



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

---

**RESULTADOS**



## **4.- RESULTADOS**

### **4.1.- Métodos alternativos al uso de animales de experimentación para la evaluación de neurotoxicidad**

El Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, EU) propuso la elaboración de una base de datos de métodos alternativos al uso de animales de experimentación en el campo de la neurotoxicología con el objetivo de proponer métodos útiles para evaluar el daño neurotóxico de compuestos químicos y formulaciones.



A partir del análisis retrospectivo de la literatura científica del periodo 1980 – 2002 , se han identificado una serie de métodos para la determinación del potencial / potencia neurotóxica de compuestos químicos mediante el uso de modelos *in vitro*. Los métodos se basan en la identificación de los marcadores biológicos (endpoints) reseñados en la tabla 3.3 (ver material y métodos).

#### **4.1.1.- Ensayo de esterasas neuronales para la evaluación de neurotoxicidad de compuestos organofosforados**

Este método *in vitro* fue propuesto para la identificación y la clasificación de compuestos organofosforados (OP) incluyendo aquellos que pueden inducir polineuropatía retardada (OPIDN, OPIDP). Es de destacar la existencia de directivas legales que regulan la evaluación y valoración del potencial neurotóxico de los compuestos organofosforados en modelos *in vivo* (Dir 96/54/EC B37 y B38).

##### 4.1.1.1.- Marco toxicológico de los compuesto organofosforados

Actualmente, en el mercado existen unos 200 insecticidas organofosforados (OP). A pesar de que algunos compuestos OP fueron utilizados como armas durante la Segunda Guerra Mundial, existen evidencias anteriores (1890) de neuropatías retardadas inducidas por tri-orto-cresil fosfato, un compuesto OP utilizado para combatir la tuberculosis (Ehrich y Jortner 2002). Los síntomas neurotóxicos observados *in vivo* provocados por intoxicación por OP son una sobrestimulación aguda del sistema colinérgico, inducción de polineuropatía retardada (OPIDP) y un síndrome difuso no totalmente caracterizado que incluye un síndrome intermedio de miastenia y algunos efectos neurofisiológicos y psicológicos. La neurotoxicidad aguda producida por los OPs implica una inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) responsable de la acumulación de acetilcolina (ACh) en las sinapsis y en las uniones neuromusculares traduciéndose en excitación, parálisis y multitud de síntomas según el grado de intoxicación. La manifestación de la OPIDN en humanos y animales se produce tras un periodo de latencia entre la exposición y la aparición de ataxia a los 7 – 14 días posteriores a la intoxicación progresando hacia una debilidad muscular y parálisis conjuntamente con la alteración en la morfología neuronal. Este periodo de latencia depende del compuesto OP y de la especie animal (Johnson 1982, Lotti 2000, Ecobichon 2001).

El desarrollo de la OPIDN está asociado a la inhibición de la carboxi-esterasa neuronal conocida como la esterasa diana de neuropatía (*neuropathy target esterase*; NTE) con valores > al 70% en exposición única y > al 50% en exposiciones múltiples (Johnson 1982, Lotti 2000, Ecobichon 2001). Esta inhibición correlaciona con la aparición de axonopatía central-periférica retardada inducida por los OPs. Los compuestos OPs inhiben de forma irreversible la AChE y la NTE por un proceso conocido como “aging” debido a la interacción covalente del compuesto OP con el centro activo de los enzimas. Si bien todos los casos de OPIDN presentan una inhibición de la NTE, no siempre su inhibición conduce al desarrollo de OPIDN. La NTE se localiza en el cerebro, en la médula espinal, en nervios periféricos y en células no-neuronales. A pesar de que la inhibición de la NTE es un elemento imprescindible para el desarrollo de OPIDN se desconoce cuál es el nexo de unión entre ellos ya que se desconoce la función fisiológica de la NTE (Lotti 2000, Ecobichon 2001). Además, las especies animales presentan diferente susceptibilidad a los OPs. En humanos, gatos, búfalos, ovejas y pollos (entre otras especies) se han observado evidencias clínicas de la progresión e irreversibilidad de la OPIDN, aunque estos hechos no se observaron en roedores (Ehrich y Jortner 2002, Abou-Donia y Lapadula 1990).

#### 4.1.1.2.- Bases del método

Teniendo en cuenta que *in vivo* los compuestos organofosforados inhiben las enzimas AChE y NTE según su potencial neurotóxico / neuropático, el método *in vitro* propuesto para evaluar el potencial tóxico para provocar axonopatía central-periférica retardada (OPIDN) se basa en la determinación de la actividad relativa de las enzimas AChE y NTE. Además, la inhibición de la AChE en el SN es un elemento clave del mecanismo de toxicidad aguda de los OPs, sean o no neuropáticos. Johnson y Lotti fueron los primeros en desarrollar un método para determinar el potencial inhibitorio de los OPs sobre la AChE y la NTE en homogenados de cerebro de pollo (Johnson et al. 1977, Lotti y Johnson 1978). La actividad NTE se determina cuantificando la hidrólisis del sustrato fenil valarato resistente a paraoxon (compuesto no neuropático) y sensible a Mipafox (compuesto neuropático). La actividad AChE se determina según el método colorimétrico desarrollado por Ellman et al 1961.

