

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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

**“Regulación de los transportadores de aminoácidos  
excitadores en el daño hepático”**

**TESIS  
que presenta**

**M. en C. Ana Catya de Jesús Jiménez Torres**

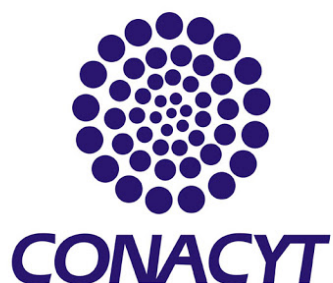
Para obtener el grado de

**DOCTORA en CIENCIAS  
en la especialidad de Toxicología**

Director de tesis:  
**Dr. Arturo Ortega Soto**

Ciudad de México

AGOSTO, 2020



El presente estudio fue realizado en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco. En el laboratorio de Neurotoxicología del Departamento de Toxicología, bajo la dirección del **Dr. Arturo Ortega Soto** y con el financiamiento otorgado por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, 2550873/490605.

El proyecto fue fruto de la colaboración con el Institut de Recherche Expérimentale et Clinique de la Université Catholique de Louvain. Realizando parte de la fase experimental en el Laboratorio de Hepatología Pediátrica y Terapia Celular, Bruselas, Bélgica. Proyecto Conacyt/FNRS 210238. El más sincero agradecimiento al **Dr. Mustapha Najimi** y a su equipo de trabajo.

## **Comité Evaluador**

### **Dra. María Isabel Hernández Ochoa**

Laboratorio de Toxicología Reproductiva Femenina, Dpto. de Toxicología,  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico  
Nacional

### **Dra. Esther López- Bayghen Patiño**

Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Dpto. de Toxicología,  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico  
Nacional

### **Dr. Saúl Villa Treviño**

Dpto. de Biología Celular,  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico  
Nacional

### **Dr. Francisco Castelán**

Dpto. Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Universidad Nacional Autónoma de México

## **AGRADECIMIENTOS**

A **Dios**. Mi idea de un Dios benevolente que me incita a ser mejor humano, consciente y maravillado de todos los fenómenos ocultos que la ciencia me permite descubrir.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por otorgarme la beca No. 210238 para el curso del posgrado.

Al **Dr. Arturo Ortega Soto**, por reafirmar en mí la importancia de la responsabilidad y dedicación, por demostrarme que el crecimiento tanto profesional como personal no es más que un acto de constancia. Gracias por sus enseñanzas, su confianza y paciencia, por exigirme dar siempre más, porque eso me permitió evolucionar y formarme como científica.

Al **Dr. Mustapha Najimi**, por compartir su conocimiento, por su confianza, esfuerzo y cooperación para la realización de este proyecto. También a su equipo de trabajo, **Jonathan Evraerts, Hoda El-Kehdy y Nawfal Chibani**, por integrarme como un miembro más del grupo durante mi estancia de investigación y por su asistencia técnica.

Al **comité evaluador**, por todas sus sugerencias y correcciones que enriquecieron este proyecto.

A la **M. en C. Clara Regina Hernández Kelly**, porque además de su apoyo profesional me ha brindado una gran amistad, gracias por los momentos juntas y por estar siempre para mí. También a **Blanca Ibarra y Luis Cid** por su apoyo técnico durante la realización de este proyecto.

Al laboratorio 31 del departamento de toxicología, **Ada, Janisse, Isabel, Jazmín, Ana, Laura, Fredy y Andrea** gracias por todos los momentos que compartimos juntos. A quienes fueron parte del equipo Neurotox, a la **Dra. Donaji, Dra. Edna**, gracias por sus enseñanzas y paciencia.

A mi **familia** y a **Julio Cesar Hernández**, por apoyar mis sueños, por creer en mí y hacerme una persona valiente y fuerte.

A todas las personas que influyeron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.



## **DEDICATORIA**

*A mi madre, cada nuevo reto está inspirado en ti. Gracias por demostrarme que el verdadero amor te hace libre, para soñar y crecer. Te amo.*

*“La ciencia y la vida diaria no pueden, ni deben estar separadas”  
Rosalind Franklin*

# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 EJE CEREBRO/HÍGADO .....	2
1.2 GLUTAMATO .....	5
1.3 GLUTAMATO EN EL HÍGADO .....	6
1.3.1 GLUTAMINASA .....	7
1.3.2 GLUTAMINA SINTETASA .....	7
1.3.4 GLUTAMATO DESHIDROGENASA .....	8
1.3.5 CICLO GLUTAMATO/GLUTAMINA Y ZONIFICACIÓN HEPÁTICA DEL METABOLISMO DEL GLUTAMATO .....	8
1.4 TRANSPORTE DE GLU EN EL HÍGADO .....	10
1.4.1 TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EXCITADORES .....	10
TRANSPORTADOR EAAT1/ GLAST .....	12
TRANSPORTADOR EAAT2/ GLT-1 .....	13
TRANSPORTADOR EAAT3/EAAC1 .....	14
1.4.2 TRANSPORTE DE GLUTAMATO INDEPENDIENTE DE SODIO .....	15
1.5 GLU EN EL DAÑO HEPÁTICO .....	15
1.5.1 COLESTASIS .....	16
1.5.2 FIBROSIS Y CIRROSIS .....	16
1.5.3 CARCINOMA HEPATOCELULAR .....	17
1.5.4 ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA .....	19
1.6 DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR XENOBIÓTICOS .....	21
1.6.1 BPA .....	22
1.6.2 CCL <sub>4</sub> .....	26
1.7 REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE GLU .....	29
1.7.1 REGULACIÓN DE EAAT1/GLAST .....	29
1.7.2 REGULACIÓN DE GLT-1/EAAT2 .....	31
1.7.3 REGULACIÓN DE EAAT3/EAAC1 .....	33
1.7.4 MOLÉCULAS REGULADORAS DEL TRANSPORTE DE GLU EN EL DAÑO HEPÁTICO .....	33
2. JUSTIFICACIÓN .....	36
3. HIPÓTESIS .....	37
4. OBJETIVOS .....	37
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	37
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	37
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
5.1 MATERIALES .....	38
5.2 CULTIVO CELULAR Y PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN .....	39
5.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA CELULAR .....	40
5.3.1 PRINCIPIO .....	40
5.3.2 MÉTODO .....	40
5.4 ACTIVIDAD DE CAPTURA DE [ <sup>3</sup> H]-D-ASPARTATO .....	41
5.4.1 PRINCIPIO .....	41
5.4.2 MÉTODO .....	41
5.5 ANIMALES Y MODELOS <i>IN VIVO</i> .....	41
5.5.1 EXPOSICIÓN SUB-CRÓNICA A BPA .....	41
5.5.2 HEPATOTOXICIDAD POR EXPOSICIÓN A CCL <sub>4</sub> .....	42
5.6 EVALUACIÓN DE DAÑO HISTOPATOLÓGICO: TINCIÓN HEMATOXILINA- EOSINA (HE) .....	43
5.6.1 PRINCIPIO .....	43
5.6.2 MÉTODO .....	43

<b>5.7 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA E INMUNODETECCIÓN EN FASE SÓLIDA .....</b>	<b>44</b>
5.7.1 PRINCIPIO.....	44
5.7.2 MÉTODO A PARTIR DEL CULTIVO CELULAR.....	44
5.7.3 MÉTODO A PARTIR DE TEJIDO.....	45
<b>5.8 INMUNOFLUORESCENCIA .....</b>	<b>46</b>
A) CULTIVOS CELULARES .....	46
B) HÍGADO .....	47
5.8.3 PRINCIPIO.....	47
5.8.4 MÉTODO .....	47
<b>5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>48</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
6.1 EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO EN LA LÍNEA CELULAR HEPG2 .....	48
6.2 ACTIVIDAD DE LOS TRANSPORTADORES DE GLU EN LA LÍNEA CELULAR HEPG2.....	49
6.3 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AGUDA A BPA SOBRE LOS TRANSPORTADORES DE GLU.....	52
6.4 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN CÉLULAS HEPG2 DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A BPA.....	56
6.5 EFECTO DEL BPA EN LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO EN UN MODELO ANIMAL DE EXPOSICIÓN SUB-CRÓNICA.....	57
6.6 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EXCITADORES EN LA HEPATOTOXICIDAD AGUDA INDUCIDA POR CCL <sub>4</sub> .....	59
6.6.1 VALIDACIÓN DE DAÑO AGUDO EN HÍGADO POR CCL <sub>4</sub> .....	59
6.6.2 EL TRANSPORTE DE GLUTAMATO SE ALTERA EN EL TEJIDO HEPÁTICO DESPUÉS DE UNA LESIÓN AGUDA.....	63
6.6.3 LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO EN EL SNC SE ALTERA DESPUÉS DE LA HEPATOTOXICIDAD AGUDA.....	64
6.6.4 PÉRDIDA NEURONAL Y ACTIVACIÓN GLIAL DESPUÉS DE LA TOXICIDAD HEPÁTICA AGUDA POR CCL <sub>4</sub> .....	67
6.6.5 LA EXPRESIÓN DE GLUTAMINA SINTETASA SE MODIFICA EN EL SNC DESPUÉS DE UNA DOSIS ÚNICA DE CCL <sub>4</sub> .....	68
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>70</b>
<b>8. MODELO PROPUESTO DE LA REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO EN LA EXPOSICIÓN A BPA EN CÉLULAS HEPG2.....</b>	<b>76</b>
<b>9. MODELO PROPUESTO DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO EN EL EJE HÍGADO-CEREBRO DURANTE LA HEPATOTOXICIDAD AGUDA POR CCL<sub>4</sub>.....</b>	<b>77</b>
<b>10. CONCLUSIONES .....</b>	<b>78</b>
<b>11. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>79</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>92</b>

## Índice de figuras

<b>FIGURA 1. ANATOMÍA MACROSCÓPICA DEL SISTEMA NERVIOSO HEPÁTICO .....</b>	<b>3</b>
<b>FIGURA 2. SISTEMA PORTA HEPÁTICO HUMANO .....</b>	<b>4</b>
<b>FIGURA 3. MODELO DE LA LANZADERA ASTROCITO, NEURONA LACTATO Y EL CICLO GLUTAMATO/GLUTAMINA (GLU/GLN) ENTRE LA NEURONA PRE-SINÁPTICA, LA POST-SINÁPTICA Y LA CÉLULA GLIAL.....</b>	<b>6</b>
<b>FIGURA 4. MODELO DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO.....</b>	<b>12</b>
<b>FIGURA 5. MECANISMO DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA PORTO-SISTÉMICA .....</b>	<b>20</b>
<b>FIGURA 6. TOXICOCINÉTICA DEL BPA.....</b>	<b>23</b>

<b>FIGURA 7. MECANISMO DE ACCIÓN DEL BPA COMO XENOESTRÓGENO.....</b>	<b>26</b>
<b>FIGURA 8. ACTIVACIÓN, METABOLISMO Y EFECTOS DEL CCL<sub>4</sub> EN LA CÉLULA.....</b>	<b>28</b>
<b>FIGURA 9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>40</b>
<b>FIGURA 10. MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO CON CCL<sub>4</sub>. .....</b>	<b>43</b>
<b>FIGURA 11. EXPRESIÓN FUNCIONAL DE TRANSPORTADORES DE GLU EN CÉLULAS HEPG2 .....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA 12. ACTIVIDAD DE LOS TRANSPORTADORES DE GLU EN CÉLULAS HEPG2.....</b>	<b>50</b>
<b>FIGURA 13. LA EXPOSICIÓN AGUDA A D-ASPARTATO DETERIORA LA ACTIVIDAD DE LOS TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EXCITADORES EN LAS CÉLULAS HEPG2 .....</b>	<b>51</b>
<b>FIGURA 14. LA EXPOSICIÓN AGUDA A BPA MODIFICA LA ACTIVIDAD DE LOS TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS EXCITADORES EN LAS CÉLULAS HEPG2 .....</b>	<b>53</b>
<b>FIGURA 15. LA EXPOSICIÓN AGUDA A BPA DISMINUYE ACTIVIDAD DE EAAT2 EN LAS CÉLULAS HEPG2. ....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 16. LA EXPOSICIÓN AGUDA A BPA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE EAAT1 EN LA LÍNEA CELULAR HEPG2. ....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURA 17. BPA REGULA LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO A NIVEL TRANSCRIPCIONAL. .....</b>	<b>57</b>
<b>FIGURA 18. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN SUBCRÓNICA A BPA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO EN EL CEREBELO DE RATONES HEMBRAS ADULTAS ..</b>	<b>58</b>
<b>FIGURA 19. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN SUBCRÓNICA A BPA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO EN CEREBRO DE RATONES HEMBRAS ADULTAS.....</b>	<b>59</b>
<b>FIGURA 20. VALIDACIÓN DE LA LESIÓN HEPATOCELULAR DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AGUDA A CCL<sub>4</sub> .....</b>	<b>60</b>
<b>FIGURA 21. EXPRESIÓN PROTEICA DE GLUTAMINA SINTETASA Y A-ACTINA DE MÚSCULO LISO EN TEJIDO HEPÁTICO DESPUÉS DE UNA DOSIS ÚNICA Y TRES DOSIS DE CCL<sub>4</sub> .....</b>	<b>62</b>
<b>FIGURA 22. LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE EAAT2/GLT-1 SE REGULAN EN EL HÍGADO DESPUÉS DE UNA DOSIS ÚNICA DE CCL<sub>4</sub>.....</b>	<b>64</b>
<b>FIGURA 23. EL PATRÓN DE EXPRESIÓN PROTEICA DE EAAT1/GLAST SE ALTERA EN CEREBELO Y CEREBRO DESPUÉS DE UNA DOSIS ÚNICA DE CCL<sub>4</sub>.....</b>	<b>65</b>
<b>FIGURA 24. LA EXPRESIÓN PROTEICA DE EAAT2/GLT-1 SE REGULA NEGATIVAMENTE EN EL CEREBELO DESPUÉS DE UNA DOSIS DE CCL<sub>4</sub> .....</b>	<b>66</b>
<b>FIGURA 25. LOS RATONES CON HEPATOTOXICIDAD AGUDA MUESTRAN PÉRDIDA CELULAR EN LA CAPA DE PURKINJE Y ACTIVACIÓN GLIAL EN CEREBELO Y CEREBRO. ....</b>	<b>68</b>
<b>FIGURA 26. UNA DOSIS DE CCL<sub>4</sub> INDUCE LA EXPRESIÓN DE GS EN EL CEREBRO DE RATÓN. ...</b>	<b>69</b>
<b>FIGURA 27. MECANISMO PROPUESTO EN LA EXPOSICIÓN AGUDA A BPA EN CÉLULAS HEPG2 .</b>	<b>76</b>
<b>FIGURA 28. MODELO DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLU EN EL EJE HÍGADO- SNC DURANTE LA HEPATOTOXICIDAD AGUDA POR CCL<sub>4</sub>. ....</b>	<b>77</b>

## Índice de tablas

<b>TABLA 1. ANTICUERPOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS .....</b>	<b>46</b>
---	-----------

## ABREVIATURAS

<b>Acetil CoA</b>	Acetil coenzima A
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>ASCT</b>	Transportador de aminoácidos neutros
<b>BPA</b>	Bisfenol A
<b>BPA-G</b>	Bisfenol glucorónido
<b>BPA-S</b>	Bisfenol sulfato
<b>CCl<sub>4</sub></b>	Tetracloruro de carbono
<b>CDC</b>	(Centers for Disease Control and Prevention) Centro para el Control y prevención de Enfermedades
<b>CPSI</b>	Carbamoil fosfato sintetasa
<b>Cyp</b>	Citocromo
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>d-asp</b>	d-aspartato
<b>EAAC</b>	Transportador de aminoácido excitadores (Excitatory aminoacid carrier)
<b>EAAT</b>	Transportador de aminoácidos excitadores (Excitatory aminoacid transporter)
<b>EDI</b>	Ingesta diaria estimada (estimated daily intake)
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamil-tetrácetico
<b>EFSA</b>	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)
<b>ER</b>	Receptor de estrógenos (Estrogen receptor)
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)
<b>GDH</b>	Glutamato deshidrogenasa
<b>GS</b>	Glutamina sintetasa
<b>GLAST</b>	Transportador de glutamato- aspartato (glutamate aspartate transporter)
<b>GLT-1</b>	Transportador de glutamato 1 (Glutamate transporter 1)
<b>Glu</b>	Glutamato
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>KM</b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>L- asp</b>	L- aspártico
<b>L- glu</b>	L- glutamato
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>mTOR</b>	Diana de rapamicina en células de mamífero (mammalian target of rapamycin)
<b>mTORC1</b>	Diana de rapamicina en células de mamífero complejo 1
<b>mTORC2</b>	Diana de rapamicina en células de mamífero complejo 2
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleótido de nicotina y adenina
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NOAEL</b>	Nivel de Efectos Adversos No Observables (no observed adverse effect level)
<b>PBS</b>	Solución reguladora de fosfatos
<b>PDK</b>	Piruvato deshidrogenasa quinasa

<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol (3,4,5) -trisfosfato
<b>PI3-K</b>	Fosfatidilinositol 3- cinasa
<b>PKB</b>	Proteína cinasa B
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PMA</b>	Forbol 12-miristato-13-acetato
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SULT</b>	Sulfotransferasa
<b>TBS</b>	Solución reguladora tris salino
<b>TDI</b>	Ingesta diaria tolerable (tolerable daily intake)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral (tumor necrosis factor alpha)
<b>US-EPA</b>	Agencia de Protección del Medio Ambiente (United States Environmental Protection Agency)
<b>YY1</b>	Factor de transcripción Ying-Yang 1
<b>4EBP1</b>	Factor eucariótico de iniciación de la traducción 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein)

## Resumen

El L-glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro de los vertebrados. El mantenimiento de niveles no excitotóxicos de este aminoácido en el sistema nervioso central se logra a través de proteínas específicas conocidas como transportadores de aminoácidos excitadores. Estas proteínas transmembranales son las encargadas del aclaramiento de glutamato en la hendidura sináptica. Interesantemente, estos transportadores se expresan también en órganos periféricos, como el hígado, en el que la disponibilidad intracelular de glutamato es altamente controlada. La homeóstasis de este aminoácido se ve alterada durante el daño hepático, por lo que su sistema de transporte podría estar vinculado con el mantenimiento de las reservas de glutamato como parte de la respuesta para sostener la demanda metabólica. En el presente estudio se analizó *in vitro* e *in vivo* la expresión y actividad de los transportadores membranales de glutamato. Se utilizó la línea celular de hepatoblastoma humano HepG2, empleando como reto, la exposición a BPA, un compuesto utilizado en la manufactura de plásticos, lo que permitió caracterizar la regulación dinámica de la expresión de los transportadores de glutamato: EAAT1 y EAAT2. Los experimentos de captura de [<sup>3</sup>H] -D-aspartato junto con un enfoque inmunológico demostraron una regulación dependiente del tiempo y de la dosis de ambos transportadores después de la exposición a este contaminante ambiental. Estos resultados sugieren que la disrupción de los transportadores de glutamato en el hígado por la exposición a BPA y resaltan la participación del factor de transcripción Ying-Yang-1 en este proceso. Por otra parte, los resultados del modelo *in vivo* de daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub> en ratones C57BL/6J demostraron la sobreexpresión de GLT-1 en tejido hepático, la activación glial y pérdida neuronal en sistema nervioso central y el aumento en la expresión de GLAST en tejido cerebelar. En conjunto, estos hallazgos indican que existe una modificación en los patrones de expresión de los transportadores de glutamato tanto en hígado como en el SNC durante la exposición aguda a moléculas hepatotóxicas.

**Palabras clave:** L-glutamato, EAAT1, EAAT2, hígado, HepG2.

## Abstract

L-glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the vertebrate brain. The maintenance of non-excitotoxic levels of this amino acid in the central nervous system is accomplished through specific proteins known as excitatory amino acid transporters, a transmembrane proteins group that are responsible for the clearance of glutamate in the synaptic cleft. Interestingly, these transporters are also expressed in peripheral organs, such as the liver, where the intracellular availability of glutamate is highly controlled. The homeostasis of this amino acid is altered during liver damage, and its transport system might be linked to the maintenance of glutamate stores as part of the response to support the metabolic demand. In the present study, the expression and activity of membrane glutamate transporters were analyzed *in vitro* and *in vivo*. The human hepatoblastoma cell line HepG2 was used, under a BPA exposure model. BPA is a compound used in the manufacture of plastics, which allowed characterizing the dynamic regulation of the expression of glutamate transporters: EAAT1 and EAAT2. [<sup>3</sup>H] -D-aspartate uptake experiments together with an immunochemical approach demonstrated a time- and dose-dependent regulation of both transporters after exposure to this environmental contaminant. These results suggest the disruption of glutamate transporters in the liver by exposure to BPA and highlight the participation of the transcription factor Ying-Yang-1 in this process. On the other hand, the results of the *in vivo* model of liver damage induced by CCl<sub>4</sub> in C57BL / 6J mice demonstrated the overexpression of GLT-1 in liver tissue, glial activation and neuronal loss in the central nervous system, and increased expression of GLAST in cerebellar tissue. Taken together, these findings indicate that there is a modification in the expression patterns of glutamate transporters in both, liver and central nervous system during acute exposure to hepatotoxic molecules.

**Key words:** L-glutamate, EAAT1, EAAT2, liver, HepG2.



## 1. Introducción

El hígado ha sido considerado un órgano importante desde las primeras civilizaciones. En la cuna de Mesopotamia y posteriormente en Egipto el hígado era nombrado como el “lugar o asiento de la vida”. Durante un largo tiempo se le atribuyó como “la fuerza vital” debido a su gran tamaño y riqueza en sangre [1]. Galeno sostuvo en una de sus hipótesis que el hígado era el “*fons venarum*,” la fuente de las venas del cuerpo y “*sanguifactionis officina*”, la fábrica de la sangre. Sin embargo, tiempo después prevaleció la visión cardiocéntrica de la vida, además, investigaciones biológicas y fisiológicas en el campo de las neurociencias han puesto en la mira al cerebro como el órgano vital [2].

Actualmente los estudios indican que los hallazgos descritos en la antigüedad, cuando el hígado era considerado un órgano con poderes de augurio y divinidad por ser el “alma o humor” del cuerpo, no eran más que el reflejo de la conexión de este con el sistema nervioso. Hipócrates fue el primero en describir esta relación hígado-sistema nervioso, en sus ensayos mencionó: “los que están trastornados por la flema son callados, pero los que están por la bilis son vociferantes, viciosos y no se callan”. Hipócrates aseguraba que el cuerpo humano constaba de cuatro sustancias o humores; sangre, bilis amarilla, bilis negra y flema. Cuando decía “demasiada bilis negra es la causa de melancolía y mal genio”, se refería muy probablemente a la descripción de un paciente con daño hepático que presentaba además trastornos neurológicos [3, 4]. Posteriormente James Foley y Raymond Adam (1949) describieron con una aproximación bioquímica, electrofisiológica y morfológica la neurología asociada al daño hepático, más comúnmente conocida como la encefalopatía hepática (EH) [5, 6]. Después de diversos estudios, es claro que entre los daños observados a nivel de sistema nervioso en la patología hepática se encuentran la morfología anormal de los astrocitos, trastornos metabólicos, y alteración en la homeostasis del Glu [7–11].

La homeostasis del Glu en el SNC se logra a través de proteínas específicas conocidas como transportadores de aminoácidos excitadores (EAATs), encargados de su aclaramiento desde la hendidura sináptica, introduciendo este aminoácido principalmente a las células gliales [12, 13]. La desregulación en la expresión o actividad de los

transportadores resulta en la activación sostenida de los receptores de Glu y una posible muerte celular por excitotoxicidad [14].

Estos transportadores se expresan también en órganos periféricos, como el hígado [15, 16]. Sin embargo, la importancia de los EAATs en este órgano se limita al metabolismo. En primer lugar, en el mantenimiento de altas concentraciones de Glu intracelular como sustrato necesario para el mantenimiento energético y en segundo lugar como sustrato esencial en la detoxificación de amonio; ambas son características importantes en el desarrollo de diversas hepatopatías [17–22].

### **1.1 Eje cerebro/hígado**

El sistema nervioso se encuentra dividido en el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está compuesto por el cerebro, el tronco encefálico, el cerebelo y la médula espinal, mientras que el SNP lo forman los diferentes nervios que surgen del SNC. El sistema nervioso autónomo como componente del SNP, regula los procesos fisiológicos involuntarios y contiene tres divisiones anatómicamente distintas: simpática, parasimpática y entérica [23].

El parénquima hepático en humanos se encuentra innervado por nervios aferentes y eferentes [24, 25]. La innervación simpática postganglionar, derivada del ganglio celíaco mesentérico, recibe fibras pre-ganglionares de la médula espinal (de la T7 a T12). La innervación parasimpática se ramifica desde el nervio vago, innervando al hígado como fibras pre-ganglionares originadas en el núcleo motor dorsal del tronco encefálico o indirectamente formando una sinapsis en el hilio hepático. Estas fibras se distribuyen en el hígado desde el hilio del portal hepático y posteriormente se ramifican junto con las arterias hepáticas y la vena porta (Figura 1) [23, 26, 27].

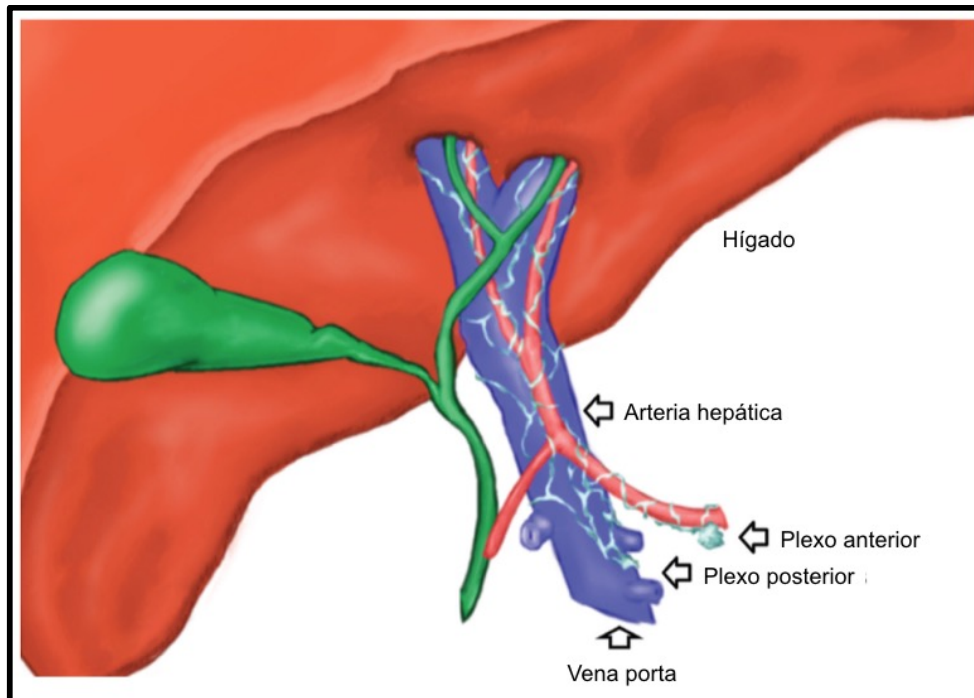


Figura 1. Anatomía macroscópica del sistema nervioso hepático. El plexo anterior se forma alrededor de la arteria hepática común, y el plexo posterior se forma alrededor de la vena porta. Estos plexos siguen estas estructuras para ingresar al hilio hepático y transportar fibras aferentes y eferentes de origen simpático y parasimpático. Modificado de Jensen *et al.*, 2013.

La inervación entre el sistema nervioso y el hígado regula diversos procesos metabólicos por medio de fibras aferentes, que censa y proporciona información al SNC sobre el nivel de glucosa, de lípidos y la osmolalidad en la vena portal [26]. En contraste, las fibras eferentes son vitales en la regulación del flujo sanguíneo y la secreción de bilis [27].

Por otra parte, el sistema venoso portal también tiene un papel relevante entre la conexión del hígado con otros órganos, incluyendo el SNC. El sistema portal incluye todas las venas que drenan la parte abdominal del tubo digestivo, el bazo, el páncreas y el sistema biliar. La vena porta se encuentra en una fisura transversal, entre los lóbulos cuadrado y caudado; es el principal vaso sanguíneo aferente del hígado y surge en la unión de las venas mesentéricas y esplénicas superiores, anterior a la vena cava inferior y posterior al cuello del páncreas. La sangre es transportada desde las vísceras por la vena porta al hígado, esta se ramifica como una arteria y termina en los sinusoides desde los cuales la sangre converge nuevamente para llegar a la vena cava inferior a través de las venas hepáticas. La circulación que corresponde a la arteria hepática se mezcla en los sinusoides suministrando oxígeno a los hepatocitos. Esta mezcla se filtra y se acumula

en una vena central que drena en la vena hepática y posteriormente en la vena cava inferior comunicando la circulación portal con la sistémica (Figura 2). La sangre aferente suministrada por la vena porta es el 80% del suministro vascular del hígado, mientras que por la arteria hepática es del 20%.

Sin embargo, cuando se obstruye la circulación portal, ya sea dentro o fuera del hígado, se desarrolla una circulación colateral notable para llevar sangre portal a las venas sistémicas [28–30].

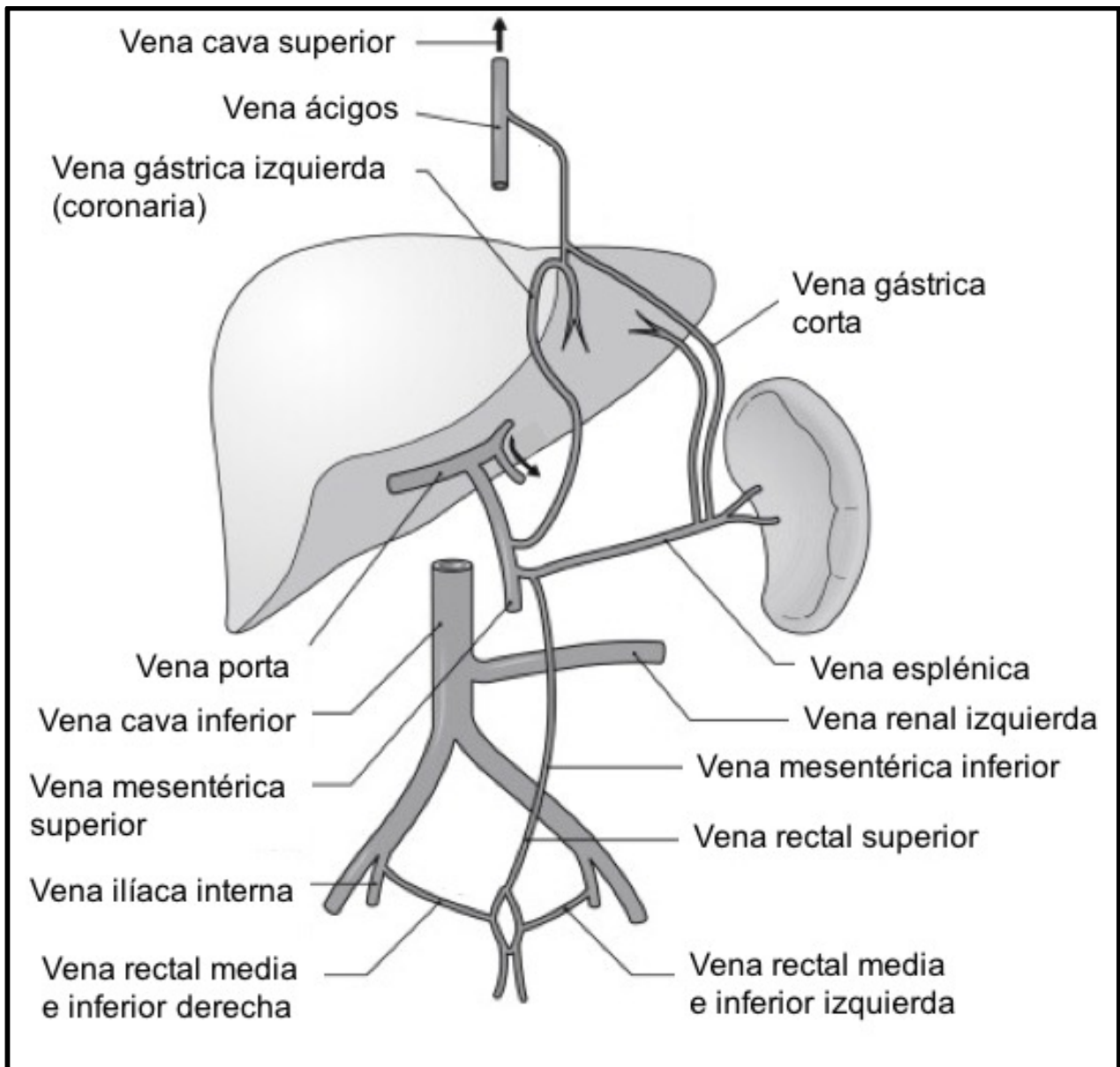


Figura 2. Sistema porta hepático humano. Modificado de Alkhouri *et al.*, 2011.

## **1.2 Glutamato**

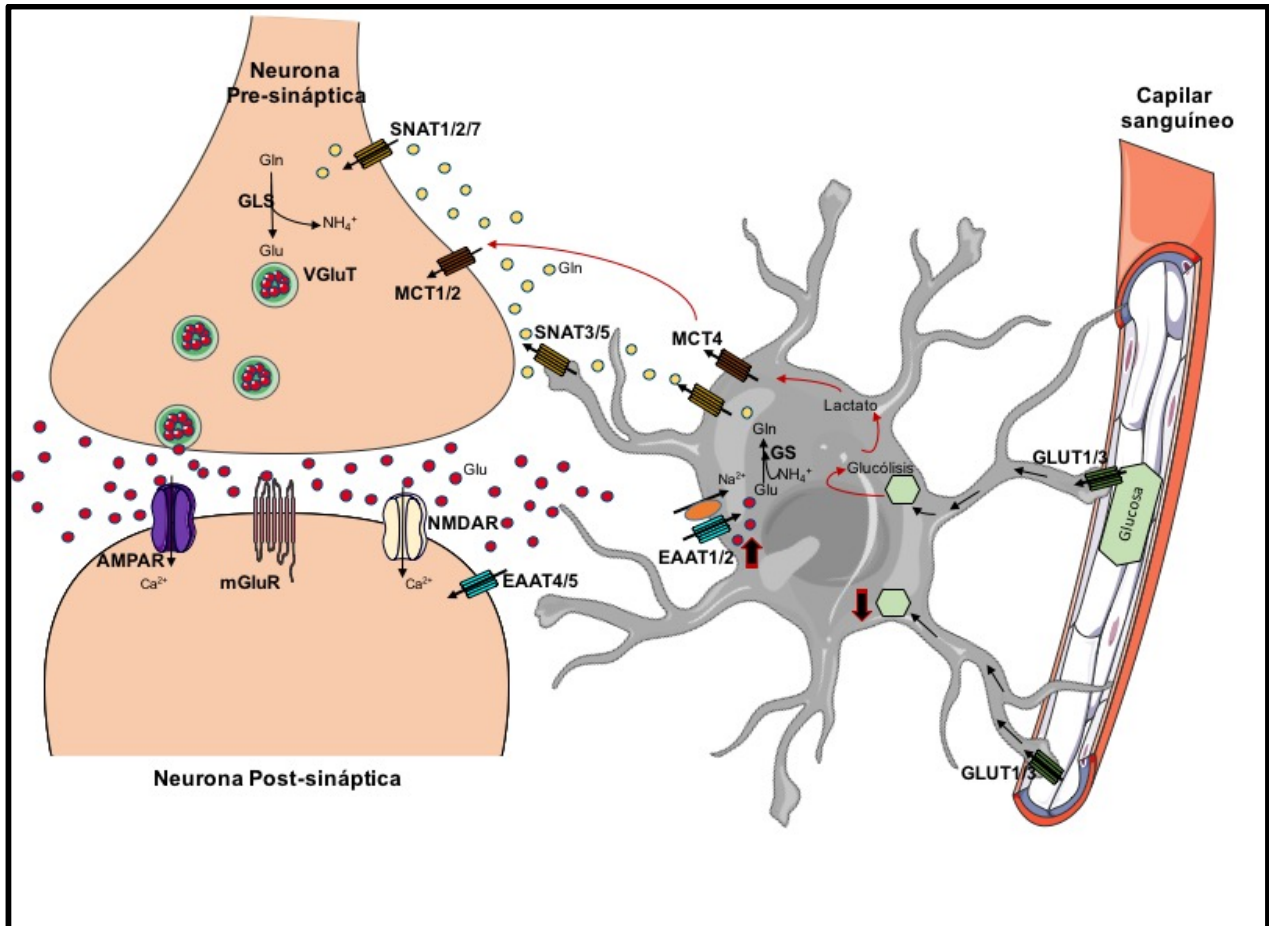
El Glu es el principal neurotransmisor excitador en vertebrados. Desempeña un rol crítico en la plasticidad sináptica y en el neurodesarrollo (Mayer and Westbrook, 1987). Las concentraciones extracelulares bajas de Glu (en el rango  $\mu\text{M}$ ) en el SNC permiten la activación correcta de receptores específicos y protección neuronal contra la excitotoxicidad por el exceso de Glu. El mantenimiento de las concentraciones de Glu en la hendidura sináptica se lleva a cabo por proteínas de transporte de Glu de la familia de acarreadores de soluto SLC1 e incluyen a los EAAT1-5.

La importancia del equilibrio del Glu radica no solo en su rol como neurotransmisor sino también a nivel metabólico como sustrato clave para la homeostasis celular. Las sinapsis glutamatérgicas poseen tres componentes importantes: la neurona pre-sináptica, la post-sináptica y las células gliales. Modelos como la lanzadera astrocito, neurona lactato y el ciclo glutamato/glutamina (Glu/Gln) sustentan que el Glu está implicado en el metabolismo energético, en la síntesis de Gln y por consiguiente en la detoxificación de amonio.

En la Figura 3 se observa que el Glu es liberado por la fusión de las vesículas sinápticas a la pre-sinapsis, como consecuencia de la depolarización y de la generación de un potencial de acción de la neurona pre-sináptica. El Glu en el espacio sináptico, se une a diversos receptores de glutamato ionotrópicos (NMDA, AMPA, kainato) y metabotrópicos localizados en la neurona pre y post-sináptica, resultando en un cambio en la permeabilidad membranal de la neurona post-sináptica.

El aclaramiento del Glu del espacio extracelular es llevado a cabo por los EAATs, iniciando con el reciclaje de este aminoácido. La captura de Glu en las células gliales incrementa las concentraciones de  $\text{Na}^+$  intracelular promoviendo la activación de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y glicólisis por el consumo de ATP, con la posterior utilización de glucosa y producción de lactato, el cual es liberado por el transportador de monocarboxilatos 4 (MCT) y capturado en la neurona por MCT1 y 2. Una vez internalizado en la célula glial, el Glu actúa como sustrato junto con  $\text{NH}_4^+$  para la producción de Gln a través de la acción de glutamina sintetasa (GS) en una reacción dependiente de ATP. Los transportadores de aminoácidos neutros dependientes de sodio (SNATs) son los que se encargan tanto

de la liberación de Gln de la célula glial, así como de su captura en la neurona, en donde es desaminada por la acción de la enzima glutaminasa (GLS) generando el Glu que se incorpora a las vesículas sinápticas, a través de los transportadores vesiculares de Glu (VGluT).



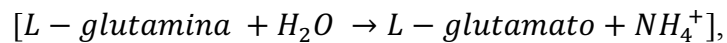
**Figura 3.** Modelo de la lanzadera astrocito, neurona lactato y el ciclo glutamato/glutamina (Glu/Gln) entre la neurona pre-sináptica, la post-sináptica y la célula glial. Modificada de Magistretti, 2009.

### 1.3 Glutamato en el hígado

En el hígado, el Glu es fundamental para la homeostasis celular. Actúa como sustrato central para la síntesis de urea, la gluconeogénesis, el metabolismo de los aminoácidos, la producción de glutatión y la transferencia de nitrógeno a través de la glutamina. El metabolismo hepático del Glu es principalmente intracelular, llevado a cabo por varias enzimas que se expresan diferencialmente a través del lóbulo hepático [22, 31–33].

### 1.3.1 Glutaminasa

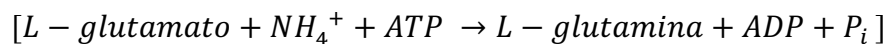
La glutaminasa (GA) fue descubierta por Krebs en su trabajo pionero sobre el metabolismo de los aminoácidos [34]. Posteriormente Errera y Greenstein demostrarían que el fosfato aumenta la actividad enzimática de GA en extractos de hígado, riñón, cerebro y bazo cambiando el nombre a GA activada por fosfato [35]. GA es una enzima presente en las mitocondrias y cataliza la hidrólisis de la glutamina para formar glutamato y amonio.



Entre las principales funciones fisiológicas de GA incluyen el aporte de nitrógeno para el ciclo de la urea, suministro de Glu como sustrato para la gluconeogénesis y para el posible mantenimiento energético de las células [36]. Las propiedades de la GA en el hígado difieren de las correspondientes a otros órganos. La isoforma hepática tiene una baja dependencia de Pi y no es inhibida por Glu, pero muestra activación por amoníaco, a diferencia de la GA renal/cerebral que tiene una alta dependencia de Pi y es inhibida por Glu, además, la enzima hepática tiene una *KM* mucho más alta (28 mM) para Gln. GA es expresada predominantemente en el hígado postnatal en la zona periportal [36–38].

### 1.3.2 Glutamina sintetasa

La glutamina sintetasa (GS), también conocida como L-glutamato: amoníaco ligasa, realiza la reacción opuesta de GA; esta enzima cataliza la síntesis de Gln a partir de Glu y  $NH_4^+$  libre en una reacción irreversible dependiente de ATP en el citosol.

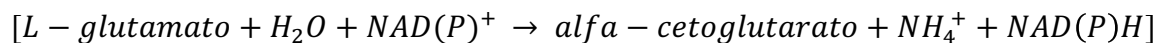


La expresión de GS en el hígado se limita a los hepatocitos perivenosos [38] y su rol principal en el hígado metabolizar el amoníaco que no se incorpora al ciclo de la urea en las células periportales, por lo cual GS tiene una afinidad relativamente alta por el amoníaco con un valor de *KM* de 0.2 mmol/L [22, 39]. La regulación de GS se ha estudiado ampliamente y algunos de los experimentos en respuesta a cambios fisiológicos *in vivo* (diabetes o después de cambios en la ingesta de proteína) no muestran

cambios significativos en su actividad, sugiriendo que los niveles totales de Gln están regulados principalmente por su consumo y no por su síntesis [22]. Sin embargo, se ha demostrado que la disminución del pH estimula la actividad de GS e inhibe la de GA, mientras que ocurre lo contrario ante un pH elevado [40]. Además, su actividad es inhibida por metionina sulfoximina, glicina y carbamoil fosfato y activada por alfa-cetoglutarato en presencia de  $Mg_2^+$  o  $Mn_2^+$  [41].

### 1.3.4 Glutamato deshidrogenasa

La enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) es responsable de la degradación completa de los aminoácidos por la desaminación oxidativa de Glu a alfa-cetoglutarato y amoníaco en una reacción reversible [42].



La GDH se localiza en la matriz mitocondrial ensamblada como un homohexámero en cantidades importantes en el cerebro, el páncreas, los riñones y el hígado. Esta enzima participa en las vías de utilización y síntesis de Gln. Su actividad en el hígado es alta y generalmente se considera que cataliza una reacción cercana al equilibrio. Este hecho sugiere que el flujo neto podría estar en ambas direcciones, dependiendo de los sustratos y la cantidad de producto [22]. La GDH está estrictamente regulada, es inhibida alostéricamente por GTP, mientras que ADP, ATP y leucina la activan también de forma alostérica [43].

### 1.3.5 Ciclo glutamato/glutamina y zonificación hepática del metabolismo del glutamato

El ciclo del Glu/Gln es un aspecto esencial del reciclaje del Glu en el SNC. En el hígado, el metabolismo de los aminoácidos está físicamente separado por zonificación, principalmente el metabolismo de Glu, Gln, arginina y ornitina, debido que las enzimas involucradas en su síntesis y/o degradación se expresan en áreas específicas del hígado. Esta separación permite la regulación independiente de los procesos metabólicos y la eliminación del exceso de amoníaco de la circulación [21].



