



Evaluación y desarrollo de modelos *in vitro* para la predicción de neurotoxicidad. Aproximación proteómica a la neurotoxicidad inducida por metilmercurio.

Tesis Doctoral presentada por

**Iolanda Vendrell Monell**

Barcelona, 2006

---

## **INTRODUCCIÓN**

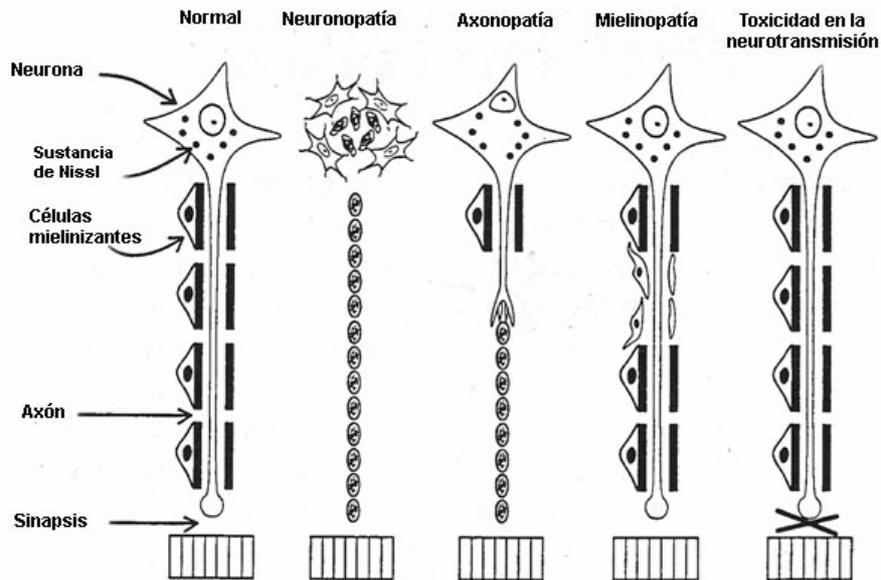


## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.- Evaluación de la neurotoxicidad inducida por compuestos químicos**

La neurotoxicología estudia el conjunto de alteraciones funcionales o estructurales inducidas por la exposición a agentes químicos, biológicos o físicos que afectan al sistema nervioso (SN) (OTA 1990, OECD 2000). Pequeños cambios anatómicos, bioquímicos o fisiológicos en el SN pueden derivar en efectos adversos para la salud humana. Los cambios biológicos, responsables de la alteración funcional y estructural del SN provocados por la exposición a un agente neurotóxico, son observables después de que el tóxico entre en el organismo, circule en él y llegue a su sitio de acción donde interaccionará con dianas específicas. Aquellas sustancias que atraviesen la barrera hematoencefálica (BHE) pueden afectar al SN. Es por esto, que durante el desarrollo, cuando la BHE no está totalmente formada, el SN es especialmente vulnerable a ser atacado por agentes tóxicos. Las neuronas son especialmente vulnerables a los agentes neurotóxicos ya que contienen multitud de elementos que pueden actuar como dianas de acción. Las consecuencias derivadas de la exposición a un agente neurotóxico dependen de la concentración del compuesto, de la frecuencia y duración de la exposición, de la diana donde actúa y de la vía neuronal afectada. Debe tenerse en cuenta que la respuesta neurotóxica a una exposición única a dosis elevadas del tóxico no predice la existencia ni el tipo de respuesta que puede producirse tras exposiciones repetidas a bajas dosis del mismo compuesto.

El daño neurotóxico puede clasificarse en 4 tipos según cuál sea la diana del agente tóxico (figura 1.1). Así pues, podemos hablar de neuronopatía o muerte global de la neurona (asociada a una proliferación astrocítica), de axonopatía, de mielinoopatía o de toxicidad en la transmisión cuando las neuronas, los axones, las células mielinizantes o la transmisión nerviosa son las dianas de acción del agente neurotóxico, respectivamente (Anthony et al. 2001).



**Figura 1.1.-** Patrón del daño neurotóxico. Esquema modificado de Anthony et al. 2001

Los efectos neurotóxicos son observables a 4 niveles de organización del SN: a nivel neuroquímico, anatómico, fisiológico y de comportamiento. A nivel neuroquímico, los efectos neurotóxicos pueden traducirse en la inhibición de la síntesis y degradación de neurotransmisores, en la alteración del flujo de iones a través de la membrana, en la alteración de la liberación de neurotransmisores en las terminales nerviosas, etc. A nivel anatómico, los efectos neurotóxicos pueden afectar al cuerpo neuronal, al axón o a la capa de mielina. A nivel fisiológico, los cambios inducidos pueden afectar los umbrales de activación neuronal o reducir la velocidad de la transmisión nerviosa. Finalmente, las alteraciones a nivel de comportamiento pueden afectar a los sentidos (oído, vista y tacto); a las funciones motoras y cognitivas (memoria, aprendizaje y atención); provocar cambios en el estado de ánimo, desorientación (personal, temporal o espacial) o alteraciones en los sentimientos y pensamientos (US EPA 1998).

Los agentes tóxicos pueden ser clasificados en agentes primarios o secundarios según si no requieren o requieren ser metabolizados para poder interactuar con sus dianas, respectivamente. Por otro lado, los efectos adversos pueden ser directos o indirectos según si los compuestos o sus metabolitos actúan directamente sobre alguna diana localizada en el SN o, por el contrario, lo hacen sobre las dianas localizadas fuera del SN aunque su acción repercute a nivel del SN, respectivamente. La definición de los efectos adversos indirectos generalmente deriva de las exposiciones únicas a dosis elevadas del compuesto tóxico cercanas a la dosis letal. (US EPA 1998, OECD 2000).

Recientemente, la Unión Europea ha aprobado una nueva legislación para el Registro, la Evaluación y la Autorización de Compuestos Químicos (REACH) computados en unos 30.000 compuestos. El objetivo principal de esta normativa europea es asegurar un elevado nivel de protección de la salud y del medio ambiente en relación con la circulación de sustancias, existentes o nuevas, fabricadas o importadas, en la Unión Europea. Para ello, se ha creado un sistema integrado único de registro, evaluación y autorización de sustancias químicas, incluidas aquellas sustancias que representen un peligro toxicológico. Este puede ser el caso de sustancias cancerígenas, de sustancias persistentes, bioacumulables y tóxicas, y sustancias con efectos irreversibles sobre el ser humano y el medio ambiente como por ejemplo los alteradores endocrinos ([http://europa.eu/index\\_es.htm](http://europa.eu/index_es.htm), Council of the European Union, 2005, Combes et al. 2006). Los productos químicos contribuyen en mejorar las condiciones de vida humana al mismo tiempo que pueden perjudicarla. Se estima que entre el 3 y el 28 % de todos los compuestos químicos existentes son potencialmente neurotóxicos (EPA 1998).

En la actualidad, existen distintas directivas internacionales propuestas por la Comunidad Europea y por la Organización Económica de Cooperación y Desarrollo (OECD, *Organization for Economic Co-operation and Development*) para la evaluación de neurotoxicidad. Estas directivas regulan la utilización de ensayos en modelos animales para evaluar las funciones neuronales de comportamiento así como métodos neuropatológicos, neurofisiológicos y neuroquímicos. Los marcadores o “end-points” utilizados para evaluar las alteraciones en el comportamiento están relacionados con la evaluación de la actividad motora, de las funciones neuromotoras y sensoriales, del proceso de aprendizaje, de la memoria y atención, y del efecto de los fármacos. Los marcadores utilizados para evaluar las alteraciones neurofisiológicas se centran en el análisis de la actividad eléctrica del SN mediante la determinación de la función de los nervios periféricos, de la actividad convulsionante, de los potenciales sensoriales evocados y de los reflejos, electroencefalográfico y electromiográfico, del funcionamiento de los canales iónicos y de la transmisión sináptica, de la detección de las alteraciones neurológicas que afecten al músculo esquelético o a los nervios periféricos. Por último, los métodos utilizados para la evaluación de las alteraciones neuroquímicas incluyen la determinación de parámetros bioquímicos generales, de la inhibición de enzimas específicas como por ejemplo la acetilcolinesterasa (AChE) o la esterasa diana de neuropatías (NTE), de marcadores específicos celulares, de marcadores de las alteraciones a nivel estructural y de los factores neuroendocrinos, principalmente a nivel

de hipotálamo (WHO 2001). De manera específica, existen ensayos regulados para evaluar la toxicidad de los compuestos organofosforados (OP) con potencial de inducir la polineuropatía retardada, basados en el ensayo bioquímico de actividad de esterasas neurales, en la evaluación de la aparición de necrosis en la médula espinal o cerebro y en un examen histopatológico del cerebelo, de la médula oblongata y espinal, y de los nervios periféricos (Dir 96/54/EC B37 y B38; OECD nº 418 y 419). Otra regulación específica, es la que regula la recogida, el almacenamiento, el transporte y la distribución de moluscos bivalvos vivos y de otras especies marinas con el objetivo de proteger la salud del consumidor frente la presencia de la toxina de paralizante (PSP) (Dir 91/492/EEC enmendada en Dir 2002/226/EC).

## **1.2.- Métodos alternativos al uso de animales de experimentación**

En 1959 dos científicos ingleses, Russell y Burch, definieron el principio de las 3 R (reducir, refinar y reemplazar) en el libro *"Principles of Humane experimental technique"*, principio que ha resultado ser la fuerza motora para el desarrollo de métodos alternativos al uso de animales en la experimentación. El objetivo de este principio es: **Reemplazar** las técnicas que usan animales en la experimentación por métodos que no requieran el uso de animales (métodos no animales), **Reducir** el número de animales y **Reformar** las técnicas y los procedimientos para reducir el dolor y el estrés de los animales. A su vez, el concepto reemplazar puede dividirse en modelos de sustitución relativos (dependientes todavía de animales donadores de sus órganos, sus tejidos o sus células) o absolutos (métodos que no precisen del material procedente de animales vertebrados).

Desde la aparición del principio de las 3 R, se han constituido distintas organizaciones internacionales cuyo objetivo es promover el desarrollo y la validación de técnicas alternativas que aporten el mismo nivel de información que el aportado por los estudios realizados con animales contribuyendo así, al desarrollo del principio de las 3 R. El ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, CE), el ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee for the Evaluation of Alternative Methods*, USA) y la sección de Medio Ambiente de la OECD son las entidades de referencia en este campo para la Unión Europea, Estados Unidos y a nivel internacional, respectivamente. A nivel nacional, los organismos existentes son por ejemplo el FRAME (*Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments*, Reino Unido), el ZEBET (*Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments*, Alemania), el NCA

(*Netherlands Centre for Alternative to Animal Use*, Holanda), el ERGATT (*European Research Group for Alternatives to Animal Testing*), el SIAT (*the Swiss Institute for Alternatives to Animal Testing*, Suiza), el REMA (*Red Española de Métodos Alternativos*, España) y el CAAT (*Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing*, Estados Unidos). Además, en 1986, la Comunidad Europea publicó una directiva (Dir 86/609/EEC) sobre la utilización de animales en la experimentación y el desarrollo de modelos no animales.

El proceso de adopción de un método alternativo implica la existencia de una fase de desarrollo del método en la cual se establece la reproducibilidad y relevancia del ensayo de toxicidad que debe contener, además, un modelo de predicción. A continuación sigue una fase de prevalidación realizada en condiciones de ciego, entre el desarrollo del método y la validación formal, que dará lugar, finalmente a una aceptación y regulación del mismo. El objetivo del proceso de validación es confirmar que el método alternativo aceptado proporciona la información necesaria para valorar el riesgo toxicológico de los compuestos químicos (OECD 1996, Spielmann y Liebsch 2002).

Recientemente, se ha introducido una nueva visión del proceso de validación para que permita validar nuevos modelos y ensayos *in vitro* como respuesta a la aparición de nuevas tecnologías (la genómica y la proteómica) y de modelos teóricos computacionales (como por ejemplo QSAR, *Quantitative Structure Activity Relationship*) para la predicción de toxicidad. Es por esto, que el proceso de validación se divide en siete módulos que proporcionan la información suficiente procedente, bien de datos existentes (validación retrospectiva) o bien de una validación prospectiva (dividida en una fase de desarrollo, de prevalidation, de validación, de peer review y de regulación) o bien por una combinación de ambas, para validar un método cuya valoración será realizada por un grupo de gestión de la validación (*Validation Management Group*). Los módulos incluidos en la fase de validación se centran en: (1) la definición del ensayo (descripción del objetivo científico, de las bases del método y del protocolo de trabajo en el que se incluyen los marcadores a analizar y la interpretación de los resultados en base a un modelo de predicción); (2) la variabilidad intra-laboratorio que permita valorar la reproducibilidad de los resultados en un mismo laboratorio (diferentes operadores, diferentes veces); (3) la transferibilidad del método que permita evaluar la reproducibilidad de los resultados realizados en un laboratorio distinto del que ha desarrollado el método (diferentes operadores); (4) la variabilidad inter-laboratorio determinada mediante el ensayo de un número limitado de

sustancias de amplio espectro que cubran distintas clases químicas y efectos tóxicos en 2 – 4 laboratorios distintos (varios operadores, distintas veces); (5) la capacidad de predicción de la toxicidad para un compuesto determinado; (6) el ámbito de aplicabilidad, es decir, definir para qué clases químicas y/o marcadores de toxicidad el método puede generar modelos de predicción; (7) y finalmente la verificación del método con estándares o compuestos químicos de referencia que permitan verificar los resultados obtenidos por el nuevo método y un método validado existente. La evaluación satisfactoria de estos siete módulos permitirá el avance del método hacia la aceptación y regulación (Hartung et al. 2004). La validación y regulación de los métodos alternativos se realiza a través de instituciones a nivel nacional, a nivel europeo por ECVAM y a nivel internacional por la OECD.

Hasta hoy existen 16 métodos científicos *in vitro* validados por la Comunidad Europea, seis de los cuales han sido aprobados durante el primer trimestre del presente año. Estos métodos están relacionados con la evaluación del potencial tóxico de compuestos químicos relacionados con la corrosividad dérmica, la fototoxicidad, la embriotoxicidad y con ensayos para la producción de anticuerpos monoclonales, la evaluación de la potencia de las vacunas contra el tétanos, la predicción de neutropenia aguda en humanos, la evaluación de productos anticancerígenos con el fin de regular las dosis y finalmente para la identificación de la presencia de posibles contaminantes en fármacos (ensayos de pirogenicidad) (<http://ecvam.jrc.it/index.htm>). En Estados Unidos, los métodos en proceso de validación o validados están relacionados con la toxicidad aguda, la irritación y la corrosividad dérmica, la toxicidad en el desarrollo, la inmunotoxicidad, la toxicidad ocular, la fototoxicidad, la pirogenicidad los alteradores endocrinos (<http://iccvam.niehs.nih.gov/>). En el año 2003, la Comunidad Europea prohibió el uso de animales en la industria cosmética para la evaluación del producto final y para el año 2009 prevé la prohibición total de la utilización de animales para la evaluación de ingredientes cosméticos.

### **1.2.1.- Métodos alternativos en el campo de la neurotoxicología**

El sistema nervioso es uno de los sistemas / órganos diana de muchos compuestos químicos. La evaluación de los efectos tóxicos de xenobióticos en el sistema nervioso (SN) es una tarea difícil de realizar debido a su complejidad e inaccesibilidad. Cambios a

nivel bioquímico, funcional y / o estructural del SNC o SNP pueden ser signo del desarrollo de un proceso neurotóxico.

Actualmente existe un sinfín de modelos neuronales *in vitro* de distintos tipos que pueden ser útiles en la evaluación de la neurotoxicidad: los cultivos primarios de células neuronales (de distintas regiones del cerebro) y gliales (de microglía, de astrocitos y de oligodendrocitos); cultivos de células madre; cultivos mixtos (por ejemplo de neurona-glía), líneas celulares; modelos celulares más complejos como los cultivos organotípicos o los modelos 3D (reagregados celulares, explantes, rodajas de hipocampo y cultivos micromasa) que permiten estudiar la interacción entre distintos tipos celulares (Stacey y Viviani 2001). Además, el desarrollo de modelos *in vitro* de la barrera hematoencefálica (BHE) permite la evaluación de aquellos compuestos capaces de atravesarla y, en consecuencia, de poder actuar en el SN y producir neurotoxicidad (Prieto et al. 2004).

