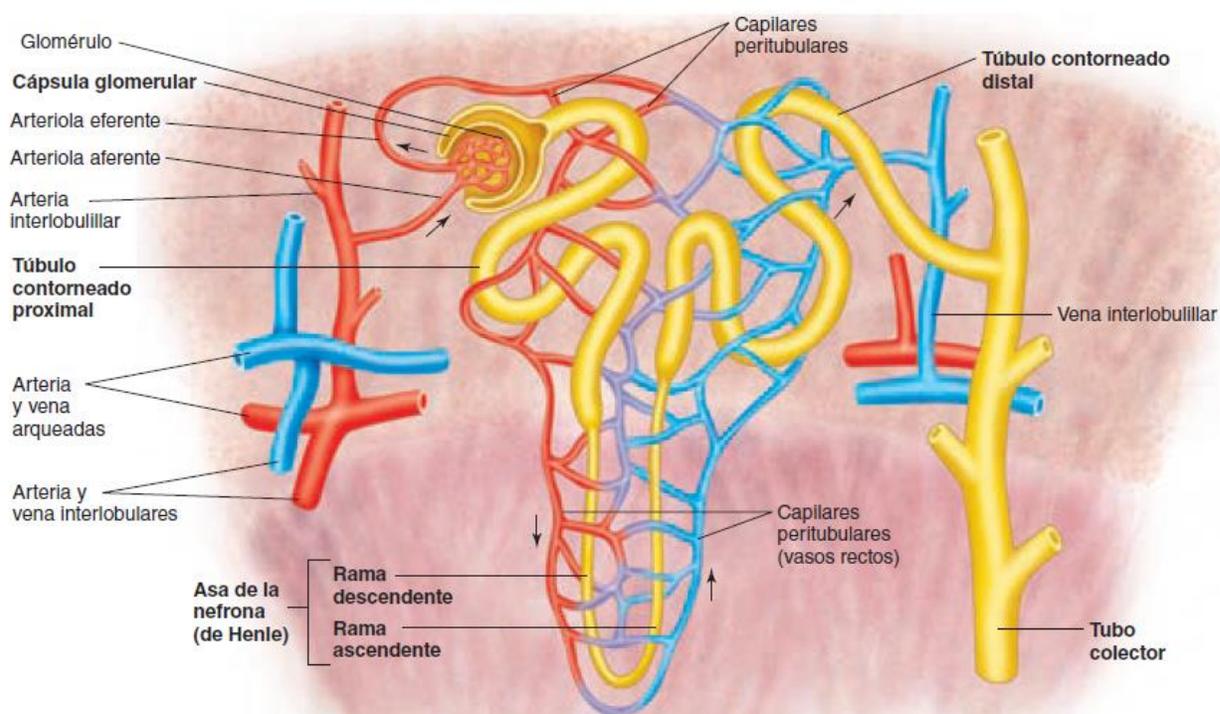


**Figura 10. Regulación del equilibrio ácido-base en el riñón**

#### 1.3.4 Circulación renal

La sangre arterial ingresa al riñón a través de la arteria renal, la cual se divide en arterias interlobulares que pasan entre las pirámides a través de las columnas renales (Figura 11). Las arterias arqueadas nacen en las arterias interlobulares en el límite entre la corteza y la médula. Varias arterias interlobulillares se irradian desde las arterias arqueadas hacia la corteza para a su vez subdividirse en numerosas arteriolas aferentes, que son

microscópicas. Las arteriolas aferentes liberan sangre en los glomérulos. La sangre que permanece en un glomérulo lo abandona a través de la arteriola eferente, la cual libera la sangre en los capilares peritubulares que circundan los túbulos renales. Desde los capilares peritubulares, la sangre es drenada por venas que siguen un recorrido paralelo al de las arterias ya descritas. Tales venas reciben los nombres de venas interlobulillares, venas arqueadas y venas interlobulares (de acuerdo con la dirección de la circulación venosa o de retorno). Las venas interlobulares descienden entre las pirámides, convergen y dejan el riñón como una sola vena renal, que se vacía en la vena cava inferior (**Fox, 2011**).



**Figura 11. Túbulos y vasos sanguíneos de la nefrona**

### 1.3.5 Susceptibilidad del riñón a daño tóxico

Aunque los riñones suponen <math><0.5\%</math> del peso corporal total, reciben aproximadamente el 20 % del gasto cardiaco. Este flujo sanguíneo tan alto le suministra el plasma sanguíneo necesario para formar un ultrafiltrado en los glomérulos (**Fox, 2011**), en consecuencia, cualquier sustancia en la circulación sistémica llegará a estos órganos en cantidades relativamente altas, por lo tanto, una concentración no tóxica de una sustancia en plasma

puede serlo para el riñón (**Jaramillo y Rodríguez, 2006**). Muchos nefrotóxicos (moléculas que causan afectación renal caracterizada por alteraciones funcionales o estructurales) tienen sus principales efectos en segmentos o regiones específicos de la nefrona, tal es el caso del túbulo proximal, este segmento es el sitio más común donde los tóxicos inducen daño, por ejemplo, antibióticos, antineoplásicos, hidrocarburos, halogenados, micotoxinas y metales pesados (**Cassaret y Doulls, 2008**). Dado que el túbulo proximal es la primera región tubular de la nefrona que recibe el filtrado glomerular, elevadas concentraciones de nefrotóxicos pueden encontrarse presentes en esta sección. En ocasiones, después de la reabsorción tubular, la absorción fraccional de agua excede a la del tóxico, dando lugar a un aumento en la concentración luminal del mismo. Una sustancia nefrotóxica puede ejercer su efecto sobre la célula renal de forma directa (por unión a la membrana plasmática o por captura celular) o de forma indirecta (mediante la liberación de mediadores vasoactivos y producción de isquemia). El daño celular se manifiesta en alteraciones morfológicas y funcionales de las células renales. Si esto ocurre se ponen de manifiesto efectos principalmente sobre la función lisosomal y mitocondrial.

La mitocondria de la célula tubular renal es el sitio de acción de muchas nefrotoxinas, las cuales interfieren con la fosforilación oxidativa y la consiguiente producción de ATP. Otro posible mecanismo de nefrotoxicidad es la formación de metabolitos intracelulares altamente reactivos, como los radicales libres de oxígeno generados durante las reacciones oxidantes (**López y cols., 1995**).

Diversas patologías se han relacionado con la localización o expresión del transporte de proteínas, por ejemplo, el síndrome hereditario de Fanconi, caracterizado por la pérdida de ácido úrico, glucosa, aminoácidos, fosfatos y bicarbonato en orina. Otro ejemplo es la enfermedad de Dent que afecta la función tubular proximal, induciendo hipercalciuria, proteinuria, nefrolitiasis por calcio, nefro-calcinosis debida a alteración de canales endosomales (**Dimke y cols, 2009**).

## 1.4 Fluoruro

### 1.4.1 Características generales del F<sup>-</sup>

El Flúor es un elemento que pertenece a la familia de los halógenos (Grupo XVII de la tabla periódica). Se presenta con el símbolo de F, tiene un número atómico de 9, masa atómica

de 19.99 g/mol y un estado de oxidación de -1. El F es un gas altamente irritante y reactivo en su forma elemental ( $F_2$ ) por lo que se combina fácilmente con la mayoría de otros elementos (**Butter, 1985**) formando compuestos orgánicos e inorgánicos. En solución acuosa el F adquiere una carga negativa presentándose como ion Fluoruro ( $F^-$ ) (**Fawell J. y cols., 2006; Jha y cols., 2011**).

#### 1.4.2 Fuentes de exposición a $F^-$

El F es el décimo tercer elemento más abundante en la corteza terrestre, constituyendo el 0.06 - 0.09 % de la misma (**Annual Report of the EFSA Journal, 2014; Fawell J., 2006**), se encuentra ampliamente distribuido en los minerales de la biosfera entre los cuales destacan: la fluorita ( $CaF_2$ ), la criolita ( $Na_3AlF_6$ ) y la fluoroapatita ( $Ca_5(PO_4)_3F$ ) (**ATDSR, 2003**). El F es liberado al ambiente a través de la disolución de estos minerales, o bien mediante emisiones volcánicas en forma de gas como Fluoruro de hidrógeno (HF). Estos compuestos pueden encontrarse en agua o suelo, depositándose finalmente en el subsuelo y en aguas subterráneas (**Edmunds & Smedley, 2013**) donde pueden entrar en contacto con el humano. Adicionalmente, el  $F^-$  puede ser producto de actividades antropogénicas de la industria de vidrio, acero, plásticos, quema de carbón, la fabricación de ladrillos, manufactura de abono de fosfatos, refinación del petróleo, por la fabricación o uso de medicamentos, anestésicos, productos dentífricos, así como la fluoración de los suministros de agua potable (**Fawell J. y cols., 2006; Jha y cols., 2011; Whitford, 1994**).

#### 1.4.3 $F^-$ en México

El agua de bebida es considerada como principal fuente de exposición a  $F^-$ , por lo que en 1984, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció la concentración de 1.5 mg/L como el límite máximo permisible de  $F^-$  en agua de consumo humano (**Fawell J. y cols., 2006**), no obstante, se estima que más de 200 millones de personas en el mundo se encuentran expuestas a concentraciones altas de  $F^-$  ( $>1.5$  mg/L) a través del agua de bebida. En México, la NOM-127-SSA1-1994 establece como límite máximo permisible de  $F^-$  a concentración de 1.5 mg/L para el agua de consumo humano. La comisión Nacional del Agua (CONAGUA) en el 2018 reportó que el 53.6% del agua suministrada a la población es extraída de los acuíferos subterráneos (**CONAGUA, 2018**) y se ha referido que en diversas regiones, los niveles de  $F^-$  exceden por mucho los límites máximos permisibles y su

presencia es un problema de salud pública, sobre todo en la región centro-norte del país en estados como Chihuahua, Sonora, Aguascalientes, San Luis Potosí, Durango, Jalisco e Hidalgo (**González-Horta y cols., 2015; Grijalva-Haro y cols., 2001**).

#### 1.4.4 Toxicocinética de F<sup>-</sup>

La toxicocinética del F<sup>-</sup> es dependiente del pH. En condiciones ácidas, se presenta como HF (Fluoruro de hidrógeno) un ácido débil con un pKa de 3.4, es decir, a pH de 3.4 el 50 % del F se encuentra en la forma HF y el otro 50 % en forma de F<sup>-</sup>. Conforme disminuye el pH, la concentración de HF incrementa y su absorción es mayor en órganos como el estómago, y a medida que incrementa el pH, incrementa la concentración de F<sup>-</sup> por lo que la absorción en compartimentos alcalinos es mayor (**Buzalaf y Whitford, 2011**).

##### 1.4.4.1 Absorción

La principal vía de absorción del F<sup>-</sup> es la oral, posee un tiempo de vida media de absorción de 30 minutos. Una vez ingerido, aproximadamente el 40 % del F<sup>-</sup> ingerido se absorbe en el estómago como HF, el porcentaje restante se absorbe en el tracto gastrointestinal (TGI). En relación con la cantidad de F ingerido, los cationes bio o trivalentes como el Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y Al<sup>3+</sup> pueden disminuir su absorción en el TGI al formar compuestos insolubles (**Buzalaf y Whitford, 2011; Jha y cols., 2011; Whitford, 1994**).

##### 1.4.4.2 Distribución

Después de la absorción, el F<sup>-</sup> se distribuye rápidamente en el organismo siendo el plasma el compartimiento central para su distribución, alcanzando la máxima concentración del ion entre los 20-60 minutos después de ser ingerido (**Whitford, 1994**). En el plasma, el F<sup>-</sup> se une a las proteínas plasmáticas y se excreta fácilmente por vía urinaria, pero cuando se encuentra en forma de HF se reabsorbe cerca de un 35 - 45 % y regresa a circulación sistémica (**Jha y cols., 2011**) y se almacena en los tejidos ricos en calcio, como los dientes y los huesos (**Whitford, 1994**).

##### 1.4.4.3 Eliminación

La principal vía de excreción del F<sup>-</sup> es la renal, en donde se remueve del organismo del 35 - 70 % de su ingesta en adultos; esta diferencia es dependiente del pH (**Whitford, 1994**).

Por otro lado, el F<sup>-</sup> en heces corresponde a la fracción que no se absorbió (< 10 %) debido en gran parte a concentraciones elevadas de cationes bi o trivalentes (**Buzalaf y Whitford, 2011**). Aproximadamente, el 1 % del F<sup>-</sup> es excretado en sudor, saliva y leche materna.

#### 1.4.5 Efectos a la salud por exposición a F<sup>-</sup>

Los efectos nocivos a la salud por exposición a F<sup>-</sup> son diversos. Debido a que el primer órgano afectado por la exposición aguda es el estómago, la toxicidad sistémica clínica comienza con signos y síntomas gástricos, que van desde náuseas hasta dolor abdominal, gastroenteritis hemorrágica, vómitos y diarrea (**Whitford, 2011; Zohoori y cols., 2017**).

La exposición crónica al F<sup>-</sup> puede conducir a trastornos locales del tejido, conocidos como fluorosis, en esta afección, el F<sup>-</sup> se une a Ca<sup>2+</sup> ocasionando la hipomineralización del esmalte por aumento de la porosidad dental causada por una ingesta de F<sup>-</sup> superior a 0.15 mg / kg / día (**NRC 2006; García Montalvo y cols., 2009**) conocida como fluorosis dental. Se estima que alrededor de 200 millones de personas de 25 países a nivel mundial están en riesgo de padecer esta enfermedad (**Ayoob y Gupta, 2006**). Otra enfermedad es la fluorosis esquelética, caracterizada por un incremento en la densidad y masa ósea provocando cambios en la estructura de los huesos, haciéndolos extremadamente frágiles y quebradizos.

Cambios metabólicos, funcionales y estructurales han sido documentados en tejidos blandos, como tiroides (**Xu y cols., 2012**), timo (**Chen y cols., 2011**), cerebro (**Zhang y cols., 2016**), corazón (**Ma y cols., 2012**), hígado (**Perumal y cols., 2013**), bazo (**Kuang y cols., 2016**), tracto gastrointestinal (**Chauhan y cols., 2011**), amígdala cecal (**Liu y cols., 2013**), bolsa de Fabricius (**Chen y cols., 2009**), órganos reproductivos (**Sarkar y cols., 2006**) y riñón (**Guan y cols., 2000**); sin embargo, dado que este último está relacionado con la excreción y retención de F<sup>-</sup>, el riñón es bastante sensible a la toxicidad inducida por este ion (**Bouaziz y cols., 2007**).

Adicionalmente se han reportado efectos neurológicos como disminución de la inteligencia de los niños y disminución de la tasa de nacimientos por efectos reproductivos (**ATDSR, 2003; Cárdenas-González y cols., 2016; Zhou y cols., 2013**). Asimismo, la exposición crónica al F<sup>-</sup> afecta a las células de los tejidos blandos, como los riñones (**ATDSR, 2003; NRC 2006**).

La toxicidad severa del  $F^-$  puede resultar en depresión vasomotora central, cardiotoxicidad y en falla multiorgánica. La muerte generalmente resulta de parálisis respiratoria, disritmia o insuficiencia cardíaca **(Zohoori y cols., 2017)**.

#### 1.4.5.1 $F^-$ y acidosis tubular

La acidosis tubular renal (ATR) se caracteriza por una excreción renal defectuosa de ácidos, algunas formas de esta enfermedad tienen origen hereditario por mutaciones en los genes que codifican los transportadores o canales iónicos que conforman las vías de transporte de  $Na^+$ ,  $HCO_3^-$  y  $H^+$  en los segmentos tubulares de la nefrona. Por otra parte, la exposición a algunos xenobióticos puede desencadenar la aparición de la ATR. El papel de la exposición a contaminantes ambientales, como el  $F^-$ , sobre el desarrollo de estos tipos de enfermedades renales ha sido poco estudiado. Rendon-Rojas en 2012 detectó una disminución significativa de la concentración plasmática de bicarbonato en animales expuestos a 15 y 50 ppm, indicando que este ion puede alterar el equilibrio ácido-base.

#### 1.4.6 Efectos celulares del $F^-$

El  $F^-$  muestra diversos efectos celulares que dependen del tiempo, concentración y tipo celular afectado. El principal efecto tóxico del  $F^-$  en las células se debe a su interacción con enzimas. En la mayoría de los casos actúa como un inhibidor enzimático reversible que interfiere con la actividad enzimática de al menos 80 proteínas, tal es el caso de enolasas, fosfoglucomutasas, fosfatasas, piruvato cinasa entre otras **(Landis, 2005; García-Montalvo y cols., 2009)**, por otra parte, los iones  $F^-$  ocasionalmente pueden estimular la actividad enzimática.