La GS se expresa únicamente en los hepatocitos ubicados en una de las tres capas celulares que rodean la vena central, mientras que el GA y las enzimas implicadas en la gluconeogénesis y la síntesis de urea se expresan en los hepatocitos periportales. Esta distribución de enzimas está tan bien estudiada que la expresión de GS se ha utilizado ampliamente como un marcador clave de los hepatocitos perivenosos [44]. El catabolismo Gln tiene lugar en los hepatocitos periportales, donde se desamina por la actividad de GA y el amoníaco producido se toma por la carbamoilfosfato sintetasa (CPS) y la posterior síntesis de urea. El Glu podría metabolizarse más para producir otros aminoácidos por transaminación o ingresar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) como sustrato anaplerótico, para integrarse en la ruta de la gluconeogénesis, o estar disponible para su absorción por los hepatocitos pericentrales en los que se utiliza para sintetizar glutatión [21, 45].

La explicación de esta zonificación se remite al amoníaco. De acuerdo con esta hipótesis, el amoníaco, la Gln y otros aminoácidos se utilizan para la síntesis de urea por los hepatocitos periportales donde los productos finales son urea y glucosa. Sin embargo, parte del amoníaco no es eliminado debido a la baja afinidad de la síntesis de urea por este, debido que GS tiene una alta afinidad por el amoníaco. El amoníaco que no fue desintoxicado en los hepatocitos periportales es absorbido por los hepatocitos perivenosos y utilizado como sustrato de GS [46]. Lo anterior se sustenta en que la destrucción selectiva de los hepatocitos perivenosos produce hiperamonemia al igual que ocurre en la deficiencia de GS [47].

Además de las enzimas del metabolismo Glu/Gln, los transportadores de aminoácidos también se expresan en zonas hepáticas específicas. Los hepatocitos sintetizadores de urea expresan transportadores de Gln del sistema N, responsables de la absorción de Gln de la sangre contra un gradiente de concentración [44]. Por otro lado, el flujo de Gln de los hepatocitos que expresan GS está mediada por transportadores de Gln independientes del sodio, que actúan utilizando la fuerza impulsora de altas concentraciones de Gln intracelular [48].

La distribución de los transportadores de Glu dependientes e independientes de sodio es inversa a la de los transportadores de Gln. Los hepatocitos perivenosos expresan

transportadores de Glu dependientes de sodio que median la absorción de Glu a través de la superficie sinusoidal utilizada para la síntesis de Gln. Sin embargo, se ha demostrado que estos transportadores se expresan en células periportales después de la estimulación hormonal, lo que sugiere que en estos hepatocitos el Glu puede usarse como sustrato para urea y producción de glucosa en condiciones fisiológicas especiales. La captura de Glu independiente del sodio tiene una distribución homogénea en el hígado, lo que demuestra que el intercambio de Glu está presente en todos los hepatocitos [44].

Con respecto a la contraparte del ciclo, se ha caracterizado la actividad de la arginasa en las células perivenosas [49]. La arginina absorbida podría ser convertida en ornitina, que después de una reacción de transaminación produciría Glu a través de la acción de la pirrolina 5-carboxilato deshidrogenasa [50]. Este Glu podría funcionar como un sustrato para la síntesis de Gln; sin embargo, la cantidad de arginina u ornitina disponible para esta ruta es relativamente pequeña [22].

#### **1.4 Transporte de Glu en el hígado**

Debido a su carga global de -1 a pH fisiológico 7.4, el Glu es incapaz de cruzar fácilmente las membranas celulares. Las células expresan diferentes proteínas responsables del transporte de Glu, que pueden clasificarse en dos grupos: dependientes e independientes de sodio.

En contraste con las células especializadas en la internalización de Glu como las células gliales en el SNC, que expresan abundantemente estos transportadores, otras estirpes celulares en órganos periféricos los expresan aunque en una menor densidad [15, 51]. Las células hepáticas expresan ambos tipos de transportadores de Glu, dependientes e independientes de sodio.

##### **1.4.1 Transportadores de aminoácidos excitadores**

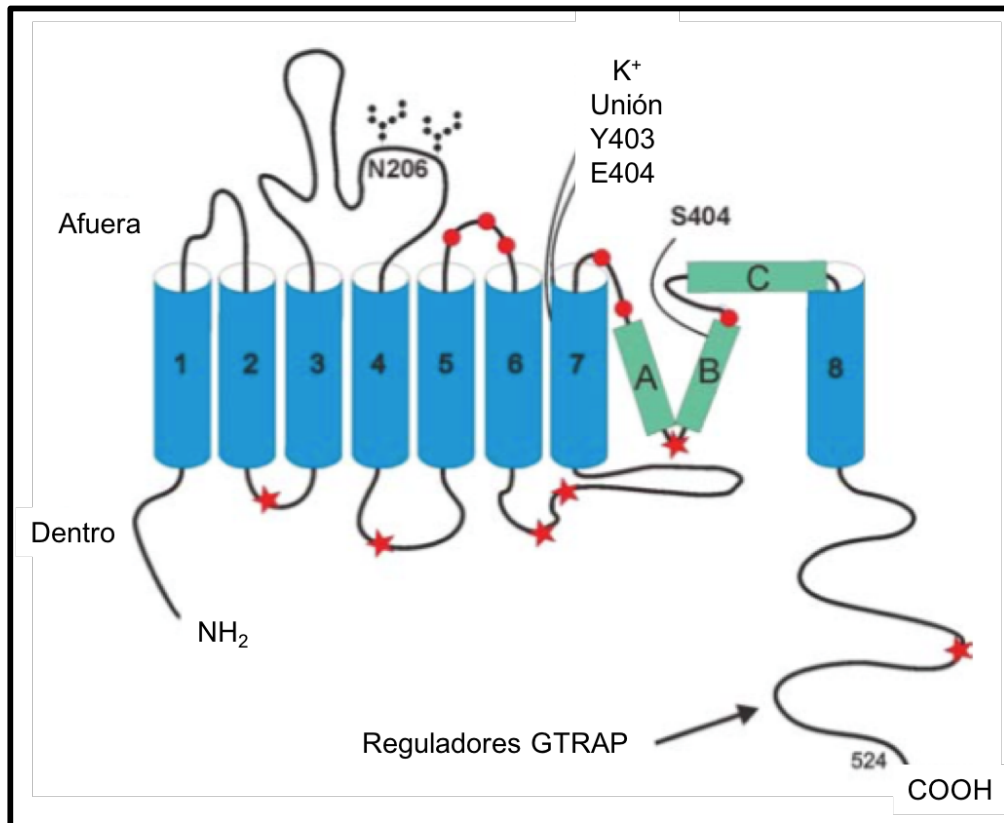
Hasta ahora, se han clonado cinco miembros de transportadores de Glu dependientes de sodio miembros de la familia de acarreadores de solutos 1 (SLC1), también denominados transportadores de aminoácidos excitadores del 1 al 5 (EAATs por sus siglas en inglés).

En 1992 se identificaron de forma independiente el acarreador de aminoácidos excitadores 1 (EAAC1), codificado por el gen *slc1a2* que en la nomenclatura de humano se denomina EAAT3; el transportador de glutamato 1 (EAAT2), SLC1a1 o su versión en roedor GLT-1 y el transportador de glutamato-aspartato (EAAT1), SLC1a3 o su versión en roedor GLAST. Kanai y Hediger (1992) aislaron un cDNA que codifica para el transportador de Glu de alta afinidad neuronal y epitelial, EAAC1, mediante clonación en ovocitos de *Xenopus* [52]. En ese mismo año, Danbolt y colaboradores purificaron una glicoproteína de cerca de 80 kDa a partir de una fracción sinaptosomal cruda, que cuando se reconstituyó en liposomas se demostró que exhibía un transporte de glutamato de alta afinidad [53]. Entonces se desarrolló un anticuerpo contra la proteína purificada y se usó para aislar un clon de una biblioteca de cDNA de cerebro de rata que codifica para el transportador GLT-1 [54]. Por otra parte, Stoffel y colaboradores (1992) durante el aislamiento de la UDPgalactosa: ceramida galactosiltransferasa purificaron una glicoproteína hidrofóbica de 66 kDa; correspondiente al transportador GLAST, obteniendo su cDNA basado en la secuenciación parcial de aminoácidos [12]. Posteriormente, con base en la homología de secuencia a los transportadores de glutamato, se identificaron dos transportadores adicionales EAAT4 y EAAT5 [12, 55–58].

La estequiometría del transporte es de una molécula de Glu por tres iones de sodio, un protón en la misma dirección de glutamato y el antiporte de un ion de potasio; el sodio se requiere para la unión del Glu, el potasio para el transporte neto. El acoplamiento de los transportadores permite el transporte ascendente de Glu en las células contra un gradiente de concentración [59].

La topología de los transportadores de Glu muestran que poseen un sitio de unión para el aminoácido sustrato y otro para la unión de cationes, el dominio C y N terminal están hacia el citoplasma creando una estructura de barril formado por ocho dominios transmembranales  $\alpha$ -helicoidales; un gran lazo glicosilado extracelular entre los dominios transmembrana 3 y 4; un "bucle reentrante" (A/B) entre los dominios transmembranales 7 y 8, similar al poro que permea los iones de los canales iónicos y un "bucle" que se prevé que se extiende parcialmente en el "poro de translocación" entre los dominios de membrana 7 y 8. En el dominio transmembrana 7 se encuentran dos residuos de

aminoácidos Tyr 403 y Glu 404 que son importantes para el acoplamiento con  $K^+$  (Figura 4) [60].



**Figura 4.** Topología de los transportadores de glutamato. La imagen mostrada se basa en experimentos que implican la biotinylación de mutantes de cisteína única del transportador de glutamato GLT1 de cerebro de rata. Se muestran los resultados del etiquetado con un reactivo de biotinylación. Los círculos completos se refieren al marcaje con el agente de biotinylación en ausencia de permeabilización. Las estrellas se refieren al etiquetado después de la permeabilización. Los dominios transmembranales que son lo suficientemente largos para abarcar la membrana como  $\alpha$ -hélices están indicados por números arábigos. Los pies del bucle reentrante están indicados por A y B. C corresponde a un "bucle" que se prevé que se extienda parcialmente al "poro de translocación" entre los dominios transmembranales 7 y 8. Traducido de Kanai & Hediger, 2004.

### Transportador EAAT1/ GLAST

El gen *slc1A3* codifica para el transportador de glutamato EAAT1/GLAST, el cual presenta una afinidad por Glu de  $\sim 70 \mu\text{M}$ . GLAST es un tipo de transportador glial de alta afinidad expresado abundantemente en el cerebelo [12]. En diversos estudios se ha reportado su expresión en astrocitos, glía radial tanto de cerebelo (glía de Bergmann) como de retina (células de Müller), en el oído interno, la glándula pituitaria, páncreas y en hueso (Rothstein, et al., 1994) (Tanaka, et al., 1997) (Arriza, et al., 1994) (Ahmeda, et al., 2013) (Mason & Huggett, 2002) (Berger & Hediger, 2006) (Harada, et al., 1998).

El transportador GLAST se encuentra relacionado con la coordinación motora en tareas complejas, en la lesión cerebelar y en la transmisión de señales normales entre los fotorreceptores y células bipolares en la retina, lo cual se ha comprobado mediante el bloqueo de la expresión del gen *slc1A3*. Además en el sistema auditivo periférico, se sugiere que GLAST juega un papel importante en el mantenimiento de la concentración de Glu en la perilinfa a un nivel no tóxico durante la sobre-estimulación acústica, importante para evitar la pérdida auditiva (Hakuba, et al., 2000).

De acuerdo con otros autores, no se ha reportado la expresión de GLAST en la membrana de los hepatocitos de roedores, ni a nivel de mRNA y ni de proteína. En un estudio *in vivo* con ratas su expresión fue detectada en tejido intersticial, alrededor de los vasos sanguíneos principales del hígado [15]. Sin embargo, aunque en células de hepatoblastoma humano, HepG2, se ha informado que EAAT2/GLT1 es el principal transportador expresado [61], hallazgos del Dr. Najimi muestran que el transportador EAAT1/GLAST también es expresado en tejido hepático de pacientes con daño en el hígado (comunicación personal), sugiriendo la posible regulación del patrón de expresión del transportador como efecto de una respuesta hepática.

### **Transportador EAAT2/ GLT-1**

El gen *slc1A2* codifica para el transportador EAAT2 (GLT-1). Su sobreexpresión en células HeLa permitió establecer una afinidad por glutamato de  $\sim 2 \mu\text{M}$ . Sin embargo, estudios posteriores mostraron la afinidad del transportador en el intervalo micromolar con variaciones de acuerdo al sistema celular, en un rango de 2 a 20  $\mu\text{M}$  (Pines, et al., 1992). Este transportador tiene una distribución amplia en el cuerpo. Se expresa en astrocitos de diversas regiones del cerebro, particularmente en la corteza cerebral y el hipocampo, se ha detectado además su expresión neuronal [62]. También en órganos periféricos como páncreas, músculo, ovarios, testículos, riñón e hígado [15].

Se han descrito diversas variantes de mRNA de GLT-1, generadas por corte y empalme alternativo que resultan en proteínas con diferencias en la longitud y/o secuencia de sus extremos carboxilo o amino terminal. Existen al menos cuatro isoformas que varían en el extremo 5'UTR del mRNA y se ha establecido que dichas isoformas pueden modificar su

patrón de expresión a nivel traduccional tanto en condiciones fisiológicas como en patológicas. Se han caracterizado dos isoformas que cambian los aminoácidos del extremo amino terminal y su expresión es variable en tejido, expresándose abundantemente la isoforma corta en hígado y en cerebro la isoforma larga [63].

El metabolismo de Glu está bien diferenciado en todo el acino hepático, por lo cual su transporte también difiere con respecto a las necesidades metabólicas de la zona. Los hepatocitos perivenosos son responsables de la mayor parte de la absorción neta de Glu y este sitio también posee la mayor y casi exclusiva capacidad de acumular Glu [64]. La expresión de GLT-1 ocurre principalmente en la membrana de los hepatocitos perivenosos, tanto a nivel de mRNA como de proteína. Además, se ha demostrado que la activación de  $\beta$ -catenina incrementa la expresión de GLT-1, lo que sugiere que este transportador participa en la respuesta proliferativa del hígado [65]. Además las líneas celulares de hepatoma exhiben mayores tasas de captura de Glu así como un incremento en los niveles de mRNA de Glt-1 que los cultivos primarios de hepatocitos de rata, [66].

### **Transportador EAAT3/EAAC1**

El EAAT3 fue aislado por Kanai y Hediger (1992) de un cDNA de intestino delgado de conejo mediante su expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*, que codifica para EAAC1, un transportador de Glu de alta afinidad dependiente de  $\text{Na}^+$  pero no dependiente de  $\text{Cl}^-$  [52, 67]. El análisis de inmunotransferencia de homogeneizados totales de cerebro humano y de rata y de sinaptosomas aislados de la corteza frontal revelaron una inmunoreacción para una proteína de ~70 kDa. A diferencia de GLAST y GLT-1, la expresión de EAAC1 en el SNC se ha reportado en neuronas y oligodendrocitos inmaduros [68, 69]. El EAAC1 también se localiza en tejidos periféricos como, riñón, corazón e intestino delgado [16, 70, 71]. Hasta ahora no ha sido reportada su expresión en tejido hepático [16] pero si en la línea celular de hepatoma H4-II-E; anticuerpos contra el C-terminal de la proteína reconocen una banda de 58 kDa correspondiente a EAAC1 [72].

Los estudios indican que el transporte de aspartato a las células H4-II-E es mucho más rápido que en los hepatocitos normales y altamente dependiente de  $\text{Na}^+$ , lo que ha sugerido que la expresión diferencial de los transportadores de Glu puede ser específica

de las células tumorales hepáticas y dicha expresión podría estar directamente relacionada con la transformación celular [72].

#### **1.4.2 Transporte de glutamato independiente de sodio**

Además de la captura de Glu por las células perivenosas, diferentes estudios demostraron la acumulación de Glu en los hepatocitos pericentrales, lo que indica que los hepatocitos periportales son capaces de absorber Glu y se ha sugerido que el sistema  $X_C^-$  está involucrado en esta actividad de intercambio [44, 48].

El sistema  $X_C^-$  es responsable de la captura de Glu de una manera dependiente de cloruro e independiente de sodio. El sistema  $X_C^-$  actúa como un intercambiador de cistina obligado, su actividad es electro-neutra con un transporte neto de cistina-Glu 1: 1, el papel fisiológico de este sistema es transportar cistina a la célula utilizando la fuerza impulsora de la exportación de Glu. La cistina transportada por el sistema  $X_C^-$  se usa principalmente para la síntesis de glutatión, que se requiere para la proliferación, el reciclaje redox y la defensa antioxidante [73]. Los valores de  $KM$  para el transporte de cistina o Glu por el sistema  $X_C^-$  están en el rango de 50 a 100  $\mu M$ , y ambos actúan como un inhibidor competitivo del otro [74]. El sistema  $X_C^-$  es un miembro de la familia de transportadores de aminoácidos heteroméricos (HAT). Este transportador está formado como heterodímeros compuestos por dos cadenas, la cadena "pesada" 4F2hc, unidas covalentemente con la cadena "ligera" xCT. La cadena ligera es responsable de la actividad de transporte, mientras que la cadena pesada actúa en el tráfico de la cadena ligera hacia la membrana plasmática [75].

#### **1.5 Glu en el daño hepático**

La enfermedad hepática crónica es un problema de salud y se considera la causa número 14 de mortalidad en el mundo. En México es la cuarta causa de muerte, además de ser la segunda causa de muerte entre los 35 y 55 años de edad. Se estima que para el año 2050 habrá 1.9 millones de personas con enfermedad hepática [76].

El daño hepático es un proceso complejo que involucra tanto a las células parenquimales y no parenquimales residentes en el hígado, así como también el reclutamiento de otros tipos de celulares en respuesta al daño y la inflamación [77, 78]. Esto puede producirse

ante la exposición a diversos agentes, entre ellos, virus, toxinas, fármacos, drogas y otros xenobióticos. Además de factores como la obesidad o la diabetes, que en conjunto promueven la alteración de la función hepática normal por diversos trastornos metabólicos que resultan en daño hepático específico como inflamación, necrosis, apoptosis y, en situaciones más graves, la tumorigénesis [79]. El Glu como sustrato y producto clave en importantes vías metabólicas en el hígado, está estrechamente relacionado con el desarrollo de hepatopatías.

### 1.5.1 Colestasis

La colestasis es una alteración de la formación de bilis y/o flujo de bilis, clínicamente puede presentarse con fatiga, prurito y, en su forma más manifiesta, ictericia [80]. Aunque varios factores influyen en la etiología de esta patología [81–83], el mecanismo aún no se conoce con detalle. Se ha sugerido que el transporte de Glu puede actuar como una respuesta hepática indirecta y/o indirecta en la restauración de grupos intracelulares de este aminoácido que probablemente se alterarán después de la colestasis [61].

Diversos estudios han demostrado cambios adaptativos de la expresión del transportador hepatobiliar de la membrana canalicular en la colestasis tanto en modelos humanos como en roedores [84–86]. En línea con esto, también se ha informado el papel del transporte de Glu en la colestasis hepática. Bajo dicho modelo, la actividad de GLT-1/EAAT2 disminuye, lo cual se correlaciona con la translocación intracelular del transportador en células HepG2, mientras que en el modelo *in vivo* el efecto es el opuesto. Este efecto está respaldado por los resultados obtenidos en muestras de colestasis hepáticas humanas en las que se documentaron altos niveles de  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa, un biomarcador de lesión hepatobiliar, en pacientes con atresia biliar y colestasis intrahepática familiar progresiva (PFIC) [61], lo que sugiere una conexión cruzada tanto en la colestasis intrahepática como extrahepática entre los sistemas glutamatérgico y biliar.

### 1.5.2 Fibrosis y cirrosis

La regeneración hepática dentro del microambiente del hígado sirve como un mecanismo poderoso en su capacidad para responder, limitar y revertir las patologías de la enfermedad. Sin embargo, la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular



(ME) incluyendo colágeno I, III y IV, fibronectina, undulina, elastina, laminina, hialuronano y proteoglucanos distorsiona la arquitectura hepática formando una cicatriz fibrosa, causando fibrosis y el posterior desarrollo de cirrosis [87]. Esto ocurre debido al colapso del parénquima hepático y la liberación de citocinas fibrogénicas que activan a las células estrelladas hepáticas (HSC). La activación de HSC o su transdiferenciación en células similares a miofibroblastos les permite adquirir propiedades contráctiles, pro-inflamatorias y fibrogénicas [88]. La transdiferenciación de HSC *in vitro* implica una gran demanda de requisitos bioenergéticos y biosintéticos; el Glu es clave para mantener el metabolismo energético.

La tasa de oxidación de Gln en las mitocondrias hepáticas cirróticas es aproximadamente cinco veces mayor que las mitocondrias hepáticas de los controles, en concordancia con el aumento (aproximadamente 20 veces) en la actividad de GA. Esto indica que la producción de Glu por hidrólisis de Gln es mayor en el hígado cirrótico lo que sugiere que el Glu se cataboliza posiblemente para suministrar ATP [89].

Anteriormente se había sugerido que el Glu, como precursor de la prolina, podía promover la biosíntesis de colágeno. La pirrolina-5- carboxilato es el sustrato intermedio formado a partir de la interconversión de Glu por la pirrolina-5- carboxilato sintasa. Sin embargo, el aumento de las reservas de prolina libre en pacientes con cirrosis hepática está correlacionado con el contenido de colágeno y está inversamente relacionado con la disminución de la cantidad de Glu libre. Esta alteración metabólica local en el hígado también se ha documentado en la cirrosis inducida con CCl<sub>4</sub> en ratas, relacionada directamente con la fibrogenesis [90].

### **1.5.3 Carcinoma hepatocelular**

En 2018, el carcinoma hepatocelular (CHC), fue el cuarto cáncer en el mundo en términos de mortalidad. Las tasas anuales de incidencia y mortalidad fueron de 82.466 y 77.375 casos en Europa; 41.851 y 34.339 casos en Estados Unidos, mientras que en América Latina y el Caribe fueron 38.400 y 36.436 casos, respectivamente [91]. La etiología más frecuentemente asociada con el CHC es la hepatitis viral crónica (B y C), el consumo de alcohol y la exposición a aflatoxinas; la cirrosis también es un factor de riesgo importante para el desarrollo de CHC [92, 93]. Diversos estudios han surgido en la participación

de Glu y Gln en el cáncer hepático. Sin embargo, hasta hoy los resultados al respecto son confusos.

Al caracterizar la composición metabólica de tejido proveniente de un CHC humano, encontró que los tumores tenían niveles elevados de Glu, glicina, leucina y alanina, así como lactato, Gln y glucógeno (Yang, et al., 2007). La Gln sintetizada a partir del Glu por la enzima GS, controla eventos importantes en el desarrollo de CHC, como procesos inflamatorios, activación de mTOR, autofagia y, recientemente se ha demostrado su contribución en la función pro-angiogénica, inmunosupresora y pro-metastásica de los macrófagos tipo M2, relevante para la formación de metástasis [94–97]. El grupo amida de la Gln actúa como fuente de nitrógeno para la biosíntesis de purinas, pirimidinas, aminoácidos y azúcares amino [98]. De esta manera, la reprogramación, al alterar el metabolismo del Glu/Gln mantiene la capacidad proliferativa y confiere resistencia al estrés oxidativo [99].

El aumento de la expresión de GS se ha documentado en la regeneración de hepatocitos y células progenitoras de hepatocitos tempranas HPC antes de la evidencia morfológica de diferenciación hepatocelular y es dependiente de la activación de  $\beta$ -catenina [65, 100]. También se ha reportado una inmunoreactividad citoplasmática difusa para GS como respuesta aguda a la lesión, ya sea causada por acumulación de bilis o una lesión viral. Esta inmunoreactividad se produjo tanto en el tejido tumoral, como en tejidos no malignos con necroinflamación y regeneración [100, 101].

En contraste, se ha reportado la disminución de la actividad de GS en células de CHC y hepatoma [89, 102]. En este contexto, se ha propuesto que estos patrones distintos del metabolismo de la Gln se deben a que algunas células cancerosas sintetizan Gln de *novo* y, en otros casos, las células cancerosas dependen de la Gln extracelular, que ingresa al metabolismo mitocondrial [103]. Alternativamente, podría deberse a un aumento en el influjo de Glu a través de su transportador, aunque esto aún no se ha estudiado a fondo. Recientemente se ha demostrado que la sensibilidad a la inhibición de la cadena de transporte de electrones mitocondrial se correlaciona con el mantenimiento de los niveles de aspartato al importarlo a través de EAAT1 en la hipoxia tumoral, lo que demuestra que

la modulación genética o farmacológica de su actividad puede alterar la sensibilidad de las células cancerosas [20].

Además de la modificación en los patrones de expresión de GS, también se ha observado que los valores medios de GDH aumentan en relación con el incremento de necrosis en las células hepáticas [104]. La GDH, cataliza la reacción de Glu a  $\alpha$ -cetoglutarato, que conlleva la liberación de amoníaco. Por lo que es probable que este aumento se deba a la necesidad de incrementar el catabolismo por la modificación en los niveles de Glu, además de que alteraciones en el metabolismo de este aminoácido se han relacionado con otros trastornos como hiperinsulismo e hiperamonemia [43] que comúnmente son desarrollados después de falla hepática.

#### **1.5.4 Encefalopatía hepática**

La insuficiencia hepática aguda es un síndrome clínico dramático, marcado por la pérdida repentina de la función hepática en una persona sin antecedentes de enfermedad hepática. La disfunción multiorgánica en la insuficiencia hepática aguda puede verse exacerbada por un metabolismo deteriorado y reacciones inflamatorias [105].

La reducción en la función de desintoxicación del hígado reducida abruptamente en la insuficiencia hepática debido a la necrosis masiva de los hepatocitos, puede promover el desarrollo de la encefalopatía hepática (EH), caracterizada por la rápida progresión de los síntomas desde cambios discretos en el estado mental hasta el estupor y el coma [106]. Aunque la EH también puede ser resultado de una hepatopatía crónica, comúnmente surge como una complicación neuropsiquiátrica de la enfermedad hepática aguda por derivación portosistémica sin enfermedad hepatocelular o cirrosis hepática, e hipertensión portal o derivaciones portosistémicas. En la Figura 5 se puede observar la conexión entre la encefalopatía porto-sistémica y el SNC, en un esquema simplificado del primer mecanismo propuesto a por la Dra. Sheila Sherlock en el año 1954 y publicado por Summerskill y colaboradores en 1956.

Se ha reportado una amplia gama de anormalidades neuropsiquiátricas de gravedad variable en pacientes afectados con EH. Alteraciones psicomotoras, intelectuales, cognitivas, emocionales, conductuales y de motricidad fina [107], y varios factores están

implicados en el desarrollo de EH como inflamación, los neuroesteroides, el manganeso, la acumulación de lactato y el amoníaco, siendo este último, reconocido como un componente crucial en la patogénesis de la EH [18, 19, 108–110].

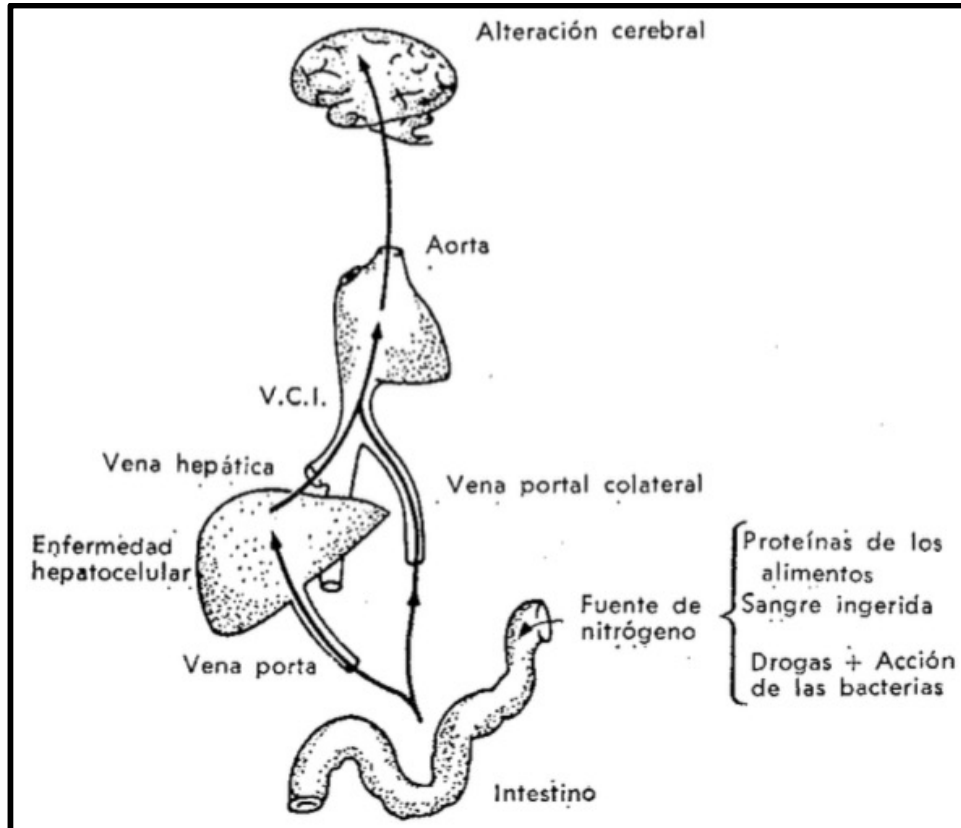


Figura 5. Mecanismo de la encefalopatía hepática porto-sistémica. Tomado de Summerskill *et al.*, 1956.

En la zona perivenosa del hígado es donde ocurre el metabolismo de la mayoría de los xenobióticos. En esta zona, la síntesis de Gln a través de GS también actúa como un "sistema de respaldo" para la desintoxicación de amoníaco, garantizando niveles de amoníaco no tóxicos en la sangre venosa hepática efluente. Sin embargo, la muerte celular de los hepatocitos, común en la insuficiencia hepática, puede promover la hiperamonemia mediante la reducción de los hepatocitos positivos para GS (la muerte de las células periportales también, donde se toma algo de Gln y la mayor parte del amoníaco por el ciclo de la urea). El estudio con la eliminación específica del gen que codifica para GS en el hígado mostró que esta afección condujo a un aumento de la hiperamonemia sistémica y al posterior estrés oxidativo cerebral y cambios cognitivos, de manera similar a la registrada en la deficiencia de GS, lo que sugiere que el hígado es un

órgano clave en el mantenimiento del homeostasis del amoníaco en todo el cuerpo [111, 112]. En este sentido, el papel de la producción, el transporte y el catabolismo de Glu como sustrato de GS, podría ser clave en el hígado dañado [11].

### **1.6 Daño hepático inducido por xenobióticos**

Los xenobióticos lipofílicos se convierten en formas más hidrofílicas por biotransformación para que su excreción sea más eficiente. El hígado tiene el mayor suministro de enzimas de biotransformación de todos los órganos del cuerpo, por lo cual es el sitio principal del metabolismo de xenobióticos inmediatamente después de su absorción en el tracto gastrointestinal y tiene un papel clave en la desintoxicación y la protección contra la toxicidad química [113].

La biotransformación puede incluir reacciones de hidrólisis, reducción, oxidación y conjugación. Para su estudio, se han dividido en reacciones de fase I y de fase II. Las reacciones de fase I incluyen reacciones de hidrólisis, reducción y oxidación, preparando a los compuestos para la conjugación (fase II) al proveer o exponer grupos polares (OH, NH<sub>2</sub>, SH<sub>2</sub>, COOH). Estas reacciones ocurren principalmente, pero no exclusivamente, en el retículo endoplásmico liso, y en menor proporción en el citosol y las mitocondrias. Cada reacción puede ser catalizada por diversas enzimas con diferente especificidad de sustrato, siendo el sistema del citocromo P-450 el que ocupa el primer puesto entre las enzimas de la fase I en cuanto a versatilidad catalítica y número de xenobióticos que activa e inactiva [114]. De los citocromos que se expresan con mayor abundancia en el hígado son CYP1a, 3a, 2C19, 2C9, 2D6, 2E1, siendo estas últimas tres isoformas las que se encuentran implicadas directamente en la patogénesis de diversas enfermedades hepáticas [115].

Las reacciones de fase II se localizan principalmente en el citosol y luego en el retículo endoplásmico liso y comprenden la glucuronidación, la sulfatación, la acetilación, la metilación, la conjugación con glutatión y la conjugación con aminoácidos. Estas reacciones aumentan el carácter hidrofílico del xenobiótico, por lo que los productos resultantes conjugados son estables e hidrosolubles y se excretan rápidamente del organismo. A excepción de la metilación y la acetilación que aumentan la liposolubilidad y disminuyen la actividad farmacológica y tóxica de los xenobióticos, ocasionalmente la sulfatación activa aminas aromáticas e hidrocarburos aromáticos policíclicos produciendo

metabolitos carcinógenos. Además, la interrupción de los procesos normales de fase II puede conducir a la acumulación de metabolitos hepatotóxicos de fase I [114].

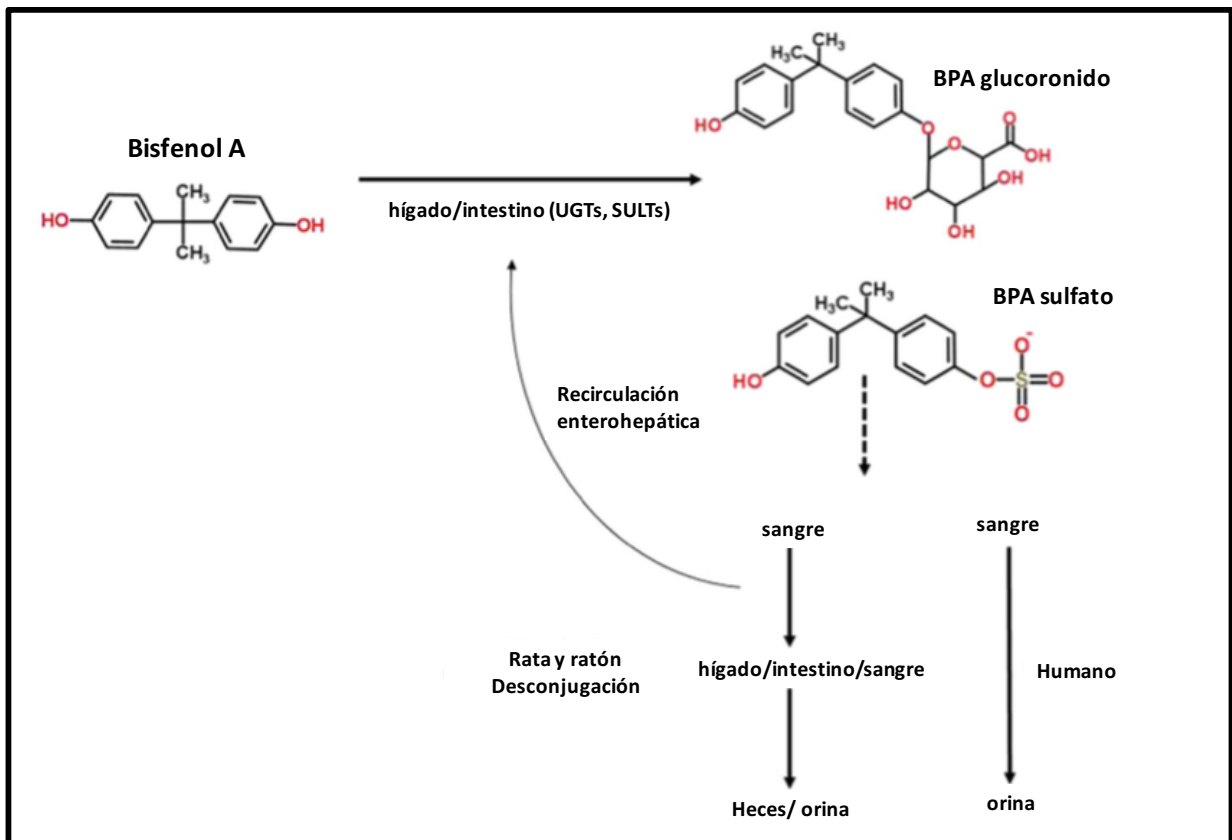
Normalmente, la hepatotoxicidad es dependiente de la dosis, aunque esto no es generalizado para todos los xenobióticos. Además, la gravedad de la lesión inducida en el hígado por productos químicos puede variar, desde pequeños cambios inespecíficos en la estructura y función hepática hasta insuficiencia hepática aguda, cirrosis y cáncer de hígado [113].

### **1.6.1 BPA**

El bisfenol A (BPA, 2,2-bis-4-hidroxifenil propano), contiene dos anillos de fenol conectados por un puente de metilo, con dos grupos metilo unidos al puente. Este plastificante con una alta producción a nivel mundial (3.8 millones toneladas/año) es utilizado como monómero en la manufactura de resinas de policarbonato y epoxi [116]. Debido a esto, el BPA es componente de diversos recipientes tanto de alimentos como de bebidas, en el recubrimiento de protección de algunas latas de alimentos, en tuberías de agua y en tanques para el almacenamiento de agua potable. Sin embargo, el BPA puede ser liberado de los materiales por hidrólisis de los polímeros después de cambios de temperatura y pH (p.ej en caso de esterilización, limpieza) por lo que representa una fuente continua de exposición para los consumidores [117].

La exposición a BPA se ha confirmado con los altos niveles de este compuesto detectados en diversos fluidos humanos. En poblaciones de Estados Unidos se ha encontrado en la orina de más del 90% de los individuos [118]; las concentraciones en suero se encuentran en el rango de 0.2 a 1.6 ng/mL [119, 120]. La principal vía de ingreso del BPA al organismo es la oral, aunque se ha documentado la presencia de este compuesto en el aire, probablemente por su unión a algunas partículas durante el proceso de manufactura, por lo que se sugiere también la exposición inhalatoria, aunque en concentraciones menores [121]. Una vez en el organismo, el BPA es metabolizado predominantemente en el hígado, en donde se une rápidamente al ácido glucurónico en un proceso metabólico llamado glucuronidación, para producir BPA glucurónido (BPA-G), que es el principal metabolito detectado en sangre y orina, tanto en humanos como en roedores. El resto del compuesto que no logra ser conjugado (BPA libre) es convertido

en conjugado sulfato, BPA sulfato (BPA-S), en una reacción mediada principalmente por la enzima sulfotransferasa SULT1A1; ambos metabolitos se consideran biológicamente inactivos [122]. Los conjugados glucurónico y sulfato son posteriormente eliminados del cuerpo en la orina a través de filtración glomerular. Además, de la excreción de BPA-glucurónico vía biliar, en roedores la excreción en heces es sustancial. En ensayos *in vivo* en ratas, el BPA conjugado y no conjugado es principalmente (~ 66%) dispuesto por excreción biliar y detectado en las heces 6 h después de la administración oral o intravenosa y se ha logrado detectar aproximadamente el 81% de la dosis administrada de BPA (medida como BPA total conjugado y no conjugado) en heces, ~16% en orina y ~0.1% acumulado en tejido [123]. También en roedores, se ha documentado que el BPA conjugado (glucurónico y sulfato) puede ser desconjugado en el tracto intestinal por glucuronidasas y sulfatasas y entrar a recirculación enterohepática [124]. Sin embargo, en humanos, la excreción urinaria es la principal vía de eliminación del BPA (Figura 6) [125].



**Figura 6.** Toxicocinética del BPA. En los seres humanos, la eliminación es a través de la orina en forma de conjugados de BPA, en su mayoría BPA-G. Las vías de eliminación en los roedores incluyen la orina, así como las heces. Las diferencias entre humanos y roedores se atribuyen a diferentes puntos de corte de peso molecular para la excreción biliar, donde el umbral de peso molecular es mayor en los seres humanos.

Además, en los roedores, los conjugados de bisfenol A pueden ser desconjugados en el intestino y sufrir re recirculación enterohepática. Modificado de Taylor *et al.*, 2011.

El nivel de efectos adversos no observables (NOAEL, por sus siglas en inglés) para el BPA es de 5 mg BPA/ kg peso/ día y la ingesta diaria estimada (EDI, por sus siglas en inglés) es de 1.1 µg/kg de peso/día y 0.5 µg/kg de peso/día en niños menores de dos años [117]. Sin embargo, la ingesta diaria tolerable (TDI, por sus siglas en inglés) según la EFSA (por sus siglas en inglés, European Food Safety Authority) y la US EPA (por sus siglas en inglés, Environmental Protection Agency) es de 4 µg/kg peso/día, basado en estudios en roedores [124].

En un estudio del Centro de Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) se reportó una concentración media de BPA urinario (BPA total, libre más sus conjugados) de 2,6 µg/L ([//wwwn.cdc.gov/nchs/nhanes/2011-2012/EPH\\_G.htm](http://wwwn.cdc.gov/nchs/nhanes/2011-2012/EPH_G.htm)), indicando que en algunas poblaciones la exposición a BPA podría ser superior a la estimada actualmente. Otros han estudiado el BPA como disruptor endócrino debido a sus propiedades xenoestrogénicas [126]. Sin embargo, los efectos de la exposición a BPA no se limitan a nivel reproductivo. El BPA puede provocar una gran variedad de efectos metabólicos claves en la etiología de diversas hepatopatías [127][128]. Lang y colaboradores (2008) demostraron que el BPA está relacionado con la aparición de marcadores séricos de daño hepático, capaces de predecir enfermedades metabólicas [129]. El BPA puede inducir daño oxidativo en el hígado después de una exposición repetida [130]. El efecto pro-oxidante de BPA también se ha demostrado en modelos *in vitro*, en hepatocitos aislados de rata y en la línea celular HepG2 [131–134].

La exposición a dosis altas y bajas de BPA producen efectos proliferativos en los conductos biliares y en tumores hepáticos [135, 136]. En estudios *in vivo* con dosis por debajo del NOAEL (0.05 y 1.2 mg/kg peso corporal/día), durante cinco días de exposición, se observó que el BPA promueve la acumulación de lípidos, lipoperoxidación, mostrando la alteración de los niveles hepáticos de malondialdehído (MDA), un producto natural de la peroxidación lipídica y la liberación de citocinas proinflamatorias como la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) [133]. Estos datos indican que la exposición a BPA contribuye a diferentes patologías hepáticas como la esteatosis, la colestasis y el cáncer [127].



También se ha reportado el efecto de la exposición a altas concentraciones de BPA en el SNC, resultando en una disminución de la captura de Glu en hipocampo y corteza cerebral [137] y como promotor del crecimiento de neuroblastoma [138].

La acción xenoendócrina del BPA se ha ligado también con diversos trastornos metabólicos [139, 140]. El BPA puede unirse estructuralmente a los dos subtipos de receptores de estrógenos ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ), aunque tiene una afinidad mucho menor (1000 - 2000 veces menos) que el  $17\beta$ -estradiol (E2), estrógeno más activo [141]. El  $ER\alpha$  y el  $ER\beta$ , son factores de transcripción activados por ligando que, al unirse a E2, cambian de conformación y migran al núcleo. Los ERs unidos a ligandos nucleares interactúan con coactivadores, correpresores y con elementos de respuesta a estrógenos (EREs) en los promotores de genes blanco para regular la expresión de ciertos genes. Aunque, el cambio en la conformación de los ERs difiere en función del ligando, haciendo al receptor más o menos propenso a los coactivadores transcripcionales o reconocimiento de corepresores [142, 143]. Los ligandos exógenos producen un desplazamiento de las  $\alpha$ -hélices formando el dominio de unión al ligando (LBD) de los ERs, debido a su estructura química que no permite un alojamiento adecuado en los confines del sitio de unión a la hormona, contrariamente a lo que ocurre cuando el E2 se une a ERs [144]. En la membrana plasmática, los ERs activados por ligando interactúan con otras proteínas de señalización formando complejos multimoleculares que desencadenan eventos de transducción rápida de señales [143, 145]. Aunque se ha documentado que el porcentaje de transactivación del BPA (10 nM) es menor para el  $ER\alpha$  con ~60% mientras que para el  $ER\beta$  es de ~80% con respecto al E2, algunos datos sugieren que la actividad estrogénica del BPA requiere de la activación de señales extracelulares mediadas por el  $ER\alpha$  que resulta en la fosforilación de ERK/MAPK y AKT, mimetizando al E2 [146]. Las consecuencias fisiológicas pueden ser diversas según sea el tejido; sin embargo, la exposición a BPA en presencia de  $ER\alpha$  actúa como un agente proliferativo, mientras que en presencia de  $ER\beta$  actúa como un antagonista del complejo E2- $ER\beta$ , por lo que se sugiere que el BPA es capaz de modificar la regulación de la muerte celular y el equilibrio de proliferación, promoviendo únicamente esto último y que sin el equilibrio de las actividades de  $ER\beta$ , podría conducir a las células a transformación de cáncer [142, 146]. Además, otro posible mecanismo acción del BPA es dependiente de la unión de este al

receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) activando a la fosfolipasa C, que cataliza la hidrólisis de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol, estimulando en consecuencia la liberación de Ca<sup>2+</sup> en el retículo endoplásmico, promoviendo la activación de la proteína quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>/diacilglicerol, PKC [147].