Los métodos *in vitro* no son capaces de cubrir todo el rango de funciones neurobiológicas observadas en modelos *in vivo* (como por ejemplo la capacidad cognitiva, la coordinación motora, el procesamiento sensorial e integrativo). Así pues, el significado de los resultados *in vitro* debe interpretarse en el contexto de un SN integrado y relacionado con los efectos neurotóxicos *in vivo*. No obstante los métodos *in vitro* aportan información muy valiosa sobre el mecanismo de acción del tóxico y sobre la base biológica de su neurotoxicidad (Atterwill et al. 1994, US EPA 1998, OECD 2000, Stacey y Viviani 2001, Hartung 2004). Por otra parte, los métodos *in vitro*, carecen de la capacidad de metabolizar compuestos químicos y de barreras biológicas como la BHE, presentes en los modelos *in vivo*, con lo cual la extrapolación de los resultados *in vitro* debe realizarse teniendo en cuenta estos dos factores. El desarrollo de modelos *in vitro* de BHE que permiten evaluar la capacidad de los tóxicos en atravesarla y de sistemas de metabolización contribuirán a la mejora de la capacidad de extrapolación (Abdulla y Campbelli 1993, Barber et al. 1999a, Stacey y Viviani 2001, Prieto et al. 2004).

El programa de Evaluación de citotoxicidad *in vitro* realizado por distintos centros (MEIC, *Multicentre Evaluation of In vitro Cytotoxicity*), cuyo objetivo se centró en estudiar si los resultados de citotoxicidad de los compuestos obtenidos mediante la utilización de métodos *in vitro* podían ser utilizados como modelos de predicción de toxicidad aguda en humanos, mostró una buena correlación entre ambos parámetros en un 86 % de los compuestos estudiados. Para el resto de compuestos (outliers), no se observó tal

correlación y los métodos de citotoxicidad subvaloraron la toxicidad aguda en humanos, indicando que o bien estos compuestos alteraban funciones específicas celulares que no conducían a la muerte celular o que las células en las que se basó el ensayo no eran susceptibles al efecto de los agentes tóxicos, o que los compuestos requerían metabolización previa. Algunos de los compuestos para los que no se observó la correlación entre la citotoxicidad *in vitro* y la toxicidad en humanos (paracetamol, digoxina, malation, nicotina, paraquat, atropina y cianuro de potasio) son, en realidad, compuestos neurotóxicos (Ekwall et al. 1999, Cledmenson et al. 2002, Walum et al. 2005).

En el año 2000, el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, EU) propuso la elaboración de una base de datos de métodos alternativos no animales en el campo de la neurotoxicología, con el objetivo de proponer métodos útiles para evaluar el daño neurotóxico de compuestos químicos y formulaciones. Esta propuesta dio lugar al proyecto "Database on alternative methods to animal experiments in the field of non-animal neurotoxicity testing of chemicals and/or formulations" (17132-2000-11F1SC ISP ES), los resultados del cual se muestran en el apartado 4.1.

### **1.3.- Aplicación de las técnicas de proteómica como herramienta para la detección de nuevos marcadores de toxicidad**

La secuenciación del genoma de un alto número de especies ha conducido a lo que se llama la era de la post-genómica. En 1994, Wilkins encunó el término proteoma como equivalente lingüístico al concepto de genoma (Simpson 2005). El proteoma define el conjunto de **proteínas** codificadas por el **genoma** en una célula, tejido u órgano. Éste, a diferencia del genoma, es dinámico y está directamente afectado por factores ambientales y fisiológicos como el estrés, por agentes tóxicos y/o por fármacos (Issaq et al. 2001, Chen et al. 2002). Así pues, la proteómica es la ciencia que se encarga del estudio del proteoma en general y en particular de los cambios sufridos en él debido a enfermedades, a la edad y a factores ambientales (Lubec et al. 2003, Beranova-Giorgianni et al. 2002, Vlahou y Fountoulakis 2004). De forma general la proteómica puede dividirse en proteómica de expresión y proteómica funcional. La primera se encarga de la identificación y cuantificación de todas las proteínas codificadas por un genoma concreto, de su localización y de las modificaciones post-transduccionales. En

cambio, la proteómica funcional estudia las interacciones entre proteínas, su localización en una ruta específica o en una estructura celular además de su propia estructura y función (Wang y Hanash 2003). Si bien la genómica proporciona información sobre la actividad génica y su relación con las enfermedades, no informa ni de la abundancia, ni de la estructura final ni de la función de las proteínas.

La utilización de la proteómica en el campo de la biomedicina ha experimentado un creciente desarrollo en los últimos años ya que las alteraciones en la abundancia, estructura o función de las proteínas son indicativas de la aparición de anomalías patológicas anteriores al desarrollo de síntomas clínicos. Es por esto que la identificación de estos cambios puede ser utilizado como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de distintas enfermedades (como por ejemplo del cáncer, de enfermedades neurológicas, cardíacas y renales) (Traum y Schachter 2005).

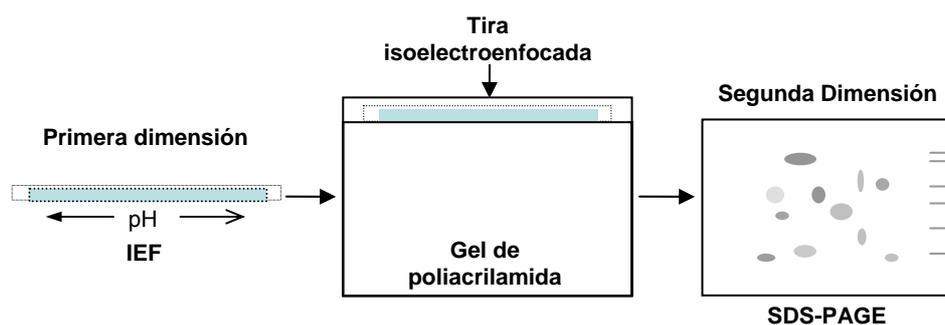
Paralelamente, la aplicación de las técnicas de proteómica en el campo de la neurociencia ha permitido la creación de bases de datos de referencia de las proteínas expresadas en distintas regiones y estadios de desarrollo del cerebro de mamíferos. Por otra parte, la utilización de estas técnicas ha permitido también la detección de los cambios producidos a nivel del proteoma debidos al estrés oxidativo, a fármacos, a la exposición a sustancias tóxicas, al envejecimiento o a enfermedades (Fountoulakis et al. 1999, Gauss et al. 1999, Langen et al. 1999, Friso y Wikström 1999, Taoka et al. 2000, Beranova-Giorgianni et al. 2002, Fountoulakis et al. 2002, Oguri et al. 2002, Krapfenbauer et al. 2003, Lubec et al. 2003, Yu et al. 2004, Yang et al. 2004, Kim et al. 2004, Vlahou y Fountoulakis et al. 2005, Yang et al. 2005a,b, Fountoulakis et al. 2005, Shin et al. 2005, Pollak et al. 2005, Chatterjee y Chatterjee, 2005, Xixi et al. 2006).

En contraposición, hasta la actualidad, son pocas las referencias existentes de la utilización de la proteómica en el campo de la neurotoxicología. La utilización de las herramientas proteómicas puede ayudar en la identificación de los efectos nocivos inducidos por compuestos químicos potencialmente neurotóxicos sobre el proteoma celular bien sea afectando a las modificaciones post-traduccionales o modificando la expresión proteica. Al mismo tiempo, la utilización de estas técnicas puede contribuir a la identificación de marcadores de toxicidad (para revisión ver LoPachin et al. 2003, Lubec et al. 2003, Wallace 2005, Barrier y Mirkes 2005). La utilización de las técnicas de proteómica, y en particular la electroforesis en gel bidimensional (2DE) combinada con la

espectrometría de masas, permitió detectar proteínas cuya expresión fue incrementada o disminuida en extractos de proteínas de cerebro de animales expuestos a compuestos químicos tóxicos como el ácido kaínico, la metanfetamina o al contaminante ambiental organo-halógeno pentabromodifenil éter (Krapfenbauer et al. 2001, Liao et al. 2005 y Alm et al. 2006).

### **1.3.1.- Separación de proteínas por electroforesis bidimensional**

Para elaborar un estudio proteómico, con el fin de evaluar las alteraciones producidas a nivel del proteoma celular en condiciones específicas, es preciso separar las proteínas que constituyen el proteoma. La electroforesis en gel bidimensional (2DE) es una de las técnicas más utilizadas para realizar dicha separación. Esta técnica de separación, descrita simultáneamente por O'Farrell y por Klose en 1975 (Klose 1975, O'Farrell 1975), permite el análisis de mezclas proteicas complejas generalmente extraídas de células, tejidos, fluidos y de otras muestras biológicas. La 2DE se lleva a cabo aplicando de forma secuencial dos procesos de separación electroforéticos basados en distintas propiedades fisicoquímicas de las proteínas, consiguiéndose de esta manera un alto poder de separación. En la denominada primera dimensión, las proteínas se separan según el punto isoeléctrico (pI) mediante la técnica de isoelectroenfoque (IEF) y en la segunda dimensión las proteínas se separan en función del peso molecular (PM) mediante la electroforesis en gel en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (figura 1.2). La 2DE es el método de separación más utilizado en las aproximaciones proteómicas ya que permite visualizar de forma paralela los mapas proteicos de distintas situaciones experimentales. Muchas de las limitaciones de la técnica se han ido corrigiendo con los años, haciéndola más adecuada a los requerimientos de la proteómica (Gorg et al. 2004). Así pues, el uso de anfolitos inmovilizados para el IEF produce separaciones de alta resolución y muy reproducibles, lo que ha permitido generar bases de datos de geles 2DE de muchos organismos y tejidos. El estudio de las proteínas con pI extremos se ha ido también mejorando con el uso de estos nuevos soportes para IEF y mediante la optimización de los protocolos de trabajo. Por otro lado, la detección de las proteínas de muy baja concentración puede mejorarse utilizando métodos de prefraccionamiento y enriquecimiento de la muestra inicial.

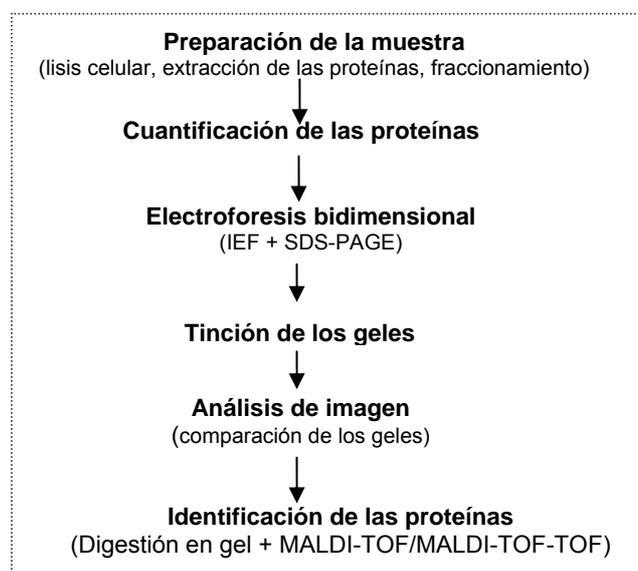


**Figura 1.2.-** Esquema de la electroforesis bidimensional (2DE)

Tras la separación de las proteínas, es necesario visualizar las proteínas en los geles 2DE. Para ello se utilizan métodos de tinción visibles (tinción con nitrato de plata, azul de coomassie o tinción negativa con zinc-imidazol), fluorescentes (SYPRO) o radioactivos. Algunos de estos métodos permiten la digestión *in situ* de las proteínas en el gel de forma muy efectiva. El método de tinción de plata ha sido el más utilizado por su alta sensibilidad (< 10 ng frente > 100 ng del azul de coomassie) si bien posee un rango dinámico muy bajo y no es una tinción de punto final (si se alarga el tiempo de tinción, los geles acaban oscureciendo). Actualmente, los métodos fluorescentes están tomando más importancia ya que son tinciones de punto final y presentan un rango dinámico más alto (tres ordenes de magnitud) (Dongrey et al. 2001, Gorg et al. 2004, Thongboonkerd y Klein 2004). Las imágenes obtenidas después del proceso de tinción muestran el conjunto de proteínas separadas como diferentes manchas distribuidas en un espacio bidimensional (gel). Generalmente, estas imágenes son complejas y la utilización de programas informáticos de análisis de imagen facilita la comparación de los geles controles y problema con el fin de localizar manchas con intensidades diferentes que podrían ser potenciales marcadores de toxicidad.

Una variante de esta técnica es el método DIGE (*Differential In Gel Electrophoresis*). En este caso, la muestra control, problema y una mezcla de ambas (utilizada como estándar interno) se tiñen con tres fluoróforos distintos. A continuación, las muestras teñidas se mezclan en un mismo tubo y se separan en el mismo gel bidimensional. La monitorización de la imagen mediante tres longitudes de onda de excitación distintas permite determinar, de forma rápida y menos tediosa, la proporción de cada mancha en el mismo gel procedente de cada situación. Por otro lado, la presencia del estándar interno permite normalizar la cuantificación al mismo tiempo que aporta una elevada precisión de los resultados cuantitativos (Gorg et al. 2004). En la figura 1.3 se detalla de

forma esquemática el protocolo general para realizar un estudio proteómico basado en la electroforesis bidimensional.



**Figura 1.3.-** Esquema de los pasos necesarios para realizar un estudio proteómico basado en la 2DE.

Existen otras técnicas de separación de proteínas como la separación multidimensional en fase líquida (MDLC) que permite la separación de mezclas de péptidos tras combinar 2 o más etapas de separación realizadas por electroforesis capilar o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La MDLC es una técnica reproducible, automatizable y rápida que permite superar algunas de las limitaciones del 2DE. Además, el acoplamiento de esta metodología a espectrómetros de masas permite analizar un proteoma en poco tiempo (Wang y Hanash 2003, Issaq et al. 2005). No obstante, actualmente la separación multidimensional en fase líquida es una técnica en desarrollo, que precisa instrumentación y softwares caros además de personal altamente especializado.

### **1.3.2.- Identificación de proteínas por espectrometría de masas**

Independientemente del tipo de método utilizado para la separación de las proteínas, la identificación de los péptidos se realiza siempre por espectrometría de masas. Esta técnica se basa en la producción de iones en fase gaseosa a partir de moléculas orgánicas o inorgánicas, la clasificación de los mismos en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ) y la cuantificación de su intensidad. Con esta información se puede determinar el peso molecular (PM) y la abundancia de los componentes de una mezcla y tener una idea de su estructura química.

Un espectrómetro de masas consta de 3 componentes: la fuente de iones, el analizador y el detector. Las muestras se introducen en la fuente de iones donde las moléculas son convertidas en iones en fase gaseosa. A continuación, estos iones pasan al analizador donde son acelerados y separados en función de la relación  $m/z$ , y finalmente el detector determina el número de iones para cada valor de  $m/z$ . Existen distintos tipos de fuentes de ionización y analizadores. Los diferentes espectrómetros disponibles son el resultado de la combinación de estos dos elementos. En proteómica, los sistemas de ionización utilizados son la ionización por desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI) y por electrospray (ESI). Existen cuatro tipos de analizadores: de sectores (eléctricos y/o magnéticos), de cuadrupolo (Q), de tiempo de vuelo (TOF) y de atrapamiento de iones (trampas iónicas y resonancia ciclotrónica) (Traum et al. 2005, Vlahou y Fountoulakis 2005, Simpson 2005).