Los mecanismos dependen del tipo de enzima afectada **(Adamek y cols., 2005)**. El  $F^-$  a nivel micromolar se considera un agente anabólico eficaz, ya que promueve la proliferación celular, mientras que a concentraciones milimolares inhiben diversas enzimas tanto *in vivo* como *in vitro* **(Mendoza-Schulz y cols., 2009)**.

Se ha sugerido que el  $F^-$  inhibe la síntesis y / o secreción de proteínas, y que influye en distintas vías de señalización implicadas en la proliferación y la apoptosis activada por mitógenos (MAPK), p53, la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear kappa B (NF-kB) **(Karube, 2009)** o bien intervenir en tráfico y reciclamiento vesicular sobre proteínas transportadoras.

En las últimas décadas, se demostró que un consumo excesivo de F<sup>-</sup> tanto en poblaciones endémicas como en animales de experimentación induce estrés oxidante en sus tejidos, particularmente en células ricas en mitocondrias como las del hígado, páncreas y riñón **(Dabrowska, 2004; Agalakova y Gusev, 2012)**, dicho efecto está relacionado con el aumento en la generación del anión superóxido de (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) **(Izquierdo-Vega y cols., 2008)** y NO **(Liu y cols., 2003)** y en consecuencia, el aumento de las concentraciones de otras especies reactivas. También se ha demostrado que interfiere en la formación de enlaces disulfuro resultando en la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (ER) que a su vez son causante de estrés y producción de ROS. Se cree que el F<sup>-</sup> inhibe la actividad de las enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa, la catalasa y GSH **(Zhang y cols., 2007)** resultando en la producción excesiva de ROS a nivel mitocondrial.

De acuerdo con estudios realizados por Luo en 2017, la administración de 12 mg / kg de F<sup>-</sup> además de inducir daño oxidante causó degeneración y necrosis de las células tubulares e hinchazón de glomérulos consistentes con la alteración de los parámetros de la función renal, incluidos los contenidos elevados de creatinina sérica (Cr), ácido úrico (UA) en suero, nitrógeno ureico en sangre (BUN) y las actividades de N-acetil-b-D-glucosaminidasa (NAG) urinaria, lactato deshidrogenasa renal (LDH) y actividades reducidas de adenosina trifosfatasa de sodio-potasio (Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup>-ATPasa) y la fosfatasa ácida (ACP) en el riñón.

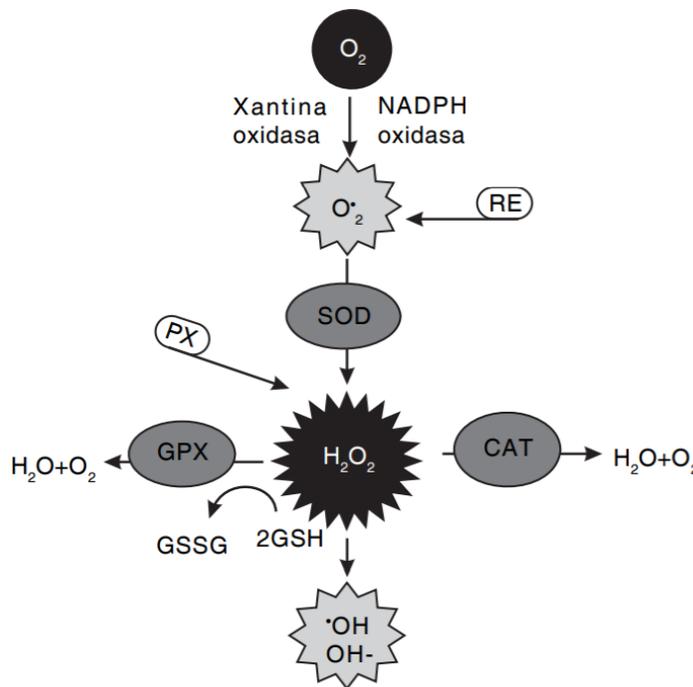
### 1.5 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas inestables al poseer una capa de electrones desapareada en el oxígeno de esta que reacciona fácilmente con otras moléculas de la célula. Las ROS son producidas como consecuencia del metabolismo aeróbico fisiológico, en embargo, alteraciones en la relación ROS - antioxidantes puede generar estrés oxidante reversible, daños en DNA, RNA y proteínas alterado las funciones celulares o bien causar la muerte de celular. Las ROS pueden ser generadas a partir de subproductos de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, enzimas extra-mitocondriales como NADPH oxidasas (NOX), Xantina oxidasa, oxido nítrico sintasa (NOS), mieloperoxidasa (MPO), citocromo P450, ciclooxigenasa (COX), lipooxigenasa y Ca<sup>2+</sup> **(Görlach y cols.,2015)**

### 1.5.1 Sistema antioxidante

Para contrarrestar el efecto nocivo de los radicales libres, los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa antioxidante que incluyen moléculas, enzimas y secuestradores químicos que previenen el daño oxidante.

Las enzimas del sistema antioxidante constituyen la primera línea de defensa celular frente al daño oxidante, las cuales actúan específicamente sobre las ROS degradándolas a moléculas menos nocivas mediante mecanismos específicos (Figura 12). El proceso inicia con la dismutación del  $O_2^-$  a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por acción de la SOD, posteriormente, la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) actúan convirtiendo el  $H_2O_2$  en  $H_2O$ . La actividad de estas enzimas debe estar en equilibrio para mantener la homeostasis celular (**Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez., 2013**).

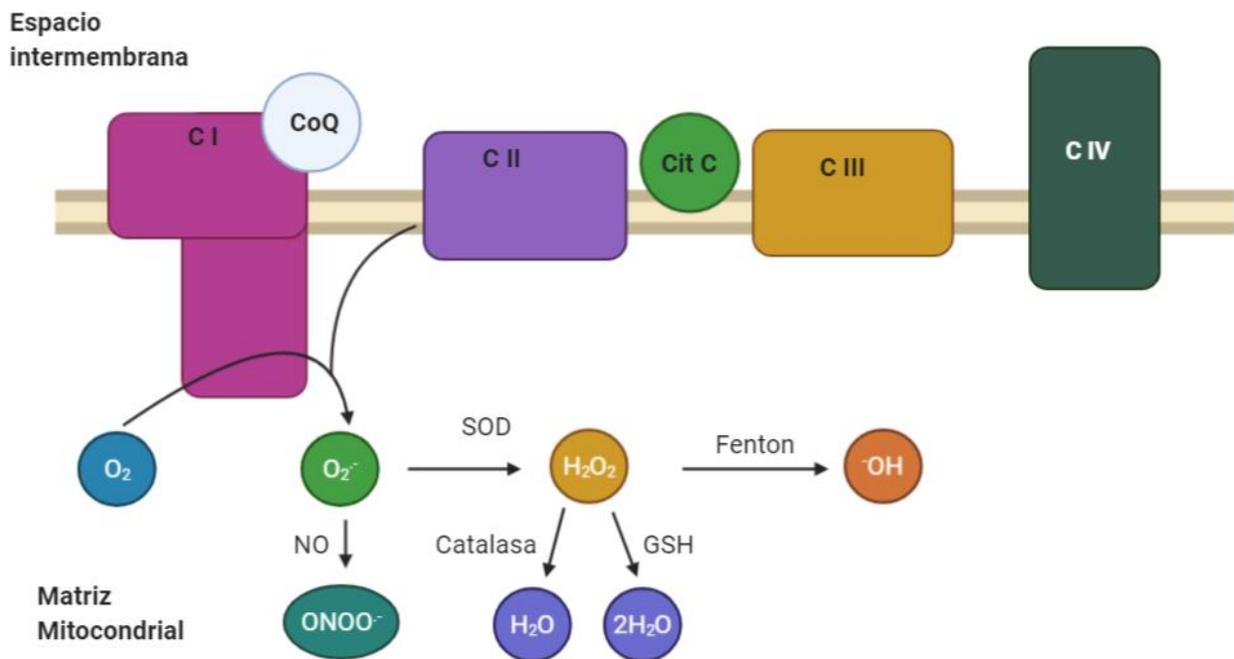


**Figura 12. Mecanismo general de producción y neutralización de ROS**

### 1.5.2 Participación de la mitocondria en la producción de ROS

Las mitocondrias son importantes para el sustento del estado redox celular, son orgánulos celulares encargados de sintetizar ATP a través de la fosforilación oxidativa; en este proceso es necesario el paso de electrones a través de complejos enzimáticos membranales en los

cuales reacciones de oxido-reducción son llevadas a cabo. Como productos secundarios de la respiración celular son generadas las ROS principalmente como consecuencia de la actividad de los complejos I y II (Figura 13) quienes al producir  $O_2^{\cdot-}$  principalmente en la matriz mitocondrial, se dismuta rápidamente en  $H_2O_2$  por acción de la superóxido dismutasa (SOD) (Gralla y Valentine., 1991). La cantidad de  $H_2O_2$  mitocondrial está en el rango de 0.1 a 2 % del flujo de electrones como  $H_2O_2$ , peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ) y radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ) (Macedo-Márquez, 2012).



**Figura 13. Producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria**

### 1.5.3 Participación del $Ca^{2+}$ en la producción de ROS

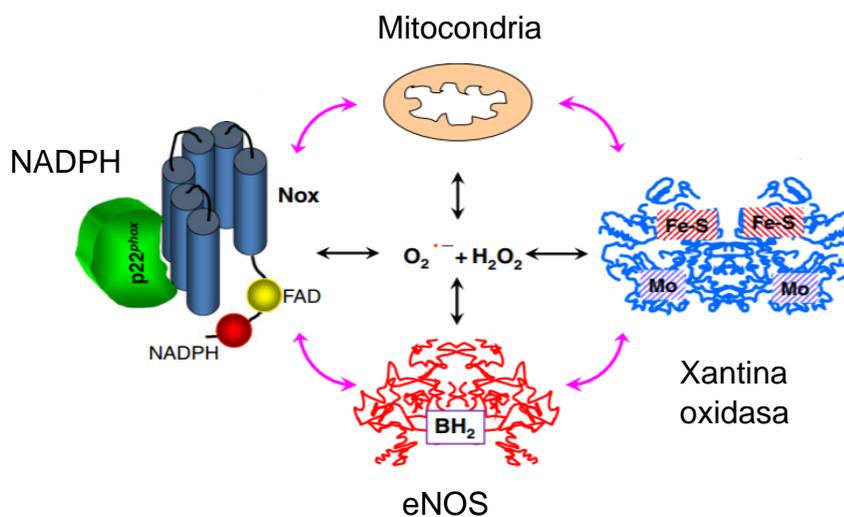
El  $Ca^{2+}$  es un segundo mensajero involucrado en la regulación de una variedad de funciones celulares, incluidas la contracción, secreción, metabolismo, expresión génica, supervivencia y muerte celular (Berridge y cols., 2012). El  $Ca^{2+}$  ingresa a la célula mediante los canales de calcio o por bombas de calcio (ATPasas). Una vez dentro de la célula, las interacciones entre ROS y la señalización de  $Ca^{2+}$  pueden considerarse bidireccionales, en donde ROS puede regular la señalización celular de  $Ca^{2+}$ , mientras que la señalización de  $Ca^{2+}$  es esencial para la producción de ROS. De tal manera, el aumento

de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activa las enzimas generadoras de ROS (**Gordeeva y cols., 2003**).

#### 1.5.4 Participación de NADPH oxidasas en la producción de ROS

Entre los mecanismos microbicidas de los neutrófilos se encuentra la producción de ROS por parte del sistema NADPH oxidasa (NOX), un complejo enzimático multi-proteico de cinco subunidades distribuidas en el citoplasma, membranas citoplasmáticas y vesículas fagocíticas. La activación del complejo enzimático consiste en la translocación de los componentes citoplasmáticos a la membrana de las vacuolas fagocíticas o a la membrana plasmática, mediada por estímulos activadores de PKC y la participación de proteínas accesorias como Rac2 (GTPasa) y RAP1 (Rasrelated protein 1A) (**Arango y cols., 2010**).

Como se mencionó en el apartado 1.5.2 las mitocondrias cumplen un papel importante en el mantenimiento del estado redox de la célula al ser el principal productor de ROS celular y a su vez ser el orgánulo con mayor cantidad de antioxidantes, de tal manera que existe una relación entre la cantidad de ROS sintetizados por las mitocondrias y por las NOX (Figura 14) por lo tanto representar un ciclo vicioso de producción de ROS en condiciones de estrés oxidante. Se ha determinado que los antioxidantes dirigidos a las mitocondrias rompen este círculo vicioso, inhibiendo la producción de ROS por las mitocondrias y reduciendo la actividad de la NADPH oxidasa (**Dikalov, 2011**).



**Figura 14. Interacción de varias fuentes de ROS**

## 1.6 Justificación

En México, un gran número de fuentes de agua de consumo humano se encuentran contaminadas por  $F^-$ , con concentraciones varias veces por encima del límite de seguridad permitido (1.5 mg / L) en la NOM. Diversos reportes *in vivo* e *in vitro* demuestran asociación entre la exposición a  $F^-$  y daños en células renales, colocando a este ion como un agente nefrotóxico, aunque se desconocen en su totalidad sus mecanismos de toxicidad.

En los últimos 30 años la incidencia y prevalencia de enfermedades renales ha ido en aumento en la población mexicana, siendo una de las diez primeras causas de muerte en la última década constituyendo un problema de salud pública. Esta patología posee diversas causas relacionadas con factores genéticos, deficientes hábitos de salud, exposición a contaminantes ambientales, entre otros. De cualquier manera, la enfermedad manifiesta una correlación lineal entre la pérdida progresiva de la función del órgano y alteraciones en los niveles de aminoácidos dando lugar a severos disturbios en el metabolismo de las proteínas y de los aminoácidos, con serias implicaciones para la salud.

El Glu es el principal neurotransmisor excitador del SNC en vertebrados y ejerce sus acciones al activar receptores membranales específicos. Además, en tejidos periféricos está implicado en diversas vías metabólicas como precursor energético, para lo que requiere de su internalización a la célula. Este proceso de entrada es dependiente de transportadores de membrana, como el EAAT3, un transportador expresado de forma ubicua en el cerebro y que ha sido identificado además en hígado, intestino y riñón. En este último órgano su ausencia se ha relacionado con disminución de la reabsorción de los aminoácidos negativos Glu y Asp.

El papel fisiológico de este transportador en el riñón no es completamente entendido aun, pero alteraciones en su función y expresión en el riñón podrían modificar la función del órgano dando lugar a un incremento de aminoácidos en orina y ser uno de los mecanismos de toxicidad renal del  $F^-$ .

Por esta razón, consideramos importante evaluar el efecto de la exposición a  $F^-$  en la función y los niveles de expresión del transportador de glutamato EAAT3 en células de riñón LLC-PK1, provenientes de túbulo proximal.

## 1.7 Hipótesis

La exposición a  $F^-$  aumentará los niveles de expresión y la actividad del transportador EAAT3 en células de riñón LLC-PK1.