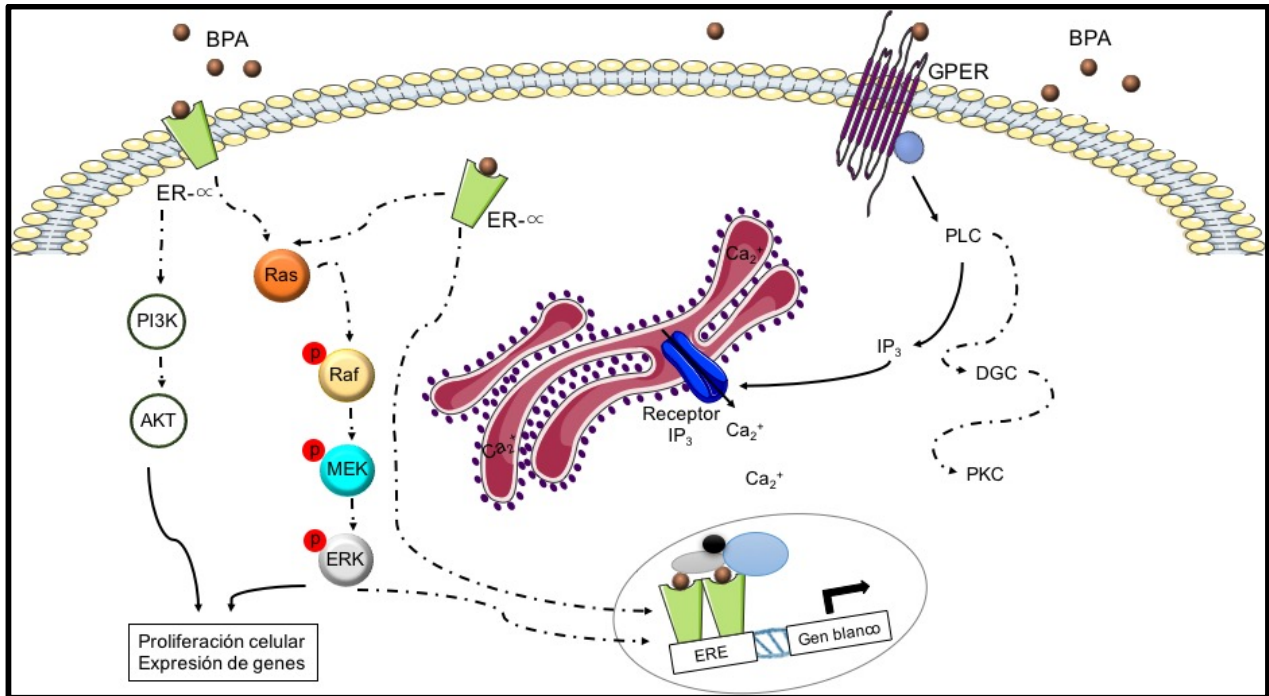


Figura 7. Mecanismo de acción del BPA como xenoestrógeno.

### 1.6.2 CCl<sub>4</sub>

El CCl<sub>4</sub> es un compuesto que fue usado ampliamente para disolver compuestos no polares. La toxicidad aguda de CCl<sub>4</sub> está bien establecida a partir de estudios en animales. En particular, los estudios realizados en ratas han demostrado que la dosis letal (LD)<sub>50</sub> después de la absorción oral aguda está en el rango de 4.7 a 14.7 mL/ kg de peso corporal [148, 149]. Comúnmente, el CCl<sub>4</sub> es usado como un modelo de daño hepático en estudios *in vivo*. La administración de dosis orales únicas de CCl<sub>4</sub>, utilizando aceite de maíz como vehículo, induce hepatomegalia (aumento en el peso del hígado), niveles elevados de grasa, urea sérica, actividades enzimáticas del hígado y clara evidencia histopatológica de daño hepático con necrosis unicelular [150], mientras que la exposición oral a largo plazo causa una hepatotoxicidad marcada con fibrosis, proliferación en el conducto biliar, cirrosis e incluso CHC [151]. El CCl<sub>4</sub> pertenece a la clase de hepatotoxinas que actúan después de la activación metabólica. Es activado en

el retículo endoplásmico por las enzimas del citocromo p450, principalmente CYP2E1, CYP2B1 o CYP2B2, para formar el radical triclorometilo ( $\text{CCl}_3\bullet$ ), altamente reactivo. Este radical por si solo puede unirse a diversas moléculas como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, afectando procesos celulares cruciales. Además, se ha sugerido la formación de aductos entre  $\text{CCl}_3\bullet$  y el DNA como un iniciador del cáncer hepático, dado que este radical reacciona rápidamente con el oxígeno para formar el radical triclorometilperoxilo ( $\text{CCl}_3\text{OO}\bullet$ ), una especie muy reactiva (Figura 7, círculos 1 y 2). El  $\text{CCl}_3\text{OO}\bullet$  inicia la reacción con los lípidos para formar productos de peroxidación lipídica, que ataca y destruye los ácidos grasos poliinsaturados, en particular los asociados con los fosfolípidos. Esto afecta inicialmente la permeabilidad de las mitocondrias, el retículo endoplásmico y posteriormente la de la membrana plasmática, lo que resulta en la pérdida del secuestro celular de calcio y la homeostasis, lo que puede contribuir en gran medida al daño celular subsecuente (Figura 7, círculos 2 y 3) [151–153].

A nivel molecular, se ha reportado que el  $\text{CCl}_4$  activa a las células macrófagas residentes en el hígado, las células de Kupffer, que resulta en la liberación de  $\text{TNF}\alpha$ , óxido nítrico e interleucinas 1, 6, y 10 y el factor de crecimiento transformante (TGF)  $-\alpha$  y  $-\beta$ , procesos que parecen dirigir la célula principalmente hacia auto-destrucción o fibrosis; este último evento apoyado por la activación de las células estrelladas a células como miofibroblastos [153].



Interesantemente, también se ha reportado que la exposición a altas dosis de CCl<sub>4</sub> producen toxicidad inespecífica, incluida la depresión del SNC e insuficiencia respiratoria que resulta en la muerte [152, 155].

### **1.7 Regulación del transporte de Glu**

La regulación de los transportadores de Glu ha sido primordialmente estudiada en el SNC, debido a su gran abundancia e importancia en el aclaramiento del Glu en la hendidura sináptica para evitar niveles excitotóxicos, debido a que no existen enzimas extracelulares para la descomposición del Glu.

Diversos mecanismos, y a distintos niveles se han sugerido para explicar la regulación de los transportadores de Glu, entre estos se encuentran el tráfico hacia y desde la membrana plasmática [48, 156], su difusión en la membrana [157–159], las modificaciones postraduccionales, la transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN), la maduración y estabilización del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) [156, 160–163], y modificaciones epigenéticas [164, 165]. Sin embargo, la diferencia temporal que existe entre cada uno de estos eventos ha sugerido que la combinación de varios de estos mecanismos es esencial para que la captura de Glu sea eficiente.

#### **1.7.1 Regulación de EAAT1/GLAST**

Hallazgos anteriores muestran que el Glu es capaz de regular su propia captura, induciendo un aumento en la actividad de GLAST y en su expresión proteica, pero no en sus niveles de mRNA [166]. Estudios en cultivos primarios de astrocitos demostraron que el dibutilil monofosfato cíclico de adenosina (dbcAMP) aumenta los niveles proteicos de GLAST, además de su mRNA; esta regulación positiva es dependiente de la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) [167]. La activación de esta proteína está involucrada en el tráfico del transportador a la membrana [160, 168–170]. Algunos experimentos muestran que el bloqueo de PKA y la activación de PKC disminuye la cantidad de transportadores GLAST en la membrana citoplasmática, aumentando la cantidad de transportadores intracelularmente [171], indicando que la activación de PKA ayuda al mantenimiento de GLAST en la superficie celular, mientras que la activación de PKC es importante en la internación del transportador. Otra molécula importante para la regulación de GLAST es la proteína mTOR. El modelo que se ha propuesto en células

gliales incluye la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa y la proteína quinasa B (PKB) y consiste en que el Glu es ingresado a las células por el transportador GLAST, provocando el aumento en las concentraciones intracelulares de  $\text{Na}^+$ , que activan el modo reverso del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , el cual toma los iones  $\text{Na}^+$  y los exporta permitiendo la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  aumentando las concentraciones celulares de este ion. El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por un lado activa a  $\text{Src}^{\text{p60}}$ , que a su vez activa la vía de señalización PI3K/PKB/mTOR que repercute en la fosforilación de 4EBP1 y de S6K regulando la síntesis de proteínas [172]. Adicionalmente, se ha descrito que los esteroides como el estrógeno y el tamoxifeno aumentan tanto de los niveles de mRNA y proteína de GLAST en cultivos primarios de astrocitos [173–175]. Los efectos de ambos compuestos en la regulación del transportador son mediados por la activación tanto GPER como de  $\text{ER}\alpha$  y  $\beta$ , pero principalmente por el  $\text{ER}\alpha$  [173, 174, 176, 177].

Los estudios de las regiones promotoras de EAAT1/GLAST de humano y de roedores han demostrado que ambas especies tienen una baja homología entre sus secuencias [178, 179]. Sin embargo, a pesar de la falta de homología de los promotores, EAAT1 y GLAST comparten varios sitios de unión a ciertos factores de transcripción putativos comunes, incluido el factor nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B), la homeoproteína 1 del cartílago (CART), CCAAT/enhancer- proteína de unión (CEBP), factores de unión a GATA (GATA), factores de leucemia mielógena aguda humana (HAML), factores de zinc 1 de zinc mielóide (MZF1), factores de Dominio del homeodominio NKX (NKXH), proteína de unión a octámero (Oct1), factor de transcripción SP1 y el factor Yin Yang 1 (YY1), sugiriendo que la expresión constitutiva de EAAT1/GLAST en ambas especies está controlada por un mecanismo similar [179]. Los factores de crecimiento y neurotróficos pueden aumentar el mRNA y los niveles de proteína de GLAST ejerciendo su efecto en a través de las vías de señalización de quinasas reguladas por mitógenos (Ras/MEK), PI3K/Akt y PKA [174, 180, 181], que resultan en la activación de NF- $\kappa$ B [173, 180].

Por otro lado, la expresión de GLAST también está regulada por los receptores de Glu. El uso de un agonista de AMPA para estimular los receptores ionotrópicos de Glu (iGluR) reduce sustancialmente la actividad del promotor de GLAST en pollo, *chglast*, a través de la vía de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$ /PKC [163, 182, 183]. Otros estudios demostraron que la incubación de cultivos primarios de células gliales de Bergmann con Glu y AMPA promueve de forma dependiente de la dosis y el tiempo un aumento de la unión del DNA

del factor de transcripción YY1 al promotor GLAST, mientras que una sobreexpresión de este factor de transcripción reduce los niveles de mRNA de GLAST, ambos casos relacionados con una represión a nivel transcripcional del promotor *chglast*, dependiente de Glu a través de la activación de PKC, principalmente las isoformas PKC $\alpha$  y PKC $\epsilon$  [184]. La regulación negativa de GLAST a través de un aumento en la unión de YY1 al promotor de *chglast* se ha reportado también dependiente de insulina [185]. Además, recientemente se ha documentado la regulación de GLAST después de la exposición a diversos tóxicos ambientales. Interesantemente se ha observado que la exposición a Mn<sup>2+</sup> resulta en la disminución en la captura de Glu en astrocitos corticales, por reducción en la expresión proteica y el tráfico a la membrana de GLAST. Además, se ha reportado la regulación a nivel transcripcional en la represión inducida por Mn<sup>2+</sup>, a través de YY1, en la cual, la secreción de TNF- $\alpha$  facilita la expresión de este factor de transcripción y su unión al DNA [186].

En contraste con lo anterior, estudios en nuestro equipo de trabajo sugieren que en cultivos primarios de glía de Bergmann, células con alta expresión de GLAST, existe una modulación dependiente del tiempo y la dosis en la captura de Glu, después de la exposición a Mn<sup>2+</sup> a tiempos cortos debido un aumento en la eficiencia catalítica del transportador [187].

### 1.7.2 Regulación de GLT-1/EAAT2

Estudios en cultivos puros de astrocitos demostraron la expresión única del transportador GLAST; sin embargo, la expresión de GLT-1 es inducida cuando los astrocitos son co-cultivados con neuronas [188, 189], indicando que algunos factores solubles liberados por las neuronas así como la interacción axonal-astroglia promueven el aumento de la proteína de GLT-1 y su mRNA [188, 190–193]. La activación de las quinasas MAP p42/44 a través de la ruta de señalización de los receptores tirosina quinasa (RTK) en un medio condicionado, es la vía de señalización que se ha propuesto para explicar la regulación positiva de GLT-1 [189, 190, 194].

El tratamiento con diferentes factores de crecimiento en co-cultivo y el tratamiento de astrocitos con dbcAMP inducen también la expresión de GLT-1, observado cambios en morfológicos relacionados directamente con la diferenciación astrocítica [167, 189, 190]. Por otra parte, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B se ha reconocido como un actor principal en la regulación transcripcional de GLT-1, ya sea como activador o represor. En 1996

Meyer y colaboradores demostraron la presencia de la secuencia consenso de unión del factor NF- $\kappa$ B en la región 5'-UTR del gen EAAT2 humano [195]. Posteriormente, el promotor de EAAT2 fue clonado y se determinó que posee elementos de unión a varios factores de transcripción, como son el factor nuclear de las células T activadas (NFAT), N-myc y NF- $\kappa$ B, que contribuyen a la expresión y la regulación del transportador [196]. Uno de los sitios de unión a NF- $\kappa$ B se encuentra en la posición -272 respecto al sitio de inicio de la transcripción y es activado por ceftriaxona [196–199]. Se ha caracterizado que la activación de la vía de las MAPK por factores de crecimiento tales como EGF finaliza en la activación de NF- $\kappa$ B promoviendo la transcripción de GLT-1 [200]. Recientemente, se ha demostrado que los estrógenos al igual que ocurre con el transportador GLAST, están involucrados en la regulación GLT-1 a través de los ER $\alpha$  y  $\beta$  y el GRP30. Cuando se activan los receptores de estrógenos, aumenta la unión a CREB al sitio -308 y NF- $\kappa$ B en los sitios -251, -272 y -583) en el promotor de GLT-1 [177, 201]. Se sugiere que parte de la respuesta generada por los estrógenos depende de la regulación positiva de TGF $\alpha$ , que funciona como un factor autocrino capaz de regular la expresión de GLT-1 a través de las vías de señalización MEK/ERK y PI3K/Akt [173, 177].

Además de la regulación positiva de GLT-1, dependiente de EGF y TGF $\alpha$ , se ha reportado su regulación a la baja mediada por TNF- $\alpha$  [196]. Se propone que TNF $\alpha$  aumenta la unión de NF- $\kappa$ B al promotor GLT-1 [198], contrariamente a lo que se ha descrito anteriormente, cuando este factor de transcripción es activado por TNF $\alpha$ , GLT-1 es reprimido. Sitcheran y colaboradores (2005) describieron que la activación de NF- $\kappa$ B inducida por TNF $\alpha$  depende del reclutamiento de N-myc, mientras que la activación mediada por EGF es independiente de la degradación de I $\kappa$ B [198].

El TNF $\alpha$  también es capaz de regular a YY1, que reprime la expresión basal del GLT-1 [202]. El NF- $\kappa$ B es un regulador de la expresión YY1, debido que la expresión de p65 activa su promotor. En línea con estos hallazgos, Karki y colaboradores (2014) demostraron que p65 es suficiente para activar el promotor GLT-1; sin embargo, la co-expresión de p65/YY1 inhibe la activación de este promotor [202], similar a lo que ocurre con el reclutamiento de N-myc, cuando YY1 se une al promotor de GLT-1, el efecto de NF- $\kappa$ B cambia de activación a supresión.



### **1.7.3 Regulación de EAAT3/EAAC1**

Respecto a EAAT3, se ha documentado que este transportador posee secuencias de elementos de respuesta a antioxidantes (ARE) en su promotor [203]. El factor nuclear derivado de eltroide 2 (Nrf2) es uno de los factores de transcripción que se une a los ARE. En las células de glioma C6, se ha descrito que la activación de Nrf2 y su sobreexpresión resultan en la activación transcripcional de EAAC1 [203].

La secuencia de unión para el factor regulador X1 (RFX1) también se ha identificado en el promotor de EAAT3 en humano. En las líneas celulares C6 y SH-SY5Y, la transfección de RFX1 aumenta tanto los niveles de proteína como la actividad del promotor de EAAT3 mientras que la eliminación de RFX1 disminuye la expresión de EAAT3 en neuronas corticales de rata cultivadas [204].

Diversas vías de señalización modulan la expresión de EAAT3 en la superficie celular. En 1998, se demostró que EAAC1 se inserta en la membrana plasmática en las células de glioma C6 después de la activación de PKC. Este efecto está asociado con una redistribución de EAAC1 desde los compartimentos subcelulares a la membrana [205]. Además, de modular la inserción del transportador en la membrana, la activación de PKC es capaz de modular su actividad. En este sentido, utilizando enfoques farmacológicos se demostró que PCK $\alpha$  regula la redistribución de EAAC1 [206]; mientras que PKC $\epsilon$  regula la eficiencia catalítica de EAAC1 [207]. Efectos similares en la expresión de EAAC1 en la membrana en células de glioma C6 fueron observados cuando se estimuló con PDGF, un factor de crecimiento que promueve la actividad de PI3K, aumentó rápidamente tanto la actividad como la expresión de EAAC1 en la membrana. Los efectos de PDGF fueron bloqueados por inhibidores de PI3K, pero no por inhibidores de PKC [208], lo que sugiere que dos vías de señalización independientes pueden estar involucradas en la regulación de la actividad y el mantenimiento de EAAC1 en la membrana plasmática.

### **1.7.4 Moléculas reguladoras del transporte de Glu en el daño hepático**

Diversas proteínas se han reportado como clave desarrollo del daño hepático, entre estas, algunas reguladoras la expresión y actividad de los transportadores de Glu. Algunos factores de transcripción que tienen un papel fundamental en procesos biológicos normales como la embriogénesis, la diferenciación, la reproducción y la proliferación celular, se han sugerido como potenciales actores iniciadores de la

tumorigénesis en hígado. El factor de transcripción YY1 es frecuentemente sobreexpresado en los tejidos cancerosos en comparación con los tejidos normales, esta molécula ejerce sus efectos a través de su capacidad para iniciar, activar o reprimir la transcripción dependiendo del contexto en el que se une. Los mecanismos de acción incluyen la activación o represión directa, activación o represión indirecta mediante el reclutamiento de cofactores, o la activación o represión por interrupción de sitios de unión o cambios en la conformación del DNA. La expresión y la función de YY1 están íntimamente asociadas con la progresión a través de fases del ciclo celular y la importancia fisiológica de su actividad se ha aplicado recientemente a modelos de biología tumoral. La mayoría de los datos son consistentes con la hipótesis de que la sobreexpresión y/o activación de YY1 está asociada con la proliferación celular no controlada, la resistencia a estímulos apoptóticos, la tumorigénesis y el potencial metastásico en carcinoma hepático [209, 210]. YY1 tiene también un papel en el mecanismo de retroalimentación positiva por el cual la replicación del virus de hepatitis B (VHB) y la expresión del factor de transcripción Sox4 están estrechamente relacionadas y controladas. El VHB activa la expresión de Sox4 a nivel transcripcional por la inducción de la expresión del factor de transcripción YY1 a través de la señalización por MAPK, lo que sugiere una asociación entre la expresión de YY1 y la infección viral hepática [211]. Por otra parte, se ha determinado que la exposición a xenobióticos como el BPA reduce la expresión de YY1 [28]. Además, se ha documentado que BPA modula la homeostasis del  $Ca^{2+}$ , que involucra tanto los canales de cloruro dependientes de  $Ca^{2+}$  así como del aumento de la actividad de Ser/Thr cinasas dependientes de  $Ca^{2+}$  [29, 30] entre las cuales, PKC representa una de las más estudiadas [31]. PKC desempeña un rol importante en la hepatotoxicidad por acetaminofén, un fármaco común causante de falla hepática aguda. En este caso, la hepatotoxicidad implica la activación de JNK (cinasa N-terminal de jun) y la reducción de p-AMPK. La hepatotoxicidad no sólo requiere la activación de JNK y las vías de señalización de muerte celular, sino que también requiere la inhibición de p-AMPK mediada por PKC. El tratamiento con un inhibidor de PKC de amplio espectro previene la regulación negativa de AMPK que normalmente se produce durante la hepatotoxicidad de acetaminofén [212]. De igual forma, la necrosis inducida por peróxido de hidrógeno en hepatocitos primarios de ratón es modulada por la activación de PKC y la posterior inactivación de AMPK [213].

Diferentes vías de transducción de señales en la secreción biliar son reguladas por PKC. Tanto en hígado de rata, hepatocitos aislados de rata y en células HepG2 se ha documentado que la activación de isoformas de PKC inducen colestasis. Esto se debe principalmente a la inhibición de la excreción de taurocolato que implica la recuperación del transportador de la membrana canalicular [214].

Najimi y colaboradores en el 2014 en estudios *in vitro*, demostraron que en la línea celular HepG2 con un modelo de colestasis, mediante la activación de PKC, la actividad del transportador EAAT2 disminuye, así como su afinidad y la velocidad máxima, mostrando una disminución en la captura de Glu correlacionado con la translocación intracelular del transportador. Sin embargo, en el estudio *in vivo*, este mecanismo de regulación en membranas de hepatocitos de ratas con ligadura del conducto biliar, se observó una fuerte regulación positiva de la expresión del transportador de GLT-1 [61]. Estos resultados, aunque son contrariamente a los obtenidos a nivel *in vitro*, confirman que la expresión del transportador EAAT2/GLT-1 se altera durante la colestasis.

En la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y la enfermedad de hígado alcohólico se ha registrado la activación de una serie de cascadas de señalización en los hepatocitos, incluidas NF- $\kappa$ B, PKC y JNK [215]. El NF- $\kappa$ B es activado por varios estímulos, lo que resulta en el inicio de respuestas inflamatorias e inmunes. Entre los activadores más potentes del NF- $\kappa$ B se encuentran las moléculas derivadas de patógenos, que estimulan los receptores tipo Toll (TLR), así como las citosinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  o interleucina 1, 6 y 8. De este modo la activación de NF- $\kappa$ B puede conducir a la transcripción de diversos genes con sitios de unión a NF- $\kappa$ B, la mayoría de los cuales están involucrados en la regulación de la inflamación, las respuestas inmunes y la supervivencia celular [215–217].

Además, se ha reportado la regulación del transporte de Glu en el SNC durante la HE. Los altos niveles de amonio y/o  $Mn^{2+}$  y la inflamación son los principales componentes en esta desregulación. Estudios en sinaptosomas y cultivos de astrocitos corticales demuestran que en condiciones de hiperamonemia (5 mM) el transporte de Glu activa su modo inverso provocando la liberación de Glu, se reduce su actividad de transporte por disminución en la proteína GLAST y de su mRNA, aumentando la concentración de Glu extracelular [218]. Tales resultados coinciden con los obtenidos por Noremborg y colaboradores en un modelo *in vivo* de hiperamonemia, en donde los niveles de mRNA de GLAST y de GLT-1 se redujeron en corteza cerebral y estriado [219]. Contrariamente,

en experimentos *ex vivo* en rebanadas de hipocampo de rata, los resultados indican que en condiciones de hiperamonemia (mayores a 80  $\mu\text{M}$ ) la actividad del transporte aumenta mientras que la síntesis de este aminoácido disminuye intracelularmente [220]. Curiosamente, cuando las rebanadas de tejido fueron expuestas a suero de pacientes con cirrosis y con diferentes niveles de HE, se determinó la disminución en la actividad de transporte [220]. Indicando que otros factores participan en la patogénesis de la HE. Estudios *in vitro* de cultivo de astrocitos corticales han demostrado que el  $\text{Mn}^{2+}$  desregula directamente la expresión y la función de ambos transportadores de GLT-1 y GLAST debido al aumento en la proteína de YY1 y su unión al DNA, disminuyendo los niveles de mRNA y proteína de los transportadores [186]. No obstante, en cultivos primarios de glía de Bergmann, células enriquecidas en el transportador GLAST, la actividad catalítica de captura de Glu se ve aumentada después de la exposición a  $\text{Mn}^{2+}$  a corto plazo [187]. La inflamación es uno de los componentes que ha tomado más fuerza en la explicación de los trastornos observados en el metabolismo del Glu en SNC durante la falla hepática aguda. Los niveles séricos de ciertas citocinas inflamatorias como interleucina 6 y 18 se encuentran aumentadas en pacientes cirróticos con HE mínima [221]. Los efectos de la inflamación en la glía inicialmente conducen a una mayor liberación y “derrame” de Glu en el espacio extrasináptico al disminuir la capacidad de los transportadores para amortiguar e ingresar el Glu a la célula. Este exceso de Glu activa receptores tanto inotrópicos como metabotrópicos. La sobre-activación de los receptores NMDA extrasinápticos puede provocar atrofia y regresión de las espinas y procesos dendríticos, y pérdida de la integridad sináptica resultando en pérdida neuronal. Por otra parte, la sobreactivación de los receptores metabotrópicos pre-sinápticos de Glu (mGluR2/3) reducen la transmisión sináptica glutamatérgica [222]. El cerebelo es la estructura del SNC en la que se registran los efectos tempranos en el daño hepático tales como efectos histopatológicos que indican pérdida y desarreglo celular, activación astrogliar y microglial así como presencia de infiltrados de linfocitos T, en pacientes con esteatosis leve [223].

## 2. Justificación

La disponibilidad intracelular de Glu en el hígado está controlada a nivel de síntesis. Sin embargo, durante el daño hepático la homeóstasis de este aminoácido se ve alterada.

Los mecanismos moleculares de regulación bajo estas condiciones aún no se han esclarecido y el sistema de transporte de Glu podría estar vinculado en el mantenimiento de sus reservas. En este estudio utilizando como un inductor de daño la exposición a dos xenobióticos diferentes, BPA o CCl<sub>4</sub>, indagamos sobre los mecanismos de regulación del transporte de Glu en el daño hepático.

### 3. Hipótesis

El daño inducido por la exposición a Bisfenol A o a CCl<sub>4</sub> alterará el transporte de Glu en células HepG2 al modificar el patrón de expresión de los transportadores de la familia *slc1a*.

### 4. Objetivos

#### 4.1 Objetivo general

Caracterizar la regulación de los transportadores de aminoácidos excitadores en el daño hepático.

#### 4.2 Objetivos particulares

- Determinar la expresión y actividad del transportador EAAT1/GLAST en la línea celular HepG2.
- Establecer la regulación del transporte de Glu después de la exposición a D-aspartato en células HepG2.
- Determinar la expresión y la actividad de los transportadores de glutamato (EAAT1 y 2) después de la exposición aguda a BPA en la línea celular HepG2.
- Establecer el efecto de la exposición aguda a BPA sobre la expresión de YY1 en células HepG2.
  
- Establecer la expresión de los transportadores de Glu en hígado, cerebro y cerebelo en un modelo *in vivo* de exposición subcrónica a BPA.
- Determinar la expresión de los transportadores de Glu en tejido hepático después de la exposición aguda a CCl<sub>4</sub>.

- Determinar la activación glial en tejido cerebral y de cerebelo después de la exposición aguda a CCl<sub>4</sub>.
- Establecer la expresión proteica de los transportadores de Glu en tejido cerebral y de cerebelo después de la exposición aguda a CCl<sub>4</sub>.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Materiales**

El BPA 2,2-Bis(4-hidroxifenil) propano, 4,4'-Isopropolidenedifenol  $\geq 99\%$  (239658), dimetilsulfóxido  $\geq 99\%$ , (#M81802) y el reactivo MTT (# M2128) fueron obtenidos de Sigma Aldrich; el radioligando [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato, 16.4  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ , fue obtenido de Perkin Elmer (Boston, MA, USA). Los reactivos para el cultivo celular fueron de Thermo Fisher Scientific (Carlsban, CA, USA) y las cajas de cultivo fueron adquiridas de Corning (New York, NY, USA). El anticuerpo Anti-GLAST/EAAT1 fue adquirido de Abcam (ab416, 1:1000) (Cambridge, United Kingdom); Anti-Glt1/EAAT2 de Alomone (AGC-022; 1:1000) (Jerusalem, Israel); AntiYY1 (C-20) (sc-281;1:1000) y Anti-EAAC1/EAAT3 (sc-7761;1:500) de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). El anticuerpo anti-glutamina sintetasa (610517, 1: 1000) se obtuvo de BD Transduction Laboratories; el anti-proteína ácida fibrilar glial/GFAP (Z0334, 1: 1000) se adquirió de Dako; el anti-alfa actina de músculo liso (C6198, 1: 250) se compró en Sigma lo mismo que el anticuerpo anti-GAPDH (1: 5000). El anticuerpo monoclonal anti-actina (1:250) fue amablemente donado por el Dr. Manuel Hernández del Departamento de Biología Celular del Cinvestav. Los anticuerpos secundarios marcados con colorante fluorescente anti-conejo (CF®680, 1: 5000) y anti-ratón (CF®770, 1: 5000) se obtuvieron de Biotium (USA). Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) y el reactivo de quimioluminiscencia (ECL) se obtuvieron de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Reino Unido). El kit de ensayo para determinación de proteínas BCA (23227) fue comprado a Pierce Thermo Fisher Scientific, el reactivo Bradford para la determinación de proteínas y los materiales para la electroforesis en gel de poliacrilamida se obtuvieron de Bio-Rad. Los reactivos utilizados en los ensayos de inmunohistoquímica bloqueador avidina/biotina (SP-2001) y el kit de peroxidasa M.O.M. (BMK-2202) se adquirió de Vector Laboratories. Los inhibidores y bloqueadores TBOA (ácido DL-threo- $\beta$ -

benziloxiaspartico), THA (L-treo-hidroxi-aspartato), DHK (ácido dihidrocaínico) y PMA (Phorbol 12-miristato 13-acetato) se obtuvieron de Tocris Cookson (St. Louis, MO, USA). El reactivo de tetracloruro de carbono grado 99.9% (319961) se obtuvo de Sigma-Aldrich.

## **5.2 Cultivo celular y protocolo de estimulación**

La línea celular HepG2 se deriva de un hepatoblastoma de paciente masculino caucásico de 15 años. Presenta morfología de células epiteliales, son adherentes en cultivo y son no tumorigénicas (ATCC® HB-8065™).

Las células HepG2 se cultivaron en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con 4,5 g/L de glucosa, 10% de suero fetal de ternera, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina. Todos los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua que contenía 5% de CO<sub>2</sub>. Las monocapas confluentes fueron expuestas a las concentraciones de BPA indicadas durante diferentes períodos y las muestras se procesaron como se detalla a continuación. Antes de cualquier tratamiento, las monocapas confluentes se cambiaron a solución de ensayo HEPES-Tris 25 mM, NaCl 130 mM, KCl 5,4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,8 mM, glucosa 33,3 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM a pH 7,4.

Para los ensayos dosis-respuesta las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de D-aspartato (1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, 2 mM) o BPA (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM) durante un periodo de 30 minutos. Posteriormente la solución de ensayo fue retirada, se colocó solución nueva sin estímulo y las placas fueron incubadas durante 2, 6 y 12h. Para los ensayos curso-temporal se colocó el estímulo de BPA (100nM) durante 30 minutos, pasado el tiempo de exposición las células se incubaron durante 30 minutos, 2, 4, 6, 12, y 24h en solución sin estímulo (Figura 8). Los inhibidores fueron colocados 30 minutos antes de los tratamientos.

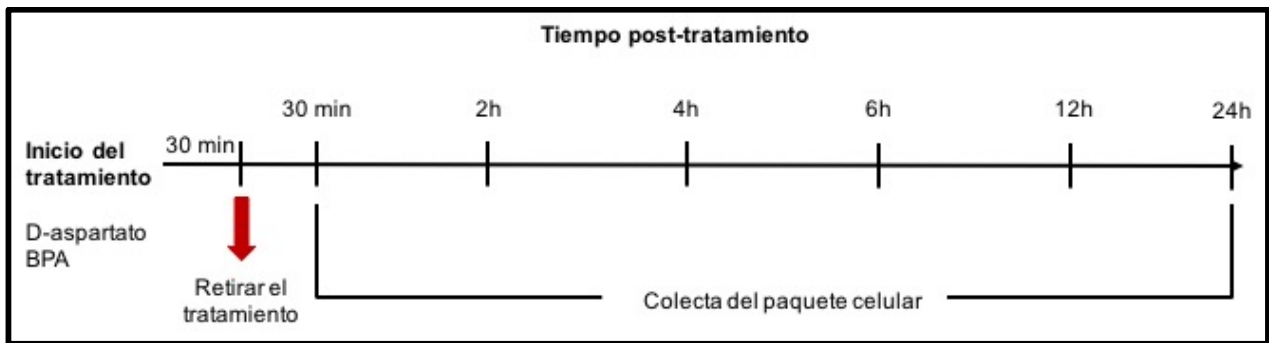


Figura 9. Estrategia experimental

### 5.3 Evaluación de la actividad metabólica celular

#### 5.3.1 Principio

La evaluación de la actividad mitocondrial se usó como un indicador de la viabilidad celular en función del potencial redox por el ensayo MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en formazán. El formazán es un compuesto de color azul, que permite determinar la función mitocondrial de las células tratadas mediante la técnica de espectrofotometría. La cantidad de células vivas es directamente proporcional a la cantidad de formazán producido.

#### 5.3.2 Método

El ensayo MTT se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron monocapas al 80% de confluencia, en placas de 96 pozos. Las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de D- aspartato (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 2 mM) y BPA (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 $\mu$ M, 10  $\mu$ M) respectivamente durante seis y 12h, como control positivo se utilizó Tritón X-100. Cuatro horas antes de finalizar el tratamiento se colocaron 20 $\mu$ L del reactivo MTT (5 mg/mL), posteriormente se decantó el medio y los cristales de formazán formados fueron disueltos en 100  $\mu$ L de DMSO por agitación durante 10 minutos en oscuridad. La densidad óptica de las muestras se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 560 nm.

Para la cuantificación de la proteína total se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm (se considera la absorción de los aminoácidos y el enlace peptídico), la concentración final se obtuvo con la siguiente ecuación:



$$\text{Concentración de proteína total } \mu\text{g/mL} = 1.55 * (A280 - (0.76 * A260))$$

## 5.4 Actividad de captura de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato

### 5.4.1 Principio

Los transportadores de aminoácidos excitadores EAAT1/GLAST y EAAT2/GLT-1 se encuentran en la membrana celular y su principal función es la internalización del Glu a la célula. Debido a que el D-aspartato es un análogo no metabolizable de Glu, el uso de este aminoácido marcado radiactivamente permite examinar el papel de estas proteínas en el transporte de Glu, sin que se presente un eflujo significativo del trazador radioactivo. Las moléculas de aspartato internalizadas son contabilizadas mediante un equipo especializado.

### 5.4.2 Método

Las monocapas confluentes se lavaron tres veces con 0.25 mL de solución de ensayo para eliminar todas las células no adheridas. La captura de [<sup>3</sup>H]-D-aspartato se inició al  $t = 0$  mediante la adición de 0.25 mL de solución de ensayo que contenía 0.4  $\mu\text{Ci/mL}$  de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartato (100  $\mu\text{L}$  de concentración final de aspartato). La reacción se detuvo aspirando el medio radiactivo y lavando cada pozo dentro de 15 s con alícuotas de 0.25 mL de solución de ensayo fría. Para la determinación de los parámetros cinéticos, la concentración de aspartato se modificó a concentraciones de 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ , 1 y 2 mM. La capturan se detuvo como se describió anteriormente. Las células en los pozos se solubilizaron durante 2h a 37 °C con 0.25 ml de NaOH 0.1 M. Posteriormente se cuantificó una alícuota de la radiactividad presente en un contador de centelleo Perkin Elmer en presencia de un cóctel de centelleo. Los experimentos se llevaron a cabo al menos tres veces con un mínimo de determinaciones por cuadruplicado.

## 5.5 Animales y modelos *in vivo*

### 5.5.1 Exposición sub-crónica a BPA

El hígado, cerebro y cerebelo provenientes de ratón hembra adulto C57BL/6J fueron donados amablemente por la Dra. Isabel Martínez Hernández.

Los animales fueron sometidos a un ritmo de 12 horas día-noche con acceso libre a alimentos y agua; fueron asignados aleatoriamente a uno de tres grupos (n= 3 para cada grupo). El nivel más bajo de efectos adversos observados por la EPA de E.U.A. (LOAEL) de BPA para humanos es de 50 mg/kg/día [224]. Sin embargo, para establecer la concentración máxima considerada segura para una exposición diaria, la EPA divide esta dosis por un factor de seguridad de 1,000 veces, obteniendo un valor de 50 µg/kg/día para la ingesta diaria tolerable (TDI). Por lo tanto, un ratón adulto (~ 0.03 kg) podría consumir "con seguridad" 1 µg/kg/día. En el presente estudio, los ratones fueron expuestos durante cuatro semanas, a una dosis alta 50 µg/kg/día y a una dosis baja, 0.5 µg/kg/día de BPA (ambas dosis son más bajas que el LOAEL). El BPA se administró en aceite mineral como vehículo por deposición en la boca. El grupo control fue administrado con el vehículo. Después de la exposición, se aplicó la eutanasia a los animales por dislocación cervical.

#### **5.5.2 Hepatotoxicidad por exposición a CCl<sub>4</sub>**

Los experimentos realizados en este estudio fueron aprobados por la Junta de Revisión ética del Institut de Recherche Expérimentale et Clinique. Ratones macho adulto de tipo salvaje C57BL/6J se sometieron a un ciclo luz-obscuridad de 12 horas día-noche con acceso libre a alimentos y agua. Se indujo lesión hepática aguda con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>). Los tratamientos se dividieron en una dosis y tres dosis de CCl<sub>4</sub> (Figura 9). Se usaron cuatro ratones control y cinco tratados con CCl<sub>4</sub> por grupo para estos experimentos. Los animales fueron asignados aleatoriamente a cada grupo y administrados con una inyección intraperitoneal de 100 µL de CCl<sub>4</sub> disuelto en aceite de maíz como vehículo (10%, v/v, 5 ml/kg) por 20 g de peso corporal. Los ratones del grupo control fueron administrados con aceite de maíz. Uno y siete días después del tratamiento se aplicó eutanasia por dislocación cervical, se recuperaron el tejido hepático, cerebro y cerebelo para el análisis de proteínas, las muestras se fijaron en formalina durante 24h y se incrustaron en parafina para análisis histopatológicos.

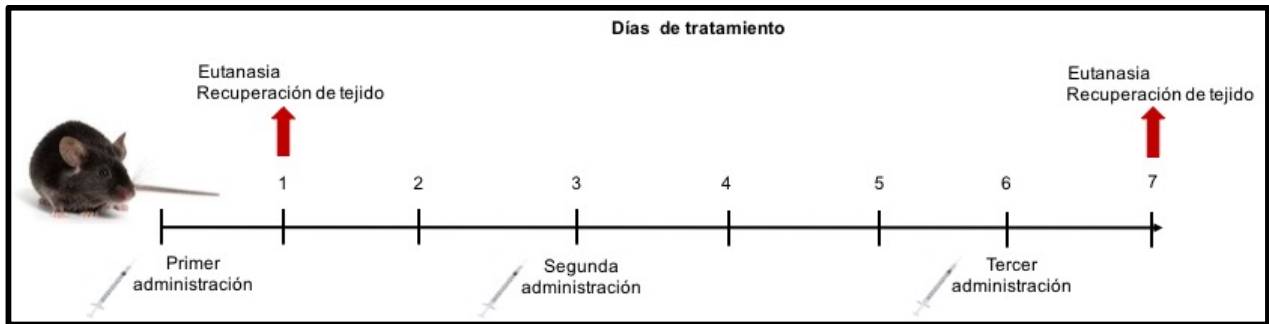


Figura 10. Modelo experimental de daño hepático agudo inducido con  $\text{CCl}_4$ .

## 5.6 Evaluación de daño histopatológico: tinción hematoxilina- eosina (HE)

### 5.6.1 Principio

La hematoxilina tiene un color azul púrpura intenso y tiñe los ácidos nucleicos. La eosina a diferencia es un colorante rosa y tiñe las proteínas inespecíficamente. En un tejido típico, los núcleos se tiñen de azul, mientras que el citoplasma y la matriz extracelular tienen diversos grados de tinción rosa. Las células bien fijadas muestran considerables detalles intranucleares. Los núcleos muestran diferentes patrones de condensación de heterocromatina (tinción con hematoxilina) específicos para el tipo de célula; si hay abundantes polirribosomas, el citoplasma tendrá un tono azul distintivo. El complejo de Golgi se puede identificar tentativamente por la ausencia de tinción en una región próxima al núcleo. Por lo tanto, la tinción revela abundante información estructural, con implicaciones funcionales específicas. Una limitación de la tinción con hematoxilina es que es incompatible con la inmunofluorescencia [225].

### 5.6.2 Método

Partimos de muestras que fueron fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras fueron cortadas en secciones de  $5 \mu\text{m}$  de grosor y adheridas a portaobjetos. Inicialmente, los cortes de tejido se desparafinaron siguiendo el siguiente protocolo: 2x5 min en xileno, 3x3 min en isopropanol, 10 min en metanol al 1%, posteriormente mantuvieron 3 min en agua destilada. Posteriormente, se incubaron 10 min en hematoxilina de Mayer; se lavaron 5 min en agua corriente, 2x1 min en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Las secciones de tejido se trataron 1 min en eosina al 0.2% en  $\text{H}_2\text{O}$ , se enjuagaron 5 min en agua corriente, 3x3 min en isopropanol, 2x3 min en xileno y se montaron con medio de montaje para su análisis.

## 5.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección en fase sólida

### 5.7.1 Principio

La inmunodetección en fase sólida (*Western blot*) es una técnica utilizada para identificar una proteína en una muestra que contiene varias proteínas. Las proteínas de la muestra se separan mediante electroforesis en gel de acrilamida en función de su peso molecular. Después son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF) para buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. A continuación, se realiza la unión antígeno-anticuerpo y finalmente se detecta la presencia de la proteína en el extracto por actividad enzimática o fluorescencia, entre otros métodos y se analiza su cantidad relativa respecto a otra proteína control [226].

### 5.7.2 Método a partir del cultivo celular

El medio de cultivo fue eliminado y las monocapas confluentes se levantaron con solución PBS con inhibidores de fosfatasas (NaF 10 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM). La fracción de membrana se obtuvo de acuerdo al protocolo de Hu y colaboradores [16] con modificaciones. Las células se homogenizaron en 10 volúmenes de agua helada que contenía EDTA 5 mM y PMSF 1 mM y se sometieron a centrifugación a 14,000 rpm durante 20 min a 4 °C. El sedimento obtenido se resuspendió en solución NaPi 10 mM con 1% de SDS, se sónico brevemente antes de la centrifugación a 6000 durante 20 min a 15 °C. La fracción nuclear se preparó a partir de células obtenidas por raspado con solución PBS, el paquete celular fue sedimentando por centrifugación y se resuspendió suavemente en solución A (HEPES 10 mM pH 7,9; KCl 10 mM; EGTA 1 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM; inhibidores de proteasa) por pipeteo, y se incubó en hielo durante 15 min. Se añadió una cantidad fija de 25 µL de NP40 al 10%, la preparación se agitó durante 10 segundos en la velocidad más alta. Después de que el sedimento se centrifugó durante 1 min a 10.000 rpm a 4 °C el sedimento nuclear se resuspendió en 30- 40 µL de tampón B (HEPES 20 mM pH 7,9; NaCl 0,4 M; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM; inhibidores de proteasas) y se agitó en vortex durante 30 min a 4 °C. Después de centrifugar durante 5 min a 9,000 rpm a 4 °C, el sobrenadante se transfirió (fracción nuclear) a un tubo limpio de microcentrifuga. Los lisados celulares de citoplasma o las fracciones nucleares se desnaturalizaron en solución de muestra de Laemmli y se

analizaron cantidades igual de proteínas (50 µg de proteína total según lo determinado por el método de Bradford) en geles de poliacrilamida al 10% y posteriormente los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa. Se realizó la tinción de las membranas con el colorante rojo de Ponceau S para confirmar que el contenido de proteína era igual en todos los carriles. Las membranas se lavaron en PBS para eliminar el Ponceau S y posteriormente se incubaron en TBS-Tween al 0.1% que contenía leche descremada al 5% durante 60 min para bloquear sitios de unión inespecíficos. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios indicados (Tabla 1) durante 12h a 4 °C, seguido de cinco lavados con TBS-Tween al 0.1% durante 5 min. Posteriormente las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios (Tabla 1) durante 2h a temperatura ambiente. Los polipéptidos se detectaron por quimioluminiscencia.