#### 1.3.2.1.- Mapeo peptídico por MALDI-TOF

En el caso de especies cuyo genoma se conoce, generalmente las proteínas son identificadas por mapeo peptídico utilizando MALDI-TOF. En esta técnica, la ionización de péptidos (producto de la digestión previa de las proteínas con tripsina) por MALDI se lleva a cabo mediante la irradiación de la muestra (previamente cocrystalizada junto con una matriz adecuada) con pulsos de luz láser de longitudes de onda en el IR o UV. Las funciones de la matriz son incorporar y dispersar las moléculas del analito, y absorber la energía de radiación para producir iones mediante reacciones fotoquímicas. En la ionización por MALDI se generan iones monocargados derivados de la protonación o desprotonación de las moléculas, a pesar de observar también iones con 2 o más cargas en el caso de proteínas con  $PM > 5000$  Da. El método estándar para el análisis de péptidos y proteínas es la combinación de MALDI con el analizador de tiempo de vuelo (TOF). En un espectrómetro de masas MALDI-TOF los iones formados son acelerados tras aplicar un campo eléctrico. Estos iones adquieren la misma energía cinética durante la aceleración con lo cual iones con distinta masa presentan “velocidades de vuelo” distintas. Considerando constantes la carga y la energía cinética, la medida del tiempo de vuelo permite determinar de forma muy precisa la masa de cada uno de estos iones. Los instrumentos MALDI-TOF permiten caracterizar la masa de los péptidos con un error de 20-100 ppm (Simpson 2005). Mediante este análisis se consigue determinar el PM de los péptidos trípticos de una determinada proteína. El resultado es lo que se conoce como huella peptídica, y es característica de cada especie proteica. A continuación y tras

realizar una búsqueda en las bases de datos puede llegar a identificarse la proteína. Si esta proteína no está recogida en las bases de datos o la búsqueda no nos da las suficientes garantías de identificación, entonces se recurre a la secuenciación “*de novo*” para luego realizar una búsqueda por homología obteniéndose así un resultado más fiable (ver apartado 1.3.2.2). Si la proteína en estudio pertenece a una especie no secuenciada o de la que no se tienen datos de su genoma, entonces se realiza una búsqueda por homología en otras especies o familias cercanas (Carrascal et al. 2002).

#### 1.3.2.2.- Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

En los casos en que las proteínas no han podido ser caracterizadas por MALDI-TOF, se recurre a la espectrometría de masas en tándem en la que se obtiene más información que la relación  $m/z$  como, por ejemplo, la estructura o secuencia de aminoácidos que constituyen el péptido. Mediante esta técnica un ión generado en la fuente de ionización es aislado (ión precursor) y sometido a procesos energéticos que lo fragmentan. El análisis de los iones fragmentados proporciona información estructural del ión precursor. La espectrometría de masas en tándem puede llevarse a cabo de dos formas: (1) utilizando dos analizadores situados en serie (en tándem) como, por ejemplo, dos tubos de vuelo en los sistemas TOF-TOF o (2) produciendo una separación en el tiempo, en la que se usa un solo analizador donde de forma secuencial los iones precursores son seleccionados, fragmentados y analizados (por ejemplo, la trampa iónica) (Simpson 2005).

El patrón de fragmentación de un péptido analizado por MS/MS depende del tipo de rotura que sufre el ión precursor. Además, este patrón es característico de la secuencia aminoacídica específica del péptido, de forma que la secuencia puede deducirse del análisis del correspondiente espectro MS/MS. En teoría, a partir de un espectro de fragmentación se podría determinar de forma manual la secuencia lineal de dicho péptido (secuenciación “*de novo*”) o al menos una parte de la secuencia. Para ello basta con calcular las pérdidas de masa molecular entre dos iones consecutivos de cada serie, este valor debe coincidir con la masa molecular del residuo de aminoácido al que pertenece. No obstante, no siempre son fáciles de interpretar las señales de fragmentación, ya que pueden existir modificaciones postraduccionales que modifiquen el valor de masa de los residuos de aminoácidos. También puede ocurrir que falte alguna señal de alguna de las series, ya que la química de los aminoácidos hace que no todos los enlaces se fragmenten con la misma eficacia. Además, los sistemas de alto rendimiento que utilizan

instrumentos capaces de generar miles de espectros por minuto, hacen inviable la interpretación de forma manual. Para resolver estos problemas se han desarrollado diferentes programas informáticos capaces de secuenciar de “*de novo*” a partir de espectros de fragmentación.

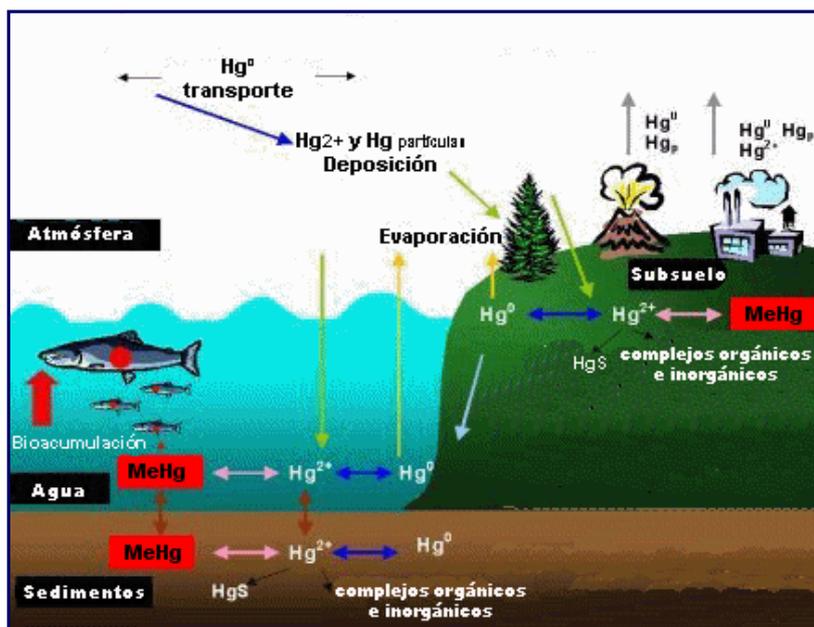
#### **1.4- Neurotoxicidad del metilmercurio**

El mercurio es un compuesto altamente tóxico que ocupa el tercer lugar en la lista de prioridad de sustancias peligrosas publicada por la Agencia de sustancias tóxicas y registro de enfermedades de USA (ATSDR, *Agency for Toxic Substances & Disease Registry*) (ATSDR 2005). Históricamente, las intoxicaciones por mercurio fueron de origen ocupacional o iatrogénico, existiendo evidencias de la utilización del mercurio desde la antigüedad. Ya los egipcios, griegos y romanos utilizaron el mercurio con fines estéticos en cosméticos, en preparaciones médicas y en amalgamas. El primer registro del uso del mercurio proviene de Aristóteles en el siglo IV a.C. quien describió su uso en ceremonias religiosas. Se sabe también que el cinabrio o sulfuro de mercurio se usaba como pigmento para la decoración corporal y en pinturas rupestres. Los síntomas tóxicos producidos por el mercurio fueron descritos ya en la Edad Media a raíz de la utilización del cinabrio o sulfuro de mercurio como pigmento rojo para la ilustración de textos, en el s. XVI a raíz del uso del calomel o dicloruro de mercurio contra la sífilis y en el s. XVI- XX a raíz de la utilización del nitrato de mercurio en la industria sombrerera. Hasta el s. XX, el mercurio ha sido empleado en el campo de la medicina como antihelmíntico, catártico, diurético y también para combatir la sífilis. Todavía puede encontrarse la utilización del calomel y el cinabrio en la medicina tradicional china (Ernst and Coon 2001, WHO 2003).

##### **1.4.1.- Origen del mercurio: fuentes naturales y antropogénicas**

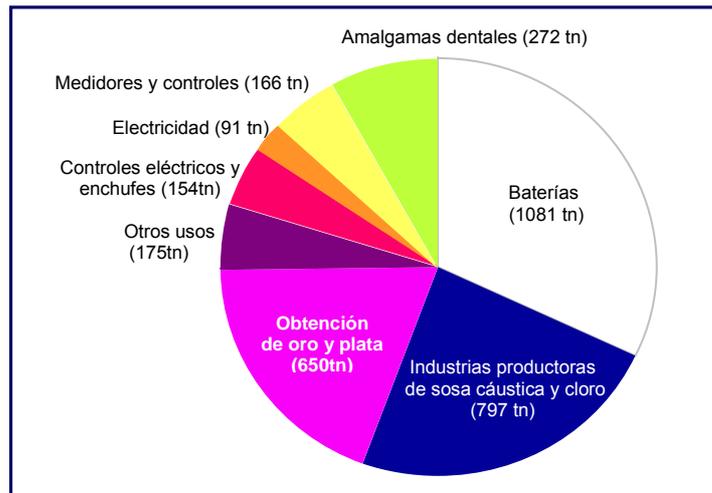
El mercurio ha sido catalogado como contaminante ambiental. En la naturaleza el mercurio puede encontrarse en 3 estados distintos: el mercurio metálico o elemental ( $\text{Hg}^0$ ), el mercurio inorgánico (compuestos derivados del mercurioso  $-\text{Hg}_2^{++}-$  y del mercúrico  $-\text{Hg}^{2+}-$ ; destaca el cloruro de mercurio) y el mercurio orgánico (mercurio unido de forma covalente a los átomos de carbono, principalmente el metilmercurio). La presencia de mercurio en el medio ambiente, fruto de la actividad natural y antropogénica, se ha convertido en un problema global para la población debido a su

potencial como agente tóxico. El mercurio es emitido a la atmósfera en forma de mercurio elemental o vapor ( $\text{Hg}^0$ ) procedente tanto de la desgasificación natural de la superficie terrestre y reevaporación del mismo depositado previamente en la superficie como de la acción antropogénica. Existen dos tipos de reacciones químicas que permiten la interconversión del mercurio a cualquier de las otras formas existentes de mercurio: (1) reacciones de oxidación-reducción y (2) procesos de metilación-desmetilación. El  $\text{Hg}^0$  es un compuesto altamente volátil que una vez emitido a la atmósfera puede residir en ella entre 0.4 y 3 años hasta volver a ser depositado en la superficie (WHO 1990, 2003). En contraposición, la vida media del  $\text{Hg}^{2+}$  en la atmósfera es inferior a las dos semanas debido a su elevada solubilidad en agua, su baja volatilidad y sus propiedades reactivas (WHO 1990, US EPA 2001). La oxidación del vapor de  $\text{Hg}^0$  a  $\text{Hg}^{2+}$  en la atmósfera es la responsable de la deposición del mercurio en la superficie terrestre y en el agua a través de la lluvia. La transformación del mercurio inorgánico a mercurio orgánico tiene lugar principalmente en los sistemas acuático y en el subsuelo por procesos de metilación. El metilmercurio (MeHg), surge de la metilación del  $\text{Hg}^{2+}$  a través de procesos no enzimáticos o de la actividad bacteriana. Es un compuesto potencialmente tóxico debido a su carácter hidrofóbico que le permite acumularse en los tejidos de los organismos. Una vez el MeHg es liberado al medio acuático, éste difunde a través de la cadena alimentaria acuática acumulándose en peces y mamíferos marinos de la cadena trófica que posteriormente pueden ser consumidos por los humanos (figura 1.5). Prácticamente, todo el mercurio que se acumula en un organismo es en forma de mercurio orgánico y en particular en forma de MeHg. En contraposición, el mercurio inorgánico no tiende a acumularse en el organismo ya que se absorbe con dificultad y es eliminado fácilmente del organismo.



**Figura 1.5.-** Ciclo global del mercurio. Modificación del esquema extraído de la Agencia de Medio Ambiente de Canadá. Las flechas de distintos colores indican las reacciones de interconversión entre las distintas formas del mercurio (rosas para los procesos de metilación – desmetilación y azules para los procesos de oxido-reducción del mercurio); y los procesos de volatilización, deposición y emisión del mercurio (flechas amarillas, verdes y grises, respectivamente).

Se estima que alrededor del 30% de la cantidad total de mercurio es de origen natural (procedente de la desgasificación de la superficie terrestre, de los gases volcánicos y de la evaporación de los océanos) mientras que el 70% procede de la actividad humana (Davidson et al. 2004, Gray et al. 2004, Trasande et al. 2006). La revolución industrial (s. XVIII – XIX) provocó un incremento de los niveles de mercurio de origen antropogénico de 3 – 6 veces comparado con los niveles existentes en la época anterior a la industrialización. Las principales fuentes antropogénicas de mercurio proceden de la minería, de la combustión de combustibles fósiles como el carbón, de la producción de cemento, de la incineración de residuos urbanos y médicos, de las industrias productoras de sosa cáustica y cloro, de la industria eléctrica en la fabricación de lámparas fluorescentes, rectificadores, osciladores, contactos de control de energía, tubos, de los procesos de extracción de oro del mineral, de los amalgamas utilizados en odontología y de la utilización como fungicida en la agricultura y como conservante en pinturas (figura 1.6).



**Figura 1.6.-** Consumo global de mercurio en el año 2000 (modificado de Maxson 2004)

En Estados Unidos la demanda industrial de mercurio disminuyó alrededor de un 75 % entre los años 1988 y 1996 debido a la eliminación del uso del mercurio como aditivo en pinturas y pesticidas así como la reducción del mercurio en baterías (US EPA). Se estima que para el año 2020 el consumo global de mercurio (figura 1.6) habrá disminuido un 44% respecto al consumo del año 2000 como consecuencia de la disminución, mayoritariamente, del uso del mercurio en baterías, de su utilización en la industria del cloro y en los procesos de obtención de plata y oro (Maxson 2004). Actualmente, el 80% del mercurio utilizado en el mundo se concentra en países en vías de desarrollo como Asia del este y Asia del sur (Greer et al. 2006).

En España, la producción de mercurio procedía de las minas de mercurio de Almadén explotadas desde la época de los romanos hasta el año 2002, momento en el que terminó la explotación minera. España producía una tercera parte de la producción anual mundial de mercurio y un 90 % de la producción total de la Unión Europea (WHO 2000) aunque se desconoce la cantidad exacta de mercurio liberado al medio ambiente. En la actualidad se ha detectado la acumulación de mercurio en aguas, sedimentos, suelo, atmósfera, plantas y crustáceos de las zonas colindantes a Almadén superior a los niveles establecidos por la Organización Mundial de la Salud suponiendo un riesgo para la población de la zona y el medio ambiente (WHO 2000, Higuera et al. 2006). Un accidente en las minas de Aznalcóllar en el año 1998 produjo un vertido de 30 toneladas de mercurio entre otros metales en el parque Natural de Doñana (Grimalt et al. 1999).

#### **1.4.2- Rutas de exposición a mercurio**

La población está continuamente expuesta a las distintas formas químicas del mercurio (vapor de mercurio, mercurio inorgánico y orgánico), siendo el consumo de pescado, las amalgamas dentales y las vacunas las principales fuentes de exposición. La fuente mayoritaria de exposición a mercurio elemental procede de la inhalación del  $\text{Hg}^0$  presente en la atmósfera (los niveles en zonas rurales son de 2 - 4  $\text{ng}/\text{m}^3$  y en zonas urbanas de 10  $\text{ng}/\text{m}^3$ ) y de las amalgamas dentales compuestas por un 50 % de mercurio, aproximadamente un 30% de plata y otros metales como el cobre, zinc y estaño (WHO 2000, 2003, 2005). Las amalgamas dentales emiten vapor de mercurio ( $\text{Hg}^0$ ) a la cavidad bucal que puede ser inhalado y absorbido por la sangre. Se estima que la cantidad ingerida diaria de  $\text{Hg}^0$ , mercurio inorgánico y MeHg procedente de la contaminación ambiental y amalgamas bucales (exposiciones no ocupacionales) es de 3.9 – 21, 4.3 y 1 - 6  $\mu\text{g}/\text{día}$ , respectivamente (NRC 2000, WHO 2003). Los niveles de mercurio en sangre de poblaciones que consumen pescado con niveles bajos de mercurio son del orden de 5-10  $\mu\text{g}/\text{L}$ . Estos datos sugieren que en estos casos el mercurio detectado en sangre procedería del  $\text{Hg}^0$  ya que la capacidad del organismo de retener el mercurio inorgánico es menor a la del mercurio orgánico o  $\text{Hg}^0$  (IPCS 1991, NRC 2000).