Los datos de actividad AChE y NTE recogidos en este método provienen del ensayo de 15 compuestos OPs diferentes (neuropáticos y no-neuropáticos) en distintos modelos *in vitro* realizado en 11 laboratorios científicos diferentes (tabla 4.1). La capacidad tóxica de

estos compuestos se valora a partir de sus IC<sub>50</sub> para la NTE y la AChE. Debe mencionarse que las concentraciones de OP utilizadas en los ensayos de NTE y AChE no causaron efectos citotóxicos.

**Tabla 4.1.-** Compuestos organofosforados y sistemas *in vitro* utilizados para la evaluación de su potencial neurotóxico

<b>Marcadores (end-point)</b>	Actividad enzimática (por métodos colorimétricos): -Esterasa diana de neuropatía (NTE) -Acetilcolinesterasa (AChE)		
<b>Sistemas experimentales</b>	Homogenado de cerebro de pollo y humano Homogenado de nervio ciático de pollo Líneas celulares (SH-SY5Y y NB41A3) Cultivos reagregados de cerebro de pollo		
<b>Parámetros</b>	IC <sub>50</sub> NTE; IC <sub>50</sub> AChE; AChE / NTE IC <sub>50</sub> ratio		
<b>Compuestos*</b>	Clorpirifos (1)	clorpirifos-oxon (2)	malaoxon (1)
	Paratión (1)	paraoxon (2)	Metamidofos (1)
	Fosfomidon (1)	diclorvos (2)	Dietil diclorvos (1)
	Triclorfon (1)	Mipafox (5)	Fenil-saligenil-fosfato (1)
	Diisopropil fosforofluoridato (DFP; gas nervioso) (5)		
	Esteroisómeros del isomaltation (1)		
	*insecticidas menos el diisopropil fosforofluoridato que es un gas nervioso		
	Entre paréntesis se indica el n° de laboratorios que ensayaron el compuesto		

#### 4.1.1.3.- Resultados

La comparación de las actividades enzimáticas de la AChE y NTE en distintos tipos de modelos experimentales (tabla 4.2), revela que la actividad NTE en homogenados de cerebro de pollo y la línea celular SH-SY5Y son equivalentes, mientras que la actividad NTE en neuroblastoma de ratón (NB41A3) es un 15 % inferior a la encontrada en cerebro de pollo. La actividad NTE también fue detectada en otros tipos de células incluido en cultivos primarios de células embrionarias de pollo y en células cromafines bovinas. Por otro lado y en referencia a la actividad AChE, se observó que la actividad AChE en cerebro de ratón y pollo es superior a la observada en la línea celular humana SH-SY5Y y en el neuroblastoma de ratón.

**Tabla 4.2.-** Actividad NTE y AChE (nmol/min/mg proteína) en cerebro y cultivos celulares. Valores representados como la media  $\pm$  SEM

Modelo experimental	NTE	AChE
Homogenado de cerebro de pollo	22 $\pm$ 3	300 $\pm$ 13
Homogenado de nervio ciático de pollo	101 $\pm$ 10*	—
Homogenado de cerebro de rata	13 $\pm$ 1	—
Homogenado de cerebro de ratón	13 $\pm$ 1	120 $\pm$ 7
SH-SY5Y (línea celular humana) (diferenciadas con ácido retinoico)	21 $\pm$ 3	9 $\pm$ 1
SH-SY5Y (tras 28 días de cultivo; sin ácido retinoico)	14.8 $\pm$ 1.3	5.3 $\pm$ 0.7
NB41A3 (neuroblastoma de ratón)	5 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1
PC12 (feocromocitoma de rata)	~13	—
Cultivos primarios de neuronas embrionarias de pollo	—	252 $\pm$ 46
Cultivos reagregados de cerebro embrionario de pollo	14 $\pm$ 2 (a 4 días <i>in vitro</i> ) 23 $\pm$ 3 (a 14 días <i>in vitro</i> ) 8 (de 20 a 71 días <i>in vitro</i> )	135 $\pm$ 11 (a 7 días <i>in vitro</i> ) 742 $\pm$ 158 (a 19 días <i>in vitro</i> )
Linfocitos humanos	14 $\pm$ 3	—
Sangre humana	0.19 $\pm$ 0.02	—