## 1.8 Objetivos

### 1.8.1 Objetivo General

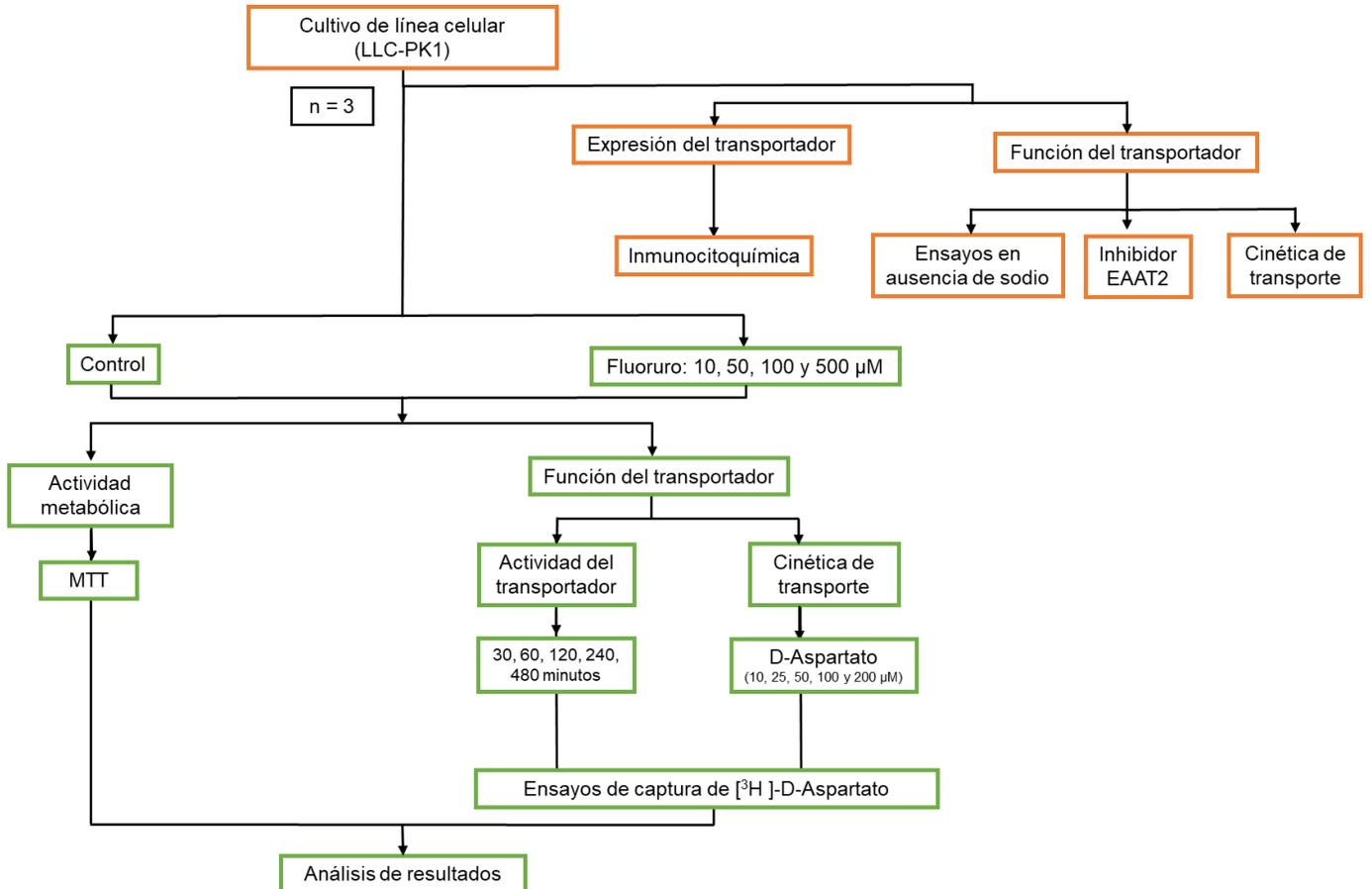
Evaluar el efecto de la exposición a  $F^-$  en los niveles de expresión y la actividad del transportador de Glu EAAT3 en células de riñón LLC-PK1.

### 1.8.2 Objetivos Particulares

- Determinar la viabilidad celular de LLC-PK1 en respuesta a exposición a  $F^-$ .
- Caracterizar la expresión y actividad del transportador EAAT3 en células de riñón LLC-PK1.
- Evaluar los efectos de la exposición a  $F^-$  en la actividad del Transportador de Aminoácidos Excitadores 3.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Estrategia Experimental



#### 2.1 Reactivos

Las células LLC-PK1 (Células porcinas derivadas de túbulo proximal de riñón) se obtuvieron de la ATCC. El anticuerpo policlonal anti-EAAT3 con número de catálogo sc-7761 se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE. UU). El anticuerpo secundario anti-cabra Alexa Fluor 488 con número de catálogo A21081 se obtuvo de Life Technologies (Carlsbad, CA, EE. UU.). El ácido D-<sup>3</sup>H]-Aspártico (actividad específica 16.5 Ci / mmol) con número de catálogo NET581001MC de Perkin Elmer (Waltham, MA, EE. UU.). El Ácido D-aspártico ((R) - (-) - Ácido aminosuccínico, ácido (R) -2-aminosuccínico) con número de catálogo A-8881, Fluoruro de Sodio (NaF) con número de catálogo 201154, Ácido Dihidrokaínico (DHK, ácido 2-carboxi-4-isopropil-3-pirrolidinacético) con número de catálogo D1064, MTT (Bromuro de

3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-2H-tetrazolio) con número de catálogo M2128 y todos los demás productos químicos fueron de grado analítico y se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.).

## 2.2 Cultivo de línea celular LLC-PK1

Se empleó la línea celular de riñón de cerdo LLC-PK1 cultivada en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1 % de antibiótico (gentamicina), las células se incubaron en condiciones estándar (95 % de humedad y 5 % de CO<sub>2</sub>). Para la resiembra, se retiró el medio de cultivo de las P100 donde crecieron y se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS (NaCl 130 mM, 20 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)). Las células fueron despegadas de la superficie de cultivo con PBS/EDTA y se incubaron 5 minutos a 37°C en condiciones estándar, una vez que las células se despegaron, el medio fue centrifugado para aislar a las células. Posteriormente se sembraron a razón de 1x10<sup>6</sup> células / mL de medio DMEM suplementado para la microplaca de 24 pocillos (mp24) y de 6x10<sup>6</sup> células / mL para el caso de la microplaca de 6 pocillos (mp6). De igual manera, las microplacas se incubaron en condiciones estándar y fueron empleadas en los experimentos hasta alcanzar una confluencia superior al 80 %.

## 2.3 Tratamientos

Para los tratamientos con F<sup>-</sup> se preparó una solución concentrada de 50 mM de NaF disuelto en agua destilada estéril. Esta se diluyó en una solución de ensayo pH 7.4 (HEPES 25 mM, NaCl 130 mM, KCl 5.4 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM, Glucosa 33.34 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM) para obtener las diferentes concentraciones de trabajo (10, 50, 100 y 500 y 1000 µM).

## 2.4 Evaluación de viabilidad celular

### 2.4.1 Principio

El ensayo colorimétrico de metabolismo de MTT [ 3-4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-bromuro de tetrazolio] se emplea para evaluar la actividad metabólica de las células. El reactivo de MTT tiene un color amarillo en disolución, en la célula el compuesto es reducido a sales de formazán (color púrpura) por enzimas oxido-reductasas dependientes de NAD(P)H, permitiendo determinar la actividad mitocondrial de las células. La cantidad de

células vivas es proporcional a la cantidad de formazán que se produce después de la escisión del anillo de tetrazolio de MTT (**Denizot & Lang, 1986**).

#### 2.4.2 Procedimiento

Monocapas confluentes de LLC-PK1 fueron expuestas por 30, 60, 120, 240 y 480 minutos y a 10, 50, 100, 500 y 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{F}^-$ , cuatro horas antes de completar el periodo de exposición, se añadieron 20  $\mu\text{L}$  del reactivo MTT (5 mg / mL) por cada 100  $\mu\text{L}$  de medio. Como control negativo las células no fueron expuestas a  $\text{F}^-$  y como control positivo las células se lisaron con Tritón X-100. Al término de la incubación se retiró el medio de las placas y los cristales de formazán formados se disolvieron en 200  $\mu\text{L}$  de DMSO. Las absorbancias se determinaron en el lector de placas EPOCH<sup>TM</sup>, BioTek. La viabilidad celular se calculó de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$[\text{Proteína } \mu\text{g/mL}] = 1.55 * (\text{Abs } 280 - (0.76 * \text{Abs } 260))$$

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{Abs } 570 - \text{Abs } 630}{[\text{Proteína}]}$$

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Viabilidad de las células expuestas}}{\text{Viabilidad de las células no expuestas}} * 100$$

El análisis estadístico se realizó comparando la viabilidad de las células no expuestas contra las células expuestas mediante la prueba ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

#### 2.5 Inmunocitoquímica

##### 2.5.1 Principio

Esta técnica es un método de análisis de las células mediante la técnica de inmunofluorescencia empleada para identificar los componentes celulares tomando como base una reacción antígeno-anticuerpo. El antígeno es la proteína o parte de la proteína que se quiere detectar; el anticuerpo primario debe ser específico para ese antígeno, y el anticuerpo secundario debe ser fluorescente o acoplado a una enzima, de manera que al

conjugarse con el anticuerpo primario permita la detección del antígeno específico presente en la célula mediante el empleo de un microscopio de fluorescencia.

## 2.5.2 Procedimiento

Con la finalidad de identificar la presencia del transportador EAAT3 en las células LLC-PK1 y estandarizar las condiciones óptimas para este ensayo se realizó una inmunocitoquímica sin exposición a  $F^-$ . Las células se sembraron en un cubreobjetos como se describió en la sección de cultivo celular y se emplearon a una confluencia aproximada del 30 %. Los cubreobjetos se lavaron con 200  $\mu$ L de PBS frío y filtrado, luego se añadieron 200  $\mu$ L de solución de paraformaldehído (PFA) al 4 % por 10 minutos seguidas de lavados con 200  $\mu$ L de PBS. Se bloquearon a los aldehídos libres en las preparaciones con Cloruro de Amonio ( $NH_4Cl$ ) 0.05 M en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente las células se lavaron con PBS, posteriormente, se permeabilizaron con 0.1 % de Tween en PBS por 15 minutos. La reactividad no específica se bloqueó con 1 % BSA, 0.1 % Glicina y 0.1% de PBS/Tween por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó el anticuerpo primario EAAT3 en solución de anticuerpo (0.01 % Trimerosal, 0.25 % BSA, 0.1% Tween-20 en TBS (Tris 200 mM, NaCl 130 mM, pH 7.6)) por 2 h a temperatura ambiente. Después se lavaron las células y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo ALEXA 488 por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Luego se añadieron 10  $\mu$ L de DAPI, se dejó incubar por 3 minutos, se realizaron 3 lavados con PBS a temperatura ambiente. A continuación, se enjuagó con agua Milli-Q y luego con etanol (por inmersión), se dejó secar al aire y se montó en un portaobjetos de vidrio, al cual se le añadieron 8  $\mu$ L de Fluorshield por cada cubreobjetos y se selló con esmalte transparente de uñas. Finalmente, las preparaciones celulares se examinaron en un microscopio de fluorescencia.

## 2.6 Determinación de proteínas

### 2.6.1 Principio

El método de Bradford se basa en la unión del colorante Azul de Coomassie G-250 a las proteínas. La forma aniónica del colorante se une a las proteínas formando una coloración azul que tiene una absorbancia máxima a 590 nm. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el

colorante libre. Este método tiene una sensibilidad de 1 a 15  $\mu\text{g}$  de proteína y pocas sustancias interfieren en su determinación.

## 2.6.2 Procedimiento

Se empleó el método de Bradford para determinar la concentración de proteínas contenida en los extractos, para ello se elaboró una curva de calibración a partir de un estándar de  $\gamma$ -globulina ( $1\mu\text{g} / \mu\text{L}$ ), las concentraciones empleadas fueron 1, 2, 3, 6 y 12  $\mu\text{g}$  de  $\gamma$ -globulina /  $\mu\text{L}$ , con las cuales se elaboró un gráfico de calibración. Para la cuantificación de proteína de los extractos se tomó un volumen pertinente de acuerdo con la cantidad de células (1 - 20  $\mu\text{L}$ , y se ajustó a 20  $\mu\text{L}$  con agua destilada) y se le añadirán 180  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford. Tanto la muestra, como las diferentes concentraciones de la curva se analizaron por duplicado. Posteriormente, la absorbancia se determinó a una longitud de onda de 630 nm en una microplaca de 96 pocillos en un lector de microplacas (DYNATECH MR 400).

## 2.7 Captura de [ $^3\text{H}$ ]-D-Aspartato

### 2.7.1 Principio

El [ $^3\text{H}$ ]-D-Aspartato es un análogo del Glu no metabolizable y transportado por EAAT3/EAAC1, permitiendo su acumulación dentro de las células y su posterior cuantificación mediante un contador de centelleo.

### 2.7.2 Procedimiento

#### 2.7.2.1 Función del transportador

Se emplearon monocapas confluentes de células LLC-PK1 sembradas en multipozos y se trataron a concentraciones de 10, 50, 100, 500 y 1000  $\mu\text{M}$  por 30, 60, 120, 240 y 480 minutos en solución de ensayo [pH=7.4, 25 mM (HEPES 25 mM, 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.8  $\text{MgCl}_2$ , 33.3 mM glucosa y 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )]. Después de los tiempos de exposición se aspiró la solución de ensayo y se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de la solución de captura (0.8  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]-D-Aspartato) por 30 minutos a temperatura ambiente. La solución radioactiva se removió mediante aspiración, posteriormente, las monocapas se lavaron con solución de ensayo fría ( $4^\circ\text{C}$ ) y posteriormente solubilizadas y lisadas con 250  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 M por 2 horas. Se empleó una alícuota de los lisados para realizar la cuantificación de

proteínas por el método de Bradford y se determinó la radioactividad incorporada en las células mediante un contador de líquido de centelleo Tri-Carb 2910 TR.

#### 2.7.2.2 Cinética de transporte

Para evaluar de la cinética de transporte se empleó solución de ensayo con diferentes concentraciones de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato (10, 25, 50, 100 y 200 μM). En los experimentos para determinar el mecanismo molecular se empleó solución de ensayo libre de Na<sup>+</sup> por lo que el NaCl se reemplazó con Cloruro de Colina y se siguió el procedimiento antes descrito para la función del transportador.

#### 2.8 Análisis Estadístico

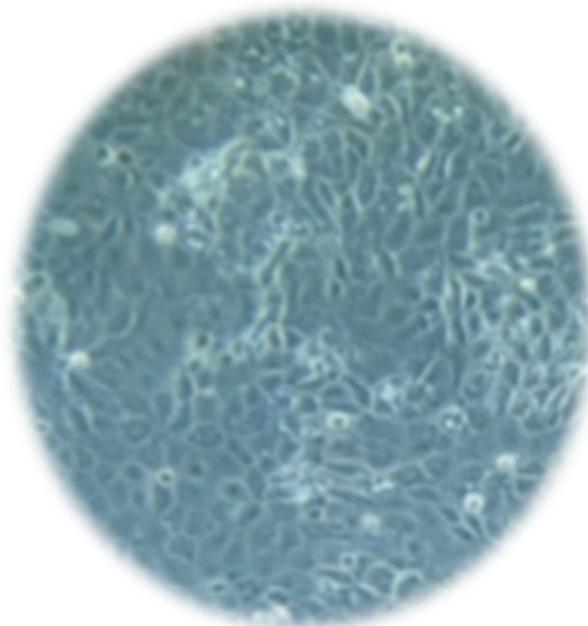
Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prisma GraphPad 8 (San Diego, CA, USA). Se evaluó la normalidad de los datos y posteriormente los datos se expresan como Media ± Error Estándar (S.E.M.). Para determinar diferencias entre las condiciones en los experimentos se realizó un análisis de varianza ANOVA. En caso de existir diferencias significativas con valor de  $p < 0.05$ , se realizaron pruebas post hoc para comparar tratamientos contra controles y para determinar diferencias entre condiciones.

### 3. Resultados

#### 3.1 Expresión del transportador EAAT3 en células LLC-PK1

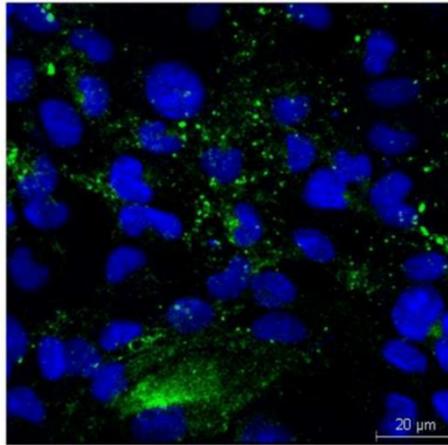
En el riñón los transportadores de Glu participan en la reabsorción de aminoácidos y protección de las células contra estrés osmótico (**Hediger, 1999**). Pocos estudios refieren la presencia de EAAT3 en células renales, en nuestro modelo de estudio no ha sido evidenciada la expresión de este transportador, motivo por el cual como primer acercamiento decidimos identificarlo en la línea celular de interés LLC-PK1 proveniente de túbulo proximal. La morfología característica de estas se visualizó mediante microscopía óptica a través de 40 aumentos (Figura 16A). Luego, mediante un estudio de inmunohistoquímica empleando el anticuerpo anti-EAAT3 acopado al anticuerpo secundario anti-cabra ALEXA Fluor™ 488 marcado en color verde aseveramos que el transportador EAAT3 se encuentra presente en nuestro modelo, además, los núcleos de las células LLC-PK1 se pueden observar en la tinción fluorescente azul (Figura 16B). La Figura 8C muestra la especificidad del anticuerpo secundario al realizar la inmunocitoquímica en ausencia del anticuerpo primario EAAT3 (panel superior de la Figura 16C), lo que demuestra que el anticuerpo se une únicamente blanco de interés.