Aunque es incierta la cantidad de mercurio inorgánico presente en el agua o los alimentos, se estima que la cantidad media consumida de mercurio inorgánico en el agua es de 50  $\text{ng}/\text{día}$  aunque tan solo se absorben pequeñas cantidades. En los alimentos es difícil de determinar la cantidad de mercurio inorgánico ya que ésta suele estar cerca del límite de detección (10 – 20  $\mu\text{g}$  mercurio/kg de tejido fresco) (US EPA 1997, 2001). Los compuestos inorgánicos de mercurio pueden encontrarse también en antisépticos, diuréticos y productos cosméticos como en cremas para blanquear la piel (contienen 6 – 10% de  $\text{HgCl}$ ) a pesar de que el uso de estas cremas fue prohibido en EEUU, en la Comunidad Europea y en muchos países africanos. Sin embargo, el organismo está expuesto a mercurio inorgánico como consecuencia de la oxidación del  $\text{Hg}^0$  a  $\text{Hg}^{2+}$  catalizada por la catalasa en la sangre o derivado de las amalgamas dentales y como resultado de la desmetilación de las formas orgánicas. Estudios realizados en primates expuestos a 50  $\mu\text{g}/\text{día}$  de MeHg durante 6 meses demostraron la presencia de cantidades importantes de  $\text{Hg}^{2+}$  en cerebro (Charleston et al. 1994, 1996, Vahter et al. 1995).

Las formas de mercurio orgánico a las que la población está expuesta son básicamente el MeHg y el etilmercurio. Las fuentes mayoritarias del etilmercurio y MeHg provienen de las vacunas que contienen el timerosal como agente antiséptico y del consumo de pescado, crustáceos y mamíferos marinos, respectivamente. En muchos países la población, y concretamente los recién nacidos, están expuestos al etilmercurio (principio activo del timerosal) durante el periodo de vacunación contra la difteria-tetanus-pertuisis acelular, la hepatitis B y contra el *Haemophilus influenzae* de tipo B. En Julio de 1999, la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA) retiró el timerosal de las vacunas aunque éste continúa siendo utilizado en otros países desarrollados. Los efectos tóxicos del timerosal a concentraciones elevadas son similares a los del MeHg pero se desconocen sus efectos a concentraciones bajas. La dosis normal en una vacuna pediátrica es de 12.5 – 25 µg de Hg en 0.5 ml (Ball et al. 2001). Aunque existen controversias sobre el riesgo en el desarrollo del SN en bebés expuestos a etilmercurio durante el periodo de vacunación, no existen evidencias sustanciales de que la cantidad de etilmercurio presente en las vacunas esté asociado a alteraciones en el desarrollo del SN incluyendo el autismo espectral (Ball et al. 2001, Magos 2001, Bernard et al. 2001, Pichichero ME et al. 2002, Geier and Geier 2003, Counter y Buchanan 2004, Verstraeten 2004).

#### **1.4.3.- Biotransformación y acumulación de mercurio en el organismo**

El vapor de mercurio ( $Hg^0$ ) difunde rápidamente a través de la barrera hematoencefálica (BHE) y la placenta facilitando su acumulación en el cerebro y en el cerebro fetal, respectivamente. Por otro lado, el MeHg conjugado con los grupos tioles (-SH) de las cisteínas es transportado hacia el interior del cerebro a través de los transportadores de aminoácidos de la BHE acumulándose en el cerebro y en la sangre fetal (Simmons-Willis et al. 2002). Se estima que el 90 - 100 % del MeHg ingerido a través de la alimentación (pescado) es absorbido por el sistema gastrointestinal y distribuido al resto de los tejidos en un periodo de 30h. Alrededor de un 10% del MeHg ingerido se acumula en el cerebro. En contraposición, el  $Hg^{2+}$  presenta una difusión limitada a través de la barrera hematoencefálica y de la placenta debido a su baja solubilidad lipídica aunque presenta una toxicidad selectiva para otros órganos sistémicos como el riñón y el hígado. (Simmons-Willis et al. 2002, WHO 2003, Counter y Buchanan 2004). Sin embargo, autopsias realizadas en cerebros de individuos que desarrollaron la enfermedad de Minamata tras ser intoxicados con el MeHg mostraron la presencia de  $Hg^{2+}$ . Este hecho

sugirió que la desmetilación del MeHg era el origen del  $Hg^{2+}$  presente en el cerebro (Takeuchi y Eto, 1989). La tasa de desmetilación en cerebros de mamíferos depende de la especie, de la región del cerebro y del tipo celular.

Los niveles de mercurio en muestras de sangre, orina, leche materna y pelo se utilizan como marcadores indicativos del grado de exposición a mercurio. Se mantiene una relación de proporcionalidad entre la cantidad de mercurio y su acumulación en distintos órganos y tejidos. La relación en humanos de mercurio en cerebro:sangre es de alrededor de 5:1, en sangre de cordón umbilical:sangre materna es de 2:1 y en sangre de cordón umbilical:pelo materno es de 5:1. Se ha observado que los niveles de mercurio en cerebro fetal son de 5 a 7 veces superiores a los niveles en sangre materna. Por otro lado, la acumulación de mercurio en el pelo es indicativo también del grado de exposición a MeHg a razón de 250:1 en pelo:sangre (US EPA 1997, 2001, WHO 2000, NRC 2000, Budtz-Jorgensen et al. 2000, Hihgtower et al. 2003). Un estudio realizado en 119 mujeres de Suecia demostró una acumulación de mercurio en la placenta, el 60 % del cuál correspondía a MeHg. A pesar de que gran parte del MeHg queda retenido en la placenta, se estima que buena parte de él puede llegar al feto (Ask et al. 2002).

#### **1.4.4.-Efectos tóxicos del MeHg en humanos**

De todas las formas de mercurio, la forma con más riesgo neurotoxicológico para la población es el MeHg ingerido a través de la dieta y, concretamente, a través del consumo de pescado. Los efectos tóxicos del MeHg sobre los seres humanos se conocen a raíz de dos grandes epidemias que tuvieron lugar en Japón (1953, 1965) y en Irak (1971-1972). Estos efectos se centran principalmente en el SNC y difieren según si afectan a un SNC en desarrollo o adulto. En adultos, el daño provocado por MeHg va dirigido a estructuras cerebrales específicas como la capa de células granulares de cerebelo y la corteza visual. En cambio, los efectos del MeHg en cerebros en desarrollo son más difusos y extensos ya que afectan a procesos de formación de microtúbulos, migración neuronal y división celular (WHO 1990, OTA 1990, para revisión Castoldi et al. 2001, Counter et al. 2004). En cerebros en desarrollo, el tiempo de inicio de la exposición al tóxico correlaciona con la severidad de los efectos inducidos, es decir cuanto más temprana sea la exposición, mayores son los efectos tóxicos observados en el cerebro. Estudios realizados en animales expuestos a MeHg demostraron una inhibición de la migración de las neuronas granulares de cerebelo y de las células de Purkinje hacia las

capas interiores del cerebelo (Kunimoto et al. 1997). El umbral de aparición de los efectos neurológicos inducidos por mercurio en cerebros de individuos adultos es de 50 µg de mercurio/g de pelo y en cerebros en desarrollo es de 10 – 20 µg mercurio/g de pelo materno. En adultos niveles de mercurio en sangre de 200 µg/l no se relacionaron con la aparición de efectos neurotóxicos, mientras que en mujeres embarazadas niveles de mercurio en sangre de 40 – 50 µg/l se asociaron con un mayor riesgo neurotoxicológico para el feto (WHO 1990, Myers et al. 1997, Clarkson et al. 2002).

#### 1.4.4.1.- Efectos del MeHg en adultos

Alrededor de 1953 en Japón, una planta productora de acetaldehído vertió grandes cantidades de residuos de mercurio, producto secundario de la síntesis del acetaldehído, a la bahía de Minamata que se extendió hacia el río Minamata y el mar de Shiranui. Este vertido provocó la acumulación del MeHg en peces y marisco de la zona siendo éstos la principal fuente de exposición para la población de la zona cuya dieta se basa en el consumo de pescado. En el año 1965 se produjo una segunda intoxicación en Niigata provocada por un vertido tóxico de residuos de mercurio al río Agano. Como consecuencia de estos dos vertidos tóxicos, los niveles de MeHg en peces de la Bahía de Minamata y del río Agano fueron de 11 y 10 µg/g de tejido, respectivamente. Han transcurrido 50 años desde el descubrimiento de la enfermedad de Minamata provocada por la ingesta de pescado contaminado. Los principales síntomas de esta enfermedad son alteraciones sensoriales en las partes dístales de las extremidades, ataxia, constricción bilateral concéntrica del campo visual, alteración de la postura y el habla, debilidad muscular, temblores, anormalidad del movimiento ocular y la pérdida de oído. Entre 1953 y 1962 ciento-once pacientes desarrollaron la enfermedad de Minamata. Entre 1963 y 2003, se confirmó la detección de esta enfermedad en 2.154 pacientes. Actualmente, dos terceras partes de los enfermos diagnosticados con esta enfermedad han muerto. Entre los supervivientes, la mayoría de los pacientes sufrían la enfermedad de Minamata crónica que se manifestó después del año 1960 con síntomas neurológicos leves o imprecisos, mientras que la aparición de los efectos patológicos (como por ejemplo la tensión arterial y las cataratas) se vieron modificados con la edad (Uchino et al. 1995). Por otro lado, hasta 1999, el registro de personas intoxicadas en Niigata constaba de 690 casos de los cuáles 338 personas murieron y 352 seguían con vida (Ninomiya et al. 2005, Uchino et al. 2005).

La población de la zona de Minamata y alrededores estuvieron expuestos a MeHg durante 20 años (1950 al 1968). La determinación del contenido de Hg-total en pelo de los habitantes de Goshoura (alrededor del mar de Shiranui) reveló la presencia de niveles de mercurio de 37 µg/g en 1960 y de 2.4 µg/g en 2002. La reducción de estos niveles coincide con el cierre de la planta productora de acetaldehído con la consiguiente disminución del aporte antropogénico de mercurio al río (Ninomiya et al. 2005). Los niveles de MeHg encontrados en cordones umbilicales de 151 individuos nacidos entre los años 1952 – 1955 en la zona de Minamata y subclasificados según si presentaban la enfermedad de Minamata fetal o congénita, la enfermedad de Minamata adquirida, retraso mental, otras enfermedades o sin síntomas fueron de 1.6, 0.72, 0.74, 0.22 y 0.28 µg de mercurio/g, respectivamente (Harada et al. 1999). Recientemente, la utilización de métodos de análisis de regresión múltiple en el estudio del perfil neurológico de pacientes con la enfermedad de Minamata ha demostrado que el índice de predicción de la severidad de la enfermedad se reduce en 25 años en la mayoría de pacientes. Tan sólo un grupo minoritario de enfermos presentaron un aumento de los síntomas neurológicos debido a complicaciones neurológicas asociadas con la edad (Uchino et al. 2005).

El segundo gran brote de intoxicación por MeHg tuvo lugar durante el invierno de 1971 – 1972 en Irak. En este caso la fuente de exposición a MeHg fue el consumo de grano de trigo tratado con MeHg como pesticida. En las comunidades rurales de la zona, este grano fue utilizado para la elaboración de pan en lugar de ser usado con fines agrícolas. El consumo de la harina de trigo se inició alrededor de Octubre – Noviembre del año 1971 y los primeros casos de intoxicación se registraron a finales de Diciembre del mismo año. Se produjeron unas 6.530 hospitalizaciones de las cuáles 459 murieron, aunque se estima que hubo unos 50.000 afectados. Los primeros síntomas observados en adultos fueron parestesia seguido de ataxia, constricción del campo visual y pérdida de oído. Se reportaron algunos casos de debilidad muscular pero la mayoría de síntomas se atribuyeron al SNC. La exposición prenatal se manifestó con una disfunción sensorial grave como ceguera y sordera, parálisis general, reflejos hiperactivos, alteraciones cerebrales y una alteración del desarrollo mental (WHO 1990, US EPA 2001, Counter y Buchanan 2004). Las concentraciones de MeHg halladas en grano tratado fueron de 4.8-14.6 µg/g con un valor medio de 9.1µg/g. Los niveles de mercurio en sangre correlacionaron con la severidad de los síntomas observados en individuos intoxicados. Se hallaron niveles de mercurio en sangre de 1 – 50 µg/L en 93 pacientes intoxicados y las muertes se produjeron cuando los niveles de mercurio en sangre eran > 30 µg/L (Wade et al. 1993). En adultos, el MeHg altera las funciones sensoriales y la capacidad

de coordinación debido a la alteración de las neuronas de la corteza visual y de las granulares de cerebelo. La parestesia en extremidades y boca son los primeros síntomas observados de la intoxicación con MeHg. Efectos irreversibles como la ataxia y la constricción del área visual aparecen tras un período de latencia de semanas o meses. Precisamente la degeneración de neuronas granulares de cerebelo es la causa de la ataxia. Este tipo de neuronas son diana específica para el MeHg (Korogi et al. 1994, Anthony et al. 2001, Eto 2000, Eto et al. 2002). El análisis post-mortem de los niveles de MeHg en un individuo que falleció a los 29 años, a pesar de que la exposición a MeHg tuvo lugar a la edad de 8 años, reveló la presencia de niveles de MeHg superiores a 1 µg/g de tejido en la corteza occipital, frontal y el cerebelo (Davis et al. 1994).

Las intoxicaciones por MeHg que tuvieron lugar en Japón e Irak encajan con los perfiles de una exposición prolongada a bajas concentraciones del tóxico y de una exposición a corto plazo a altas concentraciones del tóxico, respectivamente. A pesar de que actualmente las intoxicaciones por elevadas concentraciones de MeHg son poco comunes, existen evidencias de la exposición continua a bajas concentraciones de MeHg en la población, principalmente a raíz del consumo de pescado. Pocos son los estudios epidemiológicos existentes en población adulta sobre una exposición prolongada en el tiempo a concentraciones bajas de MeHg. El análisis de los datos de un estudio realizado con 306 indios Cree adultos del Quebec en el año 1977 desveló una asociación entre los niveles de Hg en pelo (0.5 – 46 µg/g; < 50µg/g, umbral tóxico) con la aparición de temblores en adultos jóvenes pero no en adultos de más de 40 años (Auger et al. 2005).

#### 1.4.4.2.- Efectos del MeHg en niños

Los efectos del MeHg en cerebros en desarrollo se describieron a raíz de las intoxicaciones ocurridas en Japón (1956, 1965) e Irak (1971 – 1972). Mujeres gestantes expuestas a MeHg en Minamata e Irak dieron a luz a niños con importantes daños cerebrales irreversibles. La inhibición de la división celular y de la migración neuronal, y la alteración de la citoarquitectura del cerebro en desarrollo son algunos de los principales efectos producidos por una exposición prenatal. Existe una relación dosis – respuesta entre la exposición prenatal a MeHg y los efectos neurotóxicos del MeHg. En Japón se detectaron algunos casos de la enfermedad de Minamata fetal caracterizada por alteraciones graves en el desarrollo incluyendo alteraciones cerebrales, retraso mental y convulsiones (Davidson et al. 2004). Los niveles de MeHg detectados en tejido del cordón umbilical de 25 niños diagnosticados con la enfermedad de Minamata fetal (incluidos en

un estudio de 171 niños de la región de Minamata) fueron significativamente diferente a los niveles detectados en niños controles (1.63 µg/g y 0.24 µg/g, respectivamente). Utilizando los coeficientes de regresión derivados de los estudios de las Islas Faroe (Akagi et al. 1998), los niveles de MeHg en cordón umbilical de los niños con la enfermedad de Minamata fetal equivaldrían a 216 µg/L de sangre del cordón umbilical y a 41 µg/g de pelo materno.