### **5.7.3 Método a partir de tejido**

La extracción de proteínas se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Gregor y colaboradores en 1988 [227], con modificaciones. El tejido se homogenizó en 10 volúmenes de tampón de tris-acetato 50mM helado a pH 7.0 que contenía EDTA 5 mM y PMSF 1 mM. La suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm a 4 °C, el primer sedimento se homogeneizó (fracción citoplasmática) y el sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 14000 rpm durante 20 min a 4 °C. El segundo sedimento (fracción membranal) se volvió a suspender mecánicamente y se sónico durante 55 segundos al 90%. Se usó una alícuota de cada fracción para la cuantificación de proteínas por el kit BCA. Las muestras se desnaturalizaron en solución de muestra de Laemmli, y se analizaron cantidades igual de proteínas (25 µg) a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Posteriormente el gel fue transferido sobre membranas de PVDF. Las membranas se tiñeron con el colorante rojo de Ponceau S para verificar la calidad de la transferencia y confirmar que el contenido de proteína era igual en todos los carriles. Las membranas se lavaron con PBS para eliminar el colorante y se incubaron en TBS que contenía BSA al 5% y Tween 20 al 0,1% durante 60 minutos para bloquear el exceso de sitios de unión a proteínas no específicas. Las membranas fueron incubadas durante 12h a 4 °C con anticuerpos primarios (Tabla 1). Después de lavar tres veces durante 10 minutos, las transferencias se incubaron con anticuerpos secundarios durante 2 h a temperatura ambiente (Tabla 1). Los polipéptidos inmunorreactivos se detectaron mediante un sistema infrarrojo de imágenes Odyssey®.

Todos los análisis de densitometría se realizaron con el software imagen J 1.44 (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, Estados Unidos) y los datos se representaron como la media  $\pm$  desviación estándar (DE), obtenidas con el software GraphPad, Prism 5, (San Diego, CA, EE. UU.).

**Tabla 1.** Anticuerpos primarios y secundarios usados en los ensayos de inmunodetección en fase sólida e inmunofluorescencia.

<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS</b>		
<b>Anticuerpo</b>	<b>Fabricante/Referencia</b>	<b>Dilución</b>
Anti-EAAT1/GLAST	Abcam (ab416)	1:1000
Anti-EAAT2/GLT-1	Alomone (AGC-022)	1:1000
Anti-Actina	Cinvestav, México	1:250
Anti-Glutamina Sintetasa	BD Transduction Laboratories (610517)	1:1000
Anti-Proteína ácida fibrilar glial/GFAP	Dako (Z0334)	1:1000
Anti-Alfa actina de musculo liso	Sigma (C6198)	1:250
Anti-GAPDH	Sigma	1:5000
<b>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</b>		
Anti-conejo HRP	Amersham Biosciences	1:1000
Anti-ratón HRP	Amersham Biosciences	1:1000
Anti-conejo	Biotium (CF®680)	1:5000
Anti-conejo	Biotium (CF®770)	1:5000

## 5.8 Inmunofluorescencia

### a) Cultivos celulares

#### 5.8.1 Principio

La inmunocitoquímica es una técnica que se utiliza para visualizar anatómicamente la localización de una proteína específica en las células mediante la reacción antígeno-anticuerpo. Un anticuerpo primario específico permite la visualización de la proteína bajo un microscopio de fluorescencia cuando está unido por un anticuerpo secundario que tiene un fluorocromo conjugado. Esta técnica permite evaluar si las células en estudio

expresan o no la proteína en cuestión y en caso de determinar una señal inmunopositiva, para establecer los compartimentos subcelulares que la expresan.

### **5.8.2 Método**

Las células HepG2 se sembraron en cubreobjetos. Se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron una vez con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) y se fijaron durante 10 min en paraformaldehído al 4%. Las células se lavaron con solución PBS tres veces, incubando 5 min a temperatura ambiente durante cada lavado. La unión no específica se evitó mediante incubación con suero de cabra al 4% en PBS-Tween 0.1 % durante 1h a temperatura ambiente. Las células se expusieron a una dilución 1:250 del anticuerpo primario anti-GLAST/EAAT1, anti-Glt1/EAAT2 o anti-EAAC1/EAAT3 en suero de cabra al 2% en PBS-Tween 0.1 % durante 2h a 37 °C, seguido de la incubación con la fluoresceína respectiva, anti-conejo de cabra marcado o anti-suero de cabra en suero de cabra al 2% en PBS-tween 0.1% (1:1000) durante 2h a temperatura ambiente. Las preparaciones se montaron con Fluoroshield /DAPI. Las preparaciones celulares se examinaron bajo una microscopía de fluorescencia (microscopio de inmunofluorescencia Zeiss Axioskop 40 y el software AxioVision; Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY).

## **b) Hígado**

### **5.8.3 Principio**

La inmunohistoquímica es una técnica que bajo el mismo principio que la anterior (ver 5.8.1), tiene por objetivo identificar anatómicamente la expresión de una proteína en un tejido específico mediante el uso de un anticuerpo primario específico que se une a él, también mediante la reacción antígeno- anticuerpo.

### **5.8.4 Método**

A partir de muestras de hígado de los animales tratados, el tejido se cortó en secciones de 5 µm de grosor en criostato. La inmunotinción no específica se evitó por incubación en PBS con suero de cabra normal al 1% durante 1h a temperatura ambiente. Después, las rebanadas se incubaron toda la noche con anticuerpo policlonal anti-Glutamina sintetasa a una dilución de 1:1000 a temperatura ambiente. La tinción se visualizó por

medio un sustrato cromogénico. Los núcleos se contrastaron usando hematoxilina de Mayer durante 10 min. Las preparaciones se montaron para análisis microscópico.

### 5.9 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  DE. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía para determinar diferencias significativas entre las condiciones. Cuando este análisis indicó significancia ( $p < 0.05$ ), se usó un análisis de comparación múltiple de Dunnett para determinar qué condiciones eran significativamente diferentes del control y un análisis de comparación múltiple de Tukey para determinar qué condiciones eran significativamente diferentes entre sí. Los datos de los experimentos de captura de D-aspartato se analizaron mediante regresión no lineal utilizando el programa de ajuste de curvas. Para los datos de los experimentos *in vivo* (tratamientos con  $\text{CCl}_4$ ) se realizó una prueba t de Student no pareada con corrección de Welch para determinar diferencias significativas entre condiciones ( $p < 0.05$ ) y se realizó un análisis de varianza de una sola vía para determinar diferencias significativas entre condiciones. Cuando este análisis indicó significancia ( $p < 0.05$ ), se utilizó el análisis de comparación múltiple de Dunnett para determinar qué condiciones eran significativamente diferentes del control (animales tratados con el vehículo). Los análisis fueron realizados con el software GraphPad, Prisma 5 (San Diego, CA, EE. UU.).

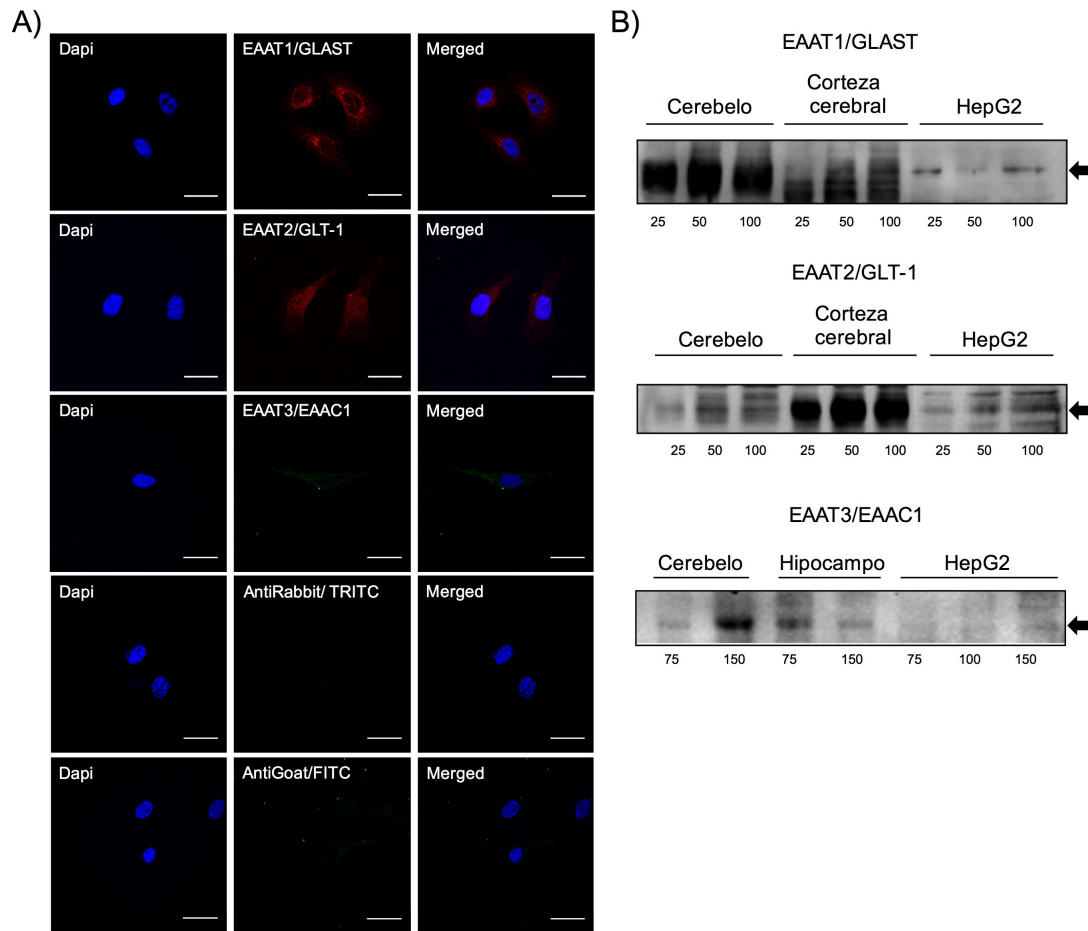
## 6. Resultados

### 6.1 Expresión de los transportadores de glutamato en la línea celular HepG2

La expresión hepática del transportador EAAT2/GLT-1 se ha reportado en modelos *in vitro* e *in vivo*. Además, este transportador está involucrado en ciertas patologías del hígado [61]. Por el contrario, la expresión de EAAT1/ GLAST en células humanas hepáticas aún no se ha demostrado. Considerando lo anterior, la pregunta inicial fue si estas proteínas transportadoras están presentes en las células de hepatoblastoma, HepG2. Los resultados mostraron que, EAAT2/GLT1 y EAAT1/GLAST están presentes en estas células con un peso molecular de  $\sim 60$  y  $\sim 66$  kDa, respectivamente, aunque a una concentración menor que en el tejido cerebral y cerebelar de rata adulto (Figura 11). La expresión de EAAT2 se localizó tanto en la membrana como en el área citoplasmática de las células, mientras que la localización de EAAT1 fue acotada principalmente a la



membrana plasmática. Es importante mencionar que la expresión del transportador EAAT3/EAAC1 también fue detectada con un peso molecular de ~ 60 kDa; sin embargo, su expresión es escasa en la membrana celular (Figura 11, paneles A y B).

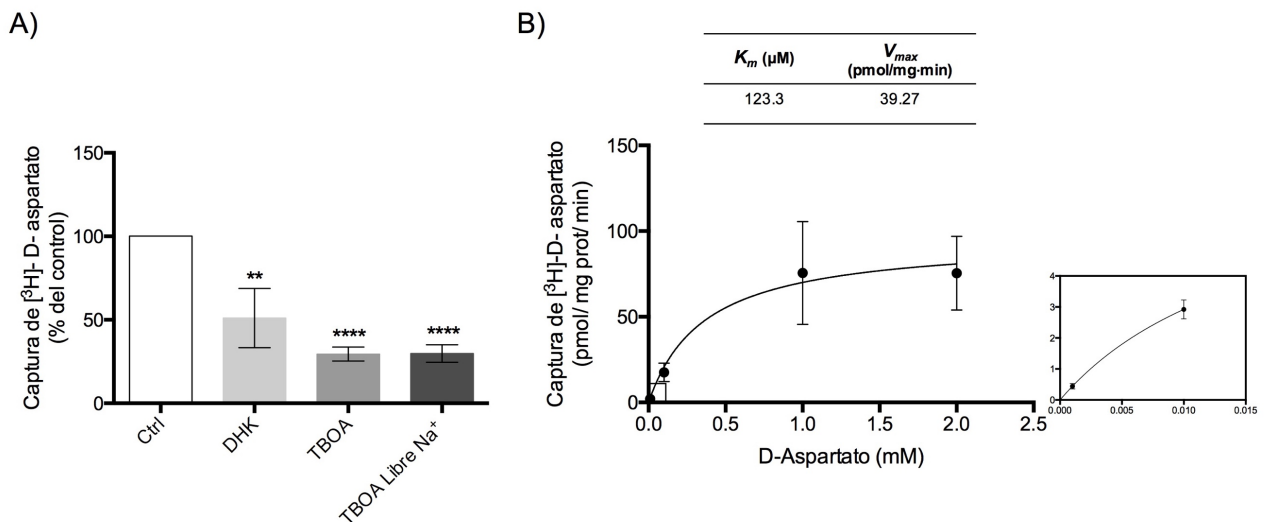


**Figura 11.** Expresión funcional de transportadores de Glu en células HepG2. A) Inmunoreactividad para anti-EAAT1, anti-EAAT2 y -EAAT3 en la línea celular HepG2. Inmunotinción con los anticuerpos primarios correspondientes, anti-EAAT1 y 2 (rojo); anti-EAAT3 (verde); DAPI, núcleos (azul), y se muestran imágenes fusionadas. En las imágenes inferiores se muestran los controles, el anticuerpo secundario sin anticuerpo primario. Barra de escala de 10 µm. B) Expresión de la proteína de membrana de EAAT1, EAAT2 y EAAT3 a partir de cerebelo, tejido de corteza cerebral o hipocampo de rata adulta, y células HepG2; 25, 50, 100 µg de proteína. El tamaño de banda previsto corresponde a 67/60 kDa, respectivamente. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

## 6.2 Actividad de los transportadores de Glu en la línea celular HepG2

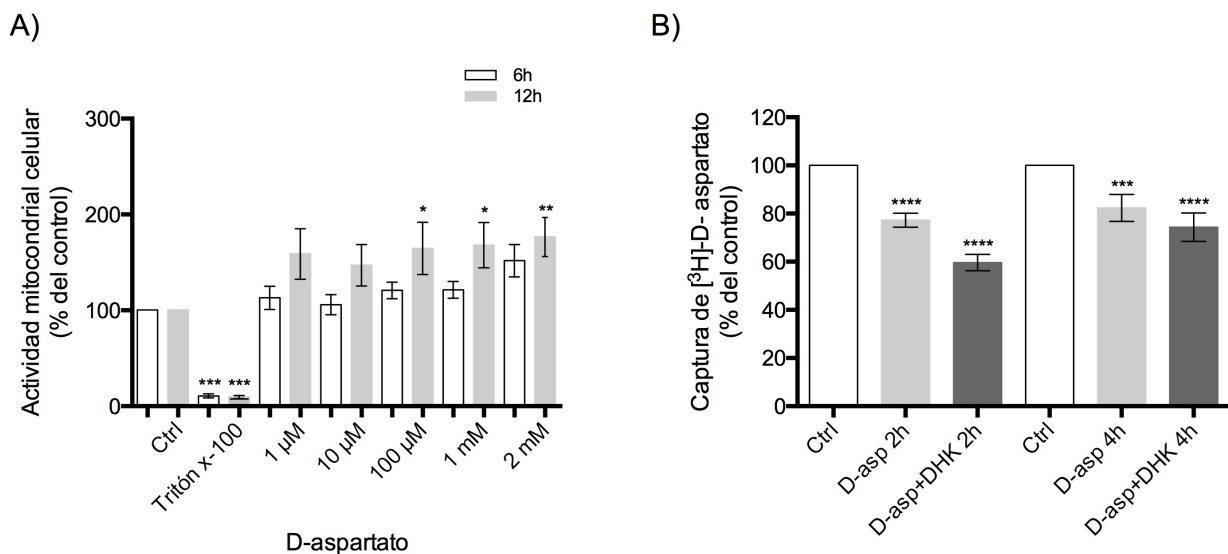
Para demostrar la expresión funcional de los transportadores de Glu, se usó un ensayo de captura de [<sup>3</sup>H]-D-aspartato. Estudios anteriores demuestran que los transportadores de aminoácidos excitadores son capaces de transportar L-Glutamato, L-aspartato y D-aspartato con altas afinidades [228]. No obstante, la principal ventaja de usar [<sup>3</sup>H]-D-aspartato es que este aminoácido no se metaboliza en las células HepG2 y, por lo tanto,

su tasa de flujo de salida es muy baja en las condiciones del ensayo, mejorando tanto la reproducibilidad como la sensibilidad de estos ensayos [229]. Como se muestra en el panel A de la Figura 12, aproximadamente el 50% de la captura se bloquea mediante la inclusión del inhibidor selectivo de EAAT2, ácido dihidrokaínico (DHK), lo que sugiere la expresión funcional de EAAT1 en las células HepG2; resultados que coinciden con los hallazgos obtenidos mediante inmunofluorescencia para ambos transportadores (Figura 12, panel A y B). Cuando se realizó la pre-incubación con el inhibidor de EAATs no selectivo, TBOA o cuando el NaCl fue reemplazado con cloruro de colina, la captura de D-aspartato se redujo un 75% respecto al control. Estos hallazgos demuestran que en las células HepG2, la mayoría de la captura de Glu es dependiente de  $\text{Na}^+$  y mediada en un 25% por EAAT2/GLT-1 (25%) y, muy posiblemente, por EAAT1/GLAST debido que la expresión de EAAT3/EAAC1 es mínima (Figura 11). Además, el valor de  $K_M$  de  $123.3 \mu\text{M}$  indica una contribución sustancial de EAAT1 en la actividad de captura (Figura 12, panel B).



**Figura 12.** Actividad de los transportadores de Glu en células HepG2. A) Las células HepG2 se pre-trataron con el bloqueador de EAAT2, DHK,  $100 \mu\text{M}$  o el bloqueador de los EAATs, TBOA,  $100 \mu\text{M}$  durante 30 min en solución de ensayo o solución de ensayo con cloruro de colina (libre de  $\text{Na}^+$ ), la captura de  $[^3\text{H}]$ -D-aspartato se midió después de 6 min. B) Isotherma de saturación para la captura de  $[^3\text{H}]$ -D-aspartato en células HepG2. Los datos mostrados corresponden a la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Se utilizó una regresión no lineal robusta para ajustar un modelo a nuestros datos y estimar los parámetros cinéticos. DHK: Ácido dihidrokaínico, TBOA: DL-treo- $\beta$ -ácido benciloxiaspártico.

La expresión y actividad de estos transportadores están regulados a corto y largo plazo por su sustrato [168, 230]. Con el fin de obtener información sobre una posible regulación desencadenada por Glu en los transportadores de aminoácidos excitadores del hígado, primero se exploró la viabilidad de las células HepG2 después de una exposición a 6 y 12h con el D-aspartato. No se detectó reducción en la actividad mitocondrial celular posterior al tratamiento con concentraciones crecientes de D-aspartato. Además, se detectó un aumento significativo en la actividad metabólica celular con 1 y 2 mM D-aspartato (Figura 13, panel A). Estos resultados permitieron examinar el efecto de una exposición de aspartato de 1 mM durante 30 minutos en la actividad de captura de [<sup>3</sup>H]-D-aspartato presente 2 y 4h post-tratamiento. Los resultados muestran una reducción aproximada de 20% en la actividad de captura, después de 2h. La inclusión del bloqueador de EAAT2 condujo a una reducción adicional del 20%, lo que sugiere que una captura dependiente de EAAT1 está presente en las células HepG2 (Figura 13, panel B). Después de 4h, la contribución de EAAT2 en la actividad de captura es solo del 10%, lo que respalda la idea de una modulación dinámica de la expresión de ambos transportadores en estas células (Figura 13, panel B).

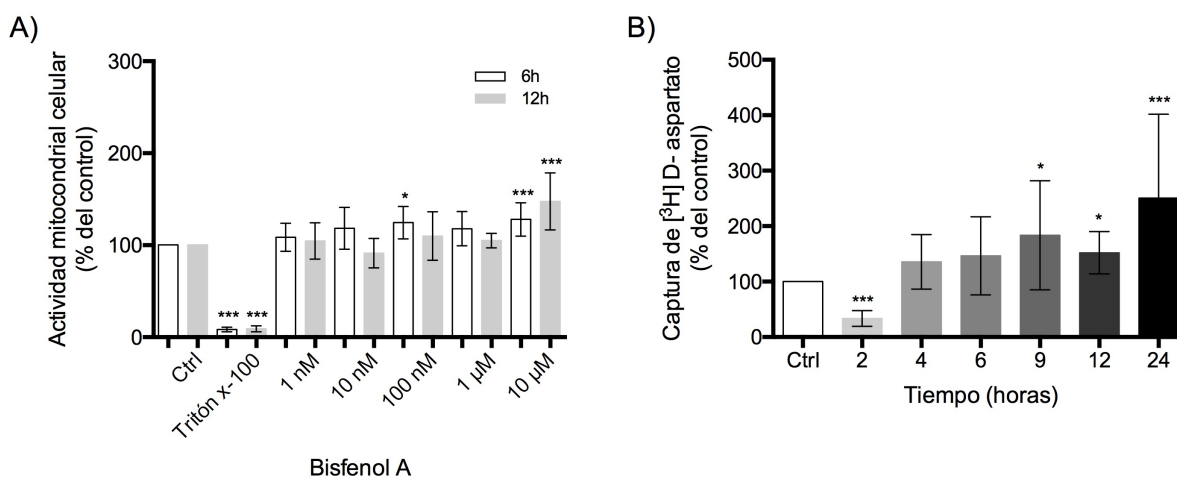


**Figura 13.** La exposición aguda a D-aspartato deteriora la actividad de los transportadores de aminoácidos excitadores en las células HepG2. A) Actividad mitocondrial celular después del análisis de los niveles de formazán púrpura intracelular en células HepG2 tratadas con D-aspartato (1μM-2mM) o tritón x-100. B) Regulación a la baja de D-aspartato en la captura de [<sup>3</sup>H]-D-aspartato. Las células se pre-trataron con D-aspartato 1 mM; bloqueador de EAAT2, DHK, 100μM o ambos durante 30 min. La captura de [<sup>3</sup>H]-D-aspartato se midió 2 o 4 h post-tratamiento. Los datos mostrados son la media ± DE de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. \* p <0.05, \*\* p <0.01. DHK: Ácido dihidrokáínico.

### 6.3 Efecto de la exposición aguda a BPA sobre los transportadores de Glu

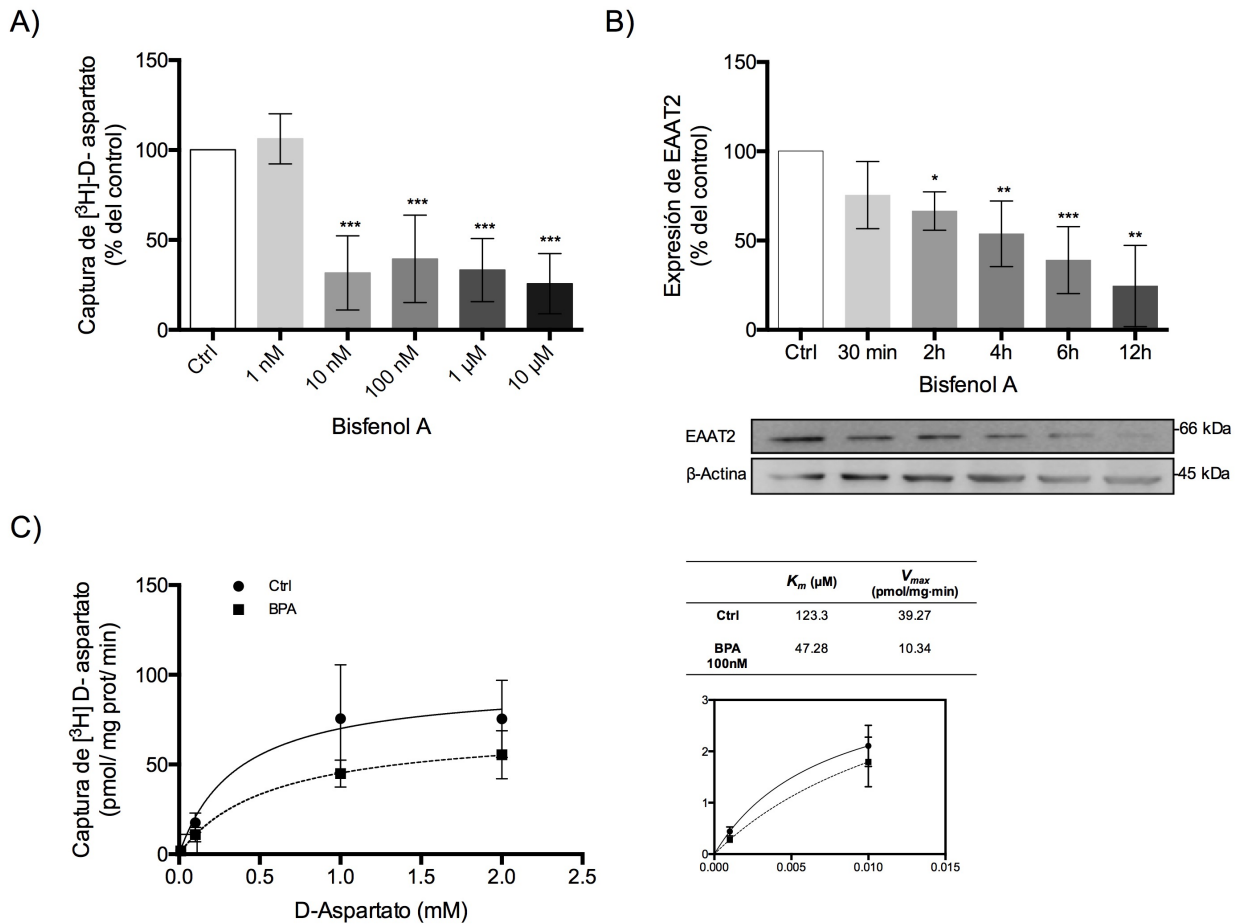
El uso del BPA es extenso por lo que su ingreso al organismo puede ser constante en toda la población. Varios estudios tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, han demostrado su carácter hepatotóxico al afectar la regulación metabólica y promover el desarrollo de hepatopatías. En este contexto se evaluó el efecto de la exposición a este xenobiótico en la expresión y actividad de los transportadores de membrana plasmática de aminoácidos excitadores en células de hepatoblastoma. El metabolismo del BPA ocurre rápidamente en humanos. Una conjugación eficiente con ácido glucurónico resulta en una pequeña cantidad de BPA libre, compuesto considerado como xenoestrógeno y al que se le atribuyen los efectos deletéreos del BPA. No obstante, el período en que el compuesto no conjugado permanece en humanos es menor en concentración y tiempo (vida media ~ 89 min) [231]. Por otra parte, se ha reportado que los efectos adversos del BPA son ocasionados a niveles inferiores de los considerados ingesta diaria aceptable. Teniendo en cuenta lo anterior, la exposición aguda a concentraciones de orden nanomolar emularía el concepto de los efectos que el BPA libre produce en el hígado.

Inicialmente se determinó la viabilidad de las células HepG2 después de la exposición a diferentes concentraciones de BPA durante 6 y 12h. No se registraron cambios significativos en la actividad metabólica celular, excepto después de la exposición a BPA 100 nM a las 6 h y BPA 10  $\mu$ M en ambos tiempos de estudio donde se detectó un aumento en la actividad celular (Figura 14, panel A). Una vez comprobada la viabilidad celular, se estudió el efecto de la exposición a BPA 100 nM durante diferentes períodos en la actividad de captura de [ $^3$ H]-D-aspartato. Los resultados mostraron un efecto bifásico, primero una reducción del 50% en la captura (después de 2h) y luego una recuperación y un posterior aumento de la actividad (Figura 14, panel B).



**Figura 14.** La exposición aguda a BPA modifica la actividad de los transportadores de aminoácidos excitadores en las células HepG2. A) Actividad mitocondrial celular después del análisis de los niveles de formazán púrpura intracelular en células HepG2 tratadas con BPA (1 nM-10 µM) o Tritón X-100. B) Las células HepG2 se trataron con BPA 100 nM durante 30 min. La captura de [<sup>3</sup>H]-D-aspartato se midió 2, 4, 6, 9, 12 y 24 h post-tratamiento. Los datos mostrados son la media ± DE de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01.

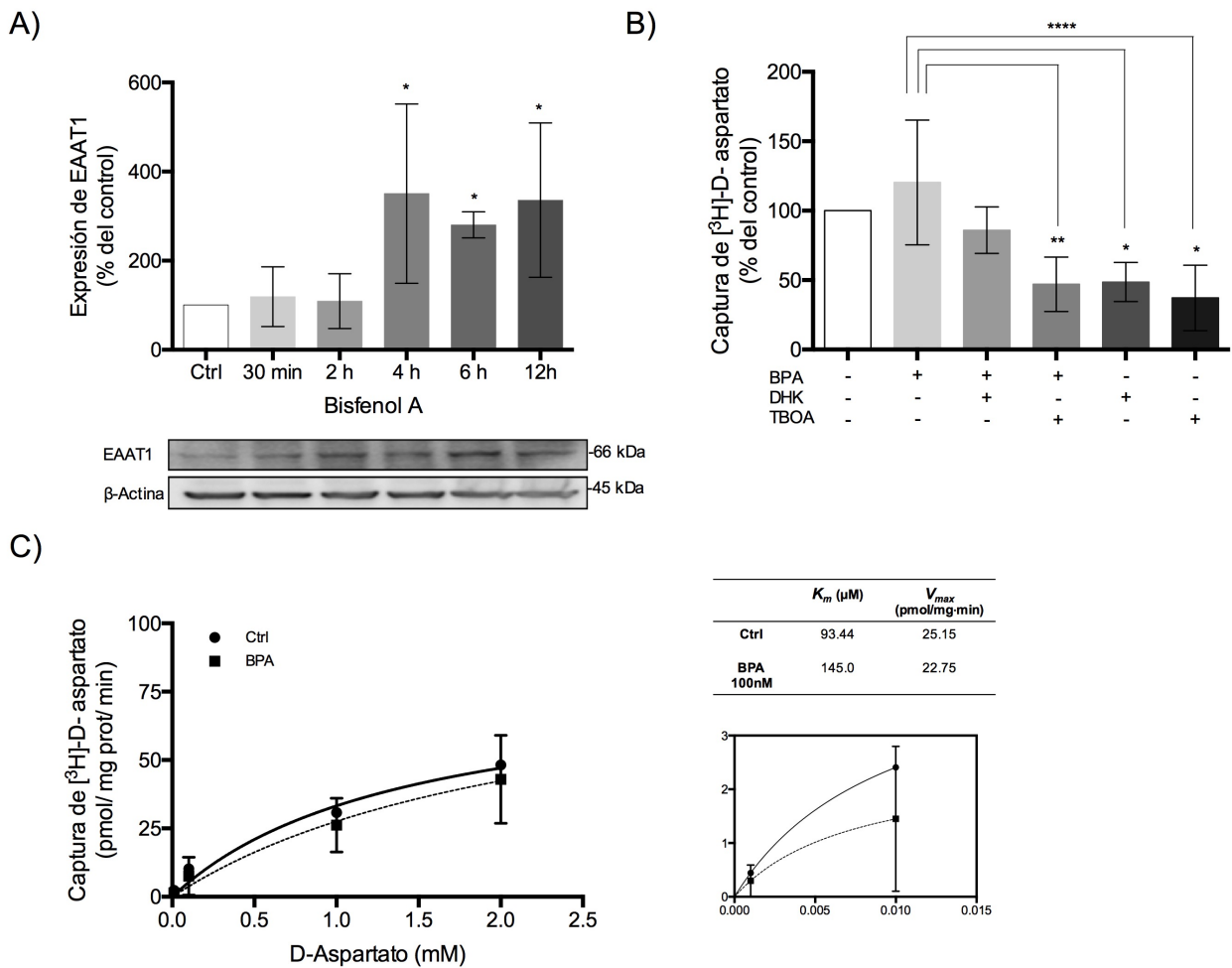
En un primer acercamiento los ensayos se dirigieron al evento de la reducción de la absorción de aspartato. Con este fin, las células cultivadas fueron expuestas a diferentes concentraciones de BPA durante 30 min y la actividad de captura fue medida 2h post-tratamiento. La reducción máxima de la captura estuvo presente después de una concentración de BPA 10 nM, lo que sugiere un efecto no monotónico (Figura 15, panel A). Esta reducción coincide con la disminución en los niveles de EAAT2 que se muestran en el panel B de la Figura 15. La reducción en el contenido del transportador es más pronunciada en función del tiempo. Como era de esperar, una reducción clara en el valor de  $V_{Max}$  estaba presente en las células tratadas con BPA (Figura 15, panel C). Es importante mencionar que también hay una disminución en la afinidad de los transportadores, señalando un efecto tanto en EAAT1 como en EAAT2 o un cambio conformacional mediado por BPA en estas proteínas.



**Figura 15.** La exposición aguda a BPA disminuye actividad de EAAT2 en las células HepG2. A) Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de BPA (1 nM-10  $\mu\text{M}$ ) durante 30 min. La captura de [ $^3\text{H}$ ] -D-aspartato se midió después de 6 min, 2h post-tratamiento. B) Efecto de la exposición aguda a BPA sobre la expresión de la proteína EAAT2 en células HepG2, 30 minutos, 2, 4, 6 y 12h post-tratamiento. Las células fueron tratadas con BPA (100nM) durante 30 min. Se utilizó anti-actina como control de carga. Se presenta una banda representativa en la parte inferior del gráfico. C) Isothermas de saturación para la captura de [ $^3\text{H}$ ] -D-aspartato en células HepG2 2 h después del tratamiento con BPA (100nM) durante 30 min. Los datos mostrados son la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Se utilizó una regresión no lineal robusta para ajustar un modelo a nuestros datos y estimar los parámetros cinéticos.

Posteriormente focalizamos los ensayos para explicar el aumento en la captura de aspartato dependiente del tiempo después de la exposición a BPA que se muestra en el panel B de la Figura 14. Estos resultados, junto con la fuerte disminución de la expresión proteica de EAAT2 (panel B, Figura 15), sugirieron que la recuperación de la actividad de captura después de 4h de BPA podría deberse a un aumento en la expresión de EAAT1. Por lo tanto, se determinaron los niveles de proteína de este transportador en función de la exposición a BPA. Los resultados se muestran en el panel A de la Figura 16. Se encontró un aumento sostenido en la inmunoreactividad de EAAT1. Para encontrar una

correlación funcional de estas observaciones, se determinó la actividad de captura de  $[^3\text{H}]$ -D-aspartato 6h después de que las células se expusieron durante 30 min a 100 nm de BPA. Se detectó un ligero aumento en la captura, sin embargo, este aumento fue bloqueado por DHK, lo que demuestra que el aumento en los niveles de proteína EAAT1 no resulta en transportadores funcionales EAAT1 en la membrana plasmática (Figura 16, paneles B y C). De acuerdo con esta interpretación, no se registraron cambios significativos en los parámetros cinéticos de absorción (Figura 16, panel C).



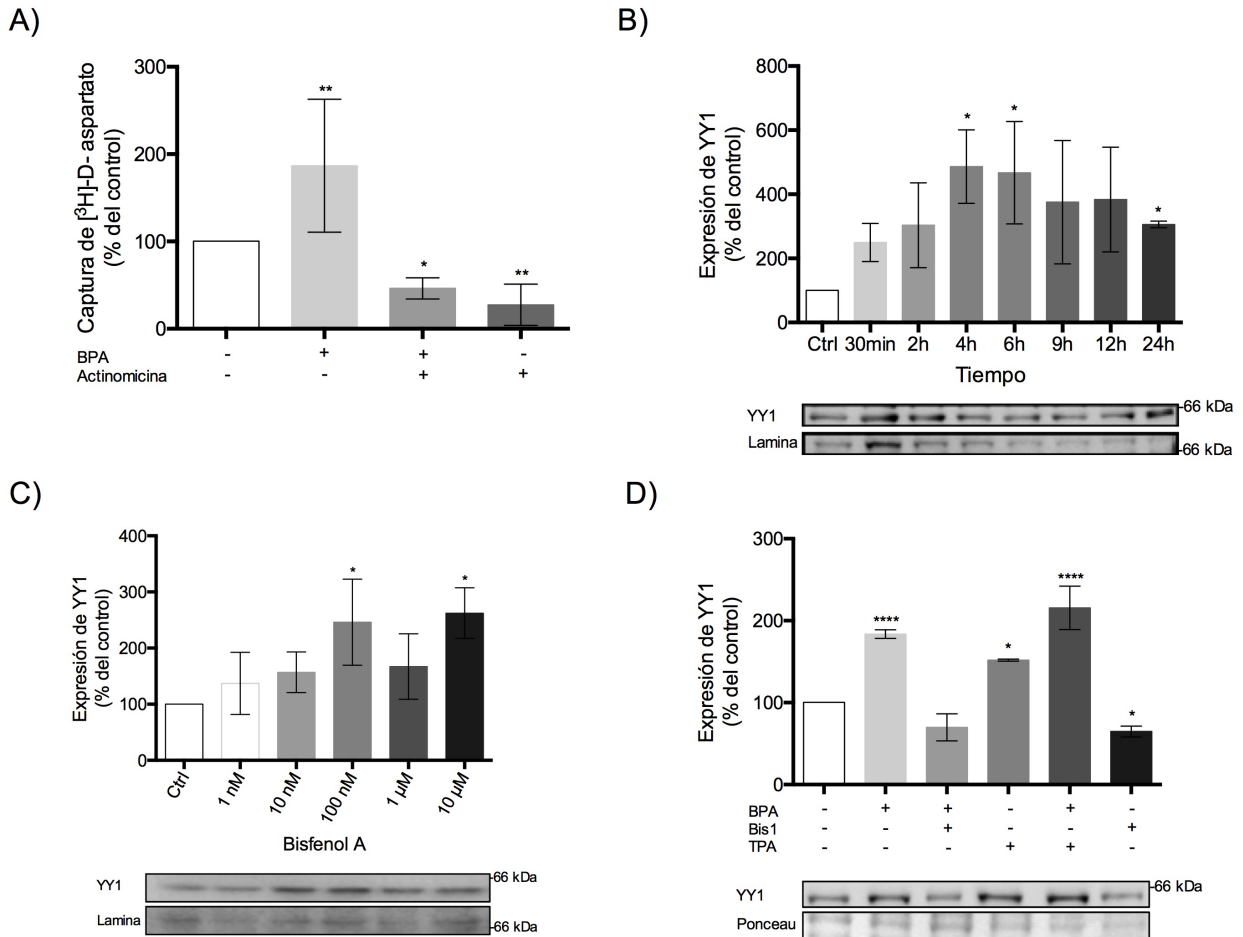
**Figura 16.** La exposición aguda a BPA aumenta la expresión de EAAT1 en la línea celular HepG2. A) Efecto de la exposición aguda a BPA sobre la expresión de la proteína EAAT1 en células HepG2 30 min., 2, 4, 6 y 12h post-tratamiento. Las células fueron tratadas con BPA (100 nM) durante 30 min. Se utilizó anti-actina como control de carga. Se presenta una banda representativa en la parte inferior del gráfico. B) Las células se trataron con BPA 100 nM durante 30 minutos; el bloqueador de EAAT2, DHK 100  $\mu\text{M}$  o el bloqueador de EAATs, TBOA, 100  $\mu\text{M}$ , se colocaron 30 minutos antes. La captura de  $[^3\text{H}]$ -D-aspartato se midió después de 6 min, 6h post-tratamiento. C) Isotermas de saturación para captura de  $[^3\text{H}]$ -D-aspartato en células HepG2 6h después del tratamiento con BPA (100 nM) durante 30 min. Los datos representan la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett o

Tukey. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Se utilizó una regresión no lineal robusta para ajustar un modelo a nuestros datos y estimar los parámetros cinéticos.

#### **6.4 Regulación transcripcional en células HepG2 después de la exposición a BPA**

Estudios previos de nuestro grupo y de algunos otros, destacan la participación del factor de transcripción YY1 como un regulador crítico en la expresión y actividad de EAAT1 y EAAT2 [25, 40]. La sobreexpresión de YY1 también puede correlacionarse con la presencia de ciertas patologías hepáticas, surgiendo que el sistema metabólico en el que participa el Glu podría modificarse como una respuesta directa o indirecta a la lesión hepática. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la exposición a BPA afecta la actividad de los transportadores EAAT2 y EAAT1 a largo plazo por lo tanto se dirigieron los ensayos a responder si el efecto del BPA ocurre a nivel transcripcional. Para esto, las células se pre-trataron con BPA 100nM, 10  $\mu\text{g/mL}$  de actinomicina D o ambas. Como se representa en el panel A de la Figura 17, el efecto del BPA se modifica con el tratamiento con actinomicina D. Estos resultados demuestran que el efecto de la exposición aguda a BPA es una baja regulación de la transcripción de los transportadores. Estos resultados llevaron a la evaluación de la expresión de YY1 en células HepG2 expuestas a BPA 100 nM durante diferentes períodos. Un aumento dependiente del tiempo en los niveles de proteína de YY1 estuvo presente después de 30 min, 2, 4, 9, 12, 24h post-tratamiento con BPA (Figura 17, panel B). Es importante mencionar que la exposición a BPA induce una respuesta hormética en los niveles de proteína YY1 (Figura 17, panel C). Teniendo en cuenta que YY1 puede actuar como un activador o represor transcripcional y que la activación de PKC es esencial para la cascada de transducción de señales de unión de YY1 al ADN que regula la transcripción EAAT1, las células fueron pre-tratadas con el inhibidor de PKC, Bis1. En este escenario, BPA ya no aumenta los niveles de proteína YY1. Como se esperaba, un activador de PKC, como el TPA, imita el efecto BPA. Interesantemente, los efectos de BPA y TPA no mostraron diferencias estadísticamente significativas, lo que sugiere que la sobreexpresión de YY1 después de la exposición a BPA está mediada por PKC (Figura 17, panel D).