A)



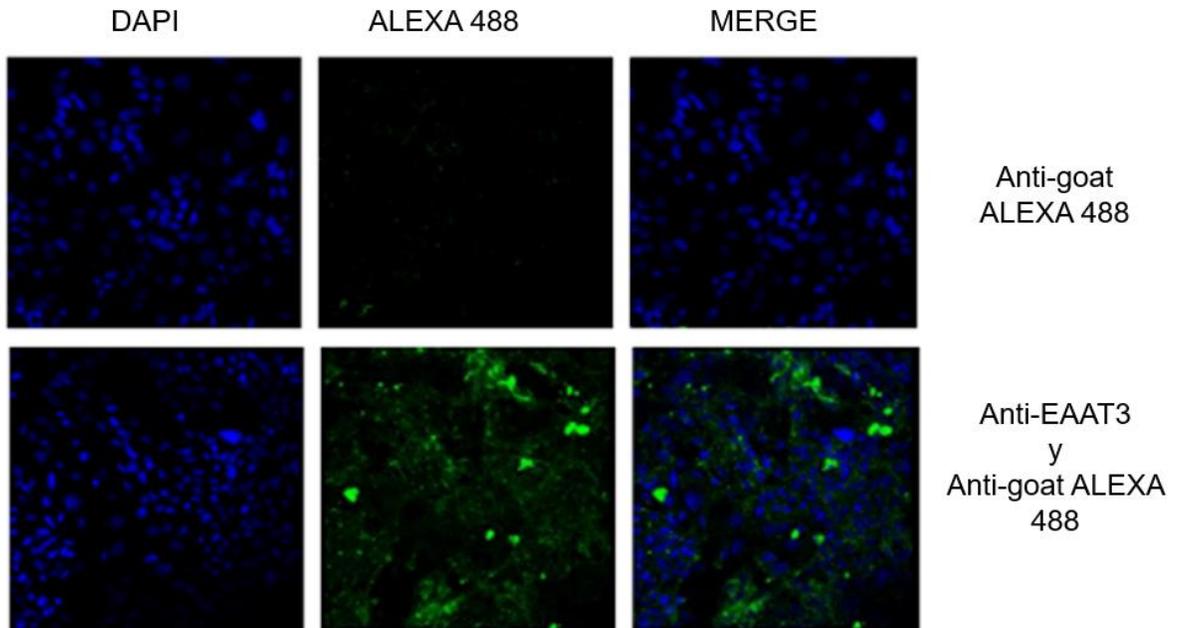
40 X

B)



100 X

C)



40 X

**Figura 16. Expresión de EAAT3 en células LLC-PK1.**

A) La morfología de las células LLC-PK1 se observa mediante microscopía óptica mediante 40X. B) Inmunohistoquímica realizada con anti-EAAT3 acoplado a ALEXA 488 en células LLC-PK1 visualizado a 100X. C) Especificidad del anticuerpo primario. DAPI (azul), anti-EAAT3-ALEXA 488 (Verde).

### 3.2 La actividad de transporte de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato es dependiente de Na<sup>+</sup>

Dado que el hecho de detectar a la proteína transportadora no asegura su funcionalidad, evaluamos su actividad mediante ensayos de captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato. Como primer acercamiento se realizaron ensayos de captura en presencia y ausencia de Na<sup>+</sup> ya que existen reportes de transportadores de Glu en el sistema renal capaces de la remoción de este aminoácido del lumen tubular que no requieren de Na<sup>+</sup> para el transporte de Glu **(Kandasamy, 2018)**.

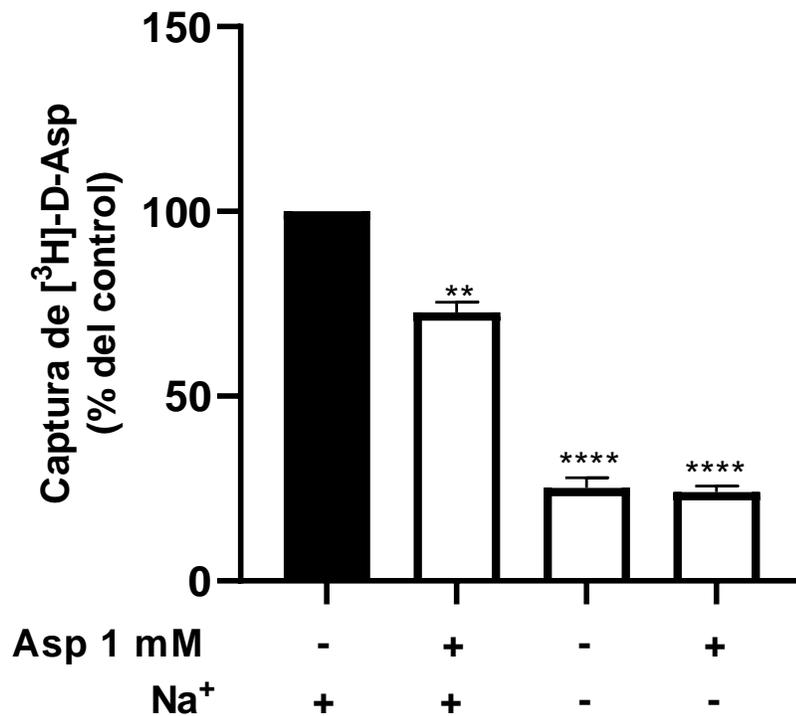
En la Figura 17 observamos que, en condiciones fisiológicas, EAAT3 internaliza [<sup>3</sup>H]-D-aspartato, un análogo no metabolizable de Glu. Como control negativo se empleó una preincubación con una concentración 1 mM de D-Asp 1 mM, el cual ha sido previamente descrito en células de glía SNC como responsable de reducir la cantidad de transportadores en la membrana plasmática disminuyendo por lo tanto la incorporación de [<sup>3</sup>H]-D-aspartato **(González y Ortega, 2000)**. En nuestro sistema se observó de igual manera una disminución de la incorporación del análogo no metabolizable de Glu en un 20 % después de exponer por 30 minutos a Asp 1 mM, lo cual demuestra que tanto GLAST como EAAT3 son regulados por el proceso de transporte.

Con la finalidad de evaluar la dependencia de sodio de la función del transportador se realizaron los ensayos en ausencia de este ion, los resultados muestran que la actividad de transporte en este caso fue solo del 20 % comparado con la actividad del transportador en presencia de Na<sup>+</sup>.

### 3.3 La actividad de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato es independiente de EAAT2.

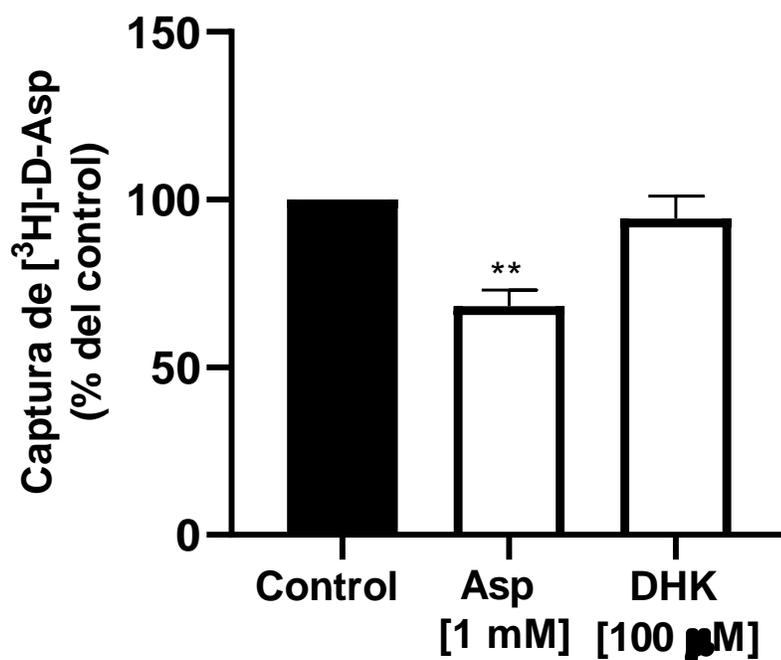
En el túbulo proximal de riñón se encuentran transportadores de aminoácidos en su mayoría independientes de Na<sup>+</sup> **(Kandasamy, 2018)**, y en menor medida transportadores dependientes de este ion. Existen pocos manuscritos que describen la presencia de otros transportadores de la familia de los EAATs en riñón, de acuerdo a lo reportado por Hu en 2018 no se encontró el mRNA de EAAT2 en tejido renal. Para cerciorarnos si la actividad de transporte de Glu en nuestro modelo se debe en parte a la presencia de EAAT2, empleamos un inhibidor selectivo de este transportador, Ácido Dihidrokaínico (DHK). En la Figura 18 observamos que después de 30 minutos de pretratamiento con DHK la actividad del transportador no se modifica significativamente en las células LLC-PK1, por lo que

podemos afirmar que este transportador no es relevante para el transporte de Glu en este modelo celular.



**Figura 17. Efecto del sodio sobre en la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato en las células LLC-PK1.**

El ensayo de captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato en monocapas LLC-PK1 se realizó en presencia y ausencia de Na<sup>+</sup> durante 30 minutos. Los datos se expresan como Media  $\pm$  S.E.M. de 3 experimentos independientes por cuadruplicado. Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, posteriormente se realizó el análisis estadístico comparando los datos de cada condición con respecto al control (no estimulado) usando ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Dunnett (\*\* p <0.01, \*\*\*\*p<0.0001).

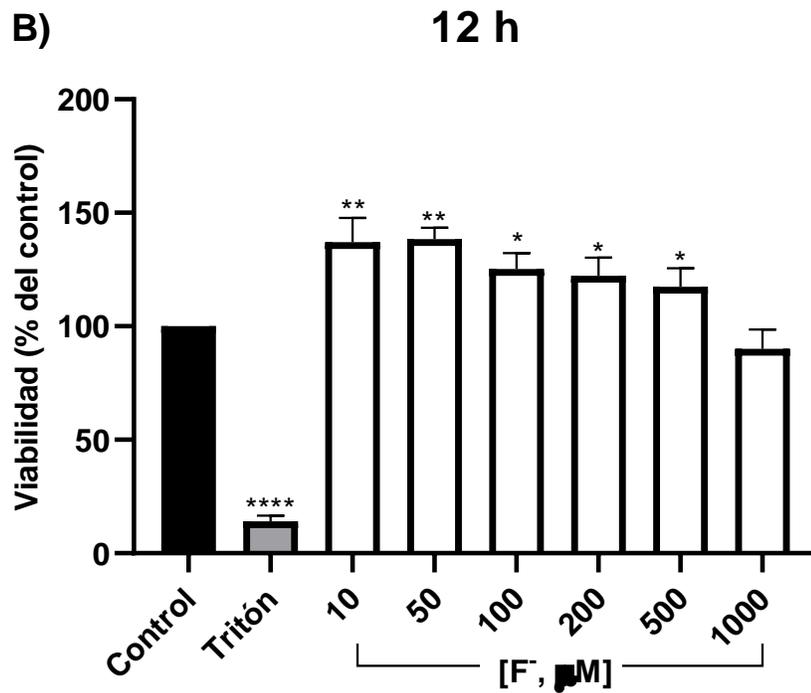
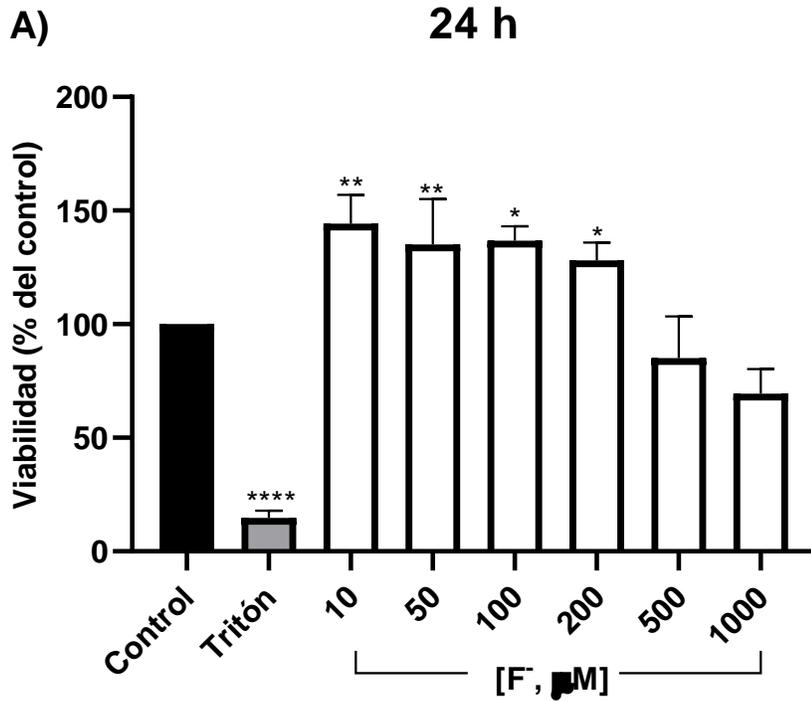


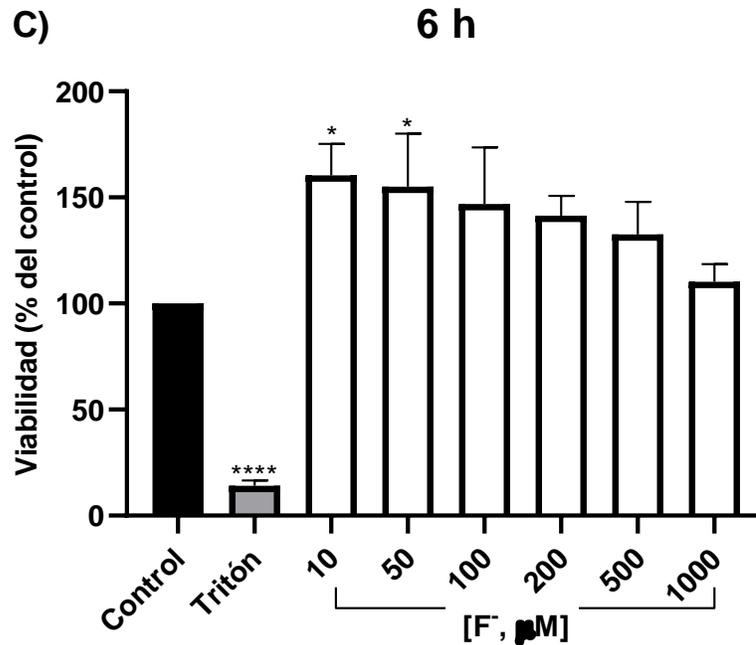
**Figura 18. Efecto de DHK en la captura de [3H]-D-Aspartato en células LLC-PK1.**

El ensayo de captura de [3H]-D-Aspartato en monocapas LLC-PK1 se realizó en presencia de sodio durante 30 minutos. Los datos se expresan como Media  $\pm$  S.E.M. de 4 experimentos independientes por cuadruplicado. Se realizó el análisis estadístico comparando los datos de cada condición contra el control (no estimulado) empleando ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Dunnett (\*\*  $p < 0.01$ ). Asp: Aspartato. DHK: Dihidroquinato, inhibidor selectivo de EAAT2.

3.4 La exposición al  $F^-$  incrementa la actividad metabólica en LLC-PK1. Sin duda, un parámetro que debe determinarse al trabajar con xenobióticos es la inocuidad del compuesto en términos de citotoxicidad, a este respecto, la actividad metabólica en células LLC-PK1 tratadas a diferentes concentraciones (10, 50, 100, 200, 500 y 1000  $\mu$ M) y tiempos de exposición a  $F^-$  (24, 12 y 6 h) fue evaluada mediante el ensayo MTT. Como control de ausencia de actividad metabólica, se empleó Tritón X-100 al 10 %. Los resultados muestran que un incremento en la actividad metabólica de las células LLC-PK1 tratadas con diferentes concentraciones de  $F^-$  durante los diferentes periodos de tiempo (Figura 19), observando diferencias significativas en los tres tiempos a las concentraciones 10 y 50  $\mu$ M, mientras que las concentraciones 100 y 200  $\mu$ M a pesar de mostrar un ligero aumento en la actividad

metabólica no son significativas. Por otra parte, en la concentración de 500  $\mu\text{M}$  se muestra una disminución en la actividad metabólica, y finalmente a la concentración 1000  $\mu\text{M}$  hay una disminución de la actividad a las 24 y 12 h de exposición. Estos resultados nos aseguran que la concentración empleada (10  $\mu\text{M}$ ) en los experimentos no es citotóxica.





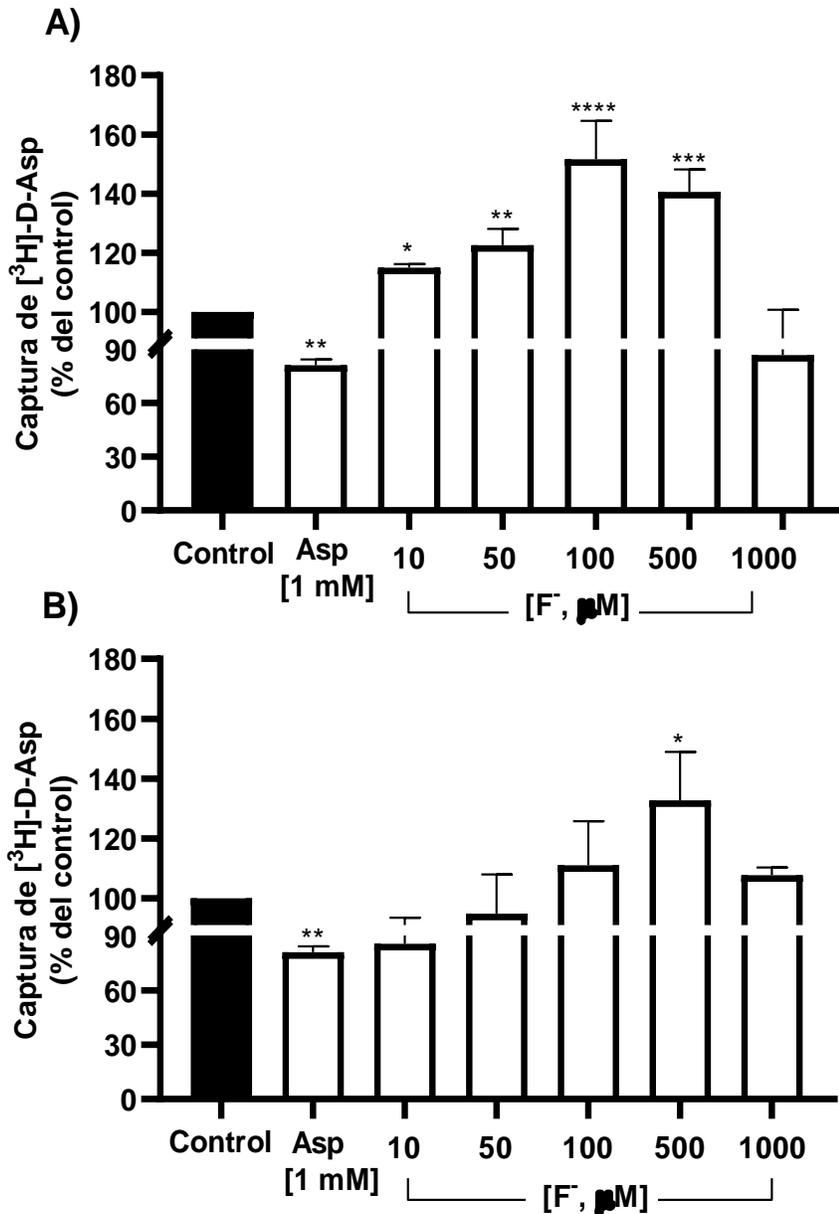
**Figura 19. Actividad metabólica en células LLC-PK1 expuestas a F<sup>-</sup>**

Se determinó la actividad metabólica empleando el método de MTT A) La actividad metabólica en células LLC-PK1 se midió después de 24 h después del tratamiento con F<sup>-</sup> a diferentes concentraciones (10, 50, 100, 200, 500 y 1000 µM), B) Después de 12 h C) Luego de 6 h de exposición se empleó el método de MTT y el producto colorimétrico resultante se evaluó a 260, 280, 570 y 630 nm. Los resultados se muestran como el promedio de 2 experimentos independientes realizados por cuadruplicado (Media ± S.E.M.) y son expresados en porcentaje con respecto en las células no estimuladas. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posteriormente prueba post-hoc Dunnet (\*\*\*\* p < 0.0001, \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01, \* p < 0.05) con respecto al control.

### 3.5 Efecto de diferentes concentraciones de F<sup>-</sup> en la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato.

Una vez que demostrado que el transportador es funcional, que depende de Na<sup>+</sup> y que la actividad es resistente al inhibidor de EAAT2 podemos concluir que el único transportador de Glu dependiente de Na<sup>+</sup> expresado en nuestra línea celular es EAAT3. Posteriormente evaluamos el efecto de la preincubación con F<sup>-</sup>, el cual ha sido ampliamente reportado como nefrotóxico (Cárdenas-González y cols., 2016; Dharmaratne, 2018). Empleamos concentraciones crecientes de F<sup>-</sup> (10, 50, 100, 500, 1000 µM) (Figura 20 A). La captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato se modifica significativamente a la concentración más pequeña (10 µM) y que el efecto es dependiente de la concentración hasta 100 µM. Curiosamente, no hubo

cambios en la actividad de transporte pre-incubando 60 minutos excepto a la concentración de 500  $\mu\text{M}$  (Figura 20B). Una vez analizados estos resultados se escogió la concentración 10  $\mu\text{M}$  y una pre-incubación de 30 minutos de exposición para continuar con los experimentos.

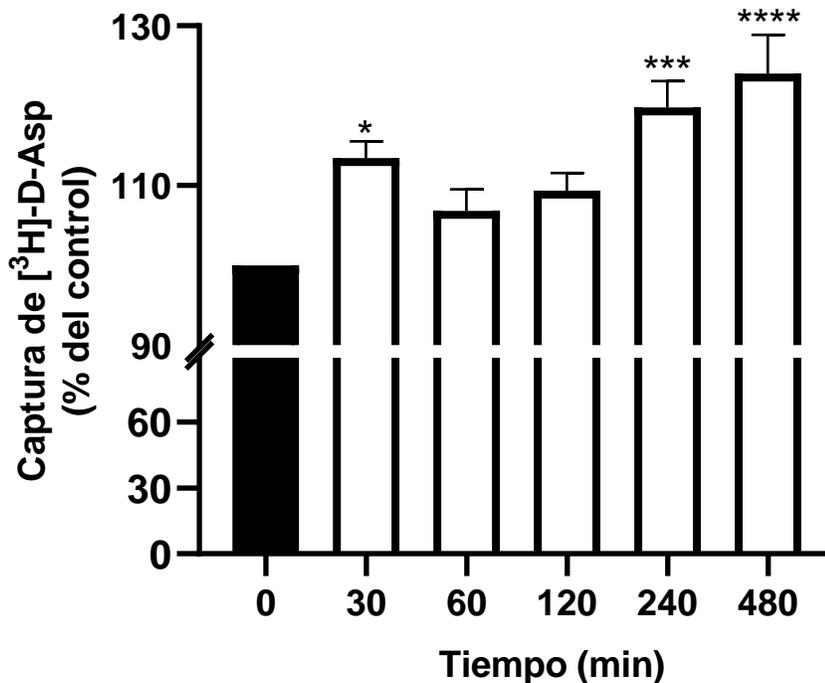


**Figura 20. Efecto de diferentes concentraciones de F<sup>-</sup> sobre la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato en las células LLC-PK1.**

Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de F<sup>-</sup> (10, 50, 100, 500, 1000  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad del transportador con preincubación de: A) 30 minutos B) 60 minutos sobre el ensayo de captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato en monocapas LLC-PK1 durante 30 minutos. Los datos se expresan como Media  $\pm$  S.E.M de 4 experimentos independientes por cuadruplicado. Prueba post hoc de Dunnett (\* p <0.05, \*\* p <0.01, \*\*\* p <0.001, \*\*\*\* p <0.0001)

### 3.6 Efecto de la exposición en diferentes tiempos de $F^-$ 10 $\mu$ M a la captura de $[^3H]$ -D-Aspartato en las células LLC-PK1.

Se ha demostrado que el  $F^-$  afecta diversos órganos y sistemas a distintos niveles, sin embargo, su efecto en células de túbulo proximal de riñón sobre el transporte de Glu no ha sido documentado hasta el momento. Con la finalidad de caracterizar el efecto del  $F^-$  sobre EAAT3, decidimos explorar la modulación de la actividad con respecto al tiempo de preincubación, para ello mediante ensayos de captura de  $[^3H]$ -D-Aspartato se estudió el efecto de diferentes períodos de exposición (0, 30, 60, 120, 240 y 480 minutos) a  $F^-$  10  $\mu$ M. En la Figura 21 se muestra un incremento significativo en actividad a partir de los 30 minutos de preincubación. Nótese una tendencia a un incremento en la actividad en función del tiempo de exposición.

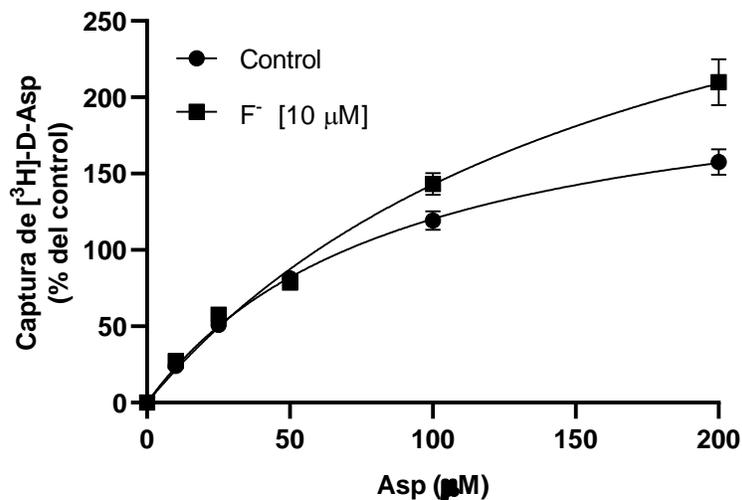


**Figura 21. Efecto de la exposición a de  $F^-$  sobre el curso temporal en la captura de  $[^3H]$ -D-Aspartato en células LLC-PK1.** La exposición se realizó a una concentración de 10  $\mu$ M durante 0, 30, 60, 120, 240 y 480 minutos de preincubación. El ensayo de captura de  $[^3H]$ -D-Aspartato se realizó durante 30 minutos. Los datos se expresan como Media  $\pm$  S.E.M. de cuatro experimentos independientes por cuadruplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con prueba post-hoc Dunnett (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.004$ ).

### 3.7 La exposición a F<sup>-</sup> modifica los parámetros cinéticos de EAAT3.

Los parámetros cinéticos de los transportadores de Glu en Sistema Nervioso Central han sido bien documentados, sin embargo, en tejidos periféricos existen escasos reportes. Conocer las propiedades cinéticas nos permite determinar indirectamente la cantidad de transportadores en la membrana plasmática y la afinidad de éstos. La Figura 22 muestra la cinética de captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato. Los parámetros cinéticos determinados por análisis de regresión no lineal para el caso de células no estimuladas fueron los siguientes: V<sub>max</sub>: 225.9 pmol / min / mg y K<sub>m</sub> 87.82 µM, células expuestas a F<sup>-</sup> 10 µM el V<sub>max</sub> aumentó a 390 pmol / min / mg y el K<sub>m</sub> aumentó a 173.1 µM, mostrando un aumento del 72.6 % y 98 % para la V<sub>max</sub> K<sub>m</sub> respectivamente.

Parámetros cinéticos	Control	F <sup>-</sup> 10 µM
V <sub>max</sub>	225.9	390.0
K <sub>m</sub>	87.82	173.1

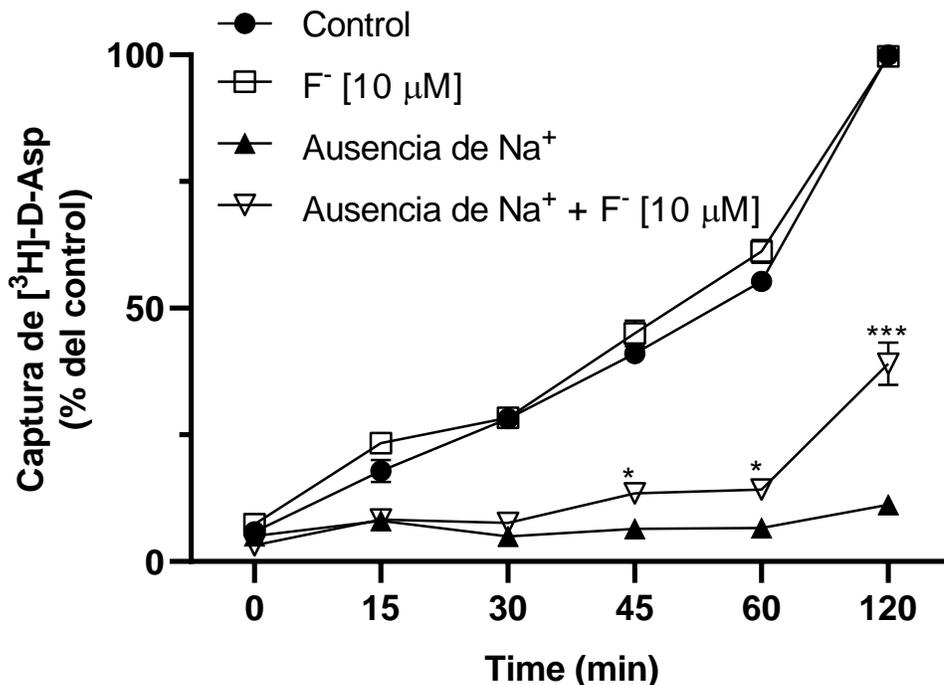


**Figura 22. Cinética de la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato.**

Las células LLC-PK1 se trataron con vehículo (control) o F<sup>-</sup> 10 µM. El ensayo se realizó empleando concentraciones crecientes de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato (0, 10, 25, 50, 100 y 200 µM) durante 30 minutos. Los resultados se muestran como el valor de la Media ± S.E.M de 4 experimentos independientes por cuadruplicado. La cinética de transporte V<sub>max</sub> (pmol/min\*mg) y K<sub>m</sub> (uM) se determinaron mediante regresión no lineal con el software Prism 8 (GraphPad).

### 3.8 Curso temporal de la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato

Con el objeto de esclarecer un posible mecanismo extracelular asociado al efecto del F<sup>-</sup> decidimos realizar el ensayo de captura añadiendo F<sup>-</sup> 10 μM a la solución de captura (0.8 μCi / ml de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato). El efecto sobre la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato se evaluó a diferentes tiempos (0, 15, 30, 45, 60, 120 minutos) en presencia y ausencia de Na<sup>+</sup> (Figura 23). En presencia de sodio no se observaron cambios significativos después de exponer a las células a F<sup>-</sup> 10 μM, sin embargo, a partir de los 45 minutos de captura se observan diferencias en la actividad de transporte independiente de Na<sup>+</sup>, a los 120 minutos se muestra un cambio exacerbado en la actividad. Estos datos sugieren que el efecto de la exposición a F<sup>-</sup> en el transporte de Glu requiere el influjo de este ion.



**Figura 23. Efecto de la co-exposición a la solución de absorción y F<sup>-</sup> con [<sup>3</sup>H] -D-aspartato en células LLC-PK1.**

Las monocapas LLC-PK1 se trataron con Asp 1 mM, F<sup>-</sup> 10 mM en presencia o ausencia de Na<sup>+</sup>. La actividad de captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato se evaluó durante 30 minutos. Los datos se expresan como Media ± S.E.M. de 3 experimentos independientes por cuadruplicado. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba múltiple t test comparando los grupos en ausencia de sodio (\* p < 0,05, \*\*\* p < 0.001).

#### 4. Discusión

El Transportador de Aminoácidos Excitadores 3 fue identificado por primera vez en neuronas y su función en el SNC ha sido ampliamente estudiada. Actualmente se conoce que fuera del cerebro, EAAT3 parece ser el principal transportador de Glu, sin embargo, ha sido escasamente descrita su importancia.

Todos los órganos requieren de energía para su correcto funcionamiento, particularmente el cerebro, hígado y riñón son los más comprometidos energéticamente; hablando específicamente del riñón, cuya masa representa aproximadamente el 0.4 % del peso corporal, recibe el 25 % del gasto cardíaco. Dado que el aminoácido más abundante en torrente sanguíneo es la Gln (**Domínguez y cols., 1998**) y que esta a su vez es transformada a Glu, un intermediario de diversas vías metabólicas, estos dos aminoácidos no esenciales son importantes para la mantener las condiciones fisiológicas, por tanto, deben existir mecanismos encargados de la reabsorción de estas moléculas a los diversos órganos y tejidos del organismo, estos sistemas son los transportadores de Glu.

En 1992, Kanai y colaboradores mediante un estudio realizado en ratones demostró altos niveles de proteína EAAT3 en tejidos periféricos como intestino y riñón comparados con el cerebro. Por otra parte, mediante ensayos con ratones nulos para EAAT3 demostraron en una matriz de orina analizada mediante HPLC que la ausencia de este transportador genera aminoaciduria, mostrando niveles 1400 veces por encima del nivel basal para el Glu y 10 veces para el Asp (**Peghini y cols., 1997**).

De acuerdo con estos antecedentes podemos deducir que la presencia del transportador es importante en este sistema, motivo por el cual decidimos estudiar más a fondo este transportador en un modelo celular de riñón. Como primer acercamiento decidimos evaluar si la línea celular LLC-PK1 expresa EAAT3, pero sobre todo si es funcional, para ello se emplearon los ensayos de captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato. Este tipo de análisis se caracteriza por su alta sensibilidad, proporcionando evidencia certera tanto de la expresión como de la función del transportador. Se verificó que la actividad del transportador es dependiente de Na<sup>+</sup> e independiente del transportador EAAT2. De esta forma podemos aseverar que el único transportador de la familia de los EAAT presente en nuestro modelo celular es EAAT3, esto pudiera explicarse con base en lo definido previamente en SNC para esta familia de transportadores, donde se describe que de los 5, el EAAT3 es de más alta afinidad (**Arraiza**

**y cols., 1994; Kanai y cols, 1993; Hertz y cols.,1978)** lo que quiere decir que requiere concentraciones muy pequeñas de sustrato para ser transportadas, característica importante en la sección del túbulo proximal pues se requiere la reincorporación de la mayor cantidad de nutrimentos.

Una vez caracterizado el transportador EAAT3 como responsable del transporte de Glu en el modelo celular empleado, nos planteamos indagar de qué manera un xenobiótico ampliamente caracterizado como nefrotóxico ( $F^-$ ) **(Dharmaratne, 2018, Santoyo-Sánchez y cols., 2013)** pudiera causar una alteración de la actividad de transporte de Glu.

Dado que la citotoxicidad de un compuesto es muy variable dependiendo de la forma química en la que se encuentre, de las concentraciones y de la susceptibilidad de las células en el sistema biológico en cuestión, es importante determinar si las concentraciones empleadas tienen un efecto citotóxico en nuestro modelo celular, para lo cual se realizó el ensayo MTT a concentraciones endémicamente relevantes (en general las concentraciones detectadas en agua de consumo humano en diferentes regiones del país oscilan entre 0.2 y 12 ppm; es decir de 10 hasta 630  $\mu M$ , respectivamente) **(Edmunds y Smedley, 2013; Ayoob y Gupta, CONAGUA)**. Los resultados de sugieren que la exposición a estas concentraciones no afecta negativamente la viabilidad celular a los tiempos y concentraciones evaluados.

Los EAATs son regulados por el estado redox **(Miralles y cols., 2001)**, por lo tanto, el proceso de captura de Glu puede ser alterado por especies reactivas de oxígeno (ROS), así mismo, uno de los mecanismos más reconocidos de toxicidad generados por la exposición a  $F^-$  es el estrés oxidante **(Trotti, 1998; Lu y cols., 2017; Luo y cols., 2017; Muñoz y cols., 2020)**.

Es bien sabido que el  $F^-$  altera la función mitocondrial, y que este orgánulo celular es el encargado de suministrar la mayor parte de la energía necesaria a la célula, por lo que si observamos un incremento de la actividad metabólica después de la exposición a  $F^-$  pudiéramos explicarlo como un mecanismo compensatorio de la célula ante el insulto agudo.

Posteriormente, nos preguntamos si el  $F^-$  podría alterar la actividad del transportador al igual que en otros modelos celulares **(Flores-Méndez y cols., 2014)** por lo que decidimos evaluar el efecto de este ion sobre el transporte de Glu. Los resultados mostraron cambios

significativos en el transporte con respecto a las células no tratadas a partir de la concentración más pequeña (10  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente se evaluó el tiempo de exposición, uno de los primeros parámetros que deben ser determinados ya que este nos proporciona un primer acercamiento del mecanismo por el cual el insulto genera la respuesta, es decir si es a nivel transcripcional, síntesis de proteínas o modificación postraduccional (PTM) **(Gegelashvili y Schousboe, 1998)**.

A los tiempos de exposición evaluados en este trabajo, pueden ocurrir dos tipos de fenómenos: el aumento en la cantidad de transportadores en membrana mediado por inserción o bien por una PTM de la proteína, para evaluar estas posibilidades realizamos experimentos para determinar los parámetros cinéticos del transportador. El tratamiento con  $\text{F}^-$  muestra aumentó tanto de la  $V_{\text{max}}$  y como de la  $K_m$  con respecto al valor de las células no estimuladas, sugiriendo que el incremento en la captura de  $[^3\text{H}]\text{-D-Aspartato}$  se debe a una mayor cantidad de transportadores en membrana, pero no debido a una mayor actividad de estos lo reflejado en la disminución de la afinidad, sin embargo, nuestros datos no son concluyentes al no lograr la saturación del sistema.

La familia de transportadores de solutos (SLC), a la cual pertenece EAAT3, está sujeta a PTM indispensables para la función y regulación de los transportadores influyendo en sus parámetros cinéticos. Existen diversos mecanismos de PTM, sin embargo, la fosforilación es uno de los principales involucrados, y, a su vez la fosforilación mediada por PKC está relacionada con la endocitosis, el tráfico de transportadores y como iniciador de cascadas de señalización **(Czuba y cols., 2018)**.

En 1994, Shigeo demostró que la activación de PKC por 12 - O - tetradecanoilforbol - 13 - acetato (TPA) modifica la función del transportador de dopamina expresado en células COS; el análisis cinético reveló que el efecto del TPA se debió a una disminución de la  $V_{\text{max}}$  y a la reducción de la afinidad por el  $\text{Na}^+$ . Experimentos realizados en células C6, mostraron que la activación de PKC con TPA aumenta la actividad de transporte de Glu **(Davis y cols., 1998; Dowd y Robinson, 1996; González y cols., 2003, Trotti, 2001)**, por el contrario la exposición a TPA en células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) transfectadas con EAAT3 disminuyó significativamente la captura de Glu; este decremento no se asoció a un cambio en la afinidad ni a una fosforilación del transportador sino a una alteración en la distribución

de EAAT3 en la membrana plasmática y en las vesículas intracelulares (**Padovano y cols., 2009**).

Debido a que EAAT3 se expresa en diferentes tejidos en los cuales desempeña diferentes propósitos (**Hediger y Welbourne, 1999**) y a que la activación de PKC por los ésteres de forbol conduce a efectos opuestos sobre la actividad de EAAT3 en diferentes modelos, sugerimos que la regulación de EAAT3 mediada por PKC es específica del tipo celular de acuerdo con los sistemas locales de tráfico sensibles a la fosforilación.

De acuerdo a lo reportado en células C6 y en hipocampo, aproximadamente el 74 % de EAAT3 intracelular puede translocarse a la membrana plasmática después de exposición a isoflurano (**Huang y Zuo, 2005**). Este efecto requiere una redistribución de EAAT3 mediada por PKC $\alpha$  dependiente de la fosforilación de S465. En 2011, Huang y colaboradores plantearon que péptidos específicos pueden diseñarse para bloquear este efecto y conjugaron un péptido sintético de 10 aminoácidos con una secuencia idéntica a la de EAAT3 alrededor del S465. Este péptido inhibió el incremento de la actividad EAAT3 inducida por isoflurano sin afectar los niveles basales del transportador (**Huang y cols., 2011**), de igual manera, el diseño de péptidos que bloqueen la fosforilación de S465 del transportador podría reestablecer la actividad de EAAT3 después de la exposición a F $^-$ .

Para determinar que el fenómeno se debe al incremento en el número de transportadores en la membrana celular es necesario realizar experimentos de biotilación y/o unión de ligando radiactivo, así como evaluar el transporte de [ $^3$ H]-D-Aspartato con citocalasina  $\beta$ , un inhibidor de transporte vesicular.

Con el objetivo de delinear el mecanismo por el cual el F $^-$  aumenta la actividad del transportador, se realizó una co-exposición del xenobiótico en la solución de captura, observamos que en presencia de sodio no hay diferencias entre la actividad del transportador en presencia del ion, esto es indicativo de que el F $^-$  no causa una modificación en la actividad por interacción directa con el transportador si no que la modificación observada es por su ingreso a la célula, sin embargo, la o las cascadas de señalización que activa el F $^-$  en las células de túbulo distal se desconocen. En condiciones fisiológicas, los EAATs llevan a cabo su función mediante la internalización de una molécula de Glu junto con tres de Na $^+$  y un H $^+$  al interior de la célula promoviendo la salida de un K $^+$  (**Danbolt,**

**2001**). La entrada de  $\text{Na}^+$  activa al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  el cual exporta  $\text{Na}^+$  e introduce  $\text{Ca}^{2+}$ , es pues altamente probable que el  $\text{F}^-$  modifique estas transacciones bioquímicas.

Por otra parte, en un estudio realizado en células  $\beta$ -pancreáticas se mostró que el  $\text{F}^-$  inhibe la actividad del canal de  $\text{K}^+$  sensible a ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) y con esto provoca la despolarización de la membrana con la consecuente apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, produciendo un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre (**García-Montalvo y cols., 2009**). El principal receptor intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es CaM, el cual activa a eEF2K promoviendo la fosforilación del factor eEF2 y detener así el proceso de elongación (**Flores-Méndez y cols., 2014**). Por otro lado, un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico puede activar a fosfolipasas y proteinasas y producir aberraciones en la estructura y función del citoesqueleto (**Harriman y cols., 2002**) modificando de esta manera el transporte de la proteína del citosol a la membrana que a su vez inciden en los parámetros cinéticos del transportador.

Hasta hoy no se conoce con certeza la importancia del Glu ni de sus transportadores a nivel renal, lo que ahora sabemos es que el Glu es internalizado a las células renales, la interrogante ahora queda abierta, es probable que al menos una parte del amino ácido regrese a torrente circulatorio y funja como precursor energético de diversos sistemas además de participar como acarreador de nitrógeno al organismo, mientras que otra parte se quede en riñón como propia fuente de energía mediante el ingreso al TCA en la mitocondrias de células renales. La situación se complica cuando intentamos relacionar el efecto del  $\text{F}^-$  sobre el transportador, debido a que su efecto es dependiente del tiempo de exposición (aguda o crónica) y de las dosis ingeridas, este fenómeno dificulta conocer la totalidad de los mecanismos por el cual induce sus efectos tóxicos.

Aunque desconocemos el motivo exacto, tenemos presente que la concentración de un tóxico en los diferentes tejidos está determinada por la velocidad de distribución del flujo sanguíneo y por la absorción/acumulación (**Buzalaf y Whitford, 2011**). De tal manera, probablemente los efectos visualizados en el riñón no sean porque este sea el más sensible si no que dadas sus funciones intrínsecas de eliminación y reabsorción es el más susceptible al poseer una gran cantidad transportadores basolaterales, apicales e irrigación sanguínea que permiten la incorporación tanto de las sustancias indispensables como dañinas para el organismo.

En el riñón, la cantidad de  $F^-$  que no es absorbida ( $\approx 30-75\%$ ) por otros tejidos es filtrada, concentrada y acumulada (**Whitford, 1994**). Debido a que el  $F^-$  no se une a proteínas plasmáticas, la concentración presente en el torrente circulatorio es la misma que se encuentra en el filtrado glomerular y ya que el túbulo proximal es la primera región tubular de la nefrona que recibe el filtrado, elevadas concentraciones de nefrotóxicos pueden encontrarse presentes en esta sección y factores dietéticos pueden afectar su retención o acumulación (concentraciones de  $Ca^{2+}$ ), por otra parte, el pH del riñón impide la reabsorción del  $F^-$  (a este pH la mayoría del F presente se encuentra en forma de  $F^-$  y no de HF) (**Buzalaf y Whitford, 2011**).

Los estudios agudos nos ayudan a dilucidar el mecanismo de acción de xenobióticos sobre la molécula o proteína de interés, sin embargo, debido a la naturaleza y a la fuente de exposición de este ion, las complicaciones observadas en la población se presentan por exposiciones crónicas, por lo que definir la trascendencia fisiológica a partir de estudios agudos *in vitro* de un compuesto que tiene una variedad inmensa de efectos y mecanismos involucrados es aventurado. En particular, si la caracterización del transportador en este modelo celular se encuentra en las primeras etapas, sin embargo, podríamos sugerir que un aumento de la actividad de captura de  $[^3H]$ -D-Aspartato después de la pre-incubación con  $F^-$  contribuye a los efectos observados por el ingreso exacerbado de Glu.

Una de las funciones de Glu es fungir como acarreador de N a partir de reacciones de transaminación mediadas por la GS (**King., 2016**), por lo que concentraciones elevadas de Glu podrían saturar a la GS dejando una cantidad considerable de N libre, tóxico para el organismo. Por otro lado, una función más del riñón es mantener el pH a través de las concentraciones de  $NH_4^+$  y  $HCO_3^-$ , ambos iones tienen como precursor al Glu intracelular, por lo que un desbalance de los niveles intracelulares de este aminoácido mediada por una desregulación de los transportadores de Glu en este sistema podría generar una sobreproducción de bicarbonato que podría desencadenar una acidosis tubular renal (ATR), o bien a su vez modificar las concentraciones de  $NH_4^+$ , el amortiguador urinario más importante.

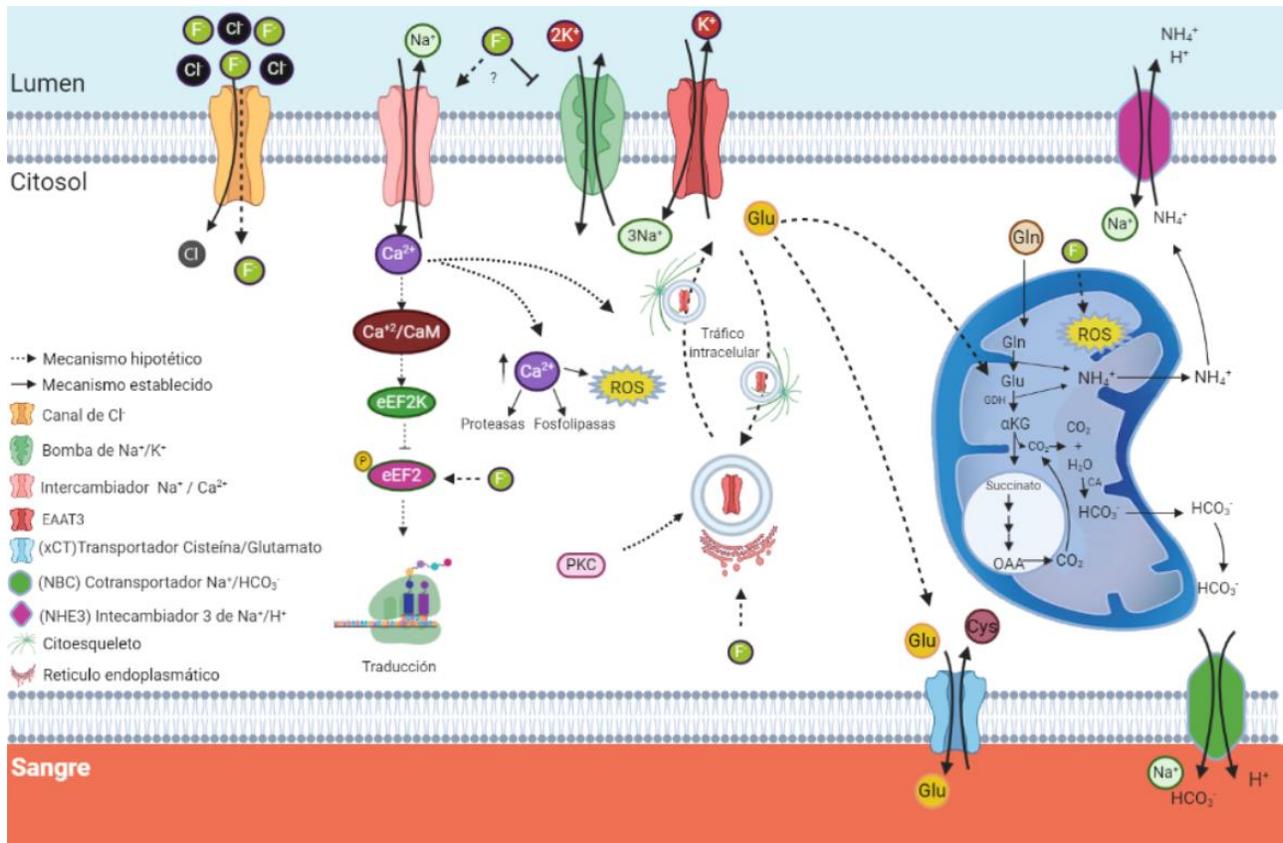
Uno de los principales mecanismos por los que el  $F^-$  ejerce sus efectos tóxicos es la producción de ROS (**Barbier 2010**), por lo tanto, tiempos largos de exposición a este ion podrían desencadenar un fenómeno de compensación renal, que con el paso del tiempo

genere estrés celular de manera irreversible, y dar lugar tanto a una inflamación crónica como al déficit energético para la síntesis de EAAT3 traducida en la presencia de Glu y Asp en orina y desencadenar la enfermedad renal.

Algunos estudios refieren que la exposición a  $F^-$  además de mostrar incrementos en ROS también aumentan de manera significativa niveles NO y NOX (**Liu y cols., 2003**) una enzima implicada en la señalización de inflamación y remodelación vascular. La producción excesiva de NO puede alterar el estado oxidante al aumentar la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular e interrumpir la cadena de transporte de electrones.

En contraparte, una fracción del Glu internalizado por EAAT3 pudiera emplearse como sustrato para el co-transporte de cistina mediante xCT, con la consecuente producción de GSH ante el estrés oxidante inducido por el  $F^-$ .

En la Figura 23 se ilustra un posible mecanismo de los efectos tóxicos del  $F^-$  sobre el transporte de Glu mediado por EAAT3 y las posibles vías involucradas en la alteración de su actividad. En resumen, la exposición aguda a concentraciones micromolares de  $F^-$  incrementa la captura de [ $^3H$ ]-D-aspartato mediado por EAAT3. Si bien se desconoce el mecanismo exacto por el cual este ion modifica esta actividad, una gran variedad de componentes biológicos está involucrados y sin duda estos resultados destacan la participación de EAAT3 en la nefrotoxicidad del  $F^-$ , lo cual es de gran importancia para el desarrollo de estrategias terapéuticas.



**Figura 24. Modelo teórico de los efectos tóxicos del  $F^-$  sobre el transporte de Glu mediado por EAAT3 en células de túbulo proximal.**

La nefrotoxicidad del  $F^-$  sobre la función del transportador EAAT3 es consecuencia del influjo del ion, probablemente por canales de  $Cl^-$ , seguida de la respuesta celular a diferentes niveles. El  $F^-$  podría inhibir la bomba  $Na^+/K^+$  resultando en la apertura del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  incrementando las concentraciones de  $Ca^{2+}$  citosólico y alterando el estado de fosforilación de  $eEF2$  con la consecuente inhibición de la elongación en el proceso de la traducción; o bien, activar fosfolipasas y proteinasas conduciendo a aberraciones estructurales y funcionales del citoesqueleto modificando a su vez el transporte vesicular y la inserción en la membrana. Por otra parte, la activación de PKC también podría conducir a alteraciones en estos procesos. Cualquier cambio en la cantidad de transportadores en membrana afecta directamente la concentración intracelular de Glu y a su vez modifica el equilibrio de los procesos metabólicos en los cuales el Glu es participe como el TCA alterando las concentraciones de  $NH_4^+$  y  $HCO_3^-$  cambiando el pH. Todos estos mecanismos podrían ser los responsables de incrementar la actividad del transporte de Glu en el riñón mediado por EAAT3.

## 5. Conclusiones

- La línea celular LLC-PK1 expresa el transportador EAAT3.
- La actividad de transportador es dependiente de  $\text{Na}^+$  e independiente al inhibidor de EAAT2.
- La exposición a  $\text{F}^-$  aumenta el transporte de  $[\text{}^3\text{H}]\text{-D-Aspartato}$  de manera dependiente del tiempo y la concentración.
- El análisis de la cinética de transporte en células expuesta a  $\text{F}^-$ , muestra un incremento en la  $V_{\text{max}}$  de un 72 % asociado a un aumento de la cantidad de transportadores en membrana.

## 6. Perspectivas

- Demostrar que la pre-incubación con  $F^-$  aumenta la densidad de EAAT3 en la membrana plasmática mediante ensayos de biotilación de proteínas membranales y ensayos de unión a ligando.
- Analizar el estado de fosforilación en Serina 465 de EAAT3 de la membrana plasmática en condiciones de pre-incubación a diferentes dosis y tiempos de pre-incubación a  $F^-$ .
- Realizar experimentos en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular en presencia y ausencia de quelantes intracelulares de  $Ca^{2+}$  como el Fura-2 para establecer la participación del  $Ca^{2+}$  en respuesta a la pre-incubación a  $F^-$ .
- Examinar si la pre-incubación a  $F^-$  modula la generación de ROS y a su vez modifica la función del transportador mediante el uso de antioxidantes.
- Determinar la participación del transportador Cistina-Glutamato (xCT) como proteína clave para la síntesis de GSH mediante el empleo de sulfasalazina, un inhibidor del antiportador, después de la pre-incubación a diferentes dosis y tiempos de  $F^-$ .
- Realizar experimentos en presencia y ausencia de cicloheximida y determinar si la pre-incubación a  $F^-$  modifica la tasa de traducción del mRNA que codifica para EAAT3.
- Evaluar el efecto de la co-exposición a As y  $F^-$  en la captura de Glu mediada por EAAT3 en células de túbulo proximal

## 7. Referencias

- Agalakova, N., Gusev, G. (2012). Fluoride induces oxidative stress and ATP depletion in the rat erythrocytes in vitro. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 34(2): 334-337
- Annual Report of the EFSA Journal 2013. (2014). *EFSA Supporting Publications*, 11(12), 1–9. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2014.en-721>
- Arango, R., Camilo, J., Díaz, G., Yaneth, L., Quintero, L., Álvaro, J. (2010). Sistema NADPH oxidasa: nuevos retos y perspectivas. Universidad de Antioquia Medellín, Colombia. 23(4):362-372
- Arriza, J. L., Fairman, W. A., Amara, S. G., Kavanaugh, P., Wadiche, I., & Murdoch, H. (1994). Functional Comparisons of Three Glutamate Cloned from Human Motor Cortex Transporter. *The Journal of Neuroscience*, 14(9), 5559–5569.
- ATDSR. (2003). *TOXICOLOGICAL PROFILE FOR FLUORIDES, HYDROGEN FLUORIDE, AND FLUORINE*. Atlanta, Georgia 30333.
- Ayoob, S., & Gupta, A. K. (2006). Fluoride in drinking water: A review on the status and stress effects. In *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (Vol. 36). <https://doi.org/10.1080/10643380600678112>
- Balcar, V. J., & Johnston, G. A. R. (1972). THE STRUCTURAL SPECIFICITY OF THE HIGH AFFINITY UPTAKE OF L-GLUTAMATE AND L-ASPARTATE BY RAT BRAIN SLICES. *Journal of Neurochemistry*, 19(11), 2657–2666. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1972.tb01325.x>
- Bannai, S., (1984). Induction of cystine and glutamate transport activity in human fibroblasts by diethyl maleate and other electrophilic agents. *J. Biol. Chem.* 259: 2435–2440.
- Barrera, I., Hernández-Kelly, L. C., Castelán, F., & Ortega, A. (2008). Glutamate-dependent elongation factor-2 phosphorylation in Bergmann glial cells. *Neurochemistry International*, 52(6), 1167–1175. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.12.006>
- Berridge, M. (2012). Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem. Soc. Trans.* 40:297-309.
- Bianchi, M. G., Bardelli, D., Chiu, M., & Bussolati, O. (2014). Changes in the expression of the glutamate transporter EAAT3/EAAC1 in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(11), 2001–2015. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1484-0>
- Bjørn-Yoshimoto, W. E., & Underhill, S. M. (2016). The importance of the excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3). *Neurochemistry International*, 98, 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.05.007>
- BLAST: Basic Local Alignment Search. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Bouaziz, H., Croute, F., Boudawara, T., Soleilhavoup, J., Zeghal, N. (2007). Oxidative stress induced by fluoride in adult mice and their suckling pups. *Exp Toxicol Pathol.* 58:339–49
- Boron, W., Boulpaep. (2017) *E. Fisiología Medica*. ELSEVIER. 3ed.
- Burdo, J., Dargusch, R., Schubert, D., (2006). Distribution of the cystine/glutamate antiporter system xc<sup>-</sup> in the brain, kidney, and duodenum. *J. Histochem. Cytochem.* 54: 549–57.

- Butter, E. (1985). N. N. Greenwood, A. Earnshaw: Chemistry of the elements. In *Pergamon press oxford 1542 seiten, 7 anhänge. Crystal Research and Technology* (Vol. 20). <https://doi.org/10.1002/crat.2170200510>
- Buzalaf, A., & Whitford, G. (2011). [Fluoride metabolism]. *Monograph Oral Sci*, 22(9), 20–36. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4514537](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4514537)
- Camacho, A., & Massieu, L. (2006). Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Archives of Medical Research*, 37(1), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.05.014>
- Cárdenas-González, M., Jacobo Estrada, T., Rodríguez-Muñoz, R., Barrera-Chimal, J., Bobadilla, N. A., Barbier, O. C., & Del Razo, L. M. (2016). Sub-chronic exposure to fluoride impacts the response to a subsequent nephrotoxic treatment with gentamicin. *Journal of Applied Toxicology*, 36(2), 309–319. <https://doi.org/10.1002/jat.3186>
- Casado, M., Bendahan, A., Zafra, F., Danbolt, N., Aragon, C., Gimenez, C., & Kanner, B. (1993). Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 268(36), 27313–27317.
- Cassarett y Doull's. (2008). *Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 7° edition. Curtis D. Klassen. McGrawHill.
- Chase, L., Roon, R., Wellman, L., Beitz, A., Koerner, J. (2001). L-Quisqualic acid transport into hippocampal neurons by a cystine-sensitive carrier is required for the induction of quisqualate. *Neuroscience*. 106(2):287-301.
- Chauhan, S., Ojha, S., Mahmood, A. (2011). Modulation of lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat intestine by subchronic fluoride and ethanol administration. *Alcohol*. 45:663–72.
- Chen, T., Cui, H., Cui, Y., Bai, C., Gong, T. (2009). Effect of dietary high fluorine on the morphologic structure, cell cycle and apoptosis of bursa of fabricius in broilers. 40:1235–43. *Chinese J Anim Vet Sci*.
- Chen, T., Cui, H., Cui, Y., Bai, C., Gong, T., Peng, X. (2011). Cell-cycle blockage associated with increased apoptotic cells in the thymus of chickens fed on diets high in fluorine. *Hum Exp Toxicol*. 30:685–92.
- CONAGUA. (2018). *Estadísticas del agua en México 2018. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Comisión Nacional del Agua. Gobierno de la República*.
- Conradt, M., Storck, T., & Stoffel, W. (1995). a cloned rat brain L-glutamate-aspartate transporter. *Reactions*, 687, 682–687.
- Curthoys, N. & Moe, O. (2014). Proximal Tubule Function and Response to Acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 9:1627–1638.
- Czuba, L., Hillgren K. & Swaan, P. (2018). Post-translational Modifications of Transporters. *Pharmacol Ther*. 192: 88–99.
- Dabrowska, E., Balunowska, M., Letko, R., & Szynaka, B. (2004). Ultrastructural study of the

- mitochondria in the submandibular gland, the pancreas and the liver of young rats, exposed to NaF in drinking water. *Ann. Acad. Med. Bialost.* 49:180-181.
- Davis, K. E., Straff, D. J., Weinstein, E. A., Bannerman, P. G., Correale, D. M., Rothstein, J. D., & Robinson, M. B. (1998). Multiple Signaling Pathways Regulate Cell Surface Expression and Activity of the Excitatory Amino Acid Carrier 1 Subtype of Glu Transporter in C6 Glioma. *The Journal of Neuroscience*, 18(7), 2475–2485. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-07-02475.1998>
- Delgado, M., Ruza, F., Hernanz, A., Madero, R., González, V., García, S., & Oliva, P. (1998). Alteraciones de los aminoácidos en sangre en niños con enfermedad hepática severa. Valoración de las diferencias en relación a la distinta fisiopatología. 48(6): 615-619.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *ImpactAssets*, 89, 271–277.
- Dharmaratn, R., (2018). Exploring the role of excess fluoride in chronic kidney disease: A review. *Human & Experimental Toxicology*. 38(3):269-279.
- Dikalov, S. (2011). Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radical Biology and Medicine*. 51(7):1289-1301.
- Donnelly, N., Gorman, A. M., Gupta, S., & Samali, A. (2013). The eIF2 $\alpha$  kinases: Their structures and functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(19), 3493–3511. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1252-6>.
- Dowd, L. & Robinson, M. (1996). Rapid stimulation of EAAC1-mediated Na<sup>+</sup>-dependent L-glutamate transport activity in C6 glioma cells by phorbol ester. *J Neurochem* 67:508–516
- Edmunds, M., & Smedley, L. (2013). Fluoride in Natural Waters W. *Essentials of Medical Geology: Revised Edition*, 1–805. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4375-5>
- Fawell J, Bailey K, Chilton J, Dahi E, Fewtrell L, M. Y. (2006). Environmental occurrence, geochemistry and exposure. In P. J. and J. F. K. Bailey, J. Chilton, E. Dahi, M. Lennon (Ed.), *Fluoride in Drinking-water*. WHO.
- Flores-Méndez, M., Ramírez, D., Alamillo, N., Hernández-Kelly, L. C., Del Razo, L. M., & Ortega, A. (2014). Fluoride exposure regulates the elongation phase of protein synthesis in cultured Bergmann glia cells. *Toxicology Letters*, 229(1), 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.022>
- Fox, S. (2011) *Fisiología humana*. 12 ed.
- García-Montalvo, E., Reyes-Pérez, H., Del Razo, M. (2009). Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress. *Toxicology* 263:75–83.
- Gendreau, S., Voswinkel, S., Torres-Salazar, D., Lang, N., Heidtmann, H., Detro-Dassent, S., ... Fahlke, C. (2004). A trimeric quaternary structure is conserved in bacterial and human glutamate transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39505–39512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408038200>
- González, M., & Ortega, A. (2000). Regulation of high-affinity glutamate uptake activity in Bergmann glia cells by glutamate. *Brain Research*. 866: 73–81.
- González-Horta, C., Ballinas-Casarrubias, L., Sánchez-Ramírez, B., Ishida, M. C., Barrera-

- Hernández, A., Gutiérrez-Torres, D., ... Del Razo, L. M. (2015). A concurrent exposure to arsenic and fluoride from drinking water in Chihuahua, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(5), 4587–4601. <https://doi.org/10.3390/ijerph120504587>
- Gonzalez, M., Bannerman, P. & Robinson, M. (2003) Phorbol myristate acetate-dependent interaction of protein kinase C (alpha) and the neuronal glutamate transporter EAAC1. *J Neurosci* 23:5589–5593
- Gordeeva, A., Zvyagilskaya, R., Labas Y. (2003). Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochemistry (Mosc)*, 68:1077-1080.
- Görlachab, A., Bertrama, K., Hudecovac S., Krizanovac, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay *Redox Biology*. 6:260-271.
- Gralla, B.E. & Valentine, S.J. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn Superoxide dismutase: Characterization and spontaneous mutantion rates. *J. Bacteriol.* 113(18), 5918-5920.
- Grewer, C., Balani, P., Weidenfeller, C., Bartusel, T., Tao, Z., & Rauen, T. (2005). Individual subunits of the glutamate transporter EAAC1 homotrimer function independently of each other. *Biochemistry*, 44, 11913–11923. <https://doi.org/10.1021/bi050987n> [doi]
- Grijalva-Haro, M. I., Barba-Leyva, M. E., & Laborín-Alvarez, A. (2001). Ingestión y excreción de Fluoruros en niños de Hermosillo, Sonora, México. *Salud Publica de Mexico*, 43(2), 127–134.
- Grunewald, M., & Kanner, B. (1995). Conformational Changes Monitored on the Glutamate Transporter GLT-1 Indicate the Existence of Two Neurotransmitter-bound States. *Journal of Biological Chemistry*, 270(28), 17017–17024. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.28.17017>
- Grunewald, Myriam, & Kanner, B. I. (2000). The accessibility of a novel reentrant loop of the glutamate transporter GLT-1 is restricted by its substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9684–9689. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9684>
- Guan, Z., Xiao, K., Zeng, X., Long, Y., Cheng, Y., Jiang, S., Wang, Y. (2000). Changed cellular membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis. *Arch Toxicol.* 74:602–08.
- Guillet, B. A., Velly, L. J., Canolle, B., Masméjean, F. M., Nieoullon, A. L., & Pisano, P. (2005). Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochemistry International*, 46(4), 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2004.10.006>
- Guyton, A., Hall J. (2011) *Tratado de fisiología Medica*. 12 ed. Elsevier
- Hediger, M. (1999). Glutamate transporters in kidney and brain. *Renal Physiol*, 46, F487–F492.
- Hediger, M. y Welbourne, T. (1999) Introduction: Glutamate transport, metabolism, and physiological responses. *Am J Physiol* 277:F477–F480
- Henry, B., Todd. S., & Davidsohn. (2007). *El laboratorio en el diagnostic clínico*. Editorial Marban. Madrid, España.
- Hertz, L., Schousboe, A., Boechler, N., Mukerji, S., & Fedoroff, S. (1978). Kinetic characteristics of the glutamate uptake into normal astrocytes in cultures. *Neurochemical Research*, 3(1),

1–14. <https://doi.org/10.1007/BF00964356>

- Horman, S., Krause, U., Vertommen, D., Bertrand, L., Hue, L., Rider, M. H., ... Lavoine, A. (2002). Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Current Biology*, 12(16), 1419–1423. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01077-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01077-1)
- Hu, Q. X., Ottestad-Hansen, S., Holmseth, S., Hassel, B., Danbolt, N. C., & Zhou, Y. (2018). Expression of Glutamate Transporters in Mouse Liver, Kidney, and Intestine. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 66(3), 189–202. <https://doi.org/10.1369/0022155417749828>
- Huang, Y., Zuo, Z. (2005). Isoflurane induces a protein kinase C alpha-dependent increase in cell surface protein level and activity of glutamate transporter type 3. *Mol Pharmacol*. 67:1522–1533.
- Huang, H., Li, L., Washington, J., Xu, X., Sando, J., Lin, D., Zuo, Z. (2011). Inhibition of isoflurane-induced increase of cell-surface redistribution and activity of glutamate transporter type 3 by serine 465 sequence-specific peptides. *Eur J Pharmacol*. 655(1-3):16–22.
- Izquierdo-Vega, J., Sánchez-Gutiérrez, M., Del Razo, L. (2008). Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss, *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 230:352–357.
- Jaramillo, J., & Rodriguez, V. (2006). Toxicología renal. En toxicología básica. *Textos universitarios. Ciencias biomédicas*. 413-418
- Jha, S. K., Mishra, V. K., Sharma, D. K., & Damodaran, T. (2011). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 218*.
- Kanai, Y., Smith, C., & Hediger, M. (1993). A new family of neurotransmitter transporters: the high affinity glutamate transporters. *The FASEB Journal*. 7 (15):1450-1459.
- Kanai, Y., & Hediger, A. (1998). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Toxicological Research*, 12(3), 14–15.
- Kandasamy, P., Gyimesi, G., Kanai, Y., & Hediger M. (2018) Amino acid transporters revisited: New views in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*. 43(10):752-789.
- Karet, F. (2009). Mechanism in hyperkalemic renal tubular acidosis. *Journal of the Am Soc of Neph*. 20 (2) 251-254.
- Kuang, P., Deng, H., Cui, H., Chen, L., Guo, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Wang, X., Zhao, L. (2016). Suppressive effects of sodium fluoride on cultured splenic lymphocyte proliferation in mice. *Oncotarget*. 7:61905–15.
- Landis, W., Ming-Ho, A. (2005). Introduction to environmental toxicology. Impacts of chemicals upon ecological systems, third edition. *Lewis publishers*. 203-217.
- Leah, A., Chase, M., VerHeulen, K., Schiller, N., Goltz, A., Flores, G., Balcazar, S., Engelsman, C., Lang, S., Jeffrey R. (2019). Hydrogen Peroxide Triggers an Increase in Cell Surface Expression of System xc- in Cultured Human Glioma Cells. 380.
- Lewis J. 2018. Regulación del equilibrio ácido base. Brookwood Baptist Health and Saint Vincent's Ascension Health, Birmingham. [https://www.msdmanuals.com/es-cl/professional/trastornos-endocrinol%C3%B3gicos-y-](https://www.msdmanuals.com/es-cl/professional/trastornos-endocrinol%C3%B3gicos-y)

metab%C3%B3licos/regulaci%C3%B3n-y-trastornos-del-equilibrio-%C3%A1cido-base/regulaci%C3%B3n-del-equilibrio-%C3%A1cido-base#v987143\_es

- Li, G., Li, J., Tan, B., Wang, J., Kong, X., Guan, G., ... Yin, Y. (2015). Characterization and Regulation of the amino acid transporter SNAT2 in the small intestine of piglets. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128207>
- Liu, G., Chai, C., Cui, L. (2003). Fluoride causing abnormally elevated serum nitric oxide levels in chicks, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *13*:199–204.
- Liu, J., Cui, H., Peng, X., Fang, J., Zuo, Z., Wang, H., Wu, B., Deng, Y., Wang, K. (2013). Dietary high fluorine induces apoptosis and alters Bcl-2, Bax, and caspase-3 protein expression in the cecal tonsil lymphocytes of broilers. *Biol Trace Elem Res.* *152*:25–30.
- Lu, S. (2008). Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* *30*:42–59.
- López-Bayghen, E., & Ortega, A. (2010). Células gliales y actividad sináptica: Control traduccional del acople metabólico. *Revista de Neurología*, *50*(10), 607–615.
- López, J., Rivas-Cabañero, L., Eleno, N., Rodríguez-Barbero, A. (1995). Mecanismos básicos de nefrotoxicidad. *NEFROLOGIA*. Vol. XV. Suplemento 1
- Lu, Y., Luo, Q, Cui, H., Deng, H., Kuang P., Liu H., Fang J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2017). Sodium fluoride causes oxidative stress and apoptosis in the mouse liver. *Aging*. *9* (6):1623-1639.
- Luo, Q., Cui, H., Deng, H., Kuang, P., Liu, H., Lu Y., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2017). Histopathological findings of renal tissue induced by oxidative stress due to different concentrations of fluoride. *Oncotarget*. *8*(31):50430-50446
- Ma, Y., Niu, R., Sun, Z., Wang, J., Luo, G., Zhang, J., Wang, J. (2012). Inflammatory responses induced by fluoride and arsenic at toxic concentration in rabbit aorta. *Arch Toxicol.* *86*:849–56.
- Macedo-Márquez, A., (2012). The reactive oxygen species (ROS) production in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. *15*(2).
- McBean, G. (2002). Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters. *Trends Pharmacol. Sci.* *23*, 299–302.
- Malandro, M., & Kilberg, M, S. (1996). Molecular Biology of Mammalian Plasma Membrane Amino Acid Transporters. *Physiological Reviews*, *78*(4), 969–1054. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.969>
- Marco A. Flores-Méndez, Martínez-Lozada, Z., Monroy, H. C., Hernández-Kelly, L. C., Barrera, I., & Ortega, A. (2013). Glutamate-dependent translational control in cultured bergmann glia cells: EIF2 $\alpha$  phosphorylation. *Neurochemical Research*, *38*(7), 1324–1332. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1024-1>
- Martinez-Lozada, Z., Guillem, A. M., & Robinson, M. B. (2016). Transcriptional Regulation of Glutamate Transporters. From Extracellular Signals to Transcription Factors. In *Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 76). <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.01.004>
- Matthews, J. C., Beveridge, M. J., Malandro, M. S., Rothstein, J. D., Campbell-Thompson, M., Verlander, J. W., ... Novak, D. A. (1998). Activity and protein localization of multiple glutamate transporters in gestation day 14 vs. day 20 rat placenta. *American Journal of*

- Miralles, V., Martínez-López, I., Zaragoza, R., Borrás, E., García, C., Pallardo, F., & Viña R. (2001). Na<sup>+</sup> dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) in primary astrocyte cultures: effect of oxidative stress. *Brain Research*. 922 (1): 21-29.
- Muñoz, M., Pascual, B., Viana R., Pérez E. (2017). Alteraciones en la homeostasis del transportador de glutamato GLT-1 en la enfermedad de Lafora. Instituto De Biomedicina De Valencia.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- No Title. (n.d.). Retrieved from <https://estudientalbarcelona.com/fluorosis-dental-causas-tratamientos/>
- Olivares-Bañuelos, T. N., Martínez-Hernández, I., Hernández-Kelly, L. C., Chi-Castañeda, D., Vega, L., & Ortega, A. (2019). The neurotoxin diethyl dithiophosphate impairs glutamate transport in cultured Bergmann glia cells. *Neurochemistry International*, 123(March 2018), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.06.004>
- Padovano, V., Massari, S., Mazzucchelli, S. & Pietrini G. (2009). PKC induces internalization and retention of the EAAC1 glutamate transporter in recycling endosomes of MDCK cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 297(4):C835-44.
- Pérez, J. & Noriega, M. (2019). Fisiología general. Vías metabólicas de síntesis. Aminoácidos y nucleótidos. Universidad de Cantabria <https://ocw.unican.es/pluginfile.php/879/course/section/967/Tema%25205C-Bloque%2520I-Vias%2520Formacion%2520Aminoacidos%2520y%2520Nucleotidos.pdf>
- Perumal, E., Paul, V., Govindarajan, V., Panneerselvam, L. (2013). A brief review on experimental fluorosis. *Toxicol Lett*. 223:236–51.
- Pines, G., Danbolt, N., Bjoras, M., Zhang, Y., A., B., Eide, L., ... Kanner, B. (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, 359, 710–713.
- Pow, D. (2001). Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to amino adipic acid, a selectively transported substrate. *Glia* 34: 27–38.
- Pradera, D. (2016). Del Nutriente a la Dieta. <http://delnutrientealadieta.com/2016/02/03/modulo-5-1-naturaleza-tipos-y-propiedades-nutricionales-de-las-proteinas/52/>
- Proud, C. G. (2005). eIF2 and the control of cell physiology. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2004.11.004>
- Proud, C. G. (2007). A sharper instrument for dissecting signalling events: a specific AGC kinase inhibitor. *Biochemical Journal*, 401(1), e1. <https://doi.org/10.1042/bj20061691>
- Rendon-Rojas, M & Olivier, B. 2012. Acidosis tubular del equilibrio ácido básico por exposición a Fluoruro. CINVSTAV.
- Rothstein, J., Martin, L., Levey, A., Dykes-Hoberg, M., Nash, N., & Kuncl, R. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, 13, 713–725. <https://doi.org/10.1007/s00103-015-2220-8>
- Sánchez-Valle, V., Méndez-Sánchez, N., (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex*. 20(3):161-168.

- Sarkar, S., Maiti, R., Ghosh, D. (2006). Management of fluoride induced testicular disorders by calcium and vitamin-E co-administration in the albino rat. *Reprod Toxicol.* 22:606–12.
- Schlag, B. D., Vondrasek, J. R., Munir, M., Kalandadze, A., Zeleniaia, O. A., Rothstein, J. D., & Robinson, M. B. (1997). Regulation of the Glial Na<sup>+</sup>-Dependent Glutamate Transporters by Cyclic AMP Analogs and Neurons. *Molecular Pharmacology*, 53(3), 355–369. <https://doi.org/10.1124/mol.53.3.355>
- Seal, R. P., & Amara, S. G. (1999). EXCITATORY AMINO ACID TRANSPORTERS: A Family in Flux. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), 431–456. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.431>
- Seal, Rebecca P., Leighton, B. H., & Amara, S. G. (2000). A model for the topology of excitatory amino acid transporters determined by the extracellular accessibility of substituted cysteines. *Neuron*, 25(3), 695–706. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81071-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81071-5)
- Shashidharan, P., Huntley, G. W., Murray, J. M., Buku, A., Moran, T., Walsh, M. J., ... Plaitakis, A. (1997). Immunohistochemical localization of the neuron-specific glutamate transporter EAAC1 (EAAT3) in rat brain and spinal cord revealed by a novel monoclonal antibody. *Brain Research*, 773(1–2), 139–148. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00921-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00921-9)
- Shigeo, K., Toshihiro, D. & George R. (1994) Phorbol esters alter functions of the expressed dopamine transporter. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology.* 268(2):115-119
- Slotboom, D. J., Sobczak, I., Konings, W. N., & Lolkema, J. S. (1999). A conserved serine-rich stretch in the glutamate transporter family forms a substrate-sensitive reentrant loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(25), 14282–14287. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.25.14282>
- So, L., Lee, J., Palafox, M., Mallya, S., Woxland, C., Arguello, M., Truitt, M., Sonenberg, N., Ruggero, D. & Fruman, D. (2016). The 4E-BP–eIF4E axis promotes rapamycin-sensitive growth and proliferation in lymphocytes. *Inmm.* 9:430-444.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., & Stoffel, W. (2006). Structure, expression, and functional analysis of a Na<sup>(+)</sup>-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(22), 10955–10959. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10955>
- Teleman, A., Chen, Y. & Cohen S. (2005). 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *European Molecular Biology Laboratory.* 19:1844–1848
- Towbin, H., Staehlin, T., & Gordon, J. (1990). electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Biochemistry*, 76(9), 4350–4354.
- Trotti, D., Danbolt, N., & Volterra A. (1998). Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration?. *Trends in Pharmacological Sciences.* 19 (8):328-334
- Trotti D, Peng JB, Dunlop J, Hediger MA (2001) Inhibition of the glutamate transporter EAAC1 expressed in *Xenopus* oocytes by phorbol esters. *Brain Res* 914:196–203
- Velaz-Faircloth, M., McGraw, T. S., Alandro, M. S., Fremeau, R. T., Kilberg, M. S., & Anderson, K. J. (1996). Characterization and distribution of the neuronal glutamate transporter EAAC1

- in rat brain. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 270(1). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.270.1.c67>
- Xu, X., Li, Q., Cui, H., Pang, J., An, H., Wang, W., Zhai, J. (2012). Column-mode fluoride removal from aqueous solution by magnesia-loaded fly ash cenospheres. *Environ Technol.* 33:1409–15.
- Whitford, G. M. (1994). Intake and metabolism of fluoride. *Advances in Dental Research*, 8(1), 5–14. <https://doi.org/10.1177/08959374940080011001>
- Whitford, G.M., 2011. Acute toxicity of ingested fluoride. In: Buzalaf, M.A.R. (Ed.), *Fluoride Intake and the Oral Environment*. Monographs in Oral Science, vol. 22. Karger, Basel, Switzerland, pp. 66–80.
- Yernool, D., Boudker, O., Folta-Stogniew, E., & Gouaux, E. (2003). Trimeric Subunit Stoichiometry of the Glutamate Transporters from *Bacillus caldotenax* and *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry*, 42(44), 12981–12988. <https://doi.org/10.1021/bi030161q>
- Zerangue, N., & Kavanaugh, M. (1996). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature*, 634–637. <https://doi.org/10.1038/383634a0>
- Zhang, M., Wang, A., He, W., He, P., Xu, B., Xia, T., Chen, X., Yang, K. (2007). Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons. *Toxicology*. 236:208–216.
- Zhang, K., Lou, D., Guan, Z. (2015). Activation of the AGE/ RAGE system in the brains of rats and in SH-SY5Y cells exposed to high level of fluoride might connect to oxidative stress. *Neurotoxicol Teratol.* 48:49–55.
- Zhou, Y., Holmseth, S., Hua, R., Lehre, A. C., Olofsson, A. M., Poblete-Naredo, I., ... Danbolt, N. C. (2011). The betaine-GABA transporter (BGT1, slc6a12) is predominantly expressed in the liver and at lower levels in the kidneys and at the brain surface. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 302(3), F316–F328. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00464.2011>
- Zhou, Yongjiang, Zhang, H., He, J., Chen, X., Ding, Y., Wang, Y., & Liu, X. (2013). Effects of sodium fluoride on reproductive function in female rats. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.026>
- Zohoori, V., Marsland, R. (2017). Fluoride: Intake and Metabolism, Therapeutic and Toxicological Consequences. *Molecular Genetic and Nutritional Aspect of Major and Trace Minerals*. Capitulo 44: 539-550.

El jurado designado por el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional aprueba la tesis:

“Efecto de la exposición a Fluoruro en el transporte de glutamato en células de riñón”

Que presenta la Q.F.B. Andrea Yetlanetzi Ocharán Mercado para su examen final de Maestra en Ciencias en la Especialidad de Toxicología, el día 24 de agosto del año 2020.

---

Dr. Arturo Ortega Soto

---

Dra. Emma Soraida Calderón Aranda

---

Dr. Jorge Rodríguez Antolín