La exposición prenatal a concentraciones elevadas de MeHg produce una alteración en el desarrollo del cerebro induciendo una pérdida de las neuronas en los dos lóbulos del cerebro. Los efectos asociados a estas alteraciones incluyen reflejos hiperactivos, sordera, ceguera, alteraciones cerebrales, retraso mental y parálisis general (NRC 2000, Counter y Buchanan 2004). En contraposición, los efectos neurológicos producidos por la exposición prenatal a bajos niveles de MeHg producen un déficit en el lenguaje, el aprendizaje, la atención y en menor grado producen alteraciones motoras y disfunción de la organización espacio-visual. Las posibles dianas del MeHg en el SN incluyen la BHE, el citoesqueleto, el transporte axonal, la producción, secreción, captación y metabolismo de neurotransmisores, los procesos de señalización celular, síntesis de proteínas, ADN y ARN; y sistemas respiratorios y productores de energía. Un estudio realizado con 83 mujeres embarazadas e intoxicadas con MeHg en Irak, mostraron niveles de mercurio en pelo del orden de 1 – 600 µg/g. La evaluación de los efectos adversos del mercurio en los niños de 30 meses de edad desveló una relación dosis – respuesta entre los niveles de mercurio en pelo y la aparición de los efectos neurológicos (Cox 1989, para revisión Davidson et al. 2004).

La valoración de los efectos neurotóxicos del MeHg en niños se analizó en diferentes poblaciones de riesgo: Canadá, Perú, Nueva Zelanda, Brasil, Islas Faroe e Islas Seychelles. En Canadá, se realizó un estudio con 234 niños indios del norte del Quebec de 12 – 30 meses de edad. La fuente de exposición fue el consumo de pescado contaminado con MeHg. El contenido medio de mercurio en el pelo de las madres fue de 6 µg/g, pero en un 6% de las mujeres los niveles eran superiores a 20 µg/g. Se observó tono muscular y reflejos de los tendones anormales en el 11.4% de los niños y en el 12.2 % de las niñas y sólo se obtuvo una asociación significativa de estos efectos con los niveles de mercurio en el pelo materno de los niños. Por otro lado, en niñas se observó una relación negativa entre la incoordinación y la exposición a mercurio. Ningún otro parámetro de función neurológica o de desarrollo mostró una asociación significativa con los niveles de MeHg ni tampoco se observó una relación dosis-respuesta. Estos

resultados fueron interpretados con cautela por los autores ya que las alteraciones observadas solían ser anomalías aisladas de severidad media con dudosa importancia clínica. (McKeown-Eyssen et al. 1983, US EPA 2001). En Perú, se realizó un estudio a partir de 131 madres (con sus respectivos hijos) cuya dieta era rica en pescado. Los niveles de mercurio detectados en el pelo materno fueron de 1.2 – 30 µg/g (valor medio de 8.3 µg/g). Sin embargo, no se halló ninguna relación significativa entre los niveles de mercurio en el pelo materno y los signos de alteración en el desarrollo neurológico de los niños. (Marsh et al. 1995, US EPA 2001). Por otro lado, en Nueva Zelanda se realizó un estudio con 935 mujeres cuya ingesta de pescado era superior a 3 veces por semana durante el embarazo. De las mujeres incluidas en el estudio 73 presentaron niveles de mercurio en pelo superiores a 6 µg/g (media de 8.3 µg/g; rango de 6 – 86 µg/g) y fueron definidas como el grupo de alto riesgo. Los resultados obtenidos de las pruebas de evaluación neurológica aplicadas a 237 niños de 6 – 7 años, reveló una asociación entre los niveles de mercurio en pelo de las madres durante el embarazo (13-15 µg/g) y la disminución de la capacidad de realizar las pruebas de inteligencia, lenguaje, habilidades motoras y de organización espacio-temporal (WHO 1990, US EPA 2001, para revisión Counter y Buchanan. 2004). En Brasil, se realizó un estudio con 351 niños de 7 – 12 años habitantes de 4 comunidades cercanas a un río en el Amazonas. Estos niños consumían peces contaminados con MeHg procedente de la utilización del mercurio en los procesos de extracción de oro. Los niveles de mercurio en pelo de 197 niños de zonas expuestas a altas concentraciones de mercurio y de 105 niños de zonas con una menor exposición ( $> 10 \mu\text{g/g}$  e  $< 10 \mu\text{g/g}$ , respectivamente) correlacionaron con una disminución de la función motora, de la atención y de la capacidad espacio-visual (Grandjean et al. 1999). Un quinto estudio epidemiológico, se realizó en las Islas Faroe donde la principal fuente del MeHg provenía del consumo de carne y grasa de ballena. Se observó una relación entre el consumo de ballena y los niveles de mercurio en el pelo materno o en la sangre del cordón umbilical. El estudio se realizó con 917 niños nacidos entre 1986 y 1987 correspondientes al 90.3% de los sobrevivientes de la cohorte inicial. El 15 % de las madres presentaban niveles de mercurio en el pelo superiores a 10 µg/g, y niveles de mercurio en la sangre del cordón umbilical hasta 350 µg/l (valor medio de 22.8 µg/l). A los 7 años de edad los niños fueron sometidos a distintas pruebas neurofisiológicas. Estos niños no presentaron anomalías neurofisiológicas o clínicas asociadas a la exposición a MeHg. Sin embargo, se observó una asociación entre los niveles de mercurio en pelo materno (mercurio en pelo  $< 10 \mu\text{g/g}$ ) en el momento del parto y una disminución de la capacidad motora. A su vez, los niveles de mercurio en

sangre de cordón umbilical se asociaron con un déficit en el lenguaje, la atención y la memoria (Grandjean et al. 1997, Grandjean y White 1999, US EPA 2001). Las asociaciones encontradas entre las alteraciones observadas y los niveles de MeHg fueron más sólidas en cordón umbilical que en pelo materno (Budtz-Jorgensen et al. 2000, US EPA 2001). Por último, en las islas Seychelles, se realizó un macroestudio epidemiológico con 711 niños de 66 meses de edad (5.5 años) residentes en las islas en el que no se observó correlación alguna entre la exposición a MeHg y el daño neurológico. La exposición prenatal a MeHg a través del consumo de pescado (media de 12 ingestas/semana) produjo una acumulación de mercurio en el pelo de 6.8 µg/g (0.5 – 26.7 µg/g) en mujeres expuestas durante el embarazo. A los 9 años de edad 643 niños del mismo cohorte fueron sometidos a 21 pruebas para evaluar las alteraciones en el lenguaje, la memoria, las funciones neurocognitivas, motoras, perceptuales-motoras y de comportamiento provocadas por MeHg. Los resultados de las pruebas relacionadas con la función motora y la atención mantenida en el tiempo correlacionaron con los niveles de mercurio en el pelo. La presencia de mercurio incrementó el índice de hiperactividad y disminuyó la función motora sólo en niños y en la mano no dominante (Davidson 1997, US EPA 2001, Myers et al. 2003, para revisión, Counter et al. 2004, Huang et al. 2005). Derivado de los estudios estadísticos, concluyen que estos resultados podrían ser casuales y que sólo existen pequeñas evidencias de los efectos adversos de la exposición prenatal a MeHg (Myers et al. 2003, Huang et al. 2005).

El riesgo neurotoxicológico de la exposición pre-natal a MeHg derivado de los estudios epidemiológicos de las Islas Faroe y Seychelles es una fuente de controversia. La comparación de ambos estudios revela que la población de las islas Faroe estuvo expuesta a concentraciones de MeHg 5 veces superiores a las concentraciones halladas en los peces consumidos en las islas Seychelles (1.6 µg/g a 0.3 µg/g, respectivamente) (Myers 1998). Además, en la carne de ballena se encontraron niveles de bifenilos policlorados (PCB, uno de los 12 contaminantes persistentes) que podrían potenciar la toxicidad del MeHg. Estos hechos podrían explicar en parte el porqué se encontró una asociación entre los niveles de MeHg y las alteraciones neurológicas en niños de las Islas Faroe y no en los niños de las islas Seychelles. Sin embargo, la reevaluación de los resultados obtenidos en las islas Faroe indicó que no existía tal interferencia entre ambos tipos de contaminantes (NRC 2000, Stewart et al. 2003). Por otro lado, la utilización de métodos de evaluación del daño neurológico y biomarcadores distintos (el pelo materno y la sangre de cordón umbilical) podría explicar, en parte, la diferencia entre estos dos

estudios. Con lo cuál, con estos datos no se puede inferir una conclusión firme de la asociación entre la exposición prenatal a MeHg y los efectos adversos en el desarrollo del cerebro en niños (Spurgeon, 2006).

#### **1.4.5.- Evaluación del riesgo**

El consumo de mercurio a través de la dieta es considerado un factor de riesgo. El MeHg es acumulado en el organismo cuando la cantidad de MeHg ingerida es superior a la cantidad eliminada. El riesgo para la salud de la población asociado al consumo de pescado y marisco es todavía tema de controversia.

##### 1.4.5.1.- Regulación de los niveles tolerables de mercurio

Tras conocer la capacidad neurotóxica del MeHg a partir de las dos grandes epidemias de Japón e Irak, varias organizaciones internacionales entre ellas la Agencia de protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS), *Food and Drug administration* (FDA) y la Agencia de registro de enfermedades provocadas por sustancias tóxicas de EEUU (ATSDR) regularon los niveles de MeHg tolerables en la ingesta diaria basados en los cambios neuropsicológicos producidos en niños expuestos a MeHg *in utero*. Por primera vez en 1989, la EPA estableció la dosis de referencia (DRf) para el consumo de mercurio en 0.3 µg/kg/día, basándose en los estudios realizados en la población Iraquí. Posteriormente, en 1995 el valor de DRf se fijó en 0.1 µg/kg/día, vigente hasta la actualidad. Este consumo daría lugar a unos niveles de mercurio de ~ 5.8 µg/L de sangre y 1.1 µg/g en el pelo. El término dosis de referencia (DRf) se define como la dosis máxima de una sustancia tóxica ingerida diariamente por la población más sensible, a lo largo de la vida, sin aparición de efectos tóxicos. Por otro lado, la OMS, la ATSDR y la FDA establecieron la dosis tolerable diaria para la población general en 0.23 µg/kg/día (~1.6 µg/kg/semana, revisado en 2003, valor anterior 3.3 µg/kg/semana), 0.3 µg/kg/día (derivado del estudio de las Islas Seychelles) y 0.4 µg/kg/día, respectivamente. Japón a su vez estableció este umbral en 0.43 µg/kg/día (WHO 1990, US EPA 1997, 2001, Budtz-Jorgensen et al. 2000, WHO 2003, Gochfeld y Burger 2005). A pesar de que la DRf establecida por estas organizaciones procede de los estudios de exposición a MeHg *in utero*, éstas son extensibles a toda la población (Grandjean y White 1999, Kaiser et al. 2000).

#### 1.4.5.2.- Datos de exposición humana

El Consejo Nacional de Investigación de los EEUU (NRC, *National Research Council*) estimó que alrededor de 60.000 niños / año podrían nacer con problemas neurológicos debido a la exposición *in utero* a MeHg (NRC 2000, Davidson et al. 2004). Estos resultados pueden ser considerados polémicos ya que los niveles del mercurio en niños y mujeres en edad fértil reportados en un estudio realizado en EEUU por la *National Health and Nutrition Examination Survey*, (NHANES 2001) fueron inferiores a los niveles considerados peligrosos (1.2 ng/g en mujeres de 16 – 49 años y 0.3 ng/g en niños de 1 – 5 años). En EEUU, se ha estimado que en niños nacidos el año 2000 el 3.2% de casos de retraso mental (IQ<70) está asociado a la exposición pre-natal a MeHg (Trasande et al. 2005, 2006). En San Francisco durante el año 2000 – 2001 se realizó un estudio de los niveles de mercurio en la población adulta en el que se demostró que el poder adquisitivo y el nivel de educación podrían considerarse también factores de riesgo. Para ello se analizaron los niveles de mercurio de 123 individuos con buena posición social (93 mujeres y 30 hombres) cuyas dietas incluían grandes cantidades de pescado. Los valores de mercurio en sangre fueron de 2.0 - 89.5 µg/L, indicando que el 89% de los pacientes presentaban niveles superiores a la DRf fijada por la US EPA. Una disminución de la ingesta de pescado fue acompañada por una reducción de los niveles de mercurio en sangre. Estos resultados mostraron una correlación positiva entre el consumo de pescado y los niveles de mercurio (Hightower y Moore, 2003).

En España existen distintas regiones con riesgo potencial a ser expuestas a mercurio debido a la minería, a la industria productora de sosa cáustica o a las incineradoras de residuos urbanos. En 1996 se realizó un estudio con 223 niños de edades comprendidas entre 6 y 16 años residentes en la provincia de Tarragona, concretamente en Flix (población cercana a una planta productora de sosa cáustica y una incineradora), Tarragona (cercana a refinerías petrolíferas, una incineradora de residuos urbanos y con actividad pesquera) y Tortosa (población agrícola) con niveles promedio de mercurio en el pelo de 0.77 µg/g. Los niveles de mercurio en el pelo correlacionaron positivamente con las variables sexo, la frecuencia de consumo de pescado y el lugar de residencia, aunque no correlacionaron con la edad, ni el número de empastes dentales ni la ocupación de los padres. Los niveles de mercurio en las niñas (n = 154) era casi el doble de los niveles observados en los niños (n = 79) (0.92 y 0.54 µg de mercurio/g de pelo, respectivamente). Por otra parte, el consumo de pescado de 3 (n = 25 sujetos) y 4 (n = 5 sujetos) veces por semana dio lugar a niveles de mercurio > 1.25 µg/g respecto los niños

(n = 5) que no consumían pescado (0.45 µg/g). Teniendo en cuenta el lugar de residencia, los niveles de mercurio en niños residentes en Tortosa (63 niños), Tarragona (100 niños) y Flix (70 niños) presentaron niveles de mercurio en pelo de 0.97, 0.83 y 0.57 µg/g, respectivamente. Era de esperar que los niños de Flix (pueblo de interior) presentaran niveles más altos de mercurio en pelo debido a la ubicación de las plantas productoras de sosa cáustica y cloro en su localidad. Sin embargo, estos presentaron unos niveles de mercurio inferiores a los niveles de los residentes en Tarragona y Tortosa, diferencia provocada probablemente por el consumo de pescado. En Flix el pescado consumido era principalmente congelado cuyos niveles de mercurio (55 µg/kg peso fresco) son inferiores a los del pescado fresco (219 µg/kg peso fresco) (Batista et al. 1996). Recientemente, se han realizado distintos estudios en niños residentes en Constantí (localidad cercana a Tarragona) donde en 1999 se puso en marcha una incineradora de residuos urbanos. En una muestra de 100 niños (39 niños y 61 niñas) de 12 – 14 años se observó una correlación positiva entre los niveles de mercurio en el pelo (0.70 µg/g) y la función cognitiva de la capacidad espacio-visual (Torrente et al. 2005, Nadal et al. 2005). Paralelamente, la determinación de los niveles de mercurio en distintos alimentos de la zona reveló que en general la población de Tarragona consume diariamente 5.3 µg de mercurio (Bocio et al. 2005). Estos niveles de mercurio son comparables a los niveles hallados durante la construcción de la incineradora (1996 – 1998) e inferiores a los valores tolerables establecidos por la OMS y la FDA pero no para la US EPA (Bocio et al. 2005).

#### 1.4.5.3.- Población de riesgo

Como hemos descrito anteriormente, el SN en desarrollo es más vulnerable a los efectos tóxicos del mercurio que el SN de un adulto ya que el MeHg es capaz de atravesar la placenta y afectar directamente al feto. Es por esto que mujeres embarazadas, en edad fértil o en periodo de lactancia, bebés y niños forman parte de la población de riesgo. La UE, así como la US EPA y la FDA recomiendan a las mujeres embarazadas (población de riesgo) no consumir más de 100 g y 340 g de pescado a la semana, con niveles altos y bajos de mercurio, respectivamente (Evans et al. 2002, European Commission 2004, Arnold et al. 2005) y evitar el consumo de determinadas especies con niveles de mercurio elevado, haciendo extensiva esta recomendación para los niños.