Valores extraídos de Correll and Ehrich, 1987; Vilanova et al., 1990; Sawyer et al., 1992; Funk et al., 1994a; Ehrich y Veronesi, 1995; Li y Casida, 1997; Barber y Ehrich, 2001; Sigolaeva et al., 2001. Valores similares reportados por otros autores. \*nmol/min/g tejido

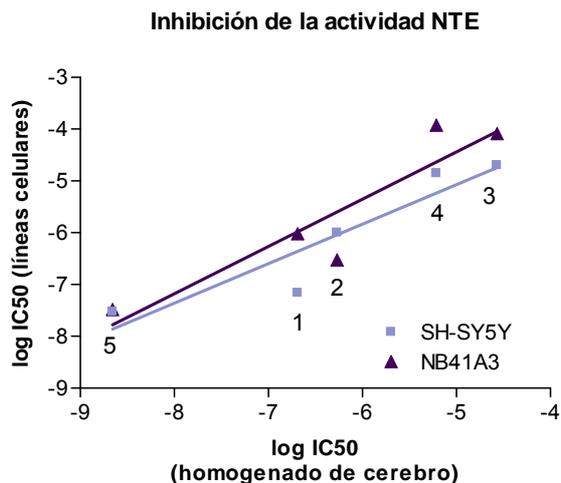
#### 4.1.1.3.1.- Reproducibilidad inter-laboratorios

Los ensayos incluidos en este método para la determinación de la actividad AChE y NTE en homogenados de cerebro de pollo fueron realizados por distintos laboratorios (Lotti y Johnson, 1978; Jonhson, 1988; Capodicasa et al. 1991; Bertolazzi et al. 1991; Kayyali et al. 1991; Jokanovic y Johnson, 1993; Richardson et al. 1993; Jokanovic et al. 1995; Jianmongkol et al. 1996; Randall et al. 1997). La reproducibilidad de los resultados publicados por laboratorios distintos, se determinó tras comparar los valores de IC<sub>50</sub> para diisopropil fosforofluoridato (DFP; 3 laboratorios) y Mipafox (4 laboratorios) frente la actividad NTE. Los valores de IC<sub>50</sub> fueron de 0.4 – 0.7  $\mu$ M para DFP y de 3 – 9.6  $\mu$ M para Mipafox (Lotti y Johnson 1978, Correll y Ehrich 1987, Yoshida et al. 1994, Moretto et al. 2000). La reproducibilidad inter-laboratorio fue > 95%, con un coeficiente de variación del log EC<sub>50</sub> de 2 % y 4 % para DFP y mipafox, respectivamente. Los valores de IC<sub>50</sub> para diferentes OPs frente la AChE y la NTE en homogenados de cerebro de pollo fueron

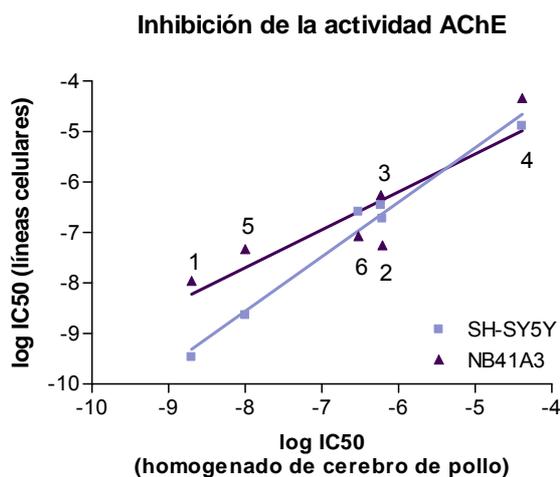
similares a los obtenidos en las líneas celulares aunque las condiciones de trabajo fueron diferentes entre los distintos modelos experimentales utilizados (Ehrich et al.1997).