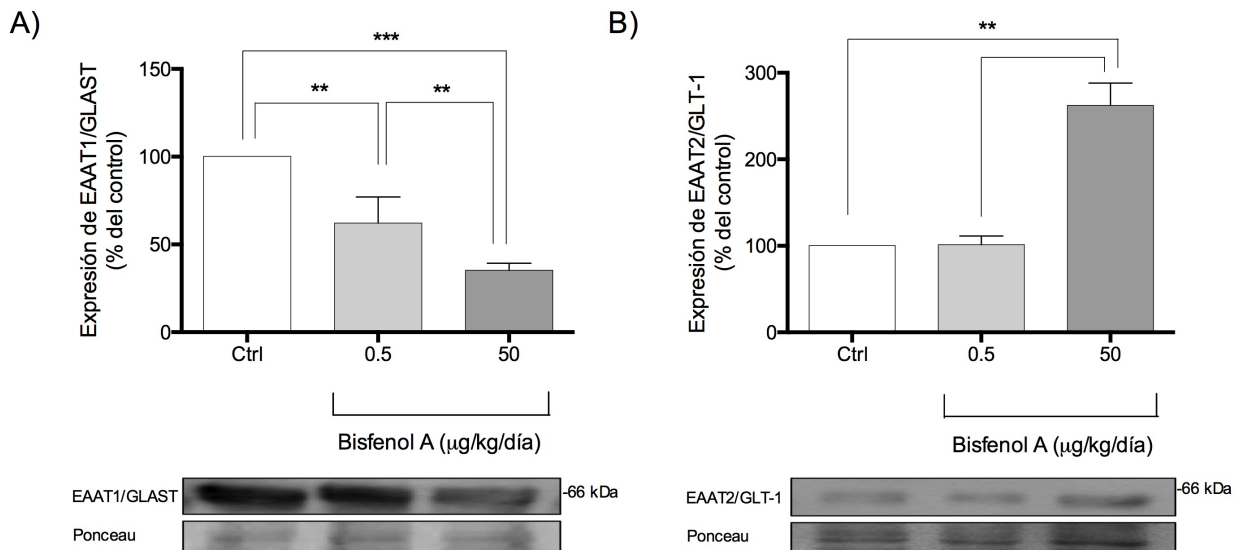


**Figura 17.** BPA regula los transportadores de glutamato a nivel transcripcional. A) Las células HepG2 se trataron con BPA 100 nM y/o actinomicina 10 µg/mL. La captura de  $^3\text{H}$ -D-aspartato se midió 24 h después del tratamiento. B) Expresión nuclear de YY1 en células HepG2 30 min, 2, 4 o 6h post-tratamiento. Las células se trataron con BPA 100nM durante 30 minutos. C) Expresión nuclear de YY1 6 h después del tratamiento. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de BPA (1 nM-10 µM) durante 30 minutos y los niveles nucleares de YY1 fueron medidos como en el panel anterior. D) Expresión nuclear YY1 6h después del tratamiento con BPA (100 nM) durante 30 min. El bloqueador de PKC, Bis I, 100µM o el activador de PKC, TPA, 100 µM se colocaron 30 min antes. Se usó anti-lamina como control de carga. Se presenta una banda representativa en la parte inferior del gráfico. Los datos mostrados corresponden a la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. \* p <0.05, \*\* p <0.01. Bis 1: bisindolylmaleimide I, TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetato.

### 6.5 Efecto del BPA en los transportadores de glutamato en un modelo animal de exposición sub-crónica

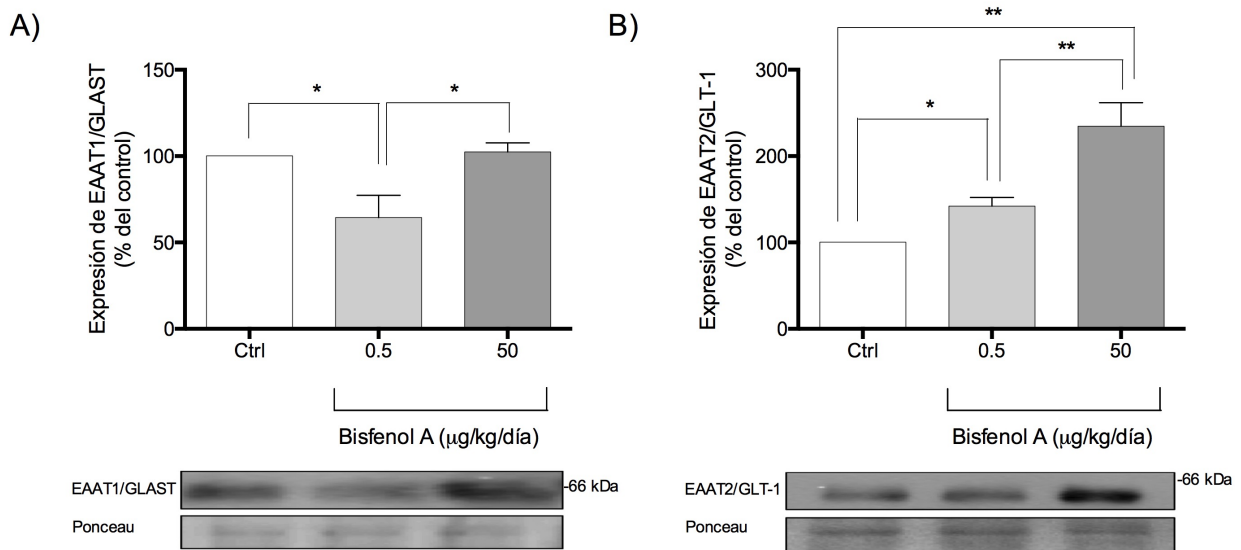
Los resultados de la exposición aguda a BPA en la línea celular HepG2 demostraron que este compuesto altera la actividad y expresión de los transportadores de glutamato, además, modifica la expresión de una proteína clave en la regulación transcripcional de estos. Teniendo en consideración lo anterior, se realizaron ensayos para determinar si un efecto era observable en animales expuestos sub-crónicamente a BPA. Después de

cuatro semanas de exposición a BPA, a dosis de 0.5 o 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ , ninguno de los principales transportadores de aminoácidos excitadores, GLAST/EAAT1 o GLT-1/EAAT2 fueron detectados en tejido hepático. Sin embargo, es importante mencionar que la ausencia de GLAST/EAAT1 en hígado de roedores ya había sido reportada anteriormente. Los transportadores de Glu se localizan principalmente en SNC, los antecedentes señalan que el BPA es capaz de provocar alteraciones neurológicas, en las cuales la homeostasis o desregulación del glutamato tiene un papel importante. En este contexto la siguiente pregunta planteada fue: ¿la alteración en la expresión de los transportadores de glutamato observada en células hepáticas *in vitro* ocurriría también a nivel de SNC?. Para esto evaluamos la expresión de EAAT1/GLAST y EAAT2/Glt-1 en tejido cerebral y cerebelar después de la exposición crónica a una dosis baja y alta de BPA. La expresión proteica de EAAT1/GLAST exhibió una regulación a la baja dependiente de la dosis en comparación con el control en cerebelo, mostrando una reducción del 20% y 50% con la dosis baja y alta, respectivamente (Figura 18, panel A). Curiosamente, la expresión de EAAT2/GLT-1 se reguló inversamente después de la exposición con la dosis alta de BPA, indicando un aumento tres veces mayor respecto al control (Figura 18, panel B).



**Figura 18.** Efecto de la exposición subcrónica a BPA sobre la expresión de los transportadores de glutamato en el cerebelo de ratones hembra adultas. A) GLAST, tamaño de banda previsto: 60 kDa; B) Glt-1, tamaño de banda previsto: 67 kDa. Los datos mostrados corresponden a la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Los resultados obtenidos a partir de tejido cerebral mostraron que EAAT1/GLAST solo fue regulado negativamente después de la exposición con la dosis baja de BPA, mostrando ~ 25% menos de su expresión proteica en comparación con el control y con el tratamiento con la dosis más alta. Sin embargo, la expresión de EAAT2/Glt-1 al igual como ocurrió en cerebelo fue regulada al alza, mostrando un aumentó dependiente de la dosis (Figura 19, paneles A y B).



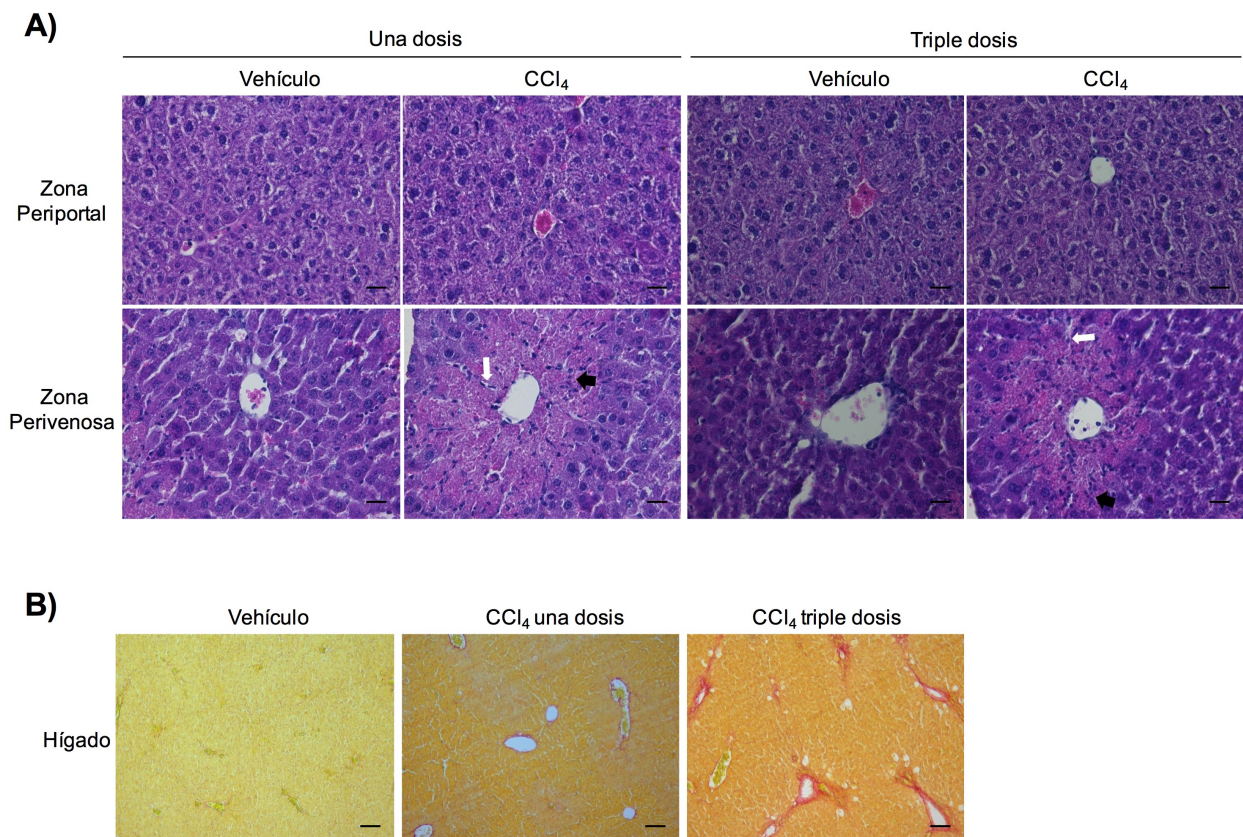
**Figura 19.** Efecto de la exposición subcrónica a BPA sobre la expresión de los transportadores de glutamato en cerebro de ratones hembras adultas. A) GLAST, tamaño de banda previsto: 60 kDa; B) Glt-1, tamaño de banda previsto: 67 kDa. Los datos mostrados corresponden a la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

## 6.6 Evaluación de la expresión de los transportadores de aminoácidos excitadores en la hepatotoxicidad aguda inducida por CCl<sub>4</sub>

### 6.6.1 Validación de daño agudo en hígado por CCl<sub>4</sub>

Debido a los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* de exposición crónica con BPA, la expresión de los transportadores de glutamato fue evaluada en un modelo probado de daño hepático, mediante la administración de CCl<sub>4</sub>. El CCl<sub>4</sub> es un químico tóxico ampliamente utilizado para producir lesión hepática en modelos animales e imitar la hepatotoxicidad humana. Los niveles de efectos adversos no observables (NOAEL) calculados en un modelo de ratón después de la exposición a CCl<sub>4</sub> en aceite de maíz es

de 1.2 mg/kg de peso corporal (5 días/semana) (OMS, 1997). En el presente estudio, los animales fueron expuestos a dosis únicas o triples de 5 mg/kg CCl<sub>4</sub> de peso corporal. Primero, determinamos la lesión hepatocelular después de la exposición aguda a CCl<sub>4</sub>. Los resultados de la tinción con hematoxilina-eosina mostraron una arquitectura hepática normal en el grupo de tratado con el vehículo, sin embargo, 24h después de una dosis única de CCl<sub>4</sub> se observó degeneración de hepatocitos en la zona centrilobular, con presencia de necrosis y focos inflamatorios, compuestos predominantemente por linfocitos (Figura 20, panel A). Después de tres dosis de CCl<sub>4</sub>, la lesión alrededor de la zona perivenosa incluyendo necrosis y focos inflamatorios se mantuvo (Figura 20, panel A). Depósito de colágeno fue detectado alrededor de hepatocitos perivenosos después de las dosis triples de CCl<sub>4</sub> (Figura 20, panel B).

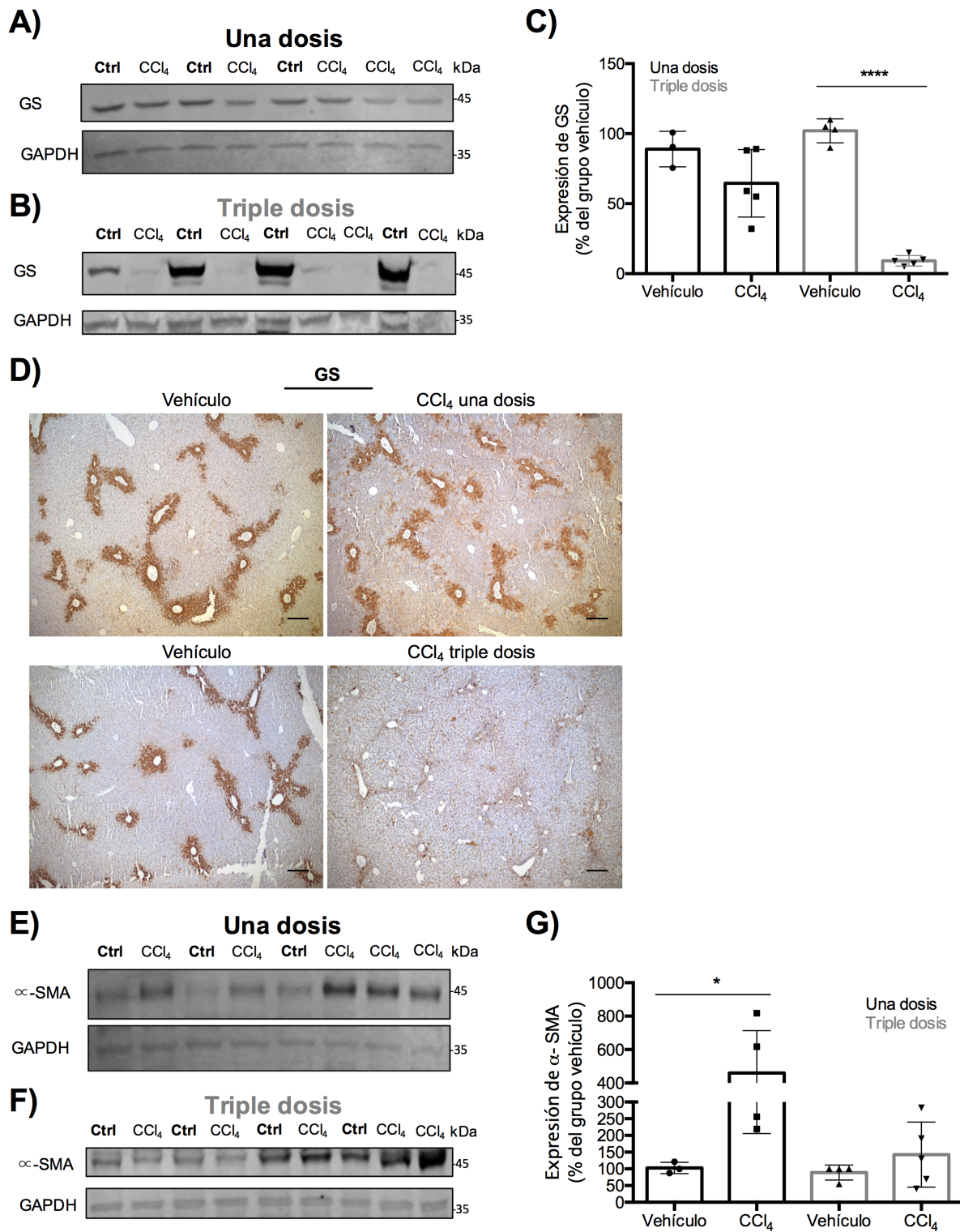


**Figura 20.** Validación de la lesión hepatocelular después de la exposición aguda a CCl<sub>4</sub>. A) Tinción con hematoxilina-eosina en áreas periportales y perivenosas de cortes de hígado de ratones tratados con el vehículo, una dosis o tres dosis de CCl<sub>4</sub> (barra 50 µm). El corte de hígado de ratón tratado con el vehículo muestra arquitectura normal de hepatocitos. Sección de hígado de ratón tratado con una dosis de CCl<sub>4</sub> muestra necrosis en el área centrolobulillar (flecha negra). Tenga en cuenta los focos inflamatorios discretos, compuestos predominantemente por linfocitos (flecha blanca corta). Sección del hígado del ratón tratado con dosis triples de CCl<sub>4</sub>, los hepatocitos están casi intactos, pero la infiltración celular y los focos inflamatorios están presentes alrededor del área centrolobular (flecha negra), observe la aparición de congestión (flecha blanca corta). B) Tinción Picro Sirius Red en tejido hepático de ratones tratados con el

vehículo, una dosis o tres dosis de CCl<sub>4</sub>. Sección de hígado del ratón de control tratado con el vehículo muestra una estructura lobular normal. Sección de hígado del ratón tratado con una dosis única de CCl<sub>4</sub> muestra una ligera deposición de colágeno alrededor del área centrilobular. Sección hepática del ratón tratado con dosis triples de CCl<sub>4</sub> muestra un depósito excesivo de colágeno alrededor del área centrilobular. Imagen representativa de 3–5 animales por grupo.

El tratamiento con CCl<sub>4</sub> promueve la necrosis hepática, principalmente en la zona perivenosa [151–153]. Para validar el efecto de la exposición a CCl<sub>4</sub> en nuestro modelo, determinamos la expresión de GS por inmunohistoquímica. La expresión de GS mostró una tendencia a disminuir ( $65 \pm 23.87\%$ ) (Figura 21, panel A, C y D) en los hígados tratados con una dosis única de CCl<sub>4</sub>, en comparación con los ratones tratados con el vehículo ( $100 \pm 10.06\%$ ). Curiosamente, la expresión proteica de GS fue abolida en un 90% después de las dosis triples de CCl<sub>4</sub> ( $p < 0.0001$ ) (Figura 21, paneles B, C y D). La expresión de  $\alpha$ -actina de musculo liso ( $\alpha$ -SMA), una proteína expresada después de la transdiferenciación de células estrelladas hepáticas (HSC) a miofibroblastos [232] se reguló significativamente después de una dosis de CCl<sub>4</sub> (Figura 21, paneles E y G), con un aumento cuatro veces mayor en los niveles de proteína ( $287 \pm 88.83\%$ ;  $p = 0.034$ ).



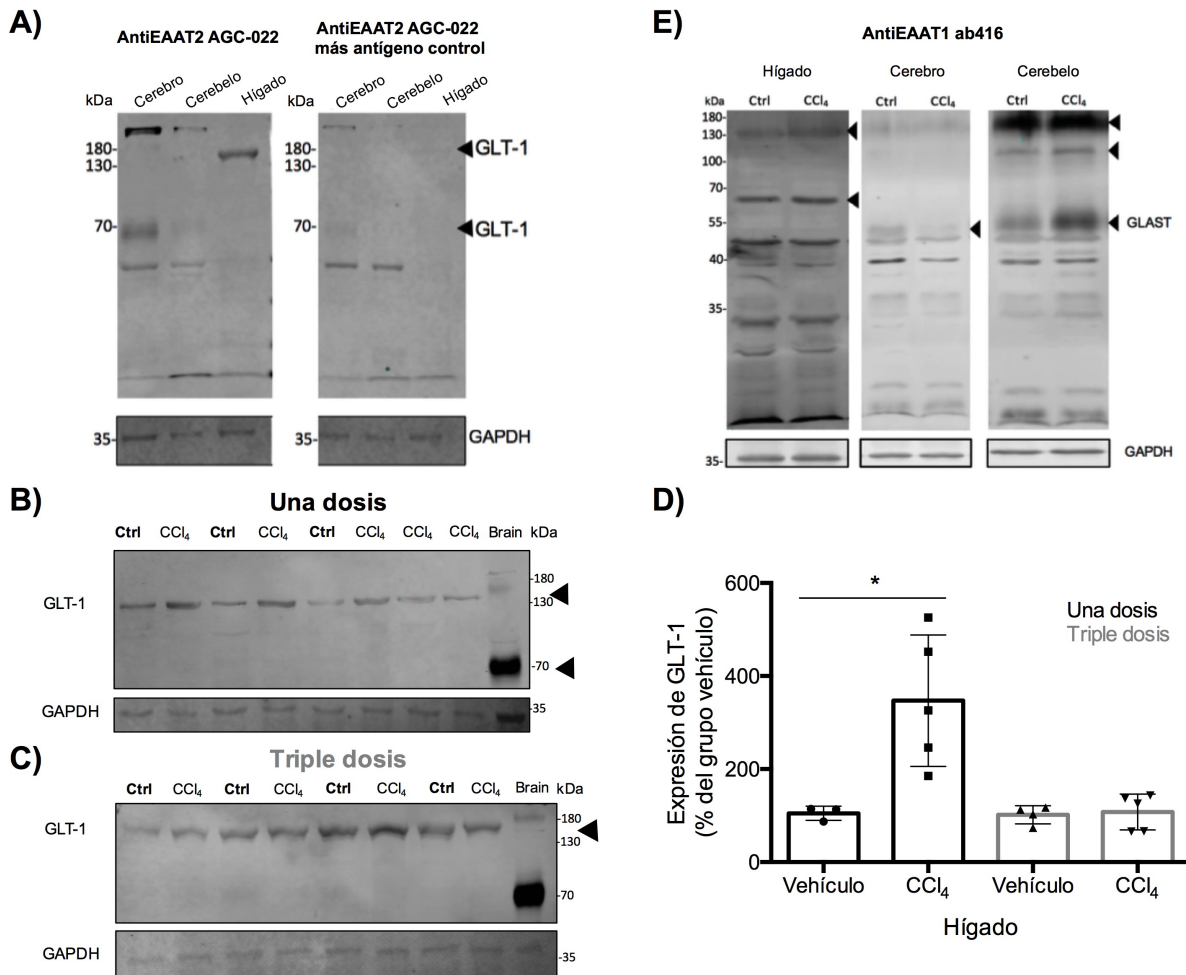


**Figura 21.** Expresión proteica de Glutamina sintetasa y  $\alpha$ -actina de músculo liso en tejido hepático después de una dosis única y tres dosis de CCl<sub>4</sub>. A) Inmunorreactividad para GS en el grupo de ratones tratados con una dosis de CCl<sub>4</sub>. B) Inmunorreactividad para GS en el grupo de ratones tratados con dosis triples de CCl<sub>4</sub>. C) Se cuantificó la expresión proteica de GS (a y b). D) La inmunohistoquímica se realizó usando un anticuerpo contra GS. Imágenes representativas de tejido hepático (barra 50  $\mu$ m). E) Inmunorreactividad para  $\alpha$ -SMA en el grupo de ratones tratados con una dosis de CCl<sub>4</sub>. F) Inmunorreactividad para  $\alpha$ -SMA en el grupo de ratones tratados con dosis triples de CCl<sub>4</sub>. G) Se cuantificó la expresión de la proteína  $\alpha$ -SMA.

Se usó anti-GAPDH como control de carga. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DE de 3–5 animales por grupo. Los valores significativamente diferentes de los ratones tratados con el vehículo (Ctrl) se indican mediante asteriscos. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### **6.6.2 El transporte de glutamato se altera en el tejido hepático después de una lesión aguda**

Después de la validación del modelo de estudio, dirigimos los siguientes ensayos para determinar la expresión de los transportadores de glutamato en la hepatotoxicidad aguda. Anteriormente se ha informado la expresión de EAAT2/GLT-1 en tejido hepático de ratas y ratones [15, 16], además, nuestros hallazgos en experimentos *in vitro* demostraron la expresión de EAAT1/GLAST en la línea celular de hepatoblastoma humano, HepG2 [233]. En este estudio, validamos también con un enfoque inmunoquímico la expresión de los dos principales transportadores de Glu (EAAT2/GLT-1 y EAAT1/GLAST) en tejido hepático de ratón. Cuando la fracción membranal de cerebro, tejido cerebelar e hígado se separaron por electroforesis y se desarrolló la inmunodetección en fase sólida, se detectaron varias bandas de distinto peso molecular ( $\sim 70, 150, 190$  kDa) para EAAT2/GLT-1 en cerebro y cerebelo, mientras que solo se detectó una banda correspondiente a EAAT2/GLT-1 a  $\sim 150$  kDa en el tejido hepático. Esto fue confirmando cuando la transferencia de los extractos proteicos se pre-incubó con el péptido control (Figura 22, panel A). Este resultado indica que las distintas bandas de mayor masa molecular podrían corresponder a fracciones monoméricas y multiméricas del transportador. Estudios anteriores han indicado que tanto EAAT2/GLT-1 y EAAT1/GLAST existen como homomultímeros [234]. El nivel de proteína de EAAT2/GLT-1 se incrementó significativamente 24h después de una dosis única de  $\text{CCl}_4$  ( $434 \pm 100.89\%$ ;  $p = 0.017$ ) en comparación con los ratones tratados con el vehículo ( $104 \pm 10.40\%$ ) (Figura 22, paneles B y D). Curiosamente, este efecto se perdió en el grupo de ratones tratados con dosis triples de  $\text{CCl}_4$ , en donde se muestra el porcentaje de expresión de proteínas similar al del grupo de ratones tratados con el vehículo (Figura 22, paneles C y D). No obstante, la inmunorreactividad para EAAT1/GLAST no fue detectada en el hígado (Figura 22, panel E).



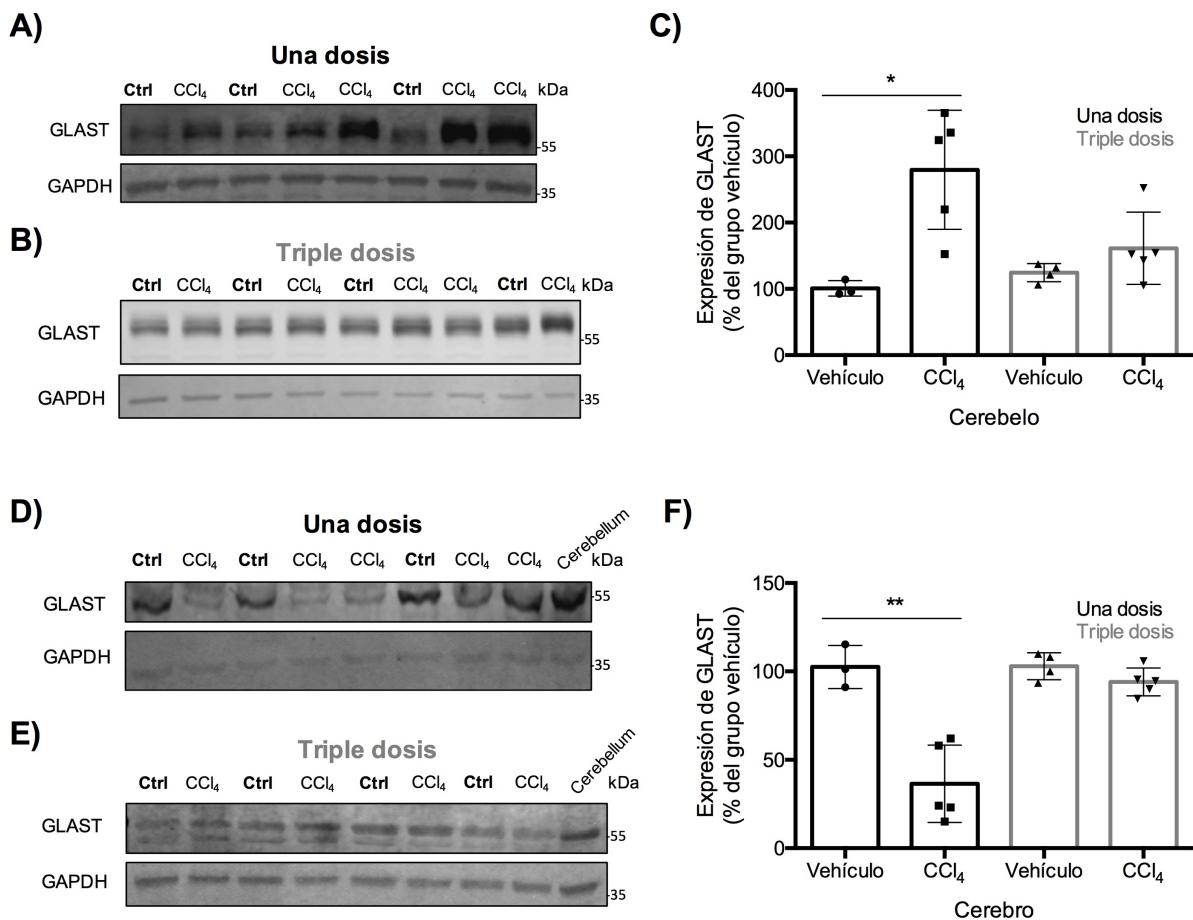
**Figura 22.** Los niveles de proteína de EAAT2/GLT-1 se regulan en el hígado después de una dosis única de CCl<sub>4</sub>. A) Validación de la expresión de la proteína GLT-1 en tejido hepático. La inmunotransferencia se realizó usando anti-EAAT2 y el antígeno control proporcionado por Alomone. Se utilizó tejido cerebral y cerebelo de ratones como control positivo para detectar GLT-1. B) Inmunoreactividad para GLT-1 en hígado del grupo de ratones tratados con una dosis de CCl<sub>4</sub>. C) Inmunoreactividad para GLT-1 en el hígado del grupo de ratones tratados con dosis triples de CCl<sub>4</sub>. D) Se cuantificó la expresión de la proteína GLT-1 en tejido hepático (B y C). Se usó tejido cerebral de ratones como control positivo. E) Validación de la expresión proteica de EAAT1/GLAST en tejido hepático. La inmunotransferencia se realizó usando AntiEAAT1 proporcionado por Abcam. Se utilizaron tejido cerebral y cerebelo de ratones como control positivo. Se usó anti-GAPDH como control de carga. Los valores corresponden a la media ± DE de 3–5 animales por grupo. Los valores significativamente diferentes de los ratones tratados con el vehículo (Ctrl) se indican mediante asteriscos. \* p < 0,05.

### 6.6.3 La expresión de los transportadores de glutamato en el SNC se altera después de la hepatotoxicidad aguda

Posteriormente decidimos estudiar si la expresión de los transportadores de Glu había sido alterada en cerebro y cerebelo tras la exposición a CCl<sub>4</sub>, en el contexto de la relación documentada entre el SN y el hígado en el daño hepático. El Glu como el principal neurotransmisor excitador tiene un papel importante en la transmisión sináptica [235] y se ha demostrado un déficit en su transporte en la encefalopatía hepática [220, 236, 237].



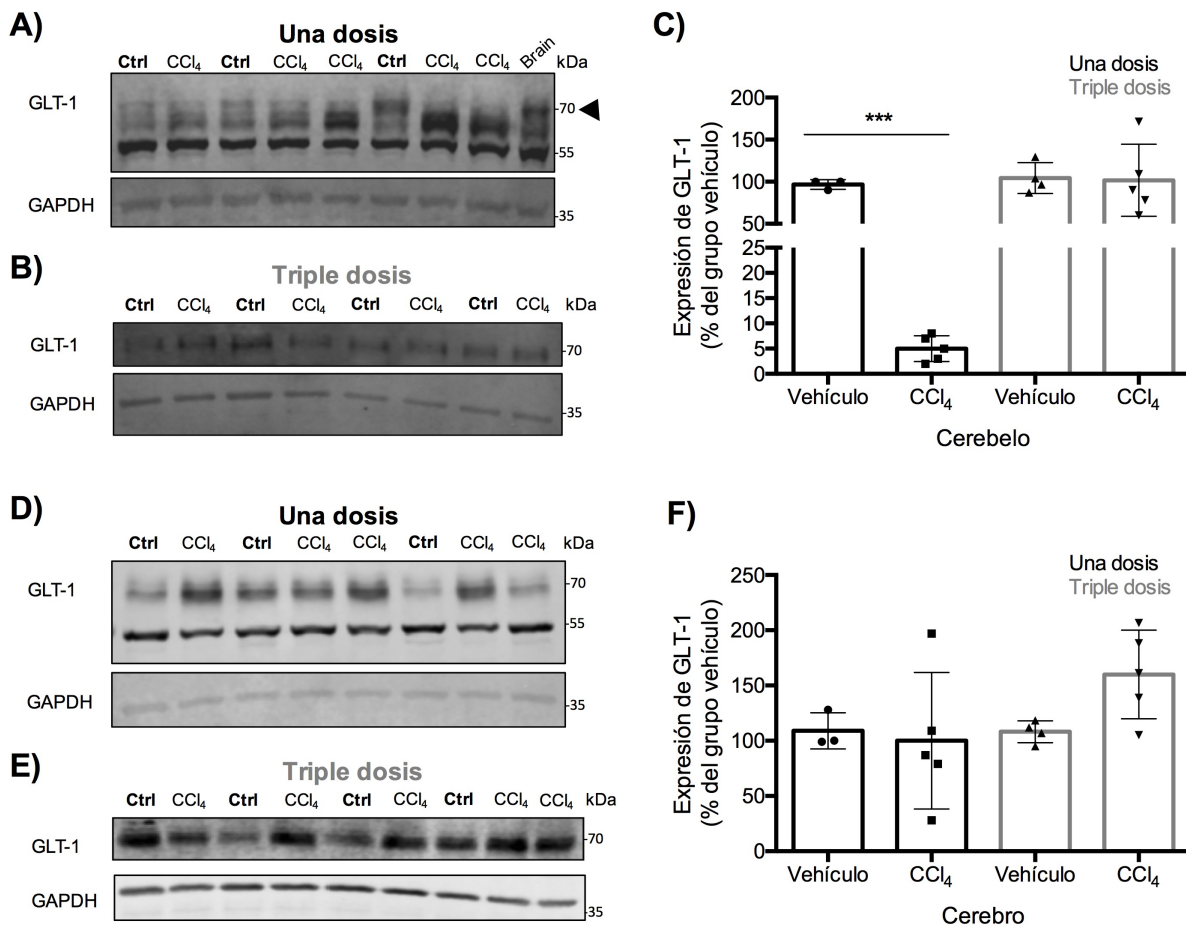
Para evaluar si este evento ocurre en las primeras etapas de la lesión hepática, se determinó la expresión de EAAT1/GLAST y EAAT2/GLT-1, los principales transportadores de Glu expresados en las células gliales. El transportador EAAT1/GLAST mostró una regulación diferencial dependiente de la región, en cerebelo o cerebro después de una dosis única de CCl<sub>4</sub>: los niveles de proteína de EAAT1/GLAST aumentaron en cerebelo ( $270 \pm 102.73\%$ ;  $p = 0.010$ ) (Figura 23, paneles A y C), mientras que se observó una expresión significativamente disminuida en el cerebro (Figura 23, paneles D y F), detectándose un 79% de reducción en los niveles de proteína ( $p = 0.001$ ). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de EAAT1/GLAST ni en cerebro y cerebelo después del tratamiento triple con CCl<sub>4</sub> (Figura 23, paneles B, C, E y F).



**Figura 23.** El patrón de expresión proteica de EAAT1/GLAST se altera en cerebelo y cerebro después de una dosis única de CCl<sub>4</sub>. A) Inmunoreactividad para GLAST en cerebelo del grupo de ratones tratados con una dosis de CCl<sub>4</sub>. B) Inmunoreactividad para GLAST en cerebelo del grupo de ratones tratados con dosis triples de CCl<sub>4</sub>. C) Se cuantificó la expresión de la proteína GLAST en tejido del cerebelo (A y B). Inmunoreactividad para GLAST en cerebro del grupo de ratones tratados con dosis única (D) o triple de de CCl<sub>4</sub> (E). F) Se cuantificó la expresión de la proteína GLAST del tejido cerebral (D y E). Se usó anti-GAPDH como control de carga. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DE de 3–5 animales por grupo. Se

usó tejido de cerebelo de ratón como control positivo para detectar la expresión de GLAST. Los valores significativamente diferentes de los ratones tratados con vehículo (ctrl) se indican mediante asteriscos. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

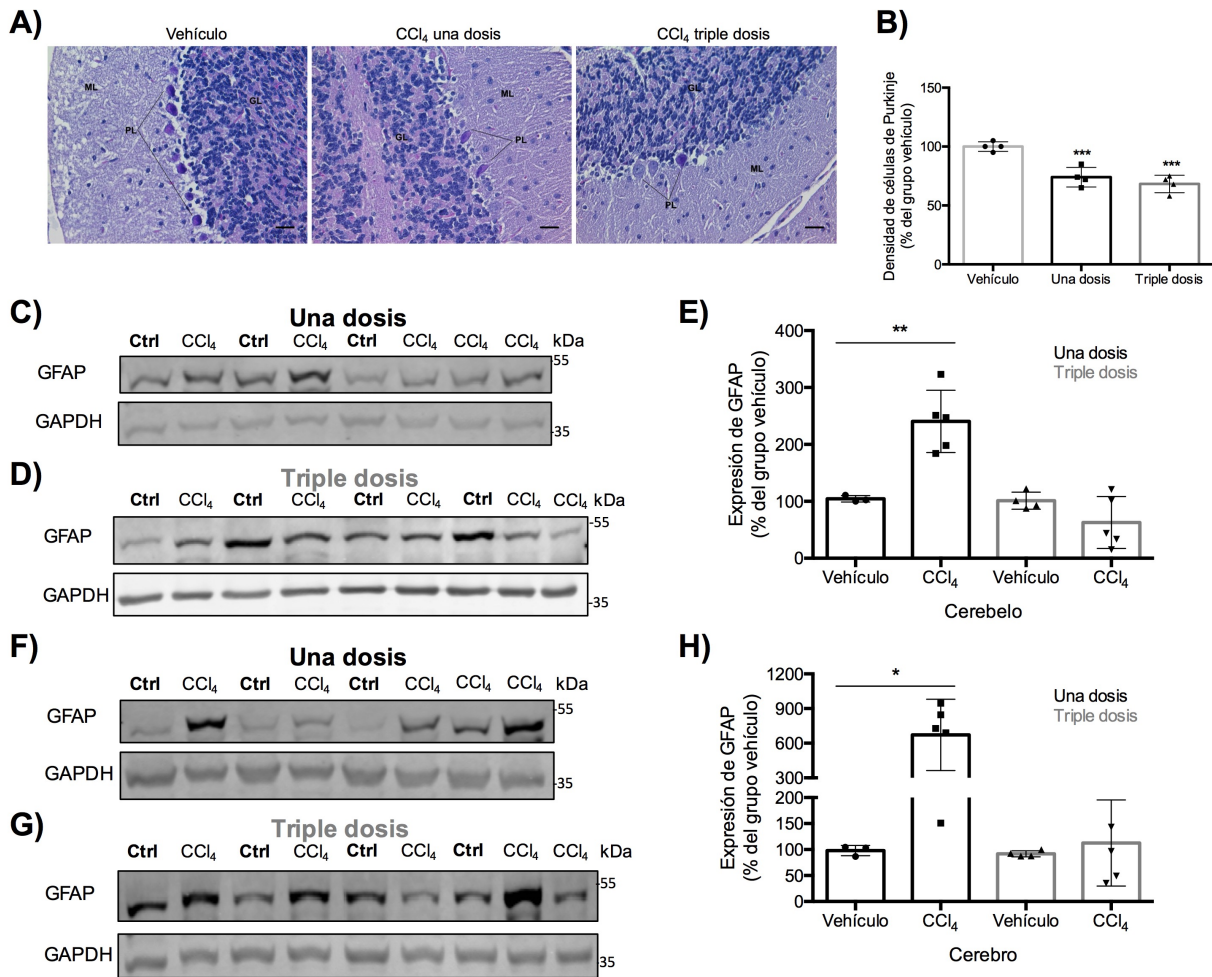
La expresión de la proteína EAAT2/GLT-1 se reguló negativamente en el cerebelo de ratones tratados con una dosis única de  $\text{CCl}_4$  (Figura 24, paneles A y C), mostrando una reducción del 94% ( $p = 0,0004$ ), mientras que no se observó ningún efecto después de la triple dosis de  $\text{CCl}_4$  (Figura 24, paneles B y C). Una vez más, no se detectaron cambios en la expresión de EAAT2/GLT-1 en cerebro, entre los ratones tratados con el vehículo y los tratados con triple dosis de  $\text{CCl}_4$  (Figura 24, paneles E y F).



**Figura 24.** La expresión proteica de EAAT2/GLT-1 se regula negativamente en el cerebelo después de una dosis de  $\text{CCl}_4$ . A) Inmunorreactividad para GLT-1 en cerebelo del grupo de ratones tratados con una dosis de  $\text{CCl}_4$ . B) Inmunorreactividad para GLT-1 en cerebelo del grupo de ratones tratados con dosis triples de  $\text{CCl}_4$ . C) Se cuantificó la expresión de la proteína GLT-1 del tejido cerebelar (A y B). Inmunorreactividad para GLT-1 en el cerebro del grupo de ratones tratados con una dosis (D) o triple dosis de  $\text{CCl}_4$  (E). F) Se cuantificó la expresión de la proteína GLT-1 a partir del tejido cerebral (D y E). Se usó anti-GAPDH como control de carga. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DE de 3–5 animales por grupo. Se usó tejido de cerebro de ratón como control positivo para detectar la expresión de GLT-1. Los valores significativamente diferentes de los ratones tratados con el vehículo (Ctrl) se indican mediante asteriscos. \*\*\*  $p < 0,0005$ .

#### **6.6.4 Pérdida neuronal y activación glial después de la toxicidad hepática aguda por CCl<sub>4</sub>**

La tinción con hematoxilina-eosina mostró una pérdida neuronal en la capa de Purkinje en el cerebelo de ratones tratados con CCl<sub>4</sub>. El número de neuronas de Purkinje se redujo un 26% ( $74 \pm 8,02\%$ ) y un 32% ( $68 \pm 7,41\%$ ) después de una dosis única y la dosis triple de CCl<sub>4</sub>, respectivamente, en comparación con los ratones tratados con el vehículo ( $100 \pm 4,08\%$ ) ( $p = 0.0002$ ) (Figura 25, panel A y B). Se ha demostrado previamente que las alteraciones en el SNC después del daño hepático están estrechamente relacionadas con la activación astrocítica [222]. Por lo tanto, la activación glial se evaluó en el cerebro y cerebelo después de la exposición a CCl<sub>4</sub>. La inmunodetección se realizó usando el marcador astrogial GFAP. Los ratones tratados con CCl<sub>4</sub> tuvieron un aumento significativo en la expresión de la proteína GFAP tanto en el cerebelo ( $209 \pm 33.08\%$ ;  $p = 0.0048$ ) (Figura 25, paneles C y E) como en el cerebro ( $575 \pm 301.90$ ;  $p = 0.014$ ) (Figura 25, paneles F y H) en comparación con los ratones tratados con el vehículo, lo cual indica astrogliosis después de una dosis única de CCl<sub>4</sub>. En contraste, no se detectaron cambios significativos en los niveles de proteína GFAP después de dosis triples de CCl<sub>4</sub>, ni en cerebelo ni cerebro (Figura 25, paneles D, E, G y H).