#### 1.4.5.4.- Regulación de los niveles de MeHg en peces. Riesgo – beneficio del consumo de pescado.

El MeHg es una de las formas más tóxicas del mercurio caracterizado por tener una vida media larga y acumularse en la cadena alimentaria, siendo esta acumulación un riesgo para la población. La US EPA estima que la ingesta de MeHg procedente de alimentos distintos al pescado es del orden de  $10^{-5} - 10^{-9}$   $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  y del consumo de pescado y marisco del orden de  $2.7 \times 10^{-2}$   $\mu\text{g MeHg}/\text{kg}/\text{día}$  en un individuo adulto. Estos valores representarían el 27.1 % de la dosis de referencia establecida por la US EPA (0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) (US EPA 2001). Estos hechos confirman que la principal ruta de exposición a MeHg procede del consumo de pescado.

El nivel máximo de MeHg en peces y marisco destinados al consumo permitido en EEUU es de 1  $\mu\text{g}/\text{g}$  de tejido fresco. En la Comunidad Europea este valor es de 1  $\mu\text{g}/\text{g}$  de tejido fresco para especies predatoras y 0.5  $\mu\text{g}/\text{g}$  de tejido fresco para el resto de peces y marisco (Egeland y Middaugh 1997, EC 466/2001, EC 221/2002, Gochfield y Burger 2005, Cabañero et al. 2005). La cantidad de MeHg acumulada en los peces depende de su tamaño y del eslabón que ocupen en la cadena trófica. Es por esto que debe controlarse los niveles de mercurio en los predadores de la parte alta de la cadena trófica (peces y mamíferos marinos como el pez espada, la ballena, el tiburón, el atún y la caballa entre otros) para su comercialización y consumo. En la tabla 4.1 se indican los niveles de mercurio detectados en peces en Estados Unidos y en diferentes regiones de España.

**Tabla 4.1.- Niveles de mercurio detectados en peces de distintas zonas geográficas**

	<b>Niveles de mercurio (<math>\mu\text{g} / \text{g}</math> tejido)</b>	<b>Especies analizadas (con niveles de Hg altos)</b>	<b>Referencias</b>
EEUU	0.01 – 1.3	tiburón, atún, barracuda, pez espada, ostras, atún en lata	US EPA 1997
España			
Río Gállego	0.25 – 4.41	Carpa, barbo, lucio del norte	Raldua y Pedrocchi 1996
Río Cinca	1.02 – 3.74		
Mercados de Guipúzcoa	0.01 – 0.301	Atún, bonito, merluza, atún en lata	Sanzo et al. 2001
Mediterráneo	0.5 – 1	Pez espada y atún	Storelli y Marcotrigiano 2001
Atlántico	0.3 – 0.5	Pez espada y atún	Cabañero et al. 2005

Los elevados niveles de mercurio detectados en peces procedentes de los ríos Gállego y Cinca derivan de la contaminación de los ríos debido a la presencia en la zona de plantas productoras de cloro. Por otro lado y a pesar de que los niveles de mercurio en la zona del país Vasco fueron bajos, un estudio realizado con 8417 voluntarios de la provincia de Guipúzcoa, cuyo consumo de pescado diario fue de 88.6 g y 55 g en hombres y mujeres, respectivamente, mostró que la ingesta de Hg en un 25 % de los hombres y un 15 % de las mujeres superaría la DRf establecida por la US EPA (0.1 µg/kg/día) pero no el límite establecido por la OMS (1.6 µg /kg/semana) (Sanzo et al. 2001). Es importante destacar que los valores de referencia establecidos por las diferentes organizaciones internacionales se establecieron a partir de los efectos tóxicos observados en la población de riesgo.

A pesar de que el pescado es una fuente de MeHg, su consumo aporta nutrientes beneficiosos para la salud como ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) omega 3 que ayudan a disminuir/prevenir el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, antioxidantes como el selenio y la vitamina E, proteínas y materia grasa con bajo contenido en ácidos grasos saturados. Los PUFA son importantes durante el desarrollo cerebral y de la retina, la maduración de la corteza visual y el desarrollo motor. El consumo de selenio y vitamina E a través de la dieta puede ejercer un papel importante en la protección frente a la exposición crónica a bajos niveles de MeHg a la cuál estamos sujetos a través de la alimentación (Egeland y Middaugh 1997, Myers 1998). Recientemente, se ha publicado un estudio en el que se muestra la relación entre los niveles de mercurio y selenio en los peces más consumidos en España y Portugal (tabla 1.1) (Cabañero et al. 2005). Estos resultados confirman la mayor acumulación de mercurio en peces predadores (pez espada y atún) a la vez que sugieren un mayor consumo de peces de eslabones inferiores de la cadena trófica por sus menores niveles de mercurio y mayores niveles de selenio.

**Tabla 1.1.-** Niveles totales de mercurio y selenio en peces destinados al consumo en mercados españoles y portugueses. Datos extraídos de Cabañero et al. 2005.

<b>Pescado</b>	<b>Hg total (<math>\mu\text{g/g}</math> peso seco)<math>\pm</math></b>	<b>Se total (<math>\mu\text{g/g}</math> peso seco)</b>	<b>Se:Hg</b>
Caballa	0.033 $\pm$ 0.001	1.21 $\pm$ 0.02	20
Pulpo	0.024 $\pm$ 0.001	0.59 $\pm$ 0.02	13
Pez espada o emperador	0.47 $\pm$ 0.02	2.09 $\pm$ 0.02	3
Sardina	0.048 $\pm$ 0.002	1.81 $\pm$ 0.02	22
Atún	0.31 $\pm$ 0.01	2.32 $\pm$ 0.03	8

El selenio es un micronutriente esencial con gran potencial de prevenir enfermedades al mismo tiempo que puede antagonizar los efectos tóxicos del mercurio, aunque hasta el momento se desconoce su mecanismo de acción. Concretamente, la selenio metionina es la forma de selenio más absorbida por el organismo que tiende a acumularse en los tejidos, a incorporarse en las proteínas y en las enzimas. Se cree que el selenio puede redistribuir el MeHg hacia tejidos menos sensibles como el músculo, competir con el MeHg por los mismos receptores, formar complejos con el MeHg y la selenio-proteína, y promover la transformación del MeHg a formas menos tóxicas (Egeland y Middaugh 1997, Combs y Gray 1998, Navarro-Alarcón et al. 2000). Teniendo en cuenta estos resultados se recomienda consumir pescado con elevados niveles de PUFA, antioxidantes y bajos niveles de MeHg y PCB.

Un estudio realizado en 8998 mujeres embarazadas reveló una mayor probabilidad de parto prematuro y menor peso de los bebés entre mujeres cuya dieta no contenía pescado. Se observó que un consumo de 8 – 15 g de pescado / día es beneficioso para la salud (Olsen and Secher 2002, Gochfield and Burger 2005). Teniendo en cuenta la DRf establecida por EPA, la población puede consumir, sin que esto suponga un riesgo toxicológico, entre 15 – 65 y 15 – 27 g de pescado/día si los niveles de MeHg en el pescado son del orden de 0.1 $\mu\text{g/g}$  (por ejemplo salmón, sardina, bacalao, cangrejo) o de 0.27  $\mu\text{g/g}$  de tejido fresco (por ejemplo atún blanco y pez espada), respectivamente.

## **1.5.- Alteraciones celulares y subcelulares inducidas por MeHg en el sistema nervioso relevantes para la evaluación del riesgo**

La elevada afinidad del MeHg para grupos tioles convierte a las proteínas o péptidos que contienen residuos de cisteínas en moléculas susceptibles a ser modificadas estructural y funcionalmente en cualquier compartimento subcelular. En los sistemas biológicos, el MeHg se halla formando complejos con las cisteínas, las homocisteínas, las metalotioninas, el glutatión o la albúmina (entre otros). Es por esto, que no existe un único mecanismo ni una única molécula diana capaz de explicar la multitud de efectos neurotóxicos inducidos por MeHg en el SNC. Los efectos del MeHg sobre la integridad celular y tisular han sido estudiados en animales de experimentación (Zhang et al. 2003, Miyamoto et al. 2001, Sakamoto et al. 1996) y en distintos modelos celulares, incluyendo células gliales (Daré et al. 2001, Bellefi et al. 2002), células madre neuronales (Tamm et al. 2006), neuroblastomas (Miura et al. 1999, Sanfeliu et al. 2001), cultivos de reagregados de cerebro (Monnet-Tschudi et al. 1996) y cultivos primarios en especial de células granulares de cerebelo (Castoldi et al. 2000, Daré et al. 2000, Gassó et al. 2001, Fonfría et al. 2002, 2005, Limke y Atchinson 2002, Sakaue et al. 2003, 2005). Además, de los efectos nocivos en la estructura celular del SN, otros elementos como la transmisión nerviosa (receptores, señalización celular, síntesis, degradación y transporte de neurotransmisores), la homeostasis del calcio, los procesos relacionados con la respiración mitocondrial y la obtención de energía, y finalmente la síntesis de proteínas, ADN, ARN se barajan como las principales dianas del MeHg en el SN (ver referencias en apartados siguientes; para revisión ver Castoldi et al. 2001, Patrick 2002, Sanfeliu et al. 2003, Aschner y Syversen 2005).

### **1.5.1.- Inhibición de la síntesis de proteínas y alteración de la fosforilación de proteínas**

Los compuestos orgánicos de mercurio son capaces de inhibir la síntesis de proteínas tal y como se ha demostrado en modelos *in vivo* e *in vitro*. La inhibición de la síntesis se debe a alteraciones a nivel de los ARN de transferencia y no a las fases de iniciación, elongación de la síntesis ni a un mal funcionamiento de los ribosomas (Sarafian et al. 1984, Cheung y Verity 1985, Sanfeliu et al. 2003 y Limke et al. 2005). Alteraciones en el patrón de fosforilación de proteínas es otro de los efectos del MeHg observado en sistemas *in vivo* e *in vitro*. La tubulina es una de las proteínas cuya fosforilación está

incrementada por MeHg, afectando su función en los procesos celulares en los que participa (Sarafian et al. 1990, Yagame et al. 1994).

### **1.5.2.- Alteraciones en la homeostasis del calcio**

El ión calcio desempeña un papel crítico en los procesos de muerte en el SN. Diferentes trabajos realizados con distintos modelos neuronales, incluido cultivos primarios de células granulares de cerebelo, demuestran que las exposiciones a corto plazo (de minutos hasta 24h) a concentraciones micromolares de MeHg alteran la homeostasis del calcio (Sarafian 1993, Marty et al. 1997, 1998, Castoldi et al. 2000, Gassó et al. 2001, Limke y Atchinson 2002, Limke et al. 2004, Atchinson et al. 2005). La utilización de inhibidores de canales y quelantes de calcio revertió de forma significativa los efectos citotóxicos inducidos por exposiciones cortas (<4h) a MeHg pero no los efectos citotóxicos producidos por exposiciones > 18 h en células granulares de cerebelo, sugiriendo que la desregulación de la homeostasis del calcio puede contribuir a la muerte neuronal a corto plazo (Marty et al. 1998). Además Sakamoto et al. (1996) demostraron la protección por agentes bloqueantes del canal de calcio frente la neurotoxicidad inducida por MeHg tanto en modelos experimentales *in vivo* como en cultivos de células granulares de cerebelo. En conclusión, parte de la neurotoxicidad ejercida por las exposiciones a corto plazo a MeHg en cultivos primarios de células granulares de cerebelo proviene de la alteración de la homeostasis del calcio ya que la utilización de quelantes o inhibidores de canales de calcio protege de ciertos efectos tóxicos entre ellos de la muerte neuronal. (Castoldi, et al. 2000, Marty y Atchinson 1997, 1998, Limke et al. 2004).

### **1.5.3.- Alteraciones en el citoesqueleto**

El citoesqueleto, implicado en el movimiento y en procesos de división celular, es una de las dianas específicas del MeHg y, en especial, los microtúbulos. La fragmentación de los microtúbulos y la disolución de la red neuronal se observó en cultivos primarios de células granulares de cerebelo expuestos a concentraciones de MeHg de 0.5 – 1  $\mu$ M (30 min – 18 h) precediendo a la muerte neuronal por apoptosis (Castoldi et al. 2000). La integridad de los microtúbulos es fundamental para el desarrollo del SN, la proliferación celular, la migración de células mitóticas durante la formación de la corteza cerebral y cerebelar, para la extensión y estabilización de las neuritas y para el transporte axodendrítico.

Todos estos procesos están alterados por la presencia del MeHg (Kunimoto et al. 1997, Miura et al. 1999, Castoldi et al. 2000). En cultivos organotípicos de cerebelo se ha mostrado la inhibición y alteración de la migración neuronal desde las capas externas del cerebelo hacia las capas internas en presencia del MeHg de manera dosis-dependiente (1 – 10  $\mu$ M) (Kunimoto y Suzuki 1997).

La actina es una proteína estructural que junto con los microtúbulos y los filamentos intermedios constituyen el citoesqueleto celular. Leong et al. (2001) demostraron una alteración del crecimiento de las neuritas de neuronas de *Lymnaea stagnalis* (serpiente de agua) expuestas a cloruro de mercurio debido a la interacción del mercurio con la tubulina, pero no con la actina. Por otro lado, un estudio realizado en una línea celular de riñón de rata mostró que la exposición a MeHg ( $\leq 2 \mu$ M, 17 h) producía una disrupción de los microtúbulos de tubulina, pero no de los filamentos de actina, excepto en algunas células expuestas a 2  $\mu$ M de MeHg. Estos resultados indican el potencial del MeHg como disruptor selectivo de microtúbulos con efectos secundarios en otros elementos del citoesqueleto a concentraciones elevadas de MeHg (Sager et al. 1988).

#### **1.5.4.- Alteraciones en la transmisión nerviosa**

Los efectos del mercurio sobre la transmisión sináptica pueden ocasionar debilidad muscular y alteraciones en el sistema nervioso central (SNC) como el déficit comportamental observado en exposiciones *in utero* a MeHg (Castoldi et al. 2001). Los compuestos de mercurio son capaces de alterar la función de los receptores GABA<sub>A</sub>, NMDA, de dopamina y de acetilcolina de tipo nicotínico y muscarínico afectando la transmisión nerviosa (Scheuhammer and Cherian, 1985, Arakawa et al. 1991, Huang y Narahashi 1996, Castoldi et al. 1996, Fonfría et al. 2001, Miyamoto et al. 2001, Coccini et al. 2006). El MeHg produce liberación espontánea de noradrenalina y de amino ácidos excitatorios en modelos *in vitro* neuronales y gliales. Los compuestos de mercurio alteran el transporte de glutamato inhibiendo su captación en glía y neuronas granulares de cerebelo e induciendo una liberación neta del glutamato endógeno (Aschner et al. 1993, 1995, Gassó 2000, Fonfría 2005). La sobreestimulación de los receptores NMDA podría provocar la muerte neuronal por excitotoxicidad. La inyección esterotáxica de MeHg en la corteza cerebral de ratas produjo un incremento de la concentración de glutamato extracelular y del daño en el ADN, que fue reducido por el antagonista del receptor NMDA MK-801 sugiriendo la asociación entre el daño en el ADN y el proceso de excitotoxicidad

(Juárez et al. 2002, 2005). Por otro parte, ratas expuestas a MeHg mostraron una degeneración neuronal en la corteza, el hipocampo y el cerebelo, que fue revertida por MK-801 en la corteza e hipocampo, pero no en el cerebelo (Miyamoto et al. 2001). Además, el MK-801 produjo una reducción del daño inducido por MeHg en las neuronas corticales de rata, así como una disminución de los productos proteolíticos derivados de la activación de la calpaína (Zhang et al. 2003). Por último, en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo, el antagonista MK-801 no fue capaz de proteger de la muerte neuronal inducida por la exposición a 1  $\mu$ M MeHg durante 18 h (Castoldi et al. 2000). Estos datos sugieren que la muerte neuronal inducida por MeHg puede tener un componente excitotóxico en neuronas corticales e hipocampales, pero no en neuronas granulares de cerebelo.