#### 4.1.1.3.2.- Comparación de la capacidad de inhibición de la NTE y AChE en los diferentes modelos *in vitro*

La sensibilidad a los compuestos OPs es distinta entre las líneas celulares humanas y no humanas, siendo en general las humanas más sensibles (Figura 4.1 y 4.2). En la figura 4.1 se muestra la correlación lineal mantenida entre la inhibición de la NTE en homogenados de cerebro de pollo y la línea celular humana SH-SY5Y ( $r^2 = 0.8637$ ,  $p=0.0223$ ) y entre homogenados de cerebro de pollo y el neuroblastoma NB43A1 de ratón ( $r^2= 0.8492$ ,  $p=0.0261$ ). Paralelamente, en la figura 4.2 se muestra la correlación lineal observada entre la inhibición de la AChE en homogenados de cerebro de pollo y la línea neuronal humana SH-SY5Y ( $r^2 = 0.9801$ ,  $p= 0.0001$ ) y entre los homogenados de cerebro de pollo y el neuroblastoma de ratón NB43A1 ( $r^2= 0.7953$ ,  $p=0.0169$ ) en presencia de los compuestos OPs clorpirifos oxon, DFP, diclorvos, mipafox, paraoxon y fenil-saligenin-fosfato. En ambos casos los compuestos no activos del clorpirifos oxon, del fenil-saligenin-fosfato y del paraoxon (clorpirifos, tri-orto-cresil fosfato y paratión, respectivamente) no fueron capaces de inhibir la NTE ni la AChE, indicando que los sistemas utilizados no tienen la capacidad de metabolizarlos. La preincubación de los compuestos no activos con sistemas de activación (solución de bromuro o microsomas de hígado de rata) indujo una inhibición de las enzimas NTE y AChE comparable a la de sus compuestos activos (Barbet et al. 1999 a y b). Los cultivos reagregados de células embrionarias de pollo son un modelo *in vitro* sensible también a los compuestos OPs. Estos cultivos expuestos a una única dosis de paraoxon y diisopropil fosforofluoridato (DFP) mostraron una ausencia de inhibición y una inhibición de la NTE > 95%, respectivamente, de acuerdo con el potencial neuropático del DFP, pero no del paraoxon. Ambos compuestos inhibieron la AChE con valores > 99% (Funk et al. 1994 b).



**Figura 4.1.-** Comparación de la inhibición de la NTE por los compuestos OPs en homogenados de cerebro de pollo y en las líneas celulares SH-SY5Y y NB41A3. Compuestos: clorpirifos oxon (1), DFP (2), diclorvos (3), mipafox (4), fenil-saligenin- fosfato (5). Valores extraídos de Lotti y Johnson, 1978, Ehrich et al. 1997.



**Figura 4.2.-** Comparación de la inhibición de la AChE por compuestos OPs en homogenados de cerebro de pollo y en las líneas celulares SH-SY5Y y NB41A3. Compuestos: clorpirifos oxon (1), DFP (2), dichlorvos (3), mipafox (4), paraoxon (5), fenil-saligenin-fosfato (6). Valores procedentes de Lotti y Johnson, 1978; Ehrich et al., 1997.

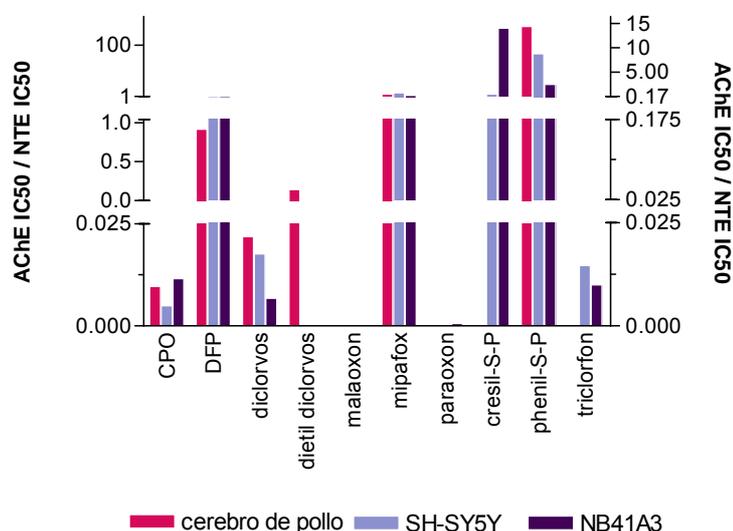
#### 4.1.1.4.- Modelo de predicción

A pesar de no existir modelos de predicción validados para la valoración de la neurotoxicidad de los compuestos OPs y anticolinesterásicos, formularon una predicción hipotética basándose en la potencia relativa de un compuesto en inhibir la AChE y la NTE *in vitro*. Este modelo de predicción se basa en los resultados publicados por Lotti y

Johnson (1978). Según el valor de la ratio  $X = \text{AChE IC}_{50} / \text{NTE IC}_{50}$  en homogenados de cerebro de pollo, los OPs pueden clasificarse en:

- ✓  $X \geq 1 \rightarrow$  compuestos que inducen OPIDN a concentraciones inferiores a la dosis letal 50 ( $\text{LD}_{50}$ ).
- ✓  $1 \geq X \geq 0.025 \rightarrow$  compuestos que inducen OPIDN sólo a dosis superiores a la  $\text{LD}_{50}$ .
- ✓  $X \leq 0.025 \rightarrow$  compuestos que no producen OPIDN.

Por otro lado y basándose en los resultados obtenidos en los estudios realizados con la línea celular humana SH-SY5Y, se considera que valores de ratio  $X < 0.024$  y  $> 0.