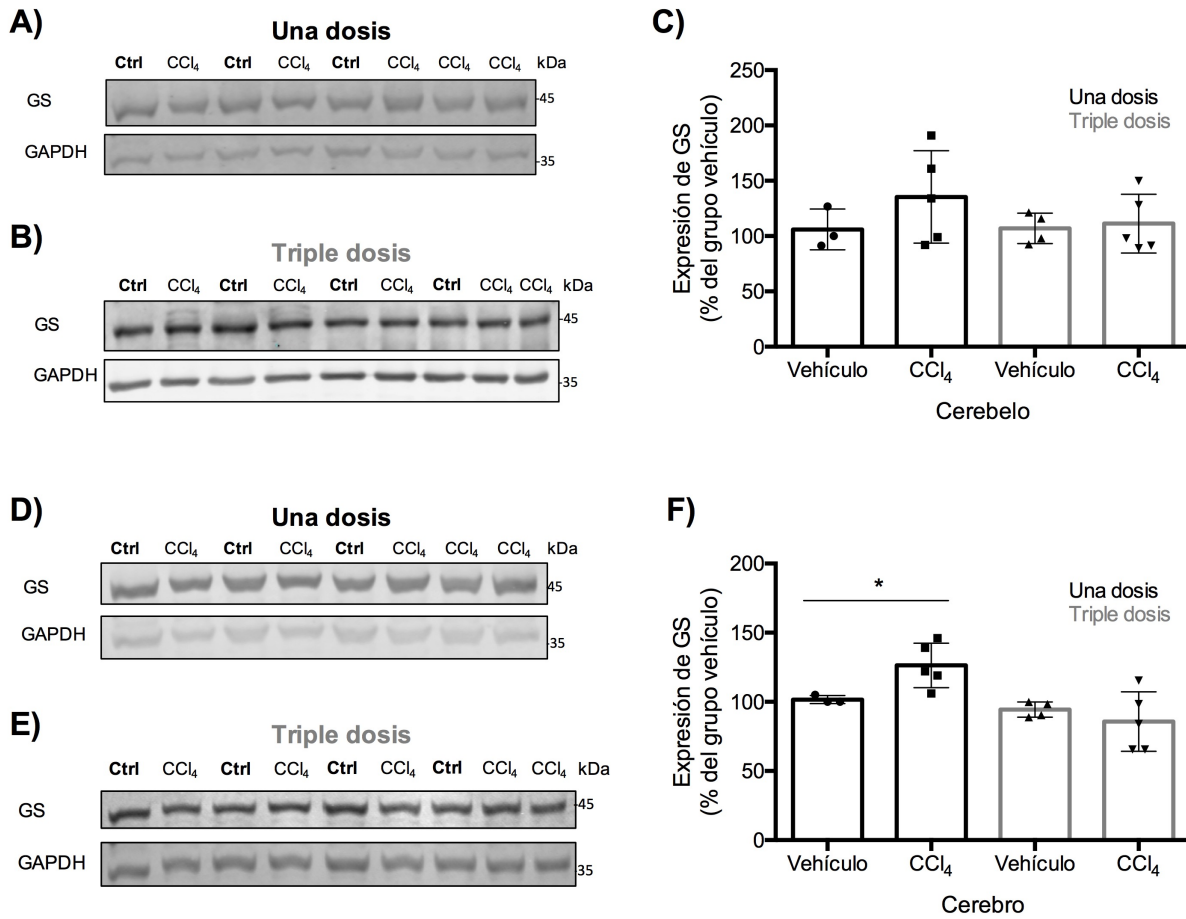


**Figura 25.** Los ratones con hepatotoxicidad aguda muestran pérdida celular en la capa de Purkinje y activación glial en cerebelo y cerebro. A) Imágenes representativas (barra 50  $\mu$ m) de la capa de Purkinje. B) Se cuantificó la densidad de las neuronas de Purkinje. Inmunorreactividad para GFAP en cerebelo del grupo de ratones tratados con una dosis (C) o triple dosis de CCl<sub>4</sub> (D). E) Se cuantificó la expresión de la proteína GFAP del tejido del cerebelo (C y D). Inmunorreactividad para GFAP en el cerebro del grupo de ratones tratados con una dosis (F) o triple dosis de CCl<sub>4</sub> (G). H) Se cuantificó la expresión de la proteína GFAP en tejido cerebral (F y G). Se usó anti-GAPDH como control de carga. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DE de 3–5 animales por grupo. Los valores significativamente diferentes de los ratones tratados con el vehículo (Ctrl) se indican mediante asteriscos. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,0005. PL= Capa de Purkinje; ML= Capa molecular; GL= Capa granular.

### 6.6.5 La expresión de glutamina sintetasa se modifica en el SNC después de una dosis única de CCl<sub>4</sub>

El análisis de la expresión de GS no muestra cambios en los niveles de proteína en cerebelos de ratones después de los dos tratamientos diferentes con CCl<sub>4</sub> en comparación con los ratones tratados con el vehículo (Figura 26, paneles A, B y C). Sin embargo, los niveles de proteína de GS mostraron un ligero aumento en el tejido cerebral en el grupo de ratones tratados con una dosis única de CCl<sub>4</sub> (122  $\pm$  16.50%; p = 0.024)

(Figura 26, panel D y F) en comparación con el grupo de ratones tratados con el vehículo (101 ± 2.88%).



**Figura 26.** Una dosis de CCl<sub>4</sub> induce la expresión de GS en el cerebro de ratón. Inmunoreactividad para GS en cerebelo del grupo de ratones tratados con una dosis (A) o triple dosis de CCl<sub>4</sub> (B). C) Se cuantificó la expresión de la proteína de GS en tejido cerebelar (A y B). Inmunoreactividad para GS en el cerebro del grupo de ratones tratados con una dosis (D) o triple dosis de CCl<sub>4</sub> (E). F) Se cuantificó la expresión proteica de GS en cerebro (D y E). Se usó anti-GAPDH como control de carga. Los valores corresponden a la media ± DE de 3-5 animales por grupo. Los valores significativamente diferentes de los ratones tratados con el vehículo (Ctrl) se indican mediante asteriscos. \* p < 0,05.

## 7. Discusión

El Glu en el hígado tiene un papel metabólico como intermediario en la desintoxicación de amoníaco, en la gluconeogénesis y el equilibrio ácido-base. El control del transporte hepático de Glu/aspartato podría modular su disponibilidad y, de este modo, regular procesos metabólicos intrahepáticos [21, 22, 39, 238].

El presente estudio demuestra que las células HepG2 expresan EAAT2/GLT-1 y EAAT1/GLAST funcionales. Estos resultados contrastan con los datos obtenidos en ambos modelos *in vivo*, con exposición a BPA y CCl<sub>4</sub>, en donde en línea con lo reportado anteriormente, EAAT2/GLT-1 es el transportador expresado exclusivamente (variante de empalme C-terminal) en tejido hepático de ratón [16]. Una posible explicación para esta discrepancia es que estas células son derivadas de tejido humano, además del carácter transformado de la línea celular. Es muy posible que la disrupción del ciclo celular desencadene la expresión de EAAT1/GLAST.

En las células de la glía radial, la exposición a Glu regula negativamente tanto la actividad como los niveles de expresión de EAAT1/GLAST de una manera dependiente del transporte [239, 240]. Interesantemente, el D-aspartato también regula la actividad de captura de D-aspartato, un análogo del Glu, aunque parte del transporte está mediado por EAAT2/GLT-1, lo cual fue comprobado farmacológicamente con el bloqueador específico DHK, observando aún más, la reducción en la actividad de captura, demostrando la expresión funcional de EAAT1/GLAST en células HepG2.

Diversos estudios han demostrado la capacidad del BPA para alterar los procesos metabólicos del hígado. El BPA-glucurónido es el principal metabolito detectado en sangre y orina, con una vida media estimada en humanos de 2h; mientras que los conjugados sulfatados son metabolitos menores [122, 231, 241–243]. Una porción reducida del BPA absorbido no se metaboliza, quedando en forma de BPA libre, el cual se considera puede actuar como xenoestrógeno produciendo efectos nocivos en la célula [244]. Por lo tanto, en este estudio decidimos usar un rango de concentración de BPA de 10 nM- 10 µM. En este escenario, se detectó una expresión diferencial de los transportadores de Glu dependiente de BPA: el EAAT2/GLT-1 se reguló a la baja de una manera dependiente del tiempo, mientras que el EAAT1/GLAST se reguló al alza. Si bien existe una buena correspondencia entre la disminución de la actividad de captura y la expresión proteica reducida de EAAT2/GLT-1 después de la exposición a BPA, no se

encontró correlación para EAAT1/GLAST. Una posibilidad es que la proteína madura no se esté insertando correctamente en la membrana plasmática.

Por otra parte, el papel fundamental de YY1 en el control transcripcional de EAAT1 ha sido bien documentado [161, 163, 184, 202]. La exposición a BPA modula los niveles de EAAT2/GLT-1 y EAAT1/GLAST y que además este evento es completamente inhibido por la actinomicina D, demostrando que el efecto de este xenoestrógeno está mediado a nivel transcripcional en las células de hepatoblastoma.

Es relevante mencionar que los promotores de EAAT2/GLT-1 y EAAT1/GLAST contienen sitios consenso YY1 de unión al ADN y que la sobreexpresión de este factor de transcripción reduce la actividad y los niveles de ARNm de los transportadores [184, 202]. La regulación positiva en la expresión de YY1 se ha informado en el hígado en condiciones patológicas [79]. De acuerdo con los datos obtenidos aquí, el BPA regula la expresión de YY1 en las células HepG2. Es tentador especular que, efectivamente, YY1 está mediando el efecto diferencial de BPA en la transcripción de EAAT1/GLAST y EAAT2/GLT-1.

La sobreexpresión de YY1 observada en la exposición a BPA, fue dependiente de PKC. Estudios anteriores sugieren que el posible mecanismo acción del BPA es dependiente de la unión de este al receptor GPER, activando a la fosfolipasa C, que cataliza la hidrólisis de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol. IP3 posteriormente estimularía la liberación de calcio en el retículo endoplásmico, promoviendo la activación de PKC, que ya se ha reportado participa en los efectos del BPA [147].

En general, los datos obtenidos del estudio *in vitro* demuestran la expresión funcional de EAAT1/GLAST en una línea celular transformada derivada del hígado. Además, la exposición a dosis bajas de BPA está relacionada con un efecto bifásico sobre la captura del análogo de Glu, el aspartato; que es muy probable que esté involucrado en la disfunción hepática.

Por otra parte, los resultados del modelo de daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub> demostraron que EAAT2/GLT-1 es el principal transportador de Glu expresado en el tejido del hígado del ratón [15, 16, 63] y, más importante, que su expresión es modulada tras una lesión hepática aguda. A diferencia de lo que ocurre en el SNC, el papel principal de Glu en el

hígado es como sustrato de diversas vías metabólicas. GS y los transportadores de Glu se encuentran colocalizando en los hepatocitos perivenosos [21, 50], sin embargo, en marcado contraste con los hallazgos registrados para la expresión de GS, la regulación positiva de los niveles de proteína EAAT2/GLT-1 detectados después de la exposición a una dosis de CCl<sub>4</sub> podría reflejar un aumento en la captura de Glu. Aunque es demasiado pronto para afirmarlo, los cambios en la entrada de Glu pueden estar asociados con el mantenimiento de los depósitos intracelulares de este aminoácido en el tejido hepático para la homeostasis celular como respuesta temprana al daño agudo [61].

La hepatotoxicidad aguda de CCl<sub>4</sub> está bien establecida en modelos animales [151]. Una dosis oral única de CCl<sub>4</sub> en el aceite de maíz como vehículo induce niveles elevados de grasa, urea sérica, actividad de enzimas hepáticas y evidencia histopatológica de daño hepático con inflamación y necrosis celular principalmente en la zona perivenular [150–152]. Los datos reportados en la Figura 20 y 21 validan la lesión hepática en ratones después de una dosis única y tres dosis de CCl<sub>4</sub>, mostrando cambios histopatológicos, progresión de la deposición de colágeno, diferenciación de miofibroblastos y la regulación negativa en la expresión proteica de GS, una proteína expresada en hepatocitos perivenosos y uno de los dos sistemas de desintoxicación de amoníaco, aparte del ciclo de la urea en el acino hepático, por lo cual su deficiencia puede resultar en hiperamonemia [21].

El daño hepático agudo en pacientes sin enfermedad hepática preexistente está asociada con el desarrollo de trastornos neurológicos [9, 18, 110, 245, 246]. Las neurotoxinas, la neurotransmisión alterada debido a cambios metabólicos en la insuficiencia hepática, los cambios en el metabolismo energético del cerebro, la respuesta inflamatoria sistémica y las alteraciones de la barrera hematoencefálica, se han sugerido como características clave en la fisiopatología de la EH, un síndrome reversible de las funciones cerebrales deterioradas que ocurren en pacientes con falla hepática aguda o bien en enfermedades hepáticas avanzadas [11, 18, 19, 108, 247, 248]. Sin embargo, estas características pueden tener un papel esencial también en la patología neurológica en las primeras etapas de la lesión hepática.

El glutamato, principal neurotransmisor excitador, requiere la participación de neuronas y células gliales para obtener su función como neurotransmisor [235]. Los niveles de Glu en la clave sináptica están estrictamente regulados por los EAATs [59], evitando la



sobreestimulación de los receptores de Glu y evitando la excitotoxicidad [249]. La lanzadera Glu/Gln está involucrada en el reciclaje de Glu. El Glu capturado por los astrocitos se convierte en Gln por la GS, luego la Gln es liberada, para ser capturada por las neuronas y convertida nuevamente a Glu [235, 250]. Por lo tanto, el equilibrio en los componentes de esta maquinaria es esencial para una neurotransmisión adecuada. Importantes hallazgos de este estudio muestran que los efectos en cerebelo de ratones expuestos a una dosis única de CCl<sub>4</sub> comprenden la expresión diferencial de los transportadores de Glu; EAAT1/GLAST está regulado positivamente y EAAT2/GLT-1 negativamente, además el efecto está acompañado de astrogliosis y pérdida neuronal. Curiosamente, no se detectaron efectos después de las dosis triples de CCl<sub>4</sub>. El Glu actúa como una molécula de señalización en las células gliales y está vinculado al control transcripcional y traduccional, involucrado de manera crítica en el control del reciclaje de Glu y en la neurotransmisión glutamatérgica. Los transportadores gliales de Glu son moléculas clave que perciben la actividad sináptica y, de este modo, modifican su fisiología a corto y largo plazo [235]. En cultivos de astroglia, el Glu “per se” regula a EAAT1/GLAST resultando en un aumento en la actividad de captura y en la expresión de la proteína pero no en sus niveles de ARNm [166]. Una de las limitaciones de este estudio es que la detección proteica se realizó a partir de fracciones membranales de los órganos completos, sin embargo, es bien sabido que EAAT1/GLAST es el principal transportador en el cerebelo, abundantemente expresado en las células gliales de Bergmann en la capa molecular (Rothstein et al. 1994). Por lo tanto, aunque también informamos una regulación a la baja de la expresión de EAAT2/GLT-1 en cerebelo, es tentador especular que la regulación al alza de los niveles de proteína de EAAT1/GLAST detectada después de la exposición aguda a CCl<sub>4</sub> refleja un aumento en la captura de Glu, modulando la permanencia de Glu en el espacio extracelular, reduciendo la acción excitadora de este neurotransmisor en las primeras horas de daño hepático agudo. Estos resultados están en contraste con la reducción de EAAT1/GLAST reportada en la lesión hepática avanzada como HE e hiperamonemia [218, 219]. Sin embargo, las secuelas más tempranas y graves por intoxicación por CCl<sub>4</sub> incluyen dolor de cabeza, ataxia, vértigo, letargo, coma [251], síntomas informados en algunos pacientes con lesión hepática aguda [9, 246]. Además, la pérdida de aproximadamente el 26% de las células de Purkinje apunta al cerebelo como un objetivo importante en las primeras etapas del daño hepático agudo inducido por CCl<sub>4</sub>, mostrando los efectos desde las 24h post-tratamiento.

En línea con lo anterior, un estudio reciente ha demostrado por primera vez que la pérdida de neuronas de Purkinje y granulares se produce en el cerebelo en las primeras etapas de esteatohepatitis [223], conjuntamente, nuestros resultados contribuyen a explicar por qué las disfunciones neurológicas son todavía presente en pacientes después del trasplante de hígado [223, 252].

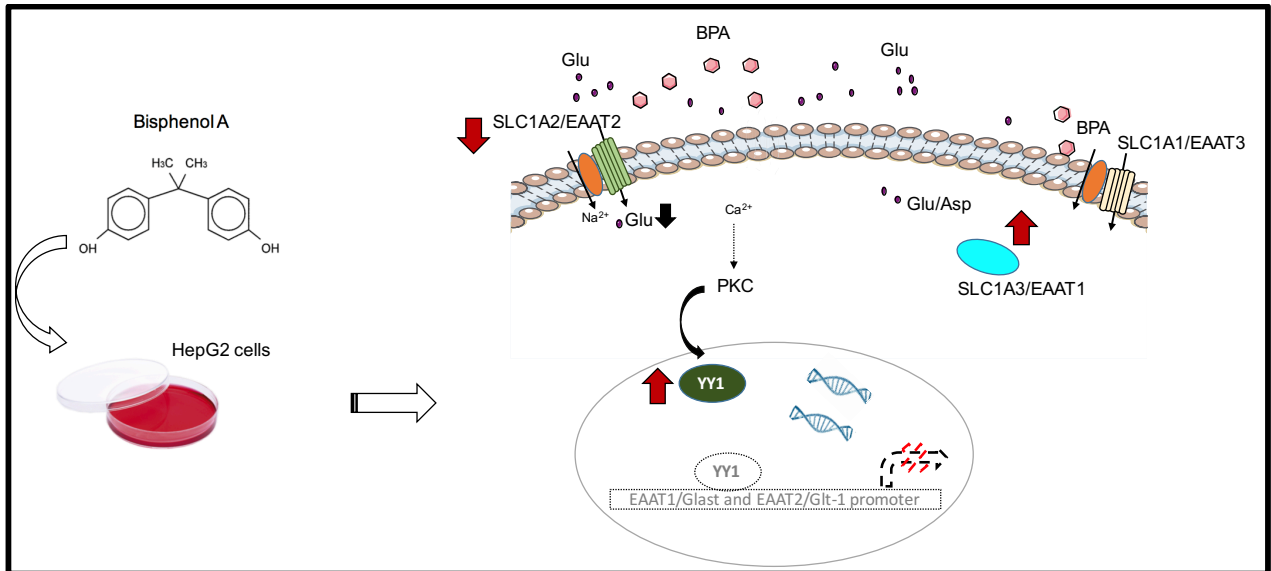
La inflamación, el estrés oxidativo y el nitrosativo tienen un papel fundamental en el daño hepático agudo [18, 153, 246, 248] y también en el mecanismo de toxicidad del CCl<sub>4</sub> [152, 153, 155]. Esto está asociado con la activación microglial y de los astrocitos. Los datos de este estudio demuestran el aumento de los niveles de proteína de GFAP tanto en el cerebelo como en el cerebro 24h después del tratamiento con CCl<sub>4</sub> (dosis única). En astrocitos primarios de ratón y microglia, el óxido nítrico (NO) induce la expresión de GFAP [253]. Los astrocitos expresan NO sintasa inducible (iNOS) produciendo una cantidad excesiva de NO, una molécula estrechamente ligada con neuropatologías y afecciones neuroinflamatorias [254]. Debido a que el CCl<sub>4</sub> induce una alta expresión del ARNm de iNOS y eNOS en roedores [152, 255], esta puede ser una explicación plausible para la regulación positiva de GFAP, sin embargo, esto debe esclarecerse en futuros estudios.

Otro hallazgo de este estudio es que GS está regulado positivamente en el tejido cerebral después de una dosis única de CCl<sub>4</sub>. La GS en el cerebro, se encuentra principalmente en los astrocitos y realiza la amidación de Glu, logrando la desintoxicación de amoníaco [256]. El aumento tanto de la actividad de GS [257, 258] en cultivos de astrocitos de rata, como de los niveles de ARNm [259] en cocultivos de astrocitos corticales de rata con neuronas de células granulares cerebelares, responden a Glu. Para nuestra sorpresa, se encontró una reducción de la expresión de EAAT1/GLAST en cerebro, mientras que no se detectó ningún cambio aparente en los niveles de proteína de EAAT2/GLT-1. EAAT2/GLT-1 es el principal transportador en la corteza cerebral [260]; por lo tanto, esto puede sugerir que la entrada de Glu no se ve afectada en la región cerebral en las primeras etapas de la lesión hepática por CCl<sub>4</sub>. Se ha demostrado que la actividad de GS en cultivos de astrocitos corticales también está regulada por el amoníaco en forma dependiente del tiempo y de la concentración, sin alteraciones en la eliminación de Glu del espacio extracelular, mejorando el metabolismo del Glu acumulado, estimulando la

conversión de Glu a Gln [261] como mecanismo de protección contra la degeneración neuronal.

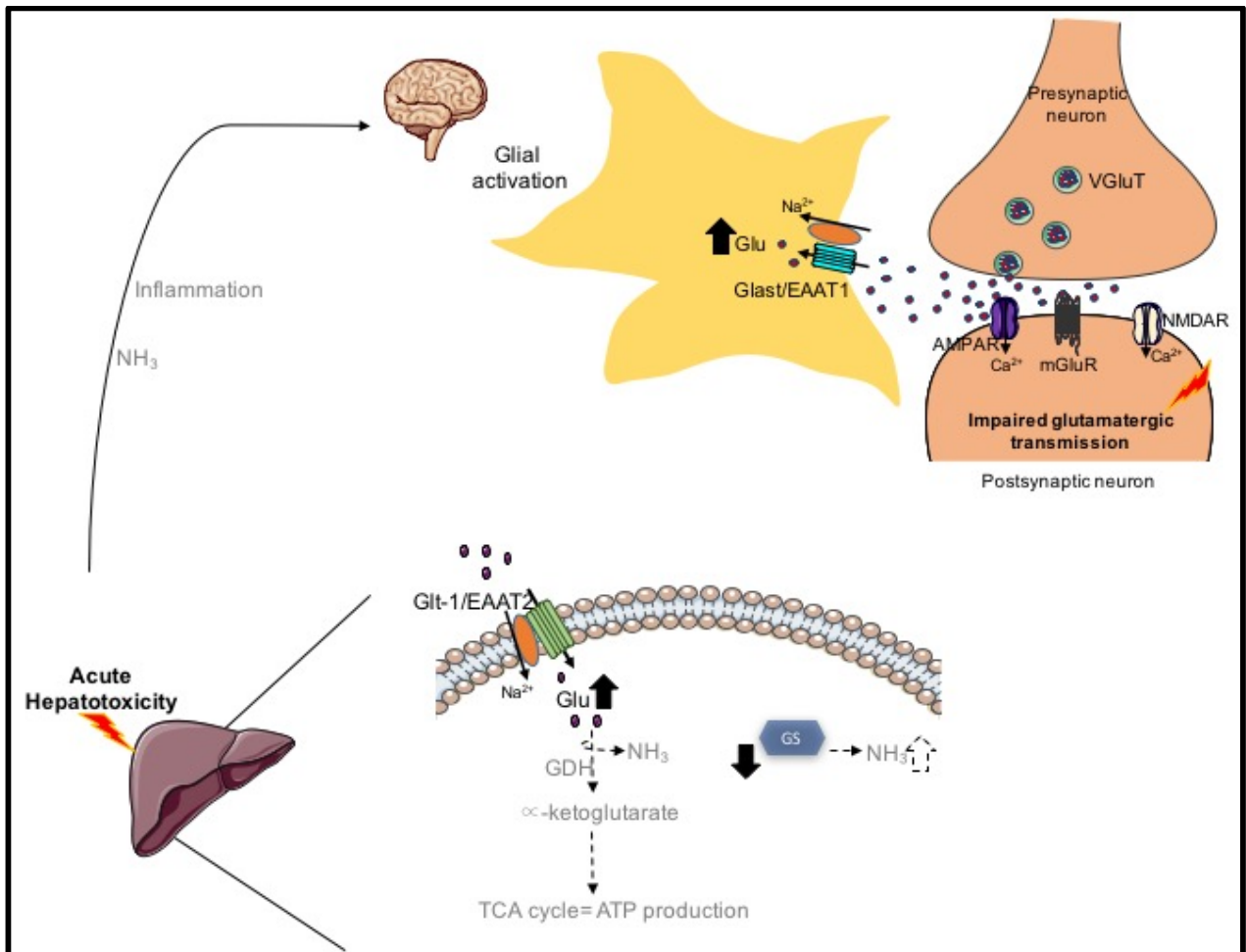
Es claro que se requieren más estudios, sin embargo, nuestros hallazgos hasta ahora demostraron la disrupción de los transportadores de Glu en el eje hígado-cerebro bajo lesión hepática aguda inducida por xenobioticos.

## 8. Modelo propuesto de la regulación de los transportadores de glutamato en la exposición a BPA en células HepG2



**Figura 27.** Mecanismo propuesto en la exposición aguda a BPA en células HepG2. La exposición aguda a BPA disminuye la expresión proteica y la actividad del transportador EAAT2/GLT-1 y aumenta la expresión de EAAT1/GLAST, pero no su actividad. Se sugiere que la disminución en la actividad del transporte de glutamato puede deberse a la represión transcripcional mediada por el aumento en los niveles proteicos de YY1 dependiente de la activación de la proteína quinasa C en células de hepatoblastoma.

## 9. Modelo propuesto de la expresión de los transportadores de glutamato en el eje hígado-cerebro durante la hepatotoxicidad aguda por CCl<sub>4</sub>



**Figura 28.** Modelo de la expresión de los transportadores de Glu en el eje hígado- SNC durante la hepatotoxicidad aguda por CCl<sub>4</sub>. Durante las primeras de daño agudo inducido por CCl<sub>4</sub>, daño histopatológico e inflamación son detectados en hígado, la expresión de EAAT2/GLT-1 aumenta, lo cual podría reflejar el aumento en el influjo de Glu, como sustrato anaplerótico. GS disminuye, por lo que podría aumentar el amonio residual. Es posible que tanto la inflamación como el aumento de los niveles de amonio estén promoviendo la activación glial y la pérdida neuronal en cerebelo, incrementando la expresión de EAAT1/GLAST en cerebelo promoviendo una disrupción en la transmisión glutamatérgica.

## **10. Conclusiones**

- La línea celular HepG2 expresa los transportadores EAAT2/GLT-1 > EAAT1/GLAST > EAAT3/EAAC1
- Las características farmacológicas de los transportadores de Glu en el hígado son similares a las descritas en el sistema nervioso central.
- La exposición aguda a BPA en el rango nanomolar reduce la expresión y la función de EAAT2/GLT-1, mientras que aumenta los niveles proteicos de EAAT1/GLAST, que no se ven reflejados en un aumento en la actividad. En todo este proceso el factor de transcripción YY1 está involucrado de una manera dependiente de la proteína cinasa C.
- La exposición subcrónica a dosis "seguras" de BPA es capaz de regular la expresión de los transportadores de Glu en SNC: la expresión proteica de EAAT1/GLAST disminuye de manera dosis-dependiente en cerebelo. EAAT2/GLT-1 aumenta su expresión en SNC.
- La exposición aguda a CCl<sub>4</sub> promueve la sobreexpresión de EAAT2/GLT-1 en hígado de ratón.
- En respuesta a una dosis única, el daño hepático agudo induce la pérdida de células neuronales, activación glial, regulación al alza de la expresión de EAAT1/GLAST en tejido cerebelar y GS en cerebro de ratón.

## **11. Perspectivas**

- Determinar la expresión y funcionalidad de los transportadores de Glu en células hepáticas de humano no cancerígenas.
- Evaluar la captura de glucosa en la línea celular HepG2 después de la exposición aguda a BPA, para determinar si la modificación del transporte de Glu está relacionado con daño metabólico.
- Identificar si los efectos observados en el transporte de Glu después de la exposición a BPA se deben a una disminución en la translocación de los transportadores a la membrana y/o su mantenimiento en esta.
- Evaluar los niveles de ARNm de EAAT1/GLAST y EAAT2/GLT-1 en células HepG2 después de la exposición aguda a BPA.
- Evaluar la actividad de EAAT1/GLAST en cerebelo y de GS en cerebro después de la hepatotoxicidad por CCl<sub>4</sub>.
- Determinar la actividad de iNOS, así como la expresión de citosinas pro-inflamatorias, y acumulación de amonio en SNC durante la hepatotoxicidad por CCl<sub>4</sub> para diseccionar los posibles reguladores de los efectos observados, como son la activación glial y la modificación de proteínas clave en el reciclaje de Glu.

## Referencias

1. Evans HM (1908) "The Liver in Antiquity and the Beginning of Anatomy" by Prof. Morris Jastrow. *Anat Rec* II:123–127
2. Reuben A (2004) The Body has a Liver. *Hepatology* 39:1179–1181. <https://doi.org/10.1002/hep.20199>
3. Moffat J (1788) *Prognostics and Prorrhethics of Hippocrates Translated from the Original Greek*. London (UK)
4. Summerskill WHJ, Davidson EA, Sherlock S, Steiner RE (1967) Central African journal of medicine. *Cent Afr J Med* 13:147
5. Adams RD, Foley JM (1949) The neurological changes in the more common types of severe liver disease. *Trans Am Neurol Assoc* 74:217
6. Agarwal R, Baid R (2016) Asterixis. *J Postgrad Med* 62:115–117. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.180572>
7. Texter EC, Borden CW (1958) *Hepatic Conm.* 3:159–177
8. Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, et al (2001) Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 34:768–773. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(01\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00026-5)
9. Weissenborn K, Bokemeyer M, Krause J, et al (2005) Neurological and neuropsychiatric syndromes associated with liver disease. *Aids* 19:93–98. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000192076.03443.6d>
10. Schwendimann RN, Minagar A (2017) Liver disease and neurology. *Contin Lifelong Learn Neurol* 23:762–777. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000486>
11. Bémeur C, Butterworth RF (2013) Liver-brain proinflammatory signalling in acute liver failure: Role in the pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema. *Metab Brain Dis* 28:145–150. <https://doi.org/10.1007/s11011-012-9361-3>
12. Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W (1992) Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10955–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10955>
13. Ramachandran B, Houben K, Rozenberg YY, et al (1993) Differential expression of transporters for norepinephrine and glutamate in wild type, variant, and WNT1-expressing PC12 cells. *J Biol Chem* 268:23891–23897
14. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, et al (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675–86. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80086-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80086-0)
15. Berger U V., Hediger MA (2006) Distribution of the glutamate transporters GLT-1 (SLC1A2) and GLAST (SLC1A3) in peripheral organs. *Anat Embryol (Berl)* 211:595–606. <https://doi.org/10.1007/s00429-006-0109-x>
16. Hu QX, Ottestad-Hansen S, Holmseth S, et al (2018) Expression of Glutamate Transporters in Mouse Liver, Kidney, and Intestine. *J Histochem Cytochem* 66:002215541774982. <https://doi.org/10.1369/0022155417749828>
17. Mitra V, Metcalf J (2009) Metabolic functions of the liver. *Anaesth Intensive Care Med* 10:334–335. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2009.03.011>
18. Mans AM, DeJoseph MR, Hawkins RA (1994) Metabolic Abnormalities and Grade of Encephalopathy in Acute Hepatic Failure. *J Neurochem* 63:1829–1838. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63051829.x>
19. Shawcross D, Wright G, Olde Damink SWM, Jalan R (2007) Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy
20. Garcia-Bermudez J, Baudrier L, La K, et al (2018) Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumours. *Nat Cell Biol* 20:775–781. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0118-z>
21. Brosnan J, Brosnan M (2009) Hepatic glutamate metabolism: a tale of 2 hepatocytes. *Am Soc Nutr* 90:10018–10026. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462Z.Am>
22. Watford M (2000) Glutamine and glutamate metabolism across the liver sinusoid. *J Nutr* 130:983S–7S
23. Catala M, Kubis N (2013) *Gross anatomy and development of the peripheral nervous system*, 1st ed. Elsevier B.V.
24. Nobin A, Baumgarten HG, Falck B, et al (1978) Organization of the sympathetic innervation in liver



- tissue from monkey and man. *Cell Tissue Res* 195:371–380. <https://doi.org/10.1007/BF00233883>
25. Rogers RC, Hermann GE (1983) Central connections of the hepatic branch of the vagus nerve: a horseradish peroxidase histochemical study. *J Auton Nerv Syst* 7:165–174. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(83\)90044-9](https://doi.org/10.1016/0165-1838(83)90044-9)
  26. Jensen KJ, Alpini G, Glaser S (2013) Hepatic Nervous System and Neurobiology of the Liver. *Comprehensive Physiol* 3:655–665. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
  27. Mizuno K, Ueno Y (2017) Autonomic Nervous System and the Liver. *Hepatol Res* 47:160–165. <https://doi.org/10.1111/hepr.12760>
  28. Okudaira M (1991) Anatomy of the Portal Vein System and Hepatic Vasculature. *Portal Hypertens* 3–12. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-68361-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-4-431-68361-2_1)
  29. Cichoz-Lach H, Celinski K, Slomka B, Kasztelan-Szczerbinska B (2008) Pathophysiology of portal hypertension. *J Physiol Pharmacol* 59:231–238. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-37078-6\\_144](https://doi.org/10.1007/978-3-642-37078-6_144)
  30. Chagas-Neto FA, Teixeira SR, Elias Junior J, et al (2016) Acquired portosystemic collaterals: anatomy and imaging. *Radiol Bras* 49:251–256. <https://doi.org/10.1590/0100-3984.2015.0026>
  31. Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau RA (1990) Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiol Rev* 70:701–748. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.3.701>
  32. Brosnan JT (2000) Glutamate, at the Interface between Amino Acid and Carbohydrate Metabolism. *J Nutr* 130:988S–990S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.988S>
  33. Huang J, Jia Y, Li Q, et al (2018) Hepatic glutamate transport and glutamine synthesis capacities are decreased in finished vs. growing beef steers, concomitant with increased GTRAP3-18 content. *Amino Acids* 50:513–525. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2540-8>
  34. Krebs HA (1935) Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J* 29:1951–1969
  35. Errera M, Greenstein JP (1949) PHOSPHATE-ACTIVATED GLUTAMINASE IN KIDNEY AND OTHER TISSUES. *J Biol Chem* 178:495–502
  36. de la Rosa V, Campos-Sandoval JA, Martín-Rufián M, et al (2009) A novel glutaminase isoform in mammalian tissues. *Neurochem Int* 55:76–84. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2009.02.021>
  37. Häussinger D, Sies H (1984) Effect of phenylephrine on glutamate and glutamine metabolism in isolated perfused rat liver. *Biochem J* 221:651–658
  38. Heini HG, Gebhardt R, Brecht A, Mecke D (1987) Purification and characterization of rat liver glutaminase. *Eur J Biochem* 162:541–546. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb10673.x>
  39. Häussinger D, Lang F (1990) Exposure of perfused liver to hypotonic conditions modifies cellular nitrogen metabolism. *Cell Biochem* 43:355:361
  40. Nissim I (1999) Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: the role of acute pH changes. *Am J Physiol Physiol* 277:F493–F497. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1999.277.4.F493>
  41. Tate SS, Leu F-Y, Meister A (1972) Rat Liver Glutamine Synthetase: PREPARATION, PROPERTIES, AND MECHANISM OF INHIBITION BY CARBAMYL PHOSPHATE. *J Biol Chem* 247:5312–5321
  42. Brusilow S, Horwich A (1995) Urea cycle enzymes. The metabolic and molecular bases of inherited disease. In: *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. pp 1187–1232
  43. Kelly A, Stanley CA (2001) Disorders of glutamate metabolism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7:287–295. <https://doi.org/10.1002/mrdd.1040>
  44. Burger H-J, Gebhardt R, Mayer C, Mecke D (1989) Different capacities for amino acid transport in periportal and perivenous hepatocytes isolated by digitonin/collagenase perfusion. *Hepatology* 9:22–28. <https://doi.org/10.1002/hep.1840090105>
  45. Newsholme P, Lima MMR, Procopio J, et al (2003) Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Brazilian J Med Biol Res* 36:153–163. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003000200002>
  46. Watford M, Watford M, Chellaraj V, et al (2002) Hepatic glutamine metabolism. *Nutrition* 18:301–303. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00739-6](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00739-6)
  47. Tuchman M, Lichtenstein GR, Rajagopal BS, et al (1997) Hepatic glutamine synthetase deficiency in fatal hyperammonemia after lung transplantation. *Ann Intern Med* 127:446–449. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-127-6-199709150-00005>
  48. Häussinger D, Soboll S, Meijer AJ, et al (1985) Role of plasma membrane transport in hepatic glutamine metabolism. *Eur J Biochem* 152:597–603. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb09237.x>
  49. O'sullivan D, Brosnan JT, Brosnan ME (1998) Hepatic zonation of the catabolism of arginine and ornithine in the perfused rat liver. *Biochem J* 330 ( Pt 2:627–632

50. Kuo FC, Hwu WL, Valle D, Darnell Jr JE (1991) Colocalization in pericentral hepatocytes in adult mice and similarity in developmental expression pattern of ornithine aminotransferase and glutamine synthetase mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9468–9472
51. Matthews JC, Anderson KJ (2002) Recent advances in amino acid transporters and excitatory amino acid receptors. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5:77–84. <https://doi.org/10.1097/00075197-200201000-00014>
52. Kanai Y, Hediger MA (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360:460–471
53. Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI (1992) An [Na<sup>++</sup> K<sup>+</sup>]coupled l-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51:295–310. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90316-T](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90316-T)
54. Pines G, Danbolt NC, Bjørås M, et al (1992) Cloning and expression of rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360:464–467
55. Arriza JL, Kavanaugh MP, Fairman WA, et al (1993) Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J Biol Chem* 268:15329–15332
56. Shafgat S, Tamarappoo BK, Kilberg MS, et al (1993) Cloning and expression of a novel Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na<sup>+</sup>/glutamate cotransporters. *J Biol Chem* 268:15351–15355. <https://doi.org/10.13039/100000002>
57. Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, et al (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375:599–603
58. Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4155–4160. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.4155>
59. Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1–105. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00067-8)
60. Kanai Y, Hediger MA (2004) The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: Molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 447:469–479. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1146-4>
61. Najimi M, Stephenne X, Sempoux C, Sokal E (2014) Regulation of hepatic EAAT-2 glutamate transporter expression in human liver cholestasis. *World J Gastroenterol* 20:1554. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1554>
62. Mennerick S, Dhond RP, Benz A, et al (1998) Neuronal expression of the glutamate transporter GLT-1 in hippocampal microcultures. *J Neurosci* 18:4490–4499. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-12-04490.1998>
63. Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y (1997) Tissue specific variants of glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett* 416:312–316. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01232-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01232-5)
64. Stoll B, Häussinger D (1991) Hepatocyte heterogeneity in uptake and metabolism of malate and related dicarboxylates in perfused rat liver. *Eur J Biochem* 195:121–129. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15684.x>
65. Cadoret A, Ovejero C, Terris B, et al (2002) New targets of  $\beta$ -catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene* 21:8293
66. Pollard M, McGivan J (2000) The rat hepatoma cell line H4-II-E-C3 expresses high activities of the high-affinity glutamate transporter GLT-1A. *FEBS Lett* 484:74–76. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02114-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02114-1)
67. Kanai Y, Bhide PG, DiFiglia M, Hediger MA (1995) Neuronal high-affinity glutamate transport in the rat central nervous system. *Neuroreport* 6:2357–2362
68. Shashidharan P, Huntley GW, Murray JM, et al (1997) Immunohistochemical localization of the neuron-specific glutamate transporter EAAC1 (EAAT3) in rat brain and spinal cord revealed by a novel monoclonal antibody. *Brain Res* 773:139–148. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00921-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00921-9)
69. Kugler P, Schmitt A (1999) Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* 27:129–142. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199908\)27:2<129::AID-GLIA3>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199908)27:2<129::AID-GLIA3>3.0.CO;2-Y)
70. Shayakul C, Kanai Y, Lee W Sen, et al (1997) Localization of the high-affinity glutamate transporter EAAC1 in rat kidney. *Am J Physiol - Ren Physiol* 273:. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1997.273.6.f1023>
71. King N, Williams H, McGivan JD, Suleiman MS (2001) Characteristics of L-aspartate transport and

- expression of EAAC-1 in sarcolemmal vesicles and isolated cells from rat heart. *Cardiovasc Res* 52:84–94. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00373-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00373-X)
72. McGivan JD (1998) Rat hepatoma cells express novel transport systems for glutamine and glutamate in addition to those present in normal rat hepatocytes. *Biochem J* 330 ( Pt 1:255–60
73. Lim JC, Donaldson PJ (2011) Focus on Molecules: The cystine/glutamate exchanger (System xc<sup>-</sup>). *Exp Eye Res* 92:162–163. <https://doi.org/10.1016/J.EXER.2010.05.007>
74. Bridges R, Lutgen V, Lobner D, Baker DA (2012) Thinking outside the cleft to understand synaptic activity: contribution of the cystine-glutamate antiporter (System xc<sup>-</sup>) to normal and pathological glutamatergic signaling. *Pharmacol Rev* 64:780–802. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003889>
75. Bridges RJ, Natale NR, Patel SA (2012) System xc<sup>-</sup> cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *Br J Pharmacol* 165:20–34. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01480.x>
76. López-Méndez E (2012) Historia natural de la cirrosis. In: *Conceptos de diagnóstico y tratamiento en hepatología y gastroenterología.*, 1st ed. Fundación Mexicana para la salud, Mexico, pp 45–49
77. Gressner AM, Bachem MG (1995) Molecular Mechanisms of Liver Fibrogenesis – A Homage to the Role of Activated Fat-Storing Cells. *Digestion* 56:335–346
78. Nagy LE (2010) Mechanisms of Hepatic Steatosis. *Compr Toxicol Second Ed* 9:251–261. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01010-1>
79. Zhang M, Zhang Y, Yang S, et al (2017) Multifunctional YY1 in Liver Diseases. *Semin Liver Dis* 37:363–376. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1607451>
80. European Association for the Study of the Liver (2009) EASL Clinical Practice Guidelines: Management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 51:237–267. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.04.009>
81. Koning T, A. Sandkuijl L, E De Schryver J, et al (1995) Autosomal-recessive inheritance of benign recurrent intrahepatic cholestasis
82. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E (2009) Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis* 4:1. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-1>
83. Turnpenny PD, Ellard S (2012) Alagille syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *Eur J Hum Genet* 20:251–257. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.181>
84. Soroka CJ, Lee JM, Azzaroli F, Boyer JL (2001) Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology* 33:783–791. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.23501>
85. Donner MG, Keppler D (2001) Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* 34:351–359. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.26213>
86. Zollner G, Fickert P, Silbert D, et al (2003) Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 38:717–727. <https://doi.org/10.1016/S0>
87. Bataller R, Brenner DA (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115:209–218. <https://doi.org/10.1172/JCI24282>
88. Harvey LD, Chan SY (2018) YAPping About Glutaminolysis in Hepatic Fibrosis. *Gastroenterology* 154:1231–1233. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.03.007>
89. Matsuno T, Goto I (1992) Glutaminase and Glutamine Synthetase Activities in Human Cirrhotic Liver and Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 52:1192–1194
90. Kershenobich D, Fierro FJ, Rojkind M (1970) The relationship between the free pool of proline and collagen content in human liver cirrhosis. *J Clin Invest* 49:2246–2249. <https://doi.org/10.1172/JCI106443>
91. Globocan. <http://gco.iarc.fr>
92. Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, et al (2017) The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol* 3:1683–1691. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.3055>
93. Galle PR, Forner A, Llovet JM, et al (2018) EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *European Association for the Study of the Liver*
94. Jung CH, Jun CB, Ro S-H, et al (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 20:1992–2003. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-12-1249>
95. van Geldermalsen M, Wang Q, Nagarajah R, et al (2016) ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene* 35:3201–3208. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.381>
96. Palmieri EM, Menga A, Martín-Pérez R, et al (2017) Pharmacologic or Genetic Targeting of

- Glutamine Synthetase Skews Macrophages toward an M1-like Phenotype and Inhibits Tumor Metastasis. *Cell Rep* 20:1654–1666. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.054>
97. Sohn BH, Park IY, Shin J-H, et al (2018) Glutamine synthetase mediates sorafenib sensitivity in  $\beta$ -catenin-active hepatocellular carcinoma cells. *Exp & Mol Med* 50:e421
  98. Christa L, Simon MT, Flinois JP, et al (1994) Overexpression of glutamine synthetase in human primary liver cancer. *Gastroenterology* 106:1312–1320. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(94\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90024-8)
  99. Choi YK, Park KG (2018) Targeting glutamine metabolism for cancer treatment. *Biomol Ther* 26:19–28. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.178>
  100. Fleming KE, Wanless IR (2013) Glutamine synthetase expression in activated hepatocyte progenitor cells and loss of hepatocellular expression in congestion and cirrhosis. *Liver Int* 33:525–534. <https://doi.org/10.1111/liv.12099>
  101. Long J, Wang H, Lang Z, et al (2011) Expression level of glutamine synthetase is increased in hepatocellular carcinoma and liver tissue with cirrhosis and chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 5:698–706. <https://doi.org/10.1007/s12072-010-9230-2>
  102. Matsuno T, Hirai H (1989) Glutamine synthetase and glutaminase activities in various hepatoma cells. *Biochem Int* 19:219–225
  103. Castegna A, Menga A (2018) Glutamine Synthetase: Localization Dictates Outcome. *Genes (Basel)* 9:108. <https://doi.org/10.3390/genes9020108>
  104. Waes L Van, Lieber CS (1977) Glutamate dehydrogenase: A reliable marker of liver cell necrosis in the alcoholic. *Br Med J* 2:1508–1510. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.6101.1508>
  105. Albert AR, Valencia R, Smereck JA, Walsh S (2018) Acute Hepatitis B with Pancreatitis and Cholecystitis Leading to Acute Liver Failure and Death. *Clin Pract Cases Emerg Med* 304:304–308. <https://doi.org/10.5811/cpcem.2018.7.38344>
  106. Ciecko-Michalska I, Szczepanek M, Słowik A, Mach T (2012) The pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Gastroenterol Res Pract* 20:91–97. <https://doi.org/10.1155/2012/642108>
  107. Prakash R, Mullen KD (2010) Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7:515–525. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.116>
  108. Krieger D, Krieger S, Theilmann L, et al (1995) Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *Lancet* 346:270–274. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)92164-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)92164-8)
  109. Zwingmann C, Chatauret N, Leibfritz D, Butterworth RF (2003) Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: Results of a [ $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology* 37:420–428. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50052>
  110. Ahboucha S, Butterworth RF (2008) The neurosteroid system: Implication in the pathophysiology of hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 52:575–587. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2007.05.004>
  111. Häberle J, Görg B, Rutsch F, et al (2005) Congenital Glutamine Deficiency with Glutamine Synthetase Mutations. *N Engl J Med* 353:1926–1933. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050456>
  112. Qvartskhava N, Lang PA, Görg B, et al (2015) Hyperammonemia in gene-targeted mice lacking functional hepatic glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:5521–5526. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423968112>
  113. Gu X, Manautou J (2012) Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert Rev Mol Med* 14:1–25. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
  114. Zimmerman H, Maddrey W (1993) Toxic and drug-induced hepatitis. In: *Diseases of the liver*. JB Lippincott, Philadelphia, E.U.A., p 707
  115. Villeneuve J-P, Pichette V (2005) Cytochrome P450 and Liver Diseases. *Curr Drug Metab* 5:273–282. <https://doi.org/10.2174/1389200043335531>
  116. Geens T, Goeyens L, Covaci A (2011) Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *Int J Hyg Environ Health* 214:339–347. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.04.005>
  117. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, et al (2010) Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 118:1055–1070. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901716>
  118. vom Saal FS, Hughes C (2005) An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect* 113:926–933. <https://doi.org/10.1289/ehp.7713>
  119. Sajiki J, Takahashi K, Yonekubo J (1999) Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci*

- Appl 736:255–261. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00471-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00471-5)
120. Takeuchi T, Tsutsumi O (2002) Serum Bisphenol A Concentrations Showed Gender Differences, Possibly Linked to Androgen Levels. *Biochem Biophys Res Commun* 291:76–78. <https://doi.org/10.1006/BBRC.2002.6407>
121. Matsumoto A, Kunugita N, Kitagawa K, et al (2003) Bisphenol A levels in human urine. *Environ Health Perspect* 111:101–104. <https://doi.org/10.1289/ehp.5512>
122. Nishiyama T, Ogura K, Nakano H, et al (2002) Sulfation of environmental estrogens by cytosolic human sulfotransferases. *Drug Metab Pharmacokinet* 17:221–228. <https://doi.org/10.2133/dmpk.17.221>
123. Kurebayashi H, Betsui H, Ohno Y (2003) Disposition of a low dose of <sup>14</sup>C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol Sci* 73:17–25. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg040>
124. Ginsberg G, Rice DC (2009) Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? *Environ Health Perspect* 117:1639–1643. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901010>
125. Mazur CS, Marchitti SA, Dimova M, et al (2012) Human and rat ABC transporter efflux of bisphenol A and bisphenol A glucuronide: Interspecies comparison and implications for pharmacokinetic assessment. *Toxicol Sci* 128:317–325. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs167>
126. Welshons W V., Nagel SC, Vom Saal FS (2006) Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147:56–69. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1159>
127. Sturgill M, Lambert G (1997) Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin Chem* 43:1512–1526. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31818e3d75r00000542-200812000-00005> [pii]
128. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B (2006) Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 6:1–28. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2005.10.004>
129. Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, et al (2008) Association of Urinary Bisphenol A Concentration Abnormalities in Adults. *JAMA* 300:1303–1310. <https://doi.org/10.1001/jama.300.11.1303>
130. Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP (2003) Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology* 188:117–124. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00056-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00056-8)
131. Nakagawa Y, Tayama S (2000) Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 74:99–105. <https://doi.org/10.1007/s002040050659>
132. Ooe H, Taira T, Iguchi-Aruga SMM, Aruga H (2005) Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1. *Toxicol Sci* 88:114–126. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi278>
133. Huc L, Lemarié A, Guéraud F, Héliers-Toussaint C (2012) Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicol Vitro* 26:709–717. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.03.017>
134. Xia W, Jiang Y, Li Y, et al (2014) Early-life exposure to bisphenol a induces liver injury in rats involvement of mitochondria-mediated apoptosis. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090443>
135. Weinhouse C, Anderson OS, Bergin IL, et al (2014) Dose-dependent incidence of hepatic tumors in adult mice following perinatal exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 122:485–491. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307449>
136. Jeong JS, Nam KT, Lee B, et al (2017) Low-dose bisphenol A increases bile duct proliferation in juvenile rats: A possible evidence for risk of liver cancer in the exposed population? *Biomol Ther* 25:545–552. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.148>
137. Jardim NS, Sartori G, Sari MHM, et al (2017) Bisphenol A impairs the memory function and glutamatergic homeostasis in a sex-dependent manner in mice: Beneficial effects of diphenyl diselenide. *Toxicol Appl Pharmacol* 329:75–84. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.05.035>
138. Zhu H, Xiao X, Zheng J, et al (2009) Growth-promoting effect of bisphenol A on neuroblastoma in vitro and in vivo. *J Pediatr Surg* 44:672–680. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2008.10.067>
139. Khalil N, Ebert JR, Wang L, et al (2014) Bisphenol A and cardiometabolic risk factors in obese children. *Sci Total Environ* 470–471:726–732. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.09.088>
140. Alonso-Magdalena P, García-Arévalo M, Quesada I, Nadal Á (2015) Bisphenol-A treatment during pregnancy in mice: A new window of susceptibility for the development of diabetes in mothers later in life. *Endocrinology* 156:1659–1670. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1952>

141. Bolli A, Galluzzo P, Ascenzi P, et al (2008) Laccase treatment impairs bisphenol A-induced cancer cell proliferation affecting estrogen receptor  $\alpha$ -dependent rapid signals. *IUBMB Life* 60:843–852. <https://doi.org/10.1002/iub.130>
142. Bolli A, Bulzomi P, Galluzzo P, et al (2010) Bisphenol a impairs estradiol-induced protective effects against DLD-1 colon cancer cell growth. *IUBMB Life* 62:684–687. <https://doi.org/10.1002/iub.370>
143. Marino M, Ascenzi P (2008) Membrane association of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  influences 17 $\beta$ -estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* 73:853–858. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2007.12.003>
144. Acconcia F, Pallottini V, Marino M (2015) Molecular mechanisms of action of BPA. Dose-Response 13:1–9. <https://doi.org/10.1177/1559325815610582>
145. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M (2006) Structure–function relationship of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ : Impact on human health. *Mol Aspects Med* 27:299–402. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2006.07.001>
146. Marino M, Pellegrini M, La Rosa P, Acconcia F (2012) Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes. *Steroids* 77:910–917. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2012.02.019>
147. Gonçalves R, Zanatta AP, Cavalari FC, et al (2018) Acute effect of bisphenol A: Signaling pathways on calcium influx in immature rat testes. *Reprod Toxicol* 77:94–102. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.02.009>
148. Mclean A, Mclean E (1966) The effect of diet and 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)ethane (DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and on sensitivity of rats to carbon tetrachloride poisoning. *Biochem J* 100:564–571. <https://doi.org/10.1042/bj1000564>
149. Pound AW, Horn L, Lawson TA (1973) Decreased toxicity of dimethylnitrosamine in rats after treatment with carbon tetrachloride. *Pathology* 5:233–242. <https://doi.org/10.3109/00313027309060840>
150. Korsrud GO, Grice HC, McLaughlan JM (1972) Sensitivity of several serum enzymes in detecting carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 22:474–483. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(72\)90255-4](https://doi.org/10.1016/0041-008X(72)90255-4)
151. Scholten D, Trebicka J, Liedtke C, Weiskirchen R (2015) The carbon tetrachloride model in mice. *Lab Anim* 49:4–11. <https://doi.org/10.1177/0023677215571192>
152. Recknagel RO, Glende EA, Dolak JA, Waller RL (1989) Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 43:139–154. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(89\)90050-8](https://doi.org/10.1016/0163-7258(89)90050-8)
153. Weber LWD, Boll M, Stampfl A (2003) Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 33:105–136. <https://doi.org/10.1080/713611034>
154. Manno M, De Matteis F, King LJ (1988) The Mechanism of the Suicidal, Reductive Inactivation of Microsomal Cytochrome P-450 by Carbon Tetrachloride. *Biochem Pharmacol* 37:1981–1990
155. Ritesh KR, Suganya A, Dileepkumar H V., et al (2015) A single acute hepatotoxic dose of CCl<sub>4</sub> causes oxidative stress in the rat brain. *Toxicol Reports* 2:891–895. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.05.012>
156. Robinson MB (2002) Regulated trafficking of neurotransmitter transporters: Common notes but different melodies. *J Neurochem* 80:1–11. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00698.x>
157. Shin JW, Nguyen KTD, Pow D V., et al (2009) Distribution of glutamate transporter GLAST in membranes of cultured astrocytes in the presence of glutamate transport substrates and ATP. *Neurochem Res* 34:1758–1766. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-9982-z>
158. Benediktsson AM, Marrs GS, Tu JC, et al (2012) Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. *Glia* 60:175–188. <https://doi.org/10.1002/glia.21249>
159. Murphy-Royal C, Dupuis JP, Varela JA, et al (2015) Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nat Neurosci* 18:219–226. <https://doi.org/10.1038/nn.3901>
160. Robinson MB (2006) Acute Regulation of Sodium-Dependent Glutamate Transporters: A Focus on Constitutive and Regulated Trafficking. *Neurotransmitter Transp* 251–275. [https://doi.org/10.1007/3-540-29784-7\\_13](https://doi.org/10.1007/3-540-29784-7_13)
161. Zepeda RC, Barrera I, Castelán F, et al (2008) Glutamate-dependent transcriptional regulation in Bergmann glia cells: Involvement of p38 MAP kinase. *Neurochem Res* 33:1277–1285. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9580-x>
162. Karki P, Kim C, Smith K, et al (2015) Transcriptional regulation of the astrocytic excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) via NF- $\kappa$ B and Yin Yang 1 (YY1). *J Biol Chem* 290:23725–23737.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.649327>
163. López-Bayghen E, Ortega A (2004) Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST: Role of PKC. *J Neurochem* 91:200–209. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02706.x>
  164. Zschocke J, Allritz C, Engele J, Rein T (2007) DNA Methylation Dependent Silencing of the Human Glutamate Transporter EAAT2 Gene in Glial Cells. *Glia* 55:663–674. <https://doi.org/10.1002/glia>
  165. Alam MA, Datta PK (2019) Epigenetic regulation of excitatory amino acid transporter 2 in neurological disorders. *Front Pharmacol* 10:1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01510>
  166. Gegelashvili G, Civenni G, Racagni G, et al (1996) Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes. *Neuroreport* 8:261–265. <https://doi.org/10.1097/00001756-199612200-00052>
  167. Schlag BD, Vondrasek JR, Munir M, et al (1997) Regulation of the glial Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol Pharmacol* 53:355–369. <https://doi.org/10.1124/mol.53.3.355>
  168. González MI, Ortega A (2000) Regulation of high-affinity glutamate uptake activity in Bergmann glia cells by glutamate. *Brain Res* 866:73–81. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02226-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02226-5)
  169. Wang Z, Li W, Mitchell CK, Carter-Dawson L (2003) Activation of protein kinase C reduces GLAST in the plasma membrane of rat Müller cells in primary culture. *Vis Neurosci* 20:611–619. <https://doi.org/10.1017/S0952523803206039>
  170. Isakov N (2018) Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin Cancer Biol* 48:36–52. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.012>
  171. Guillet BA, Velly LJ, Canolle B, et al (2005) Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem Int* 46:337–346. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2004.10.006>
  172. Martínez-Lozada Z, Hernández-Kelly LC, Aguilera J, et al (2011) Signaling through EAAT-1/GLAST in cultured Bergmann glia cells. *Neurochem Int* 59:871–879. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.07.015>
  173. Karki P, Webb A, Zerguine A, et al (2014) Mechanism of Raloxifene-induced Upregulation of Glutamate TransporterS in Rat Primary Astrocytes. *Glia* 62:1270–1283. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
  174. Lee, Sidoryk M, Jiang H, et al (2009) Estrogen and tamoxifen reverse manganese-induced glutamate transporter impairment in astrocytes. *J Neurochem* 110:530–544. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06105.x>
  175. Pawlak J, Brito V, Küppers E, Beyer C (2005) Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *Mol Brain Res* 138:1–7. <https://doi.org/10.1016/J.MOLBRAINRES.2004.10.043>
  176. Sato K, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K (2003) Estrogens inhibit L-glutamate uptake activity of astrocytes via membrane estrogen receptor  $\alpha$ . *J Neurochem* 86:1498–1505. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01953.x>
  177. Lee E, Sidoryk-Wêgrzynowicz M, Wang N, et al (2012) GPR30 regulates glutamate transporter GLT-1 expression in rat primary astrocytes. *J Biol Chem* 287:26817–26828. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341867>
  178. Kim SY, Choi SY, Chao W, Volsky DJ (2003) Transcriptional regulation of human excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1): Cloning of the EAAT1 promoter and characterization of its basal and inducible activity in human astrocytes. *J Neurochem* 87:1485–1498. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02128.x>
  179. Unger T, Lakowa N, Bette S, Engele J (2012) Transcriptional regulation of the GLAST/EAAT-1 gene in rat and man. *Cell Mol Neurobiol* 32:539–547. <https://doi.org/10.1007/s10571-011-9790-2>
  180. Figiel M, Maucher T, Rozyczka J, et al (2003) Regulation of glial glutamate transporter expression by growth factors. *Exp Neurol* 183:124–135. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00134-1](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00134-1)
  181. Dhandapani KM, Wade FM, Mahesh VB, Brann DW (2005) Astrocyte-derived transforming growth factor- $\beta$  mediates the neuroprotective effects of 17 $\beta$ -estradiol: Involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology* 146:2749–2759. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0014>
  182. López-Bayghen E, Espinoza-Rojo M, Ortega A (2003) Glutamate down-regulates GLAST expression through AMPA receptors in Bergmann glial cells. *Mol Brain Res* 115:1–9. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(03\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(03)00136-0)
  183. Espinoza-Rojo M, Lopez-Bayghen E, Ortega A (2000) GLAST: Gene expression regulation by phorbol esters. *Neuroreport* 11:2827–2832. <https://doi.org/10.1097/00001756-200008210-00043>
  184. Rosas S, Vargas MA, López-Bayghen E, Ortega A (2007) Glutamate-dependent transcriptional

- regulation of GLAST/EAAT1: A role for YY1. *J Neurochem* 101:1134–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04517.x>
185. Poblete-Naredo I, Angulo C, Hernández-Kelly L, et al (2009) Insulin-dependent regulation of GLAST/EAAT1 in Bergmann glial cells. *Neurosci Lett* 451:134–138. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2008.12.049>
  186. Lee, Karki P, Johnson J, et al (2017) Manganese control of glutamate transporters' gene expression. *Adv Neurobiol* 16:1–12. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-55769-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-55769-4_1)
  187. Escalante M, Soto-Verdugo J, Hernández-Kelly LC, et al (2019) GLAST Activity is Modified by Acute Manganese Exposure in Bergmann Glial Cells. *Neurochem Res*. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02848-8>
  188. Gegelashvili G, Danbolt NC, Schousboe A (1997) Neuronal Soluble Factors Differentially Regulate the Expression of the GLT1 and GLAST Glutamate Transporters in Cultured Astroglia. *J Neurochem* 69:2612–2615. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69062612.x>
  189. Swanson RA, Liu J, Miller JW, et al (1997) Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* 17:932–940. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-03-00932.1997>
  190. Zeleniaia O, Schlag BD, Gochenauer GE, et al (2000) Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF- $\kappa$ B. *Mol Pharmacol* 57:667–678. <https://doi.org/10.1124/mol.57.4.667>
  191. Apricò K, Beart PM, Crawford D, O'Shea RD (2004) Binding and Transport of [3H](2S,4R)-4-Methylglutamate, a New Ligand for Glutamate Transporters, Demonstrate Labeling of EAAT1 in Cultured Murine Astrocytes. *J Neurosci Res* 75:751–759. <https://doi.org/10.1002/jnr.20013>
  192. Yang Y, Gozen O, Watkins A, et al (2009) Pre-synaptic regulation of astroglial excitatory neurotransmitter transporter GLT1. *Neuron* 61:880–894. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.010.Pre-synaptic>
  193. Ghosh M, Lane M, Krizman E, et al (2016) Transcription Factor Pax6 Contributes to Induction of GLT-1 Expression in Astrocytes Through an Interaction with a Distal Enhancer Element Mausam. *Neurochemistry* 136:262–275. <https://doi.org/doi:10.1111/jnc.13406>
  194. Gegelashvili G, Dehnes Y, Danbolt NC, Schousboe A (2000) The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. *Neurochem Int* 37:163–170. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(00\)00019-X](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(00)00019-X)
  195. Meyer T, Speer A, Meyer B, et al (1996) The glial glutamate transporter complementary DNA in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 40:456–459. <https://doi.org/10.1002/ana.410400317>
  196. Su Z zhong, Leszczyniecka M, Kang D chul, et al (2003) Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: Cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1955–1960. <https://doi.org/10.1073/pnas.0136555100>
  197. Rothstein JD, Patel S, Regan MR, et al (2005)  $\beta$ -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73–77. <https://doi.org/10.1038/nature03180>
  198. Sitcheran R, Gupta P, Fisher PB, Baldwin AS (2005) Positive and negative regulation of EAAT2 by NF- $\kappa$ B: A role for N-myc in TNF $\alpha$ -controlled repression. *EMBO J* 24:510–520. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600555>
  199. Lee SG, Su ZZ, Emdad L, et al (2008) Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J Biol Chem* 283:13116–13123. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707697200>
  200. Kim K, Lee SG, Kegelman TP, et al (2011) Role of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: Opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol* 226:2484–2493. <https://doi.org/10.1002/jcp.22609>
  201. Karki P, Webb A, Smith K, et al (2013) CAMP response element-binding protein (CREB) and nuclear factor- $\kappa$ B mediate the tamoxifen-induced up-regulation of glutamate transporter 1 (GLT-1) in rat astrocytes. *J Biol Chem* 288:28975–28986. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.483826>
  202. Karki P, Webb A, Smith K, et al (2014) Yin Yang 1 Is a Repressor of Glutamate Transporter EAAT2, and It Mediates Manganese-Induced Decrease of EAAT2 Expression in Astrocytes. *Mol Cell Biol* 34:1280–1289. <https://doi.org/10.1128/MCB.01176-13>
  203. Escartin C, Won SJ, Malgorn C, et al (2011) Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 facilitates neuronal glutathione synthesis by upregulating neuronal excitatory amino acid transporter 3



- expression. *J Neurosci* 31:7392–7401. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6577-10.2011>
204. Ma K, Zheng S, Zuo Z (2006) The transcription factor regulatory factor X1 increases the expression of neuronal glutamate transporter type 3. *J Biol Chem* 281:21250–21255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600521200>
205. Davis KE, Straff DJ, Weinstein EA, et al (1998) Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *J Neurosci* 18:2475–2485. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-07-02475.1998>
206. González MI, Bannerman PG, Robinson MB (2003) Phorbol myristate acetate-dependent interaction of protein kinase C $\alpha$  and the neuronal glutamate transporter EAAC1. *J Neurosci* 23:5589–5593. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-13-05589.2003>
207. González MI, Kazanietz MG, Robinson MB (2002) Regulation of the neuronal glutamate transporter excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1) by different protein kinase C subtypes. *Mol Pharmacol* 62:901–910. <https://doi.org/10.1124/mol.62.4.901>
208. Sims KD, Straff DJ, Robinson MB (2000) Platelet-derived growth factor rapidly increases activity and cell surface expression of the EAAC1 subtype of glutamate transporter through activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275:5228–5237. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.5228>
209. Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B (2006) Transcription factor YY1: Structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 25:1125–1142. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209080>
210. Kaufhold S, Garbán H, Bonavida B (2016) Yin Yang 1 is associated with cancer stem cell transcription factors (SOX2, OCT4, BMI1) and clinical implication. *J Exp Clin Cancer Res* 35:1–14. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0359-2>
211. Shang J, Zheng Y, Guo X, et al (2015) Hepatitis B virus replication and sex-determining region y box 4 production are tightly controlled by a novel positive feedback mechanism. *Sci Rep* 5:1–14. <https://doi.org/10.1038/srep10066>
212. Saberi B, Ybanez MD, Johnson HS, et al (2014) Protein kinase C (PKC) participates in acetaminophen hepatotoxicity through JNK dependent and independent signaling pathways. *Hepatology* 59:1543–1554. <https://doi.org/10.1002/hep.26625>
213. Saberi B, Shinohara M, Ybanez MD, et al (2008) Regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced necrosis by PKC and AMP-activated kinase signaling in primary cultured hepatocytes. *Am J Physiol - Cell Physiol* 295:50–63. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.90654.2007>
214. Kubitz R, Süffels G, Kühlkamp T, et al (2004) Trafficking of the Bile Salt Export Pump from the Golgi to the Canalicular Membrane Is Regulated by the p38 MAP Kinase. *Gastroenterology* 126:541–553. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.11.003>
215. Zeng L, Tang WJ, Yin JJ, Zhou BJ (2014) Signal transductions and nonalcoholic fatty liver: A mini-review. *Int J Clin Exp Med* 7:1624–1631
216. Duvnjak M, Lerotić I, Baršić N, et al (2007) Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 13:4539–4550. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i34.4539>
217. Mencin A, Kluwe J, Schwabe RF (2009) Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut* 58:704–720. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.156307>
218. Butterworth RF (2002) Glutamate transporters in hyperammonemia. *Neurochem Int* 41:81–85. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00027-X](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00027-X)
219. Norenberg MD, Huo Z, Neary JT, Roig-Cantesano A (1997) The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: Relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia* 21:124–133. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199709\)21:1<124::AID-GLIA14>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199709)21:1<124::AID-GLIA14>3.0.CO;2-U)
220. Schmidt W, Wolf G, Grüngreiff K, et al (1990) Hepatic encephalopathy influences high-affinity uptake of transmitter glutamate and aspartate into the hippocampal formation. *Metab Brain Dis* 5:19–31. <https://doi.org/10.1007/BF00996975>
221. Montoliu C, Piedrafita B, Serra MA, et al (2009) IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol* 43:272–279. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31815e7f58>
222. Haroon E, Miller AH, Sanacora G (2017) Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology* 42:193–215. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.199>
223. Balzano T, Forteza J, Molina P, et al (2018) The Cerebellum of Patients with Steatohepatitis Shows Lymphocyte Infiltration, Microglial Activation and Loss of Purkinje and Granular Neurons. *Sci Rep* 8:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21399-6>

224. Vandenberg LN, Ehrlich S, Belcher SM, et al (2013) Low dose effects of bisphenol A. *Endocr Disruptors* 1:e26490. <https://doi.org/10.4161/endo.26490>
225. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R (2008) Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harb Protoc* 3:4986–4988. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
226. Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:3116–3120. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.7.3116>
227. Gregor P, Eshhar N, Ortega A, Teichberg VI (1988) Isolation, immunochemical characterization and localization of the kainate sub-class of glutamate receptor from chick cerebellum. *EMBO J* 7:2673–2679. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03120.x>
228. Zhou Y, Danbolt NC (2013) GABA and glutamate transporters in brain. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00165>
229. Ruiz M, Ortega A (1995) [ruiz1995.pdf](https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00165). *Neuroreport* 6:2041–2044
230. Olivares-Bañuelos TN, Chí-Castañeda D, Ortega A (2019) Glutamate transporters: Gene expression regulation and signaling properties. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.02.032>
231. Völkel W, Colnot T, Csanády GA, et al (2002) Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15:1281–1287. <https://doi.org/10.1021/tx025548t>
232. Kanta J, Mrkvicová A, Weiskirchen R (2016) Editorial: Liver myofibroblasts. *Front Physiol* 7:1–2. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00343>
233. Jiménez-Torres C, Hernández-Kelly LC, Najimi M, Ortega A (2020) Bisphenol A exposure disrupts aspartate transport in HepG2 cells. *J Biochem Mol Toxicol* 1–10. <https://doi.org/10.1002/jbt.22516>
234. Haugeto Ø, Ullensvang K, Levy LM, et al (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 271:27715–27722. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27715>
235. Martínez-Lozada Z, Ortega A (2015) Glutamatergic transmission: A matter of three. *Neural Plast* 2015:. <https://doi.org/10.1155/2015/787396>
236. Knecht K, Michalak A, Rose C, et al (1997) Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci Lett* 229:201–203. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)00444-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)00444-8)
237. Norenberg MD, Huo Z, Neary JT, Roig-Cantesano A (1997) The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: Relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia* 21:124–133. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199709\)21:1<124::AID-GLIA14>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199709)21:1<124::AID-GLIA14>3.0.CO;2-U)
238. Häussinger B, Stoll S, McNelly H, Buscher P (1991) Functional hepatocyte heterogeneity in glutamate, aspartate and  $\alpha$ -ketoglutarate uptake: A histoautoradiographical study. *Hepatology* 13:247–253
239. Gadea A, López E, López-Colomé AM (2004) Glutamate-Induced Inhibition of D-Aspartate Uptake in Müller Glia from the Retina. *Neurochem Res* 29:295–304. <https://doi.org/10.1023/B:NERE.0000010458.45085.e8>
240. Martínez D, García L, Aguilera J, Ortega A (2014) An acute glutamate exposure induces long-term down regulation of GLAST/EAAT1 uptake activity in cultured bergmann glia cells. *Neurochem Res* 39:142–149. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1198-6>
241. Teeguarden JG, Calafat AM, Ye X, et al (2011) Twenty-four hour human urine and serum profiles of bisphenol A during high-dietary exposure. *Toxicol Sci* 123:48–57. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr160>
242. Thayer KA, Doerge DR, Hunt D, et al (2015) Pharmacokinetics of Bisphenol A in Humans Following a Single Oral Administration. *Environ Int* 83:107–115. <https://doi.org/10.1186/s40945-017-0033-9>. Using
243. Yalcin EB, Kulkarni SR, Slitt AL, King R (2016) Bisphenol A sulfonation is impaired in metabolic and liver disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 292:75–84. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.009>
244. World Health Organization (WHO). International Food Safety Authorities Network (INFOSAN). Erişim Tarihi (2010) Bisphenol A (BPA)-Current state of knowledge and future actions by WHO and FAO
245. Lee W, Squires R, Nyberg S, et al (2008) Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* 47:1401–1415. <https://doi.org/10.1002/hep.22177>
246. Al-Bassam W, Warrillow SJ (2018) Acute liver failure. *Anaesth Intensive Care Med* 19:87–92. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2017.12.012>

247. Ferenci P (2017) Hepatic encephalopathy. *Gastroenterol Reports* 5:138–147. <https://doi.org/10.1701/2318.24932>
248. Liere V, Sandhu G, DeMorrow S (2017) Recent advances in hepatic encephalopathy. *F1000Research* 6:1637. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11938.1>
249. Kew J, Kemp J (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Physicopharmacology* 179:4–29. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2200-z>
250. McKenna MC, Dienel GA, Sonnewald U, et al (2012) Chapter 11 - Energy Metabolism of the Brain. In: Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DLBT-BN (Eighth E (eds). Academic Press, New York, pp 200–231
251. Luse SA, Wood WG, Luse SA (1967) The Brain in Fatal Carbon Tetrachloride Poisoning. *Arch Neurol* 17:304–312. <https://doi.org/10.1001/archneur.1967.00470270082010>
252. Campagna F, Montagnese S, Schiff S, et al (2014) Cognitive Impairment and Electroencephalographic Alterations Before and After Liver Transplantation: What Is Reversible? *Liver Transplant* 20:977–986. <https://doi.org/10.1002/lt>
253. Brahmachari S, Fung YK, Pahan K (2006) Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci* 26:4930–4939. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5480-05.2006>
254. Murphy S (2000) Production of nitric oxide by glial cells: Regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29:1–13. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(20000101\)29:1<1::AID-GLIA1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(20000101)29:1<1::AID-GLIA1>3.0.CO;2-N)
255. Ji DG, Zhang Y, Yao SM, et al (2018) Cav-1 deficiency promotes liver fibrosis in carbon tetrachloride (CCl4)-induced mice by regulation of oxidative stress and inflammation responses. *Biomed Pharmacother* 102:26–33. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.016>
256. Bessman SP (1964) Ammonia metabolism. *Rev Neuropsiquiatr* 27:323–326. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1978.235.4.f265>
257. Wu DK, Scully S, Vellis J de (1988) Induction of Glutamine Synthetase in Rat Astrocytes by Co-Cultivation with Embryonic Chick Neurons. *J Neurochem* 50:929–935. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb03001.x>
258. Tiffany-Castiglioni E, Roberts JA, Sheeler-Gough L V. (1989) Reduction of glutamine synthetase specific activity in cultured astroglia by ferrous chloride. *J Neurosci Res* 24:508–516. <https://doi.org/10.1002/jnr.490240408>
259. Mearow KM, Mill JF, Freese E (1990) Neuron–glial interactions involved in the regulation of glutamine synthetase. *Glia* 3:385–392. <https://doi.org/10.1002/glia.440030510>
260. Rothstein JD, Martin L, Levey AI, et al (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13:713–725. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90038-8)
261. Waniewski RA (1992) Physiological Levels of Ammonia Regulate Glutamine Synthesis from Extracellular Glutamate in Astrocyte Cultures. *J Neurochem* 58:167–174. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb09292.x>

# **ANEXO I**

## RESEARCH ARTICLE

# Bisphenol A exposure disrupts aspartate transport in HepG2 cells

Catya Jiménez-Torres<sup>1</sup>  | Luisa C. Hernández-Kelly<sup>1</sup>  | Mustapha Najimi<sup>2</sup>  | Arturo Ortega<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ciudad de México, México

<sup>2</sup>Hepato-Gastroenterology Research Pole, Laboratory of Pediatric Hepatology and Cell Therapy, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique (IREC), Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

## Correspondence

Arturo Ortega, Department of Toxicology, Cinvestav-IPN, Apartado Postal 14-740, Ciudad de México 07360, México.  
Email: [arortega@cinvestav.mx](mailto:arortega@cinvestav.mx)

## Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, Grant/Award Numbers: 210238, 255087

## Abstract

The liver is the organ responsible for bisphenol A (BPA) metabolism, an environmental chemical agent. Exposure to this toxin is associated with liver abnormalities and dysfunction. An important role played by excitatory amino acid transporters (EAATs) of the *slc1* gene family has been reported in liver injuries. To gain insight into a plausible effect of BPA exposure in the liver glutamate/aspartate transport, using the human hepatoblastoma cell line HepG2, we report a BPA-dependent dynamic regulation of SLC1A3 and SLC1A2. Through the use of radioactive [<sup>3</sup>H]-D-aspartate uptake experiments and immunochemical approaches, we characterized time and dose-dependent regulation of the protein levels and function of these transporters after acute exposure to BPA. An increase in nuclear Yin Yang 1 was found. These results suggest an important involvement of the EAATs in liver physiology and its disruption after acute BPA exposure.

## KEYWORDS

bisphenol A, gene expression regulation, liver SLC1 transporters

## 1 | INTRODUCTION

Bisphenol A (BPA; 4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane; CAS 80-05-7) is an environmental chemical used in the manufacturing of many consumer products including plasticware.<sup>[1]</sup> BPA is released through a temperature and pH-dependent hydrolysis.<sup>[2]</sup> The average daily exposure of an adult to BPA is estimated to be in the range of 0.1–5 µg/kg body weight.<sup>[3]</sup> Several studies have been focused on BPA as an endocrine disruptor due to its xenoestrogenic properties.<sup>[4]</sup> However, the effects of BPA are not restricted to reproductive disruption. The liver is the primary organ responsible for BPA metabolism to its corresponding glucuronide and sulfate conjugates,<sup>[5,6]</sup> and recently, both in vivo and in vitro data suggest that BPA exerts a wide variety of metabolic effects in the liver. Lang et al<sup>[7]</sup> demonstrated that BPA is linked to the appearance of serum markers of liver damage which, in fact, are predictive of metabolic diseases. BPA can induce oxidative damage in the liver after a long and repeated exposure.<sup>[8]</sup> Both, high and low BPA doses result in proliferative effects on bile ducts and liver tumors.<sup>[9,10]</sup> The prooxidant effect of BPA has been

demonstrated in isolated rat hepatocytes and HepG2 cells.<sup>[11–14]</sup> Moreover, BPA promotes lipid accumulation, lipoperoxidation, and the release of proinflammatory cytokines in the liver.<sup>[13]</sup> These data indicate that BPA exposure contributes to different liver pathologies such as steatosis, cholestasis, and cancer.<sup>[15]</sup>

Glutamate, the most abundant intracellular hepatic amino acid, participates in a plethora of liver functions. The extracellular levels of this amino acid are tightly regulated by two subtypes of plasma membrane glutamate transporters, originally described in rodent glia cells: the glutamate/aspartate transporter (GLAST) and the glutamate transporter 1, encoded by the genes *slc1a3* and *slc1a2*, respectively. Interestingly, its human counterparts, SLC1A3 (excitatory amino acid transporter 1 [EAAT1]) and SLC1A2 (EAAT2), respectively, have been implicated in human liver diseases. In cholestasis, the activity and expression of SLC1A2-mediated glutamate transport is altered.<sup>[16]</sup> More recently, SLC1A3 has been defined as a key molecule in cell proliferation.<sup>[17]</sup> In the liver, glutamate is fundamental for hepatic amino acid metabolism, and it is the crossroad in others metabolic pathways such as ammonia detoxification, protein

synthesis, and energy metabolism.<sup>[18-21]</sup> Although glutamate transporter gene expression regulation in the liver is not yet fully understood, it is possible that the described regulatory mechanisms in brain cells are operative in the liver, meaning cell-surface expression, translational, and transcriptional control.<sup>[22-24]</sup>

BPA modifies the expression of proteins that participate in glutamate transporters regulation in the central nervous system. SLC1A2 and SLC1A3 promoters contain consensus DNA-binding sites for the transcription factor Yin Yang 1 (YY1), and previous studies have revealed an important role of YY1 in glutamate transporters gene expression regulation.<sup>[25-27]</sup> BPA modulates YY1 through the inhibition of its expression.<sup>[28]</sup> It has also been reported that BPA modulates calcium homeostasis involving the Ca<sup>2+</sup>-dependent chloride channels and also through the increase of [Ca<sup>2+</sup>]-dependent Ser/Thr kinases activity,<sup>[29,30]</sup> among which protein kinase C (PKC) represents one of the most widely studied kinase.<sup>[31]</sup>

As BPA is associated with liver abnormalities, we investigated the expression and function of glutamate transporters of the *slc1A* gene family in HepG2 cells after BPA treatment. These cells were chosen as this pollutant is metabolized in this system.<sup>[32]</sup> In the current study, we demonstrate that both SLC1A3 and SLC1A2 transporters are expressed and active in HepG2 cells and are modified by BPA exposure. A dynamic modification of glutamate transporter systems is triggered as part of the liver response to BPA.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Materials

BPA, 2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane, 4,4'-isopropylidenediphenol  $\geq 99\%$  (239658), dimethyl sulfoxide (DMSO)  $\geq 99\%$  (#M81802), and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; # M2128) were obtained from Sigma Aldrich; <sup>3</sup>[H]-D-aspartate was obtained from PerkinElmer (Boston, MA). Cell culture reagents were from Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA), and plasticware was purchased from Corning (New York, NY). Anti-SLC1A3 antibody was purchased from Abcam (ab416; 1:1000) (Cambridge, UK); anti-SLC1A2 from Alomone (AGC-022; 1:1000) (Jerusalem, Israel); anti-YY1 (C-20) (sc-281; 1:1000) and anti-SLC1A1 (sc-7761; 1:500) from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) and monoclonal anti-actin (1:250) antibody was kindly donated by Manuel Hernandez (Cinvestav, Mexico). Horseradish peroxidase-linked anti-rabbit anti-goat and the enhanced chemiluminescence reagent were obtained from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). Bradford and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) reagents were obtained from Bio-Rad (Hercules, CA). Threo- $\beta$ -benzyloxyaspartate (TBOA) (100  $\mu$ M) dihydrokainic acid (DHK) (100  $\mu$ M), tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (100 nM), and bisindolylmaleimide 1 (Bis 1) (1  $\mu$ M) were purchased from Tocris Cookson (St Louis, MO).

### 2.2 | Cell culture and stimulation protocol

HepG2 cells were cultured in DMEM containing 4.5 g/L glucose supplemented with 10% fetal calf serum, 1% nonessential amino acids, 1% glutamine, and 1% penicillin-streptomycin. All cultures were maintained at 37°C in a water-saturated atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Confluent monolayers were exposed to the indicated BPA concentrations for different time periods, and samples were processed as detailed below. Before any treatment, confluent monolayers were switched to solution A containing 25 mM HEPES-Tris, 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 33.3 mM glucose, and 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at pH 7.4.

### 2.3 | Evaluation of cell metabolic activity

Mitochondrial activity was used to assess cell viability as a function of redox potential. The MTT assay was evaluated according to the manufacturer's instructions. Briefly, exponentially growing cells were seeded into 96-well plates. Upon reaching 70% to 80% confluence, cells were treated as indicated. Then, the cell viability was detected by incubating the cells in a medium containing 1 mg/mL MTT for 4 hours. One hundred microliters of DMSO was then added to solubilize the formazan and shaken for 10 minutes in the dark. The absorbance was recorded at 570 nm.

### 2.4 | Cell immunostaining

HepG2 cells were seeded on coverslips. The culture media was removed and cells were rinsed once with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed for 10 minutes in 4% paraformaldehyde. Cells were rinsed with PBS three times, incubating five minutes at room temperature after each wash. Nonspecific binding was prevented by incubation with 4% goat serum in PBS-Tween 0.1 for 1 hour at room temperature. Cells were exposed to a 1:250 dilution of the primary antibody anti-SLC1A3, anti-SLC1A2, or anti-SLC1A1 in 2% goat serum in PBS-Tween 0.1 for 2 hours at 37°C, followed by the incubation with the respective fluorescein-labeled goat anti-rabbit or anti-goat anti-sera in 2% goat serum in PBS-Tween 0.1 (1:1000) for 2 hours at room temperature. Preparations were mounted with Fluoroshield/DAPI. Cell preparations were examined under a fluorescence microscopy (Zeiss Axioskop 40 immunofluorescence microscope and the AxioVision software; Carl Zeiss Inc, Thornwood, NY).

### 2.5 | SDS-PAGE and Western blots

Confluent monolayers were harvested with PBS (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.4) containing phosphatase inhibitors (10 mM NaF, 1 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, and 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). The membrane fraction was obtained according to Hu et al.<sup>[33]</sup> with modifications.

The cells were homogenized in 10 volumes of ice-cold water containing 5 mM EDTA and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and were subjected to centrifugation (14 000 rpm × 20 minutes, 4°C). The pellet was collected, resuspended in 1% SDS in 10 mM NaPi and briefly sonicated before centrifugation (6000 rpm × 20 minutes, 15°C). The nuclear fraction was prepared from cells collected by scraping in PBS and pelleted by centrifugation and gently resuspended in buffer A (10 mM HEPES pH 7.9; 10 mM KCl; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; protease inhibitors) by pipetting up and down several times and incubated on ice for 15 minutes. A fixed amount of 25 µL of 10% NP40 was added and the vortexing was carried out for 10 seconds at highest setting. After the pellet was centrifuged for 1 minute at 10 000 rpm at 4°C, the nuclear pellet was resuspended in 90 to 100 µL buffer C (20 mM HEPES pH 7.9; 0.4M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; protease inhibitors [complete]) for 30 minutes with vortexing at 4°C, and after centrifuging for 5 minutes at 9000 rpm at 4°C, the supernatant was transferred (nuclear fraction) to a clean microcentrifuge tube. Cell lysates of membrane or nuclear fractions were denaturated in the Laemmli sample buffer, and an equal amount of proteins (50 µg of total protein as determined by the Bradford method) were resolved through a 10% SDS-PAGE and then electroblotted to nitrocellulose membranes. Blots were stained with Ponceau S stain to confirm that protein content was equal in all lanes. Membranes were soaked in PBS to remove the Ponceau S and incubated in TBS containing 5% dried skimmed milk and 0.1% Tween 20 for 60 minutes to block the excess of nonspecific protein binding sites. Membranes were then incubated overnight at 4°C with the particular primary antibodies indicated in each figure, followed by secondary antibodies. Immunoreactivity polypeptides were detected by chemiluminescence. Densitometry analyses were performed with ImageJ 1.44 (National Institute of Health, Bethesda, MD), and the mean ± standard deviation (SD) was calculated with Prism, GraphPad Software (San Diego, CA).

## 2.6 | [<sup>3</sup>H]-D-aspartate uptake activity

Confluent monolayers were washed three times to remove all non-adhering cells with 0.25 mL of solution A. The [<sup>3</sup>H]-D-aspartate uptake was initiated at  $t=0$  by the addition of 0.25 mL solution A containing 0.4 µCi/mL of [<sup>3</sup>H]-D-aspartate (100 µM final aspartate concentration). The reaction was stopped by aspirating the radioactive medium and washing each well within 15 seconds with 0.25 mL aliquots of an ice-cold solution A. For the determination of the kinetic parameters, the Asp concentration was modified to a final 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 1 mM, and 2 mM concentrations with unlabeled Asp. The uptake was stopped as described above. The cells in the wells were then solubilized for 2 hours at 37°C to 0.25 mL NaOH 0.1M and an aliquot of the radioactivity present was quantified in a PerkinElmer scintillation counter in the presence of a scintillation cocktail. Experiments were carried at least three times with a minimum of quadruplicate determinations.

## 2.7 | Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± SD. A one-way analysis of variance was performed to determine significant differences between conditions. When this analysis indicated significance ( $P < .05$ ), Dunnett's multiple comparison analysis was used to determine which conditions were significantly different from the control and a Tukey multiple comparison analysis was used to determine which conditions were significantly different from each other with the Prism 5, GraphPad Software. Data from the aspartate uptake experiments were analyzed by nonlinear regression using the curve-fitting program (GraphPad Software). The results were expressed as mean ± SD.

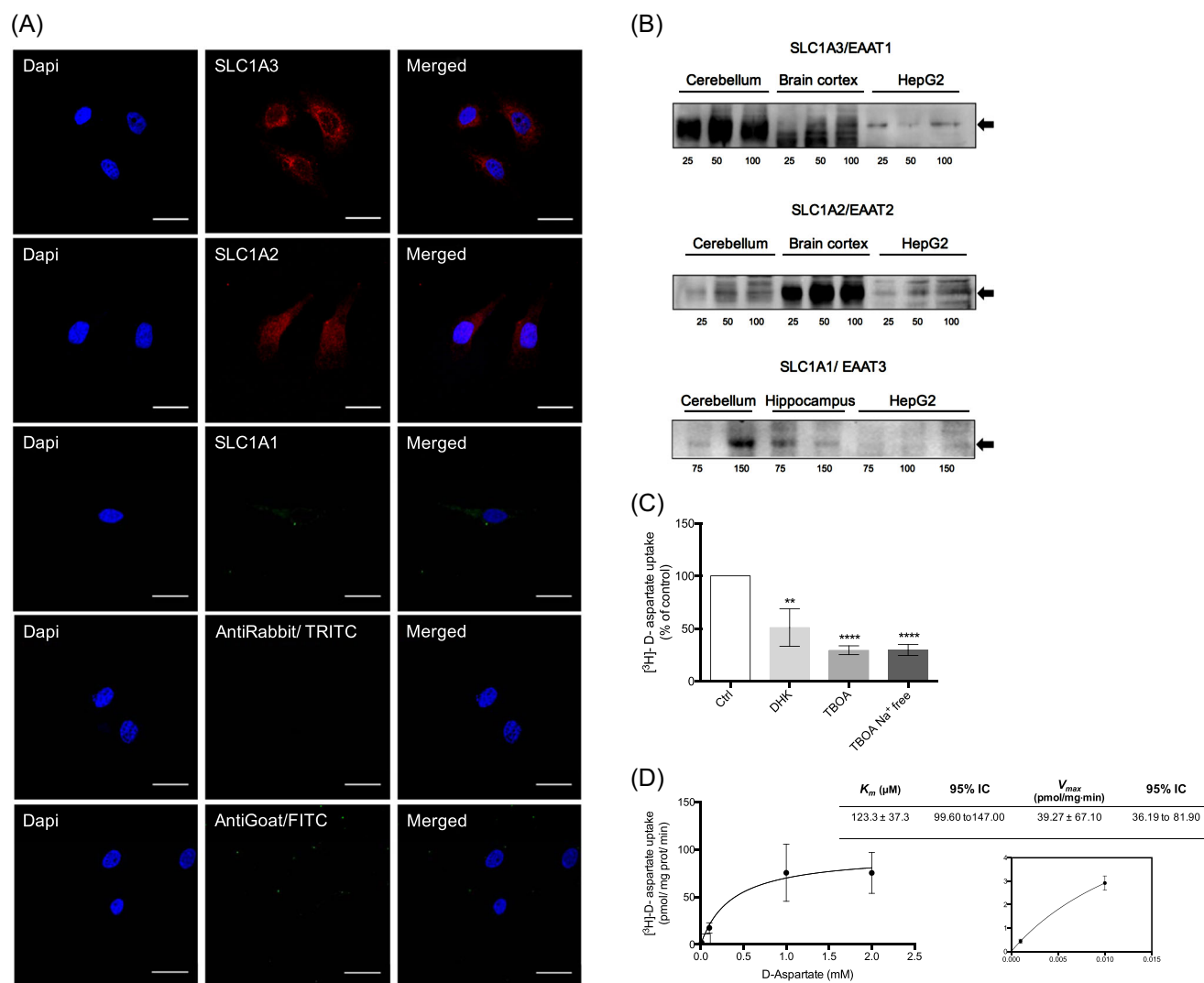
## 3 | RESULTS

### 3.1 | Expression of GLASTs of the *slc1A* gene family in HepG2 cell line

The liver expression of the glutamate transporter SLC1A2 has been reported for in vitro and in vivo models. It has also been reported that this transporter is involved in certain liver diseases.<sup>[16]</sup> In contrast, the expression of SLC1A3 in hepatic human cells has not yet been fully demonstrated. With this in mind, we first decided to ask ourselves if these transporter proteins are present in HepG2 cells. The results are shown in Figure 1, both, SLC1A3 and SLC1A2 are present in these cells, albeit at a lower concentration than in rat brain tissue, note that SLC1A13 is slightly expressed in the plasma membrane (Figure 1A,B).

To demonstrate a functional expression of these transporters, an [<sup>3</sup>H]-D-aspartate uptake assay was used. It has been reported that SLC1 transporters (EAATs) are capable to transport L-glutamate, L-aspartate, and D-aspartate with high affinities.<sup>[34]</sup> The main advantage to use [<sup>3</sup>H]-D-aspartate is that this amino acid is not metabolized in HepG2 cells, and therefore, its efflux rate is very low under the assay conditions, improving both the reproducibility and the sensitivity of these assays.<sup>[35]</sup> As depicted in Figure 1C, approximately 50% of the uptake is blocked by the inclusion of the selective SLC1A2 blocker dihydrokainate (DHK), suggesting the functional expression of SLC1A3, in line with the immunochemical detection of both transporters (Figure 1A). Note that preincubation with the nonselective EAAT blocker TBOA or the replacement of NaCl with choline chloride reduces the control uptake by 75%, demonstrating that in HepG2 cells, the majority of glutamate/aspartate uptake is Na<sup>+</sup>-dependent, carried out by SLC1A2 (25%) and most possibly by SLC1A3, as the expression of the SLC1A1 (EAAC1 or EAAT3) is minimal (Figure 1). Moreover, the  $K_M$  value of 123.3 µM favors the notion of a substantial contribution of EAAT1 (Figure 1D).

Previous results have demonstrated that these transporters are regulated in short and long term by its substrate, namely glutamate.<sup>[36,37]</sup> To gain insight into a plausible glutamate-triggered regulation in liver excitatory amino acids transporters, we first explored the HepG2 cells viability after a long-term (12-24 hours) exposure to



**FIGURE 1** Glutamate-aspartate transporters functional expression in HepG2 cells. A, SLC1A3, SLC1A2, and SLC1A1 immunoreactivity in the HepG2 cell line. Cell staining with the proper primary antibodies (red); anti-SLC1A1 antibody (green); DAPI counter-stained nucleus (blue); and merged images are shown. The two bottom rows of this panel correspond to the negative controls (without primary antibodies). Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . B, Membrane protein expression of SLC1A3, SLC1A2, and SLC1A1 from rat adult cerebellum, rat adult cerebral cortex tissue or hippocampus, and HepG2 cells; 25, 50, and 100  $\mu\text{g}$  of protein. Predicted band size corresponds to 67/60 kDa. C, HepG2 cells were pretreated with the EAAT2 blocker dihydrokainic acid (DHK; 100  $\mu\text{M}$ ) or EAAT blocker DL-threo- $\beta$ -benzyloxyaspartic acid (TBOA; 100  $\mu\text{M}$ ) for 30 minutes in assay buffer or assay buffer with choline chloride ( $\text{Na}^+$  free), [ $^3\text{H}$ ]-D-aspartate was measured after 6 minutes. D, Saturation isotherm for [ $^3\text{H}$ ]-D-aspartate uptake in HepG2 cells. The data shown correspond to the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in quadruplicate. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparison test. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ . A robust nonlinear regression was used to fit a model to our data and estimate the kinetic parameters. Representative images of three independent experiments. ANOVA, analysis of variance; EAAT, excitatory amino acid transporter; SD, standard deviation

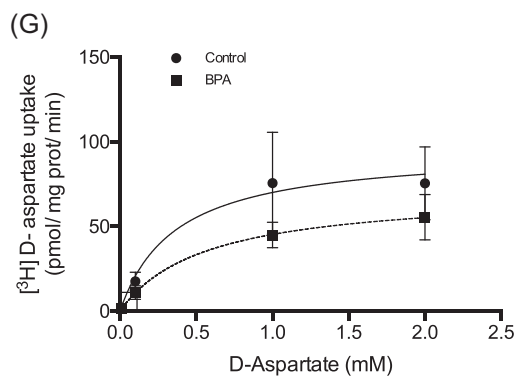
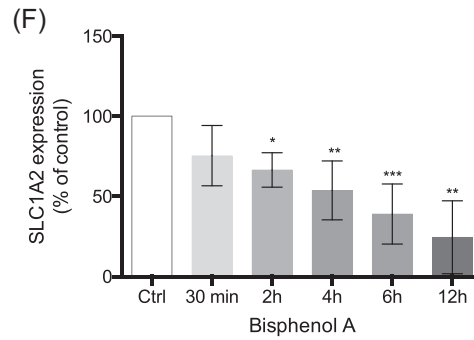
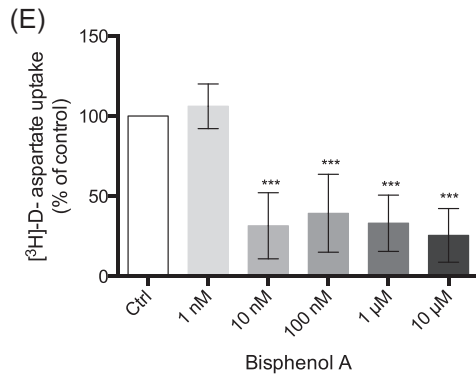
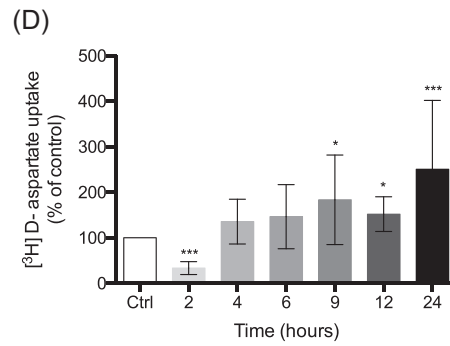
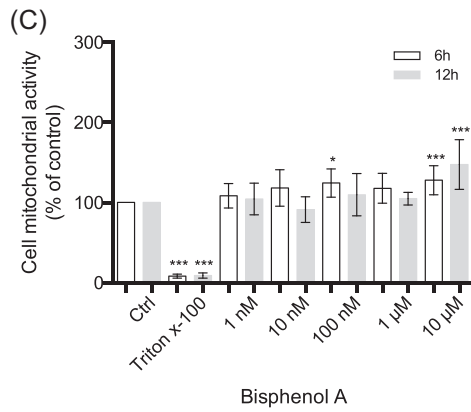
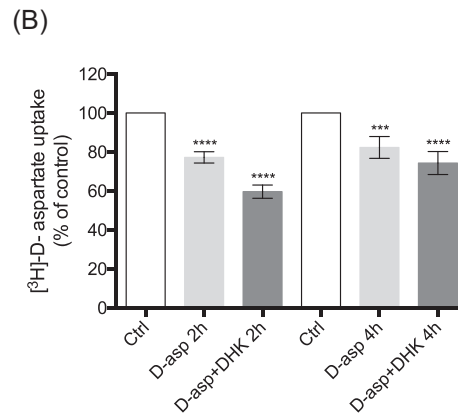
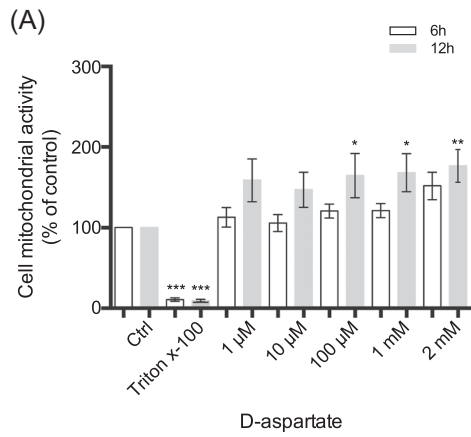
the glutamate analog, D-aspartate. No reduction in cell mitochondrial activity was detected upon the treatment with different D-aspartate concentrations. Furthermore, a significant increase in cell metabolic activity was detected with 1 and 2 mM aspartate (Figure 2A). These results enabled us to examine the effect of a 1 mM aspartate exposure for 30 minutes on the [ $^3\text{H}$ ]-D-aspartate uptake activity after 2 and 4 hour-postexposure.<sup>[38]</sup> A reduction in the uptake activity was observed, note that after 2 hours approximately a 20% reduction in the activity was detected. The inclusion of the SLC1A2 blocker led to a further 20% reduction, suggesting that a SLC1A3-dependent uptake

indeed is present in HepG2 cells (Figure 2B). After 4 hours, the contribution of SLC1A2 to the uptake was observed to be of only 10%, supporting the idea of a dynamic modulation of the expression of both transporters in these cells (Figure 2B).

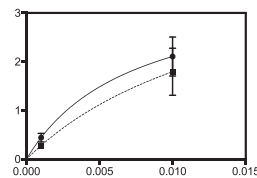
### 3.2 | BPA exposure impairs [ $^3\text{H}$ ]-D-aspartate uptake

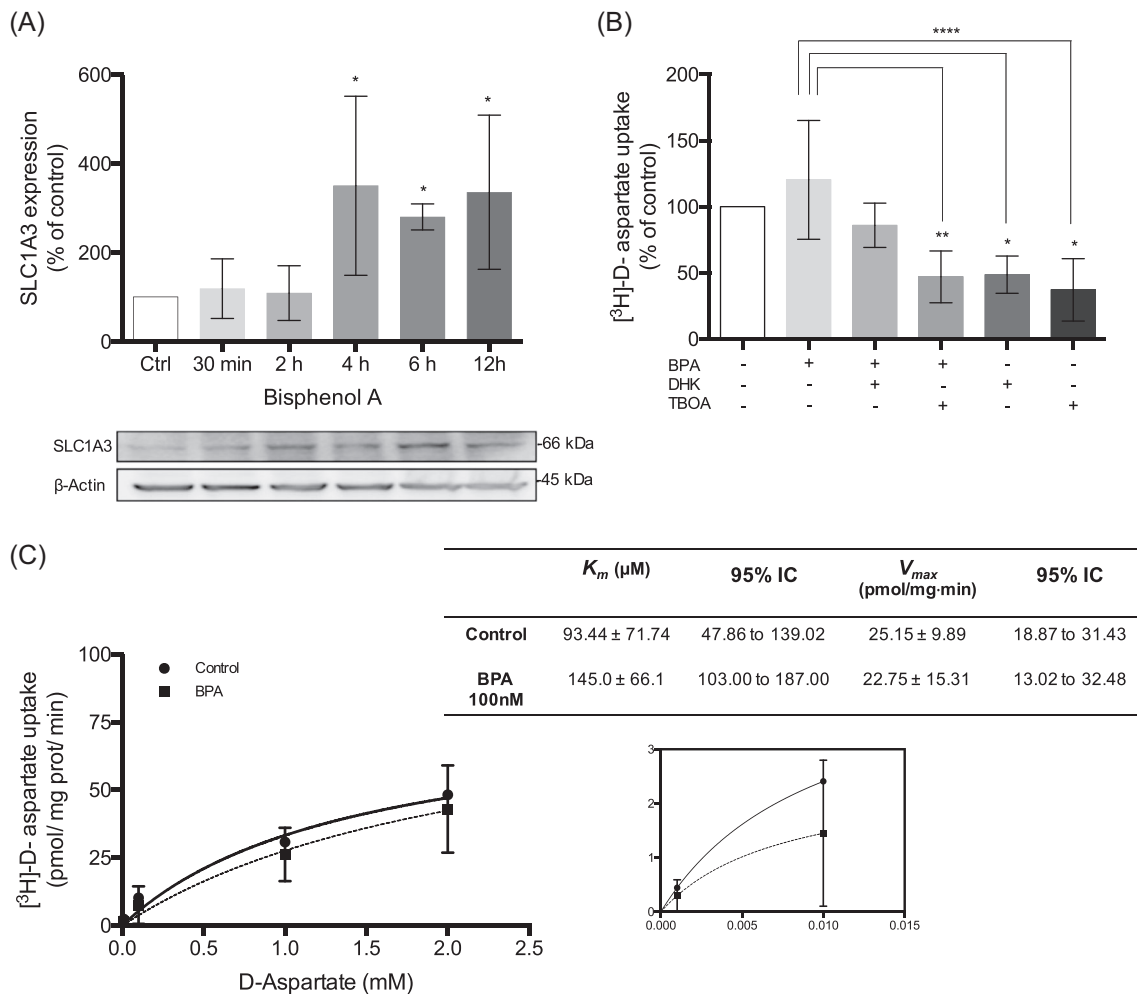
Taking into consideration the extended use of BPA and its hepatotoxic character, we decided to evaluate the effect of the exposure to





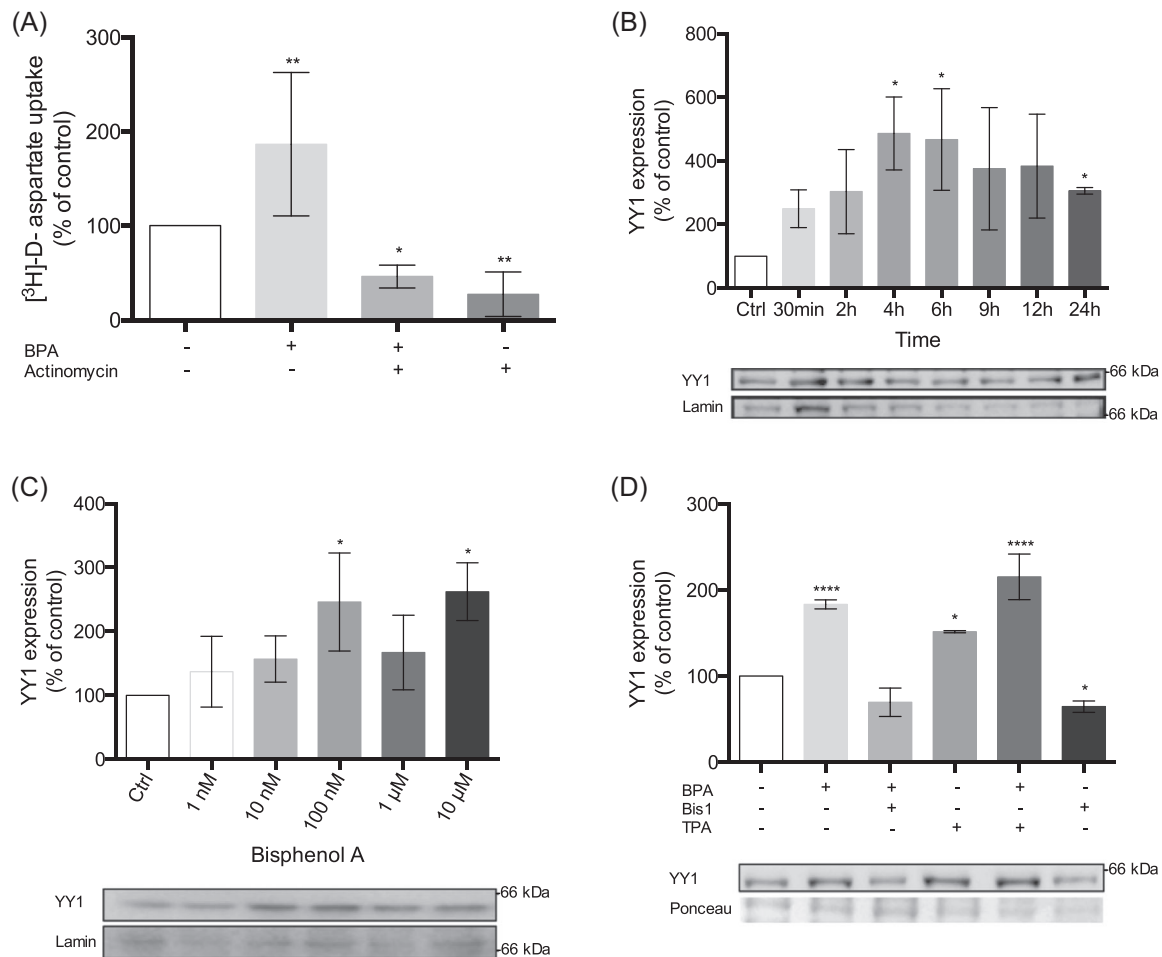
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	95% IC	$V_{max}$ (pmol/mg·min)	95% IC
Control	$123.3 \pm 37.3$	99.60 to 147.00	$39.27 \pm 67.10$	36.19 to 81.90
BPA 100nM	$47.28 \pm 33.24$	26.16 to 68.40	$10.34 \pm 2.74$	8.60 to 12.08





**FIGURE 3** Bisphenol A (BPA) acute exposure increases SLC1A3 expression in HepG2 cells. A, Effect of BPA acute exposure on SLC1A3 protein expression in HepG2 cells 30 minutes, 2, 4, 6, and 12 hours of posttreatment. The cells were treated with BPA (100 nM) for 30 minutes. Anti-actin Western blots were used as loading controls. A representative blot is presented on bottom of the graph. B, Cells were treated with 100 nM BPA for 30 minutes; SLC1A2 blocker dihydrokainic acid (DHK; 100  $\mu\text{M}$ ) or SLC1A blocker D,L-threo- $\beta$ -benzyloxyaspartic acid (TBOA; 100  $\mu\text{M}$ ) was placed 30 minutes before. [<sup>3</sup>H]-D-aspartate was measured after 6 minutes, 6 hours posttreatment. C, Saturation isotherms for [<sup>3</sup>H]-D-aspartate uptake in HepG2 cells 6 hours posttreatment with BPA (100 nM) for 30 minutes. Data represents the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments performed in quadruplicate. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance, followed by Dunnett's or Tukey's multiple comparison test. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ . A robust nonlinear regression was used to fit a model to our data and estimate the kinetic parameters

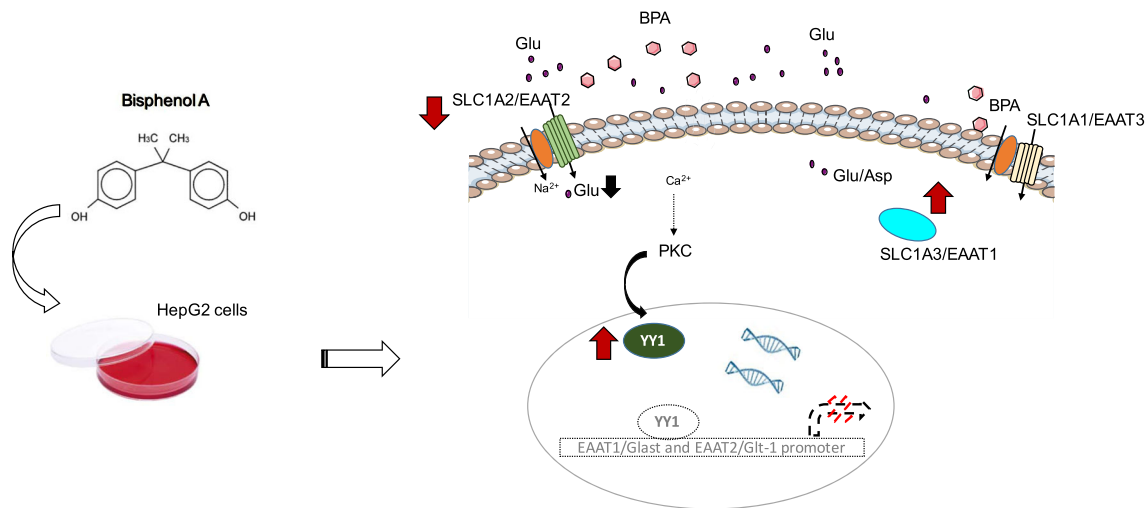
**FIGURE 2** D-Aspartate and bisphenol A (BPA) acute exposure impair excitatory amino acid transporters activity in HepG2 cells. A, Cell mitochondrial activity after analysis of intracellular purple formazan levels in HepG2 cells treated with D-aspartate (1  $\mu\text{M}$ -2 mM) or Triton X-100. B, D-Aspartate downregulation of [<sup>3</sup>H]-D-aspartate uptake. Cells were pretreated with 1 mM D-aspartate, SLC1A2 blocker dihydrokainic acid (DHK; 100  $\mu\text{M}$ ), or both for 30 minutes. [<sup>3</sup>H]-D-aspartate uptake was measured 2 or 4 hours posttreatment. C, Cell mitochondrial activity after analysis of intracellular purple formazan levels in HepG2 cells treated with BPA (1 nM-10  $\mu\text{M}$ ) or Triton X-100. D, HepG2 cells were treated with 100 nM BPA for 30 minutes. 2, 4, 6, 9, 12, and 24 hours posttreatment [<sup>3</sup>H]-D-aspartate uptake was measured. E, Cells were treated with increasing concentrations of BPA (1 nM-10  $\mu\text{M}$ ) for 30 minutes. [<sup>3</sup>H]-D-aspartate was measured after 6 minutes and 2 hours posttreatment. F, Effect of BPA acute exposure on SLC1A2 protein expression in HepG2 cells 30 minutes, 2, 4, 6, and 12 hours posttreatment. The cells were treated with BPA (100 nM) for 30 min. Anti-actin Western blots were used as loading controls. A representative blot is presented on bottom of the graph. G, Saturation isotherms for [<sup>3</sup>H]-D-aspartate uptake in HepG2 cells 2 hours posttreatment with BPA (100 nM) for 30 minutes. The data shown are the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments performed in quadruplicate. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance, followed by Dunnett's multiple comparison test. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ . A robust nonlinear regression was used to fit a model to our data and estimate the kinetic parameters



**FIGURE 4** Bisphenol A (BPA) regulates *slc1A* transporters at the transcriptional level. A, HepG2 cells were treated with 100 nM BPA and/or actinomycin 10 μg/mL. [<sup>3</sup>H]-D-aspartate uptake was measured, 24 hours posttreatment. B, Yin Yang 1 (YY1) nuclear expression in HepG2 cells 30 minutes, 2 hours, 4 hours, or 6 hours posttreatment. Cells were treated with 100 nM BPA for 30 minutes. C, YY1 nuclear expression 6 hours posttreatment. Cells were treated with increasing BPA concentrations (1 nM–10 μM) for 30 minutes and YY1 nuclear levels were measured as in the previous panel. D, YY1 nuclear expression 6 hours posttreatment with BPA (100 nM) for 30 minutes. Protein kinase C (PKC) blocker Bisindolylmaleimide I (Bis I; 100 μM) or PKC activator 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA; 100 μM) were placed 30 minutes before. Anti-lamin Western blots were used as loading controls. A representative blot is presented on bottom of the graph. The data shown correspond to the mean ± standard deviation of three independent experiments. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance, followed by Dunnett's multiple comparison test. \**P* < .05, \*\**P* < .01

this xenobiotic in the expression and activity of excitatory amino acid plasma membrane transporters. BPA metabolism in humans occurs very quickly, and an efficient conjugation with glucuronic acid results in a small amount of free BPA, a xenoestrogen compound. However, the period that the unconjugated compound remains in humans is less in concentration and time (half-life ~89 min).<sup>[39]</sup> In addition, we were interested in concentrations in nanomolar range because it has been reported BPA produces adverse effects at levels below the acceptable daily intake. In fact, acute exposure mimics free BPA in the liver. We first evaluated the viability of HepG2 cells following exposure to different concentrations of BPA for 12 and 24 hours. No significant changes in cell metabolic activity were recorded, and interestingly, an increase in cell activity after BPA 100 nM at 6 hours and BPA 10 μM at 12 and 24 hours was detected (Figure 2C).

The effect of the exposure to 100 nM BPA for different periods in the [<sup>3</sup>H]-D-aspartate uptake activity was determined. A biphasic effect was found, first a 50% reduction in the uptake (after 2 hours) and then a recovery of the activity (Figure 2D). We decided first to concentrate in the reduction of the aspartate uptake. To this end, we exposed the cultured cells to different BPA concentrations for 30 minutes and measured the uptake activity after 2 hours. The maximal uptake reduction was present after a 10 nM BPA concentration, suggesting a nonmonotonic effect (Figure 2E). This reduction matches with a decrease in SLC1A2 levels shown in Figure 2F. The reduction in the transporter content is more pronounced as a function of time. As one would expect, a clear reduction in *V*<sub>Max</sub> was present in BPA-treated cells (Figure 2G). It is important to mention that also a decrease in the affinity of the transporters is



**FIGURE 5** Proposed model for the effects of acute bisphenol A (BPA) exposure on SLC1A3 and SLC1A2 expression in hepatoblastoma cells. See text for details

present, pointing out either an effect in both SLC1A3 and SLC1A2 or/and a BPA-mediated conformational change in these proteins.

Next, we focused in the BPA time-dependent increase in aspartate uptake depicted in Figure 2D. These results, together with the sharp decrease in SLC1A2 (Figure 2F), suggested that the recovery of the uptake activity after 4 hours of BPA might be due to an increase in SLC1A3 expression. Therefore, we measured the protein levels of this transporter as a function of BPA exposure. The results are shown in Figure 3A. A sustained increase in SLC1A3 immunoreactivity was found. To find a functional correlate of these observations, we determined the [<sup>3</sup>H]-D-aspartate uptake activity 6 hours after the cells were exposed for 30 minutes to 100 nM BPA. A slight increase in uptake is detected; nevertheless, this augmentation is blocked by DHK demonstrating that the increase in SLC1A3 protein levels does not result in functional SLC1A3 transporters at the plasma membrane (Figure 3B). In line with this interpretation, no significant changes are present in the uptake kinetic parameters (Figure 3B,C).

### 3.3 | Transcriptional regulation of *slc1A* in HepG2 cells after BPA exposure

Previous studies from our group and from some others highlight the involvement of the transcription factor YY1 as a critical regulator in the expression and activity of *slc1A3* and *slc1A2*.<sup>[25,40]</sup> YY1 overexpression may also be correlated with the presence of certain liver pathologies; it is suggested that the metabolic system in which glutamate participates could be modified as a direct or indirect response to liver injury. According to our results, BPA exposure impairs SLC1A2 and SLC1A3 transporter activity at the long term. In view of this fact, we asked ourselves if the BPA effect is a transcriptional effect. Cells were pretreated with 100 nM BPA, 10 μg/mL actinomycin D or both. As depicted in Figure 4A, the BPA effect was

sensitive to the actinomycin D treatment. These results demonstrate that the effect of acute exposure of BPA is a downregulation of the *slc1A* transporters transcription. These results prompted us to evaluate YY1 expression in HepG2 cells exposed to 100 nM BPA for different periods. A time-dependent increase in YY1 protein levels is presented after 30 minutes, 2 hours, 4 hours, 9 hours, 12 hours, and 24 hours post-BPA (Figure 4B). Note that BPA induces a hormetic response in YY1 protein levels (Figure 4C). Taking into consideration that YY1 acts as both as a transcriptional activator and as a repressor and that PKC activation is essential for the YY1 DNA-binding signal transduction cascade that regulates *slc1A3* transcription, we pretreated the cells with the PKC inhibitor Bis 1. In this scenario, BPA is no longer able to increase YY1 protein levels. As expected, a PKC, such as TPA, mimics the BPA effect. Interestingly enough, the BPA and the TPA effects are not statistically different, suggesting that YY1 overexpression is PKC-mediated (Figure 4D).

## 4 | DISCUSSION

Glutamate in the liver has an important metabolic role as intermediary in ammonia detoxification, gluconeogenesis, acid-base balance, and so on. The control of hepatic glutamate/aspartate transport might possibly modulate its availability and by these means regulate related intrahepatic metabolic processes.<sup>[18,20,21,41]</sup>

The current study demonstrates that HepG2 cells express functional SLC1A2 and SLC1A3 transporters. These results are in sharp contrast to the reported SLC1A2 (C-terminal splice variant) exclusive expression in mouse liver.<sup>[33]</sup> A plausible explanation for this discrepancy is the transformed character of the HepG2 cell line. It might well be possible that cell cycle disruption triggers SLC1A3 expression.

In radial glia cells, glutamate exposure downregulates the activity as well as the expression levels of SLC1A3 in a transporter-dependent manner.<sup>[38,42]</sup> Interestingly enough, as depicted Figure 2B, in HepG2

cells D-aspartate downregulates the aspartate uptake activity, albeit part of the transport is mediated by SLC1A2 as the its blocker DHK further reduces the uptake, once again demonstrating the functional expression of SLC1A3 in human liver-transformed cells.

BPA disrupts liver metabolic processes. BPA glucuronide is the major metabolite detected in blood and urine, with an estimated half-life in humans of 2 hours, whereas sulfated conjugates are minor metabolites.<sup>[39,43–46]</sup> A reduced portion of the absorbed BPA is not metabolized remaining in the form of free BPA-producing noxious effects acting as a xenoestrogen.<sup>[47]</sup>

Therefore, we decided to use a BPA concentration range from 10 nM to 10  $\mu$ M. In this scenario, a BPA-dependent differential expression of glutamate transporters was detected: SLC1A2 was downregulated in a time-dependent manner, whereas SLC1A3 was upregulated. Although there is a good correspondence between SLC1A2 decreased activity and reduced protein expression under BPA exposure, no correlation was found for SLC1A3. The possibility that the mature protein is not correctly inserted in the plasma membrane which remains to be determined. Further experiments, beyond the scope of this communication, are needed to clarify this issue.

A pivotal role of YY1 in *slc1A* transcriptional control has been documented.<sup>[25,27,31,48,49]</sup> Moreover, the fact that BPA modulates SLC1A2 and SLC1A3 levels and that this effect is completely inhibited by actinomycin D demonstrated that the effect of this xenoestrogen is mediated at the transcriptional level.

Of relevance is to mention that *slc1A2* and *slc1A3* promoters contain YY1 DNA consensus-binding sites and that overexpression of this transcription factor reduces [<sup>3</sup>H]-D-aspartate transport and their respective mRNA levels.<sup>[25,27]</sup> Interestingly, YY1 upregulation expression has been reported in liver pathogenic conditions.<sup>[49]</sup> In line with these data, in HepG2 cells, BPA regulates YY1. It is tempting to speculate that indeed YY1 is mediating the differential effect of BPA in *slc1A2* and *slc1A3* transcription. Experiments currently in progress in our group are aimed to reveal this issue.

In conclusion, we report here the functional expression of SLC1A3 in a liver-derived transformed cell line. Furthermore, the exposure to low BPA doses is linked to a biphasic effect on the uptake of the glutamate analog, aspartate, that is most likely involved in liver dysfunction. Our findings are summarized in Figure 5.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by CONACYT grants (210238 and 255087) to Arturo Ortega. The technical assistance of Luis Cid and Blanca Ibarra is acknowledged.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

C. J.-T. performed the experiments, analyzed the data and wrote the first draft paper. L. C. H.-K., M. N., and A. O. were involved in revising the manuscript. A. O. designed, coordinated the research, provided financial support, and wrote the final version of the manuscript.

## ORCID

Catya Jiménez-Torres  <http://orcid.org/0000-0001-9653-5066>

Luisa C. Hernández-Kelly  <http://orcid.org/0000-0003-2710-3731>

Mustapha Najimi  <http://orcid.org/0000-0002-7329-9635>

Arturo Ortega  <http://orcid.org/0000-0002-9594-8114>

## REFERENCES

- [1] T. Geens, L. Goeyens, A. Covaci, *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2011**, 214, 339. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.04.005>
- [2] L. N. Vandenberg, I. Chahoud, J. J. Heindel, V. Padmanabhan, F. J. R. Paumgarten, G. Schoenfelder, *Environ. Health Perspect.* **2010**, 118, 1055. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901716>
- [3] L. N. Vandenberg, S. Ehrlich, S. M. Belcher, N. Ben-Jonathan, D. C. Dolinoy, E. R. Hugo, P. A. Hunt, R. R. Newbold, B. S. Rubin, K. S. Saili, A. M. Soto, H. S. Wang, F. S. vom Saal, *Endocr. Disruptors* **2013**, 1, e26490. <https://doi.org/10.4161/endo.26490>
- [4] W. V. Welshons, S. C. Nagel, F. S. Vom Saal, *Endocrinology* **2006**, 147, 56. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1159>
- [5] J. J. Pritchett, R. K. Kuester, I. G. Sipes, *Drug Metab. Dispos.* **2002**, 30, 1180. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.11.1180>
- [6] N. Hanioka, T. Naito, S. Narimatsu, *Chemosphere* **2008**, 74, 33. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.053>
- [7] I. A. Lang, *JAMA* **2008**, 300, 1303. <https://doi.org/10.1001/jama.300.11.1303>
- [8] V. Bindhumol, K. C. Chitra, P. P. Mathur, *Toxicology* **2003**, 188, 117. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00056-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00056-8)
- [9] C. Weinhouse, O. S. Anderson, I. L. Bergin, D. J. Vandenberg, J. P. Gyekis, M. A. Dingman, J. Yang, D. C. Dolinoy, *Environ. Health Perspect.* **2014**, 122, 485. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307449>
- [10] J. S. Jeong, K. T. Nam, B. Lee, A. D. Pamungkas, D. Song, M. Kim, W. J. Yu, J. Lee, S. Jee, Y. H. Park, K. M. Lim, *Biomol. Ther.* **2017**, 25, 545. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.148>
- [11] Y. Nakagawa, S. Tayama, *Arch. Toxicol.* **2000**, 74, 99. <https://doi.org/10.1007/s002040050659>
- [12] H. Ooe, T. Taira, S. M. M. Iguchi-Aruga, H. Ariga, *Toxicol. Sci.* **2005**, 88, 114. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi278>
- [13] L. Huc, A. Lemarié, F. Guéraud, C. Héliers-Toussaint, *Toxicol. In Vitro* **2012**, 26, 709. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.03.017>
- [14] J. Zhuo, H. B. Wei, F. J. Zhao, F. Sun, B. M. Han, X. W. Sun, S. J. Xia, *PLoS One* **2014**, 29, 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090443>
- [15] M. Sturgill, G. Lambert, *Clin. Chem.* **1997**, 43, 1512. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31818e3d75.vr00000542-200812000-00005>
- [16] M. Najimi, X. Stephenne, C. Sempoux, E. Sokal, *World J. Gastroenterol.* **2014**, 20, 1554. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1554>
- [17] J. Garcia-Bermudez, L. Baudrier, K. La, X. G. Zhu, J. Fidelin, V. O. Sviderskiy, T. Papagiannakopoulos, H. Molina, M. Snuderl, C. A. Lewis, R. L. Possemato, K. Birsoy, *Nat. Cell Biol.* **2018**, 20, 775. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0118-z>
- [18] D. Häussinger, F. Lang, *J. Cell. Biochem.* **1990**, 43, 355.
- [19] P. Newsholme, M. M. R. Lima, J. Procopio, T. C. Pithon-Curi, S. Q. Doi, R. B. Bazotte, R. Curi, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2003**, 36, 153. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003000200002>
- [20] J. Brosnan, M. Brosnan, *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, 90, 857S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462z>
- [21] B. Häussinger, S. Stoll, H. McNelly, P. Buscher, *Hepatology* **1991**, 13, 247.
- [22] E. López-Bayghen, S. Rosas, F. Castelan, A. Ortega, *Neuron Glia Biol.* **2007**, 3, 155. <https://doi.org/10.1017/S1740925X0700066X>
- [23] Z. Martínez-Lozada, L. C. Hernández-Kelly, J. Aguilera, E. López-Bayghen, A. Ortega, *Neurochem. Int.* **2011**, 59, 871. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.07.015>
- [24] M. I. González, A. Ortega, *J. Neurosci. Res.* **1997**, 50, 585. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19971115\)50:4<585::AID-JNR9>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19971115)50:4<585::AID-JNR9>3.0.CO;2-A)

- [25] S. Rosas, M. A. Vargas, E. López-Bayghen, A. Ortega, *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 1134. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04517.x>
- [26] H. Abe, T. Ogawa, L. Wang, M. Kimura, T. Tanaka, R. Morita, T. Yoshida, M. Shibutani, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *280*, 467. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.08.013>
- [27] P. Karki, A. Webb, K. Smith, J. Johnson, K. Lee, D. S. Son, M. Aschner, E. Lee, *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*, 1280. <https://doi.org/10.1128/MCB.01176-13>
- [28] J. K. Mueller, S. Heger, *Reprod. Toxicol.* **2014**, *44*, 73. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.10.011>
- [29] W. Wang, J. Wang, Q. Wang, W. Wu, F. Huan, H. Xiao, *J. Membr. Biol.* **2013**, *246*, 391. <https://doi.org/10.1007/s00232-013-9545-8>
- [30] R. Gonçalves, A. P. Zanatta, F. C. Cavalari, M. A. W.doNascimento, C. Delalande-Lecapitaine, H. Bouraïma-Lelong, F. R. M. B. Silva, *Reprod. Toxicol.* **2018**, *77*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.02.009>
- [31] E. López-Bayghen, A. Ortega, *J. Neurochem.* **2004**, *91*, 200. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02706.x>
- [32] J. Bursztyka, E. Perdu, K. Pettersson, I. Pongratz, M. Fernández-Cabrera, N. Olea, L. Debrauwer, D. Zalko, J. P. Cravedi, *Toxicol. In Vitro* **2008**, *22*, 1595. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.06.013>
- [33] Q. X. Hu, S. Ottestad-Hansen, S. Holmseth, B. Hassel, N. C. Danbolt, Y. Zhou, *J. Histochem. Cytochem.* **2018**, *66*, 189. <https://doi.org/10.1369/0022155417749828>
- [34] Y. Zhou, N. C. Danbolt, *Front. Neuroendocrinol.* **2013**, *4*, 1. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00165>
- [35] M. Ruiz, A. Ortega, *NeuroReport* **1995**, *6*, 2041.
- [36] M. I. González, A. Ortega, *Brain Res.* **2000**, *866*, 73. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02226-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02226-5)
- [37] T. N. Olivares-Bañuelos, D. Chí-Castañeda, A. Ortega, *Neuropharmacology* **2019**, *161*, 107550. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2019.02.032>
- [38] D. Martínez, L. García, J. Aguilera, A. Ortega, *Neurochem. Res.* **2014**, *39*, 142. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1198-6>
- [39] W. Völkel, T. Colnot, G. A. Csanády, J. G. Filser, W. Dekant, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1281. <https://doi.org/10.1021/tx025548t>
- [40] P. Karki, C. Kim, K. Smith, D. S. Son, M. Aschner, E. Lee, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 23725. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.649327>
- [41] M. Watford, *J. Nutr.* **2000**, *130*, 983S.
- [42] A. Gadea, E. López, A. M. López-Colomé, *Neurochem. Res.* **2004**, *29*, 295. <https://doi.org/10.1023/B:NERE.000010458.45085.e8>
- [43] T. Nishiyama, K. Ogura, H. Nakano, T. Kaku, E. Takahashi, Y. Ohkubo, K. Sekine, A. Hiratsuka, S. Kadota, T. Watabe, *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2002**, *17*, 221. <https://doi.org/10.2133/dmpk.17.221>
- [44] J. G. Teeguarden, A. M. Calafat, X. Ye, D. R. Doerge, M. I. Churchwell, R. Gunawan, M. K. Graham, *Toxicol. Sci.* **2011**, *123*, 48. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr160>
- [45] K. A. Thayer, D. R. Doerge, D. Hunt, S. H. Schurman, N. C. Twaddle, M. I. Churchwell, S. Garantziotis, G. E. Kissling, M. R. Easterling, J. R. Bucher, L. S. Birnbaum, *Environ. Int.* **2015**, *83*, 107. <https://doi.org/10.1186/s40945-017-0033-9>
- [46] E. B. Yalcin, S. R. Kulkarni, A. L. Slitt, R. King, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *292*, 75. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.009>
- [47] World Health Organization. Bisphenol A (BPA)-Current state of knowledge and future actions by WHO and FAO, International Food Safety Authorities Network (INFOSAN), **2010**.
- [48] R. C. Zepeda, I. Barrera, F. Castelán, A. Soto-Cid, L. C. Hernández-Kelly, E. López-Bayghen, A. Ortega, *Neurochem. Res.* **2008**, *33*, 1277. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9580-x>
- [49] M. Zhang, Y. Zhang, S. Yang, J. Zhou, W. Gao, X. Yang, D. Yang, Z. Tian, Y. Wu, B. Ni, *Semin. Liver Dis.* **2017**, *37*, 363. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1607451>

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Jiménez-Torres C, Hernández-Kelly LC, Najimi M, Ortega A. Bisphenol A exposure disrupts aspartate transport in HepG2 cells. *J Biochem Mol Toxicol.* 2020:e22516. <https://doi.org/10.1002/jbt.22516>



DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA  
Coordinación Académica

**FORMATO DE EVALUACIÓN DE TESIS**

Nombre del estudiante: **Ana Catya de Jesús Jiménez Torres**

Título de la Tesis: **“REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO EN EL DAÑO HEPÁTICO”**

Evaluación: **Aprobada**

- Aprobada con modificaciones menores  
(No requiere revisión ulterior)
- Aprobada con modificaciones mayores  
(Requiere revisión ulterior)

Lugar y Fecha: CDMX a 20 de julio de 2020

Nombre y Firma del Sinodal:

Dra. Esther Ivonne López Bayghen Patiño





DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA  
Coordinación Académica

**FORMATO DE EVALUACIÓN DE TESIS**

Nombre del estudiante: **Ana Catya de Jesús Jiménez Torres**

Título de la Tesis: **“REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO EN EL DAÑO HEPÁTICO”**

Evaluación:

Aprobada

Aprobada con modificaciones menores  
(No requiere revisión ulterior)

Aprobada con modificaciones mayores  
(Requiere revisión ulterior)

Lugar y Fecha: Ciudad de México a 17 de julio de 2020

  
Dra. Isabel Hernández Ochoa

Nombre y Firma del Sinodal: \_\_\_\_\_





DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA  
Coordinación Académica

**FORMATO DE EVALUACIÓN DE TESIS**

Nombre del estudiante: **Ana Catya de Jesús Jiménez Torres**

Título de la Tesis: **“REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO EN EL DAÑO HEPÁTICO”**

Evaluación:



Aprobada



Aprobada con modificaciones menores  
(No requiere revisión ulterior)



Aprobada con modificaciones mayores  
(Requiere revisión ulterior)

Lugar y Fecha:

CDM 8/07/20 a 8 de Julio de 2020

Nombre y Firma del Sinodal:

SALV VILLATREVIÑO



DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA  
Coordinación Académica

## FORMATO DE EVALUACIÓN DE TESIS

Nombre del estudiante: **Ana Catya de Jesús Jiménez Torres**

Título de la Tesis: **“REGULACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO EN EL DAÑO HEPÁTICO”**

Evaluación:

- Aprobada
- Aprobada con modificaciones menores  
(No requiere revisión ulterior)
- Aprobada con modificaciones mayores  
(Requiere revisión ulterior)

Lugar y Fecha: Tlaxcala, Tlaxcala a 2 de julio de 2020

Nombre y Firma del Sinodal:

  
Francisco Castellán