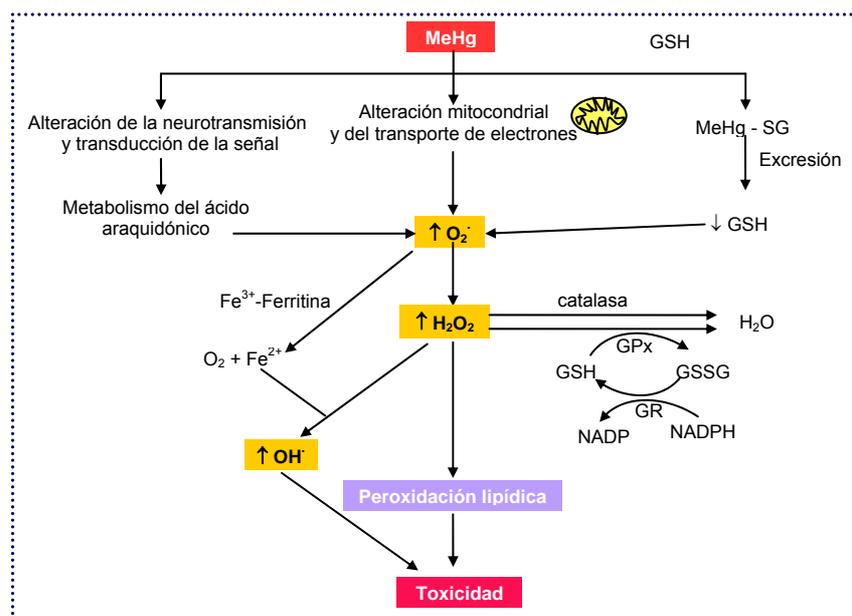
#### **1.5.5.- Alteraciones en la actividad mitocondrial y en la homeostasis de oxidorreducción**

El cerebro es un órgano especialmente vulnerable al estrés oxidativo debido a la elevada tasa de actividad metabólica oxidante, a la alta demanda energética para el transporte de neurotransmisores e iones, a la elevada concentración de sustratos oxidables (como por ejemplo los ácidos grasos polinsaturados de las membranas), a la generación endógena de ROS, a la alta relación superficie de membrana / volumen citoplasmático y finalmente a los bajos niveles de mecanismos intracelulares de protección (GSH, metalotioninas, catalasa y glutatión peroxidasa) (Kodavanti, 1999, Castoldi et al. 2001). El estrés oxidativo, asociado a una acumulación de especies reactivas tóxicas (ROS, especies reactivas al nitrógeno o iones metálicos no unidos) procedente de la alteración del equilibrio entre los componentes celulares pro-oxidantes y antioxidantes, es un factor fundamental en la neurotoxicidad mediada por MeHg. En organismos eucariota, la mitocondria es el principal orgánulo productor de ROS.

El MeHg es capaz de alterar distintas funciones mitocondriales incluyendo la respiración y la fosforilación oxidativa además de inducir cambios en la concentración de calcio mitocondrial (Yee y Choi 1996, Limke et al. 2004). El MeHg altera la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo III (ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa) de la cadena respiratoria mitocondrial, traduciéndose en un incremento de ROS, una deplección de GSH y un aumento en la peroxidación lipídica tal y como se ha observado en ratas expuestas a MeHg (Yee S y Choi 1996). Así mismo, el MeHg es capaz de reducir los

niveles de ATP intracelular en células granulares de cerebelo (Fonfría et al. 2005). El MeHg promueve la apertura del poro de permeabilidad transitoria en la mitocondria (MTP) (Insug et al. 1997, Shenker et al. 2000) a través del cual pueden difundir de forma pasiva hacia el citosol moléculas con pesos moleculares < 1.5 kDa tales como iones, metabolitos y agua (Green y Reed 1998, Martinou 1999, Bröker et al. 2005). La apertura del MTP es un proceso irreversible acompañado de una hinchazón de la mitocondria que conduciría a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , de factores mitocondriales como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIF) procedentes de la mitocondria (Petit et al. 1998) como ha sido observado en el caso del MeHg (Shenker et al. 2000, Limke et y Atchinson 2002, Fonfría et al. 2002). La sobreexpresión de Bcl-2 o la exposición a ciclosporina A, agentes inhibidores de la formación del MTP, disminuyen el estrés oxidativo y la muerte neuronal inducidos por MeHg en preparaciones neuronales (Sarafian et al. 1994, Myhre y Fonnum 2001). Estos resultados sugieren la participación de la mitocondria y en particular la formación del MTP en la muerte neuronal inducida por MeHg.

El estrés oxidativo y la formación de radicales libres ( $\text{O}^{2-}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peróxidos lipídicos etc.) contribuyen a la neurotoxicidad del MeHg mientras que los antioxidantes ofrecen una protección parcial en sistemas *in vivo* e *in vitro*. En la figura 1.7 se muestran de forma esquemática como el MeHg puede inducir estrés oxidativo. La expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la apoptosis experimentó un incremento tras 6 y 24 horas de exposición a  $1\mu\text{M}$  MeHg en células PC12, respectivamente (Wilke et al. 2003). Los antioxidantes vitamina E (Vit E), probucol y propil gallato protegieron del daño neuronal y de la generación de ROS en sistemas *in vivo* e *in vitro*, respectivamente (Sarafian et al. 1991, Sorg et al. 1998, Usuki et al. 2001, Gassó et al. 2001). Los antioxidantes ejercen una mayor protección de la muerte neuronal inducida por MeHg que los inhibidores de canales y transportadores de calcio (Gassó et al, 2001 Sanfeliu et al. 2003).

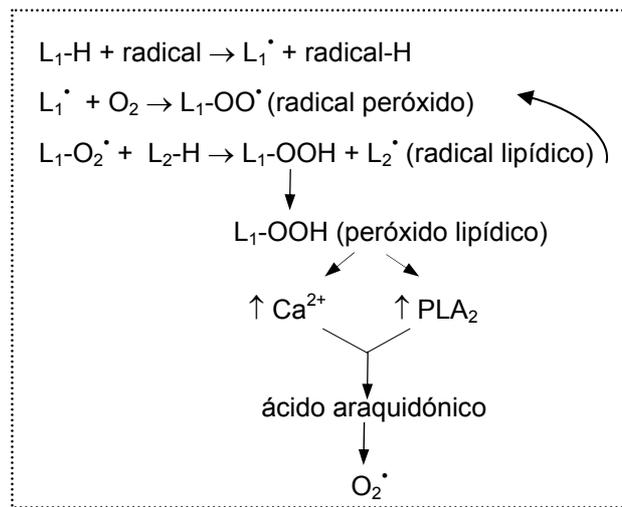


**Figura 1.7.-** Mecanismos implicados en la generación de estrés oxidativo por MeHg. Modificación del esquema original de Sarafian et al. 1996

Ratas expuestas a largo plazo con MeHg mostraron una muerte apoptótica de las células neuronales al mismo tiempo que se observó también una disminución de la actividad catalasa y citocromo c oxidasa en músculo esquelético. La reversión de la muerte neuronal por el antioxidante trólox (análogo de la vitamina E) sugirió la implicación del estrés oxidativo en los procesos de intoxicación con MeHg (Usuki et al. 2001). El efecto del MeHg sobre el estrés oxidativo ha sido valorado en tres modelos *in vitro* diferentes: en cultivos de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) y en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de feto humano. El patrón de muerte inducido por concentraciones de 0 – 10  $\mu$ M de MeHg durante distintos tiempos de exposición fue similar en los dos cultivos neuronales pero diferentes al de los astrocitos. La depleción de los niveles endógenos de GSH en los tres modelos mostró que entre ellos, el neuroblastoma humano era el modelo más sensible y los cultivos de astrocitos el más resistente a la acción del MeHg. Si bien, la muerte neuronal inducida por MeHg fue protegida por la cisteína en astrocitos y en neuroblastoma, esta muerte fue parcialmente protegida sólo en los cultivos neuronales por el selenio, la vitamina E y la catalasa (Sanfeliu et al. 2001). Además, la muerte neuronal de neuronas granulares de cerebelo inducida por la exposición a MeHg durante 24 h fue protegida totalmente por propil gallato, 17- $\beta$ -estradiol y un derivado del estradiol, y parcialmente protegida por probucol y vitamina E. La protección ejercida por probucol se debe a la reducción parcial de los niveles de ROS y a la disminución de los niveles de calcio intracelular, a diferencia de la ejercida por propil gallato, que reduce totalmente los

niveles de ROS y parcialmente los niveles de calcio intracelular sugiriendo que el estrés oxidativo sería la principal causa de la neurotoxicidad (Daré et al. 2000, Gassó et al. 2001)

Finalmente, la peroxidación lipídica tiene lugar cuando los lípidos son atacados por radicales libres. En general, un desequilibrio entre factores pro-oxidantes y antioxidantes de la célula puede conducir a la peroxidación lipídica. En la figura 1.8 se esquematiza la amplificación del daño oxidativo iniciado por el ataque de un radical libre a la cadena alifática de un ácido graso. La presencia de hidroperóxidos lipídicos en la membrana celular puede modificar su estructura y función alterando su fluidez, potencial de membrana y permeabilidad a iones como por ejemplo a  $\text{Ca}^{2+}$ . Los peróxidos lipídicos formados no se eliminan con lo cual pueden dar lugar a la formación de otros radicales ( $\text{LO}^{\bullet}$ ) suficientemente reactivos como para atacar a biomoléculas como ácidos nucleicos y proteínas (Kodavanti 1999).



**Figura 1.8.-** Esquema detallado de las reacciones implicadas en la generación de peróxidos lipídicos

En sistemas *in vivo* se ha visto que la vitamina E es capaz de prevenir la lipoperoxidación (Sarafian et al. 1999, Usuki et al. 2001). Sarafian y Verity (1991), mostraron que cultivos primarios de células granulares de cerebelo expuestas a MeHg (agudo) sufrían un incremento de la peroxidación de lípidos que podía ser reducido por la vitamina E aunque esta reducción no prevenía la muerte neuronal. Ratas expuestas de forma aguda a MeHg mostraron un incremento de la peroxidación lipídica en hígado (Lin et al. 1996). Por otro lado, la muerte por apoptosis se caracteriza por una reorganización de los lípidos de la membrana y una pérdida de la simetría de la membrana debido a la translocación de la

fosfatidilserina desde las capas internas hacia las externas. En modelos experimentales *in vitro* de monocitos, se observaron ambos efectos tras ser expuestos a 5  $\mu\text{M}$  de MeHg durante 1h (Insug et al. 1997, Shenker et al. 1998).

Todas estas observaciones indican el papel que ejerce el estrés oxidativo en la muerte neuronal inducida por MeHg.

### **1.5.6.- Muerte neuronal inducida por metilmercurio**

La apoptosis y la necrosis son dos tipos de muerte bien diferenciadas morfológica y molecularmente. La neurodegeneración provocada por MeHg cursa por ambos mecanismos de muerte dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición al metal, tal y como se demostró en estudios realizados en animales de experimentación y en sistemas *in vitro* (Kunimoto et al. 1994, Nagashima et al. 1996, Castoldi 2000, 2001, Toimela et al. 2004, Wilke et al. 2003). Ratas expuestas a 10 mg/kg/día de MeHg durante 10 días mostraron la aparición de indicios de una muerte necrótica en la corteza cerebral y en los núcleos del tronco del mesencéfalo mientras que las ratas expuestas a 4 mg/kg cada dos días durante 20 días, mostraban signos de atrofia y condensación nuclear en las células granulares de cerebelo (típico de procesos apoptóticos), aunque no se observó daño en las células de Purkinje ni en las células estrelladas o en cesto (Nagashima et al. 1996). Además, estudios realizados en los cultivos de células granulares de cerebelo expuestos a concentraciones de MeHg  $>5 \mu\text{M}$  durante 1h mostraron alteraciones celulares típicas de una muerte por necrosis, mientras que concentraciones de MeHg  $\leq 1 \mu\text{M}$  inducían una muerte de tipo apoptótica después de  $\geq 18$  horas de exposición (Kunimoto et al. 1994, Castoldi et al. 2000, 2001, Daré et al. 2000). El mismo tipo de muerte apoptótica se produjo en las líneas celulares de neuroblastoma SH-SY5Y, glioblastoma y de células epiteliales de retina, fueron tiempo- y concentración-dependientes, aunque la línea SH-SY5Y resultó ser la más sensible. En las tres líneas celulares, la muerte neuronal inducida por los compuestos de mercurio fue de tipo apoptótica manifestándose a las 24 h (Toimela et al. 2004). Recientemente, el mecanismo de muerte activado por MeHg ha sido explorado también en cultivos de células corticales y en la línea de células madre neuronales C17.2. El porcentaje de muerte por apoptosis inducida por el tratamiento agudo con MeHg ( $\sim 20\%$  a 50 nM, 24h) en los cultivos primarios de células corticales fue similar al observado en la línea neuronal C17.2 pero a concentraciones de MeHg 10 veces inferiores ( $\sim 20\%$  a 500 nM, 24h)

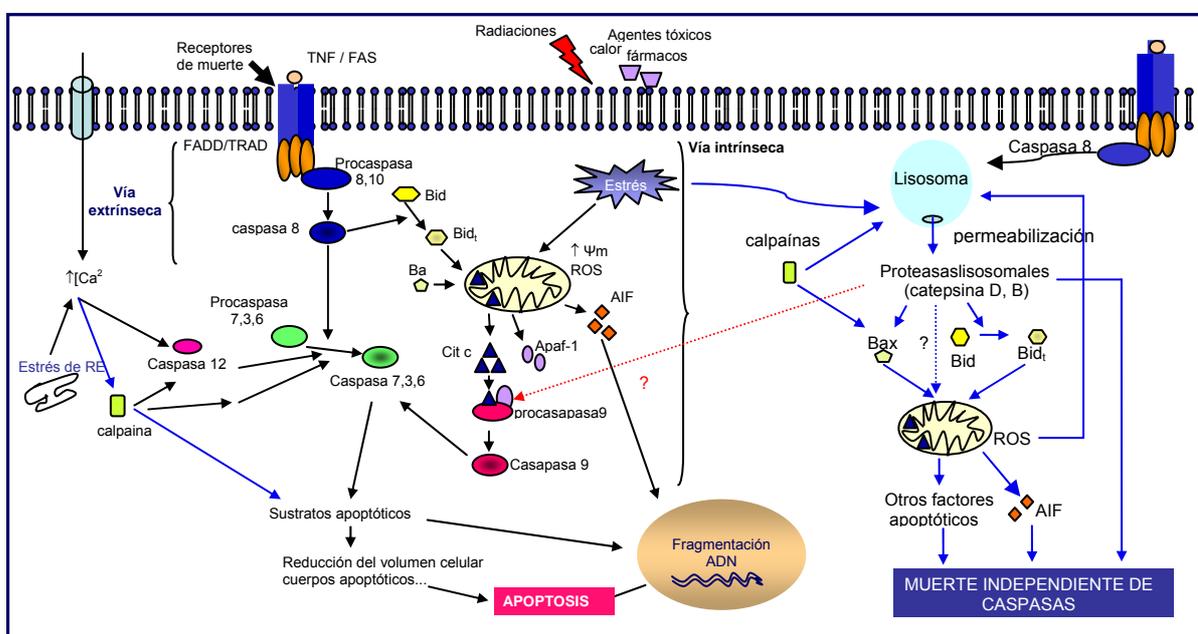
(Tamm et al. 2006). En cultivos de células granulares de cerebelo, la síntesis de ARNm y proteínas parecen no estar implicadas en la muerte apoptótica inducida por la exposición aguda a MeHg ya que la inhibición de estos procesos con actinomicina D y cicloheximida, respectivamente, no protegieron de la muerte neuronal (Castoldi et al. 2000).

Se desconoce cuál es la secuencia “cronológica” exacta de eventos que evocan a la muerte apoptótica inducida por MeHg. Las células PC12 muestran una muerte apoptótica concentración-dependiente a las 24 h de la exposición con una  $EC_{50}$  de 1.3  $\mu$ M. Tras un insulto agudo con MeHg (5  $\mu$ M), la secuencia de eventos desencadenada consiste en una disminución del potencial de la membrana mitocondrial detectable a los 30 min del insulto, seguida por una disminución de los niveles de GSH y ATP (1 h exposición) siendo ésta última más pronunciada a las 3h de la exposición, momento en el que se observó también un incremento de los niveles de ROS y de la actividad caspasa 3. La protección de la muerte por N-acetil-cisteína (NAC) y GSH, pero no por la ciclosporina A que a pesar de inhibir la formación del poro mitocondrial no fue capaz de mejorar la viabilidad neuronal, parecen indicar que la depleción de los niveles de GSH son la primera causa desencadenante de la muerte. A su vez la disminución de los niveles de GSH implicaría un incremento del estrés oxidativo de la célula (Gatti et al. 2004). En contraposición, la secuencia de eventos desencadenados en células gliales C6 tratadas de forma aguda con MeHg se inicia con un incremento inmediato de ROS alcanzando el máximo a las 2 h o 3 h de la exposición a 1 – 10  $\mu$ M de MeHg o a 0.1  $\mu$ M MeHg, respectivamente. A continuación, la fragmentación del ADN de forma tiempo- y concentración-dependiente tuvo lugar de forma paralela a la alteración del potencial de la membrana mitocondrial responsable de la formación del poro de permeabilidad transitoria (MPT). Aunque la muerte neuronal cursó exclusivamente por apoptosis, tan sólo se observó un incremento en los niveles de caspasa 3 en los cultivos expuestos a la máxima concentración. Esta muerte neuronal fue protegida por los secuestradores de radicales libres N-acetil-cisteína y GSH (Belletti et al. 2002).

La muerte apoptótica puede cursar por distintas vías según el mecanismo intracelular activado. Existen dos vías principales de apoptosis, la vía extrínseca dependiente de la activación de los receptores de muerte y la vía intrínseca dependiente de las mitocondrias (Strausser et al. 2000, Fan et al. 2005). Generalmente, la muerte apoptótica dependiente de la activación de los receptores de muerte cursa con la activación de la caspasa 8, seguida por la activación directa de las caspasas efectoras (3, 6 o 7) o de factores citosólicos pro-apoptóticos como BID, capaz de activar la vía intrínseca de apoptosis

(figura 1.9) (Fan et al. 2005, Li et al. 1998). La vía intrínseca de apoptosis, iniciada por estímulos externos e internos (estrés oxidativo, daño en el ADN, agentes tóxicos, etc.), conduce a la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria debido a la activación de las proteínas de la familia bcl-2 o a la formación del poro de permeabilidad transitoria (MTP), liberación del citocromo c y posterior formación del apoptosoma y activación de las caspasas efectoras (3, 6 y 7) (Li et al. 1997, Bröker et al. 2005). No obstante, la muerte apoptótica puede ser activada también por el estrés del retículo endoplasmático (RE) con el posterior incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y activación de la caspasa 12 (figura 1.9) (Breckenridge et al. 2003).

Por otro lado, en los últimos años se han descrito otras formas de muerte celular programada que cursan o pueden cursar por mecanismos independientes a la activación de las caspasas como por ejemplo la muerte neuronal mediada por el factor inductor de apoptosis (AIF), por las proteasas lisosomales y por las calpaínas (proteasas dependientes de calcio) (figura 1.9) (Guttmann y Jonhson 1998, Daugas et al. 2000, Leist y Jaattela 2001; para revisión ver Uchiyama 2001, Guicciardi et al. 2004, Harwood et al. 2005, Bröker et al. 2005). No obstante, existen distintos puntos de intercomunicación entre las distintas vías apoptóticas descritas.



**Figura 1.9.-** Esquema resumen de la muerte celular apoptótica por vía intrínseca y extrínseca. En azul se indica la apoptosis independiente de caspasa. Esquema modificado de Leist y Jaattela 2001 y Guicciardi et al. 2004.

En muchas ocasiones la muerte apoptótica inducida por MeHg es el resultado de la activación de distintas vías de señalización tal y como queda reflejado en distintos modelos de toxicidad del MeHg (Tamm et al. 2006, Nishioku et al. 2000).

#### 1.5.6.1.- Evidencias de la muerte apoptótica inducida por metilmercurio dependiente de la activación de la caspasa 3

La muerte apoptótica observada en las líneas celulares PC12, C6, SH-SY5Y y en las células epiteliales y de glioblastoma inducida por la exposición < 48h a concentraciones  $\mu\text{M}$  de MeHg cursó con la activación de la caspasa 3 (Belletti et al. 2002, Gatti et al. 2004, Toimela et al. 2004). Existen algunos modelos celulares en los que la apoptosis inducida por MeHg es fruto de la activación de distintas vías de señalización intracelular. Por ejemplo, la muerte apoptótica inducida por la exposición a 500nM MeHg durante 24 h en la línea celular de células madre neuronales C17.2 depende tanto de la activación de la caspasa 3 como de la activación de las calpaínas debido al incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Como consecuencia de la exposición a MeHg se produce una oligomerización y activación de Bax (proteína proapoptótica de la familia de las proteínas bcl-2) que permite la formación de poros en la membrana mitocondrial a través de los cuáles el citocromo c es liberado al citosol dónde, posteriormente, se producirá la activación de la caspasa 3. La muerte neuronal inducida por MeHg fue protegida parcialmente por los inhibidores de las caspasas de amplio espectro o por los de las calpaínas y totalmente revertida por la exposición simultanea a ambos tipos de inhibidores, confirmando la implicación de ambas vías de muerte en este modelo celular (Tamm et al. 2006). Un segundo ejemplo de muerte celular por apoptosis dependiente de la activación de la caspasa 3 lo encontramos en cultivos de microglía de rata expuestos durante 48 h a 500 nM MeHg. Si bien en estos cultivos se observó también una muerte apoptótica dependiente de la liberación de proteasas lisosomales, aunque ésta tuvo lugar de manera minoritaria (Nishioku et al. 2000).

#### 1.5.6.2.- Evidencias de la existencia de otras vías de muerte apoptótica inducida por metilmercurio

Existen distintos trabajos que demuestran que la muerte apoptótica inducida por MeHg puede cursar por mecanismos independientes a la activación de las caspasas (Daré et al. 2000, Nishioku 2000, Castoldi et al. 2000, Fonfría et al. 2002, Zhang et al. 2003, Sakaue et al. 2003, 2005).

#### *1.5.6.2.1.- Muerte apoptótica mediada por el factor inductor de la apoptosis*

El factor inductor de apoptosis (AIF) es una proteína localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria cuya translocación al núcleo induce la fragmentación del ADN de manera independiente a la apoptosis nuclear derivada de la liberación del citocromo c al citosol y de la posterior activación de las caspasas (Susin et al. 1996, Daugas et al. 2000). Cultivos de células granulares de cerebelo tratadas de forma aguda con MeHg mostraron una translocación del factor AIF desde la mitocondria al núcleo. Esta translocación fue la responsable de la fragmentación del ADN 8 h después de exposición a 1  $\mu$ M MeHg (Fonfría et al. 2002). En estas condiciones no se observó un incremento en la actividad caspasa 3 (Castoldi et al. 2000, Daré et al. 2000).

#### *1.5.6.2.2.- Muerte apoptótica mediada por las proteasas lisosomales*

En los últimos años, se ha descrito la participación de las proteasas lisosomales (catepsina B, D y L) en la muerte por apoptosis (Shibata et al. 1998, Bidere et al. 2003, Canu et al. 2005, Erdal et al. 2005, Kaasik et al. 2005). Cultivos celulares del astrocitoma humano D348 expuestos a MeHg durante 1 h mostraron una disminución de la viabilidad lisosomal acompañada por una reducción del potencial de membrana mitocondrial a las 8 h de tratamiento, seguido por una alteración de la integridad de la membrana plasmática y por una fragmentación del ADN a las 24h. En ningún caso se produjo un incremento de la caspasa 3. Estos hechos parecen indicar que las proteasas lisosomales podrían ser los factores desencadenantes de la muerte astrocítica inducida por el estrés oxidativo (Daré et al. 2001). Por otro lado, la inhibición farmacológica de la proteasa lisosomal catepsina D en cultivos primarios de microglía de rata expuestos a MeHg (500 nM, 48h) revertió parcialmente la muerte celular inducida por MeHg, aunque la vía principal de muerte en estos cultivos dependió de la activación de la caspasa 3 (Nishioku et al. 2000).

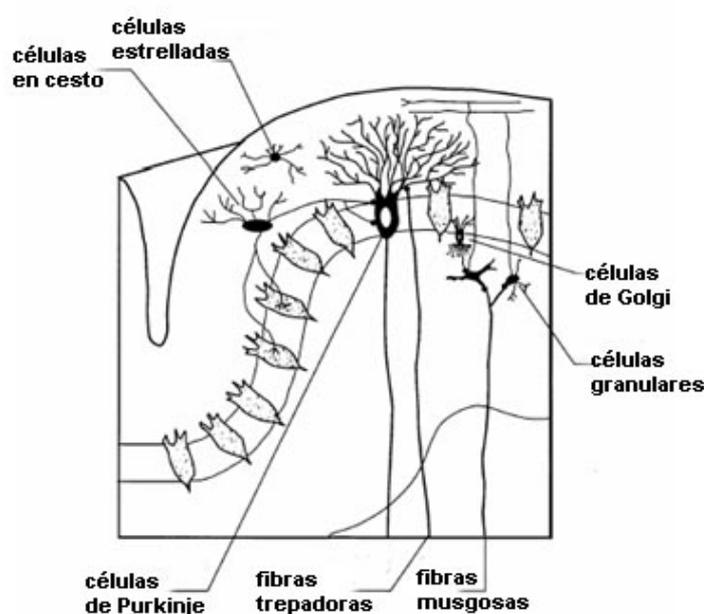
#### *1.5.6.2.3.- Muerte apoptótica mediada por las calpaínas*

Las calpaínas son proteasas activadas por calcio que pueden participar en procesos apoptóticos tal y como se observó en células SH-SY5Y en las que se indujo estrés oxidativo (Guttmann y Jonhson 1998). Animales de experimentación expuestos de forma crónica a MeHg, mostraron una activación de la  $\mu$ -calpaína y una acumulación de productos proteolíticos derivados de la activación de las calpaínas previos a la aparición de daño neuronal. Paralelamente, en estos animales no se observó activación de la caspasa 3 (Zhang et al. 2003). Por otro lado, se observaron resultados similares en

cultivos de células granulares de cerebelo tratadas con el MeHg durante periodos de tiempo de 24 – 48h. En estos cultivos el MeHg indujo una muerte neuronal apoptótica, de tipo concentración dependiente, que cursó con la activación de las calpaínas. Esta muerte fue parcialmente revertida por los inhibidores de las calpaínas y por los agentes antioxidantes 17  $\beta$ -estradiol y J811 (un derivado del 17  $\beta$ -estradiol), pero no por los inhibidores de la caspasa demostrando la participación de las calpaínas en la muerte neuronal (Daré et al. 2000, Sakaue et al. 2003, 2005).

### **1.6.- Cerebelo. Modelo de toxicidad del metilmercurio**

Tradicionalmente, el cerebelo se describió como la parte del cerebro encargado del control de las funciones motoras (concretamente las relacionados con el SN voluntario y los movimientos finos) y el proceso de aprendizaje, a pesar de que también se le asigna el control de las funciones cognitivas incluyendo la memoria de trabajo. Estructuralmente el cerebelo está compuesto por tres capas de células: la capa molecular (células estrelladas y en cesto), la capa de células Purkinje y la capa de células granulares (figura 1.8). El cerebelo recibe impulsos nerviosos de las regiones cerebrales relacionadas con la actividad motora (la médula espinal, el núcleo vestibular y la corteza cerebral) a través de las fibras trepadoras y musgosas, y sólo proyecta al exterior a través de las células de Purkinje. Éstas son activadas por los axones de las células granulares de cerebelo (fibras paralelas) e inhibidas por las células de la capa molecular (Fonnum et al. 2000, Fonnum y Lock 2004, Atchinson et al. 2005). Las células granulares son la únicas células de la capa interna capaces de liberar el neurotransmisor glutamato. La neurotransmisión en las células granulares, en las fibras trepadoras y en las musgosas tiene lugar a través del neurotransmisor excitador glutamato, mientras que en las células de Purkinje y en el resto de neuronas locales tiene lugar a través del neurotransmisor inhibidor GABA. Sin embargo, las células de Golgi utilizan como neurotransmisores la glicina y el GABA (Wilkin et al. 1981).



**Figura 1.8.-** Esquema de la composición celular del cerebelo

Los ratones weaver, ratones que de forma natural presentan mutaciones que provocan la pérdida de las neuronas granulares de cerebelo, muestran alterada su función motora (Rakic y Sidman 1973). Estos mismos efectos se observan en los casos de intoxicación por MeHg. Si la exposición a MeHg tiene lugar durante el desarrollo cerebral, se produce una alteración de la migración de las neuronas granulares y de la sinaptogénesis afectando a la estructura general del cerebelo. En cambio, si la exposición sucede en las etapas posteriores al desarrollo cerebral o en adultos, el daño es mucho más selectivo e induce la pérdida de las neuronas granulares después de haber migrado hacia las capas internas del cerebelo. Aunque existen multitud de evidencias, de la especial vulnerabilidad de las neuronas granulares de cerebelo al MeHg todavía se desconoce el mecanismo de su selectividad (Davis et al. 1994, Korogi et al. 1994, Nagashima et al. 1996). La vulnerabilidad no es resultado de la cantidad de MeHg acumulada ya que las células granulares de cerebelo acumulan menos MeHg que las células de Purkinje, pero sin embargo, son más vulnerables al MeHg que las células de Purkinje (Leyshon-Sorland et al. 1994, en Atchinson, et al. 2005, Harada 1995). La exposición prolongada a MeHg en ratas produjo una alteración estructural (fragmentación del ADN) en las neuronas granulares de cerebelo pero, sin embargo, no se observaron alteraciones en la corteza o en la materia blanca. En este trabajo se observó que el MeHg afectó específicamente a las células granulares de cerebelo pero no a las células de la capa molecular (Nagashima et al. 1996).

Una de las ventajas de trabajar con el cerebelo como modelo de toxicidad al MeHg es la simplicidad estructural y la posibilidad de cultivar *in vitro* las células granulares de cerebelo. En este trabajo, como modelo *in vitro* de toxicidad al MeHg se han utilizado cultivos primarios monocapa de las neuronas granulares de cerebelo por distintos motivos: (1) la facilidad de cultivar éste tipo de células y (2) la apreciable vulnerabilidad de estas neuronas a MeHg. A pesar de ser cultivos mayoritariamente glutamatérgicos, también contienen un 5 – 6% de las interneuronas GABAérgicas de tipo cesto y estrelladas (Currie y Dutton 1980, Sonnewald et al. 2004). La contaminación glial se mantiene a niveles inferiores al 5% tras añadir un anti-mitótico. Se ha descrito que las neuronas granulares de cerebelo en cultivos, crecidas en condiciones despolarizantes (25 mM KCl) (Peng et al. 1991), adquieren la madurez a los 8 días de cultivo justo cuando expresan los receptores funcionales de glutamato y adquieren la capacidad de liberar el glutamato de forma calcio dependiente (Gallo et al. 1982; Frandsen y Schousboe 1990; Kato et al. 1991; Griffiths et al. 1997). Estructuralmente, en este momento estos cultivos presentan conexiones sinápticas principalmente de tipo axodendríticos (Peng et al. 1991), transportadores de glutamato funcionales (Numakawa et al. 2001; Fonfría et al. 2005) y receptores GABA<sub>A</sub> tal y como sucede en las neuronas de la capa granular del cerebelo (Olsen y Mikoshiba 1978; Palacios et al. 1980, Pomés et al. 1993; Vale et al. 1997; 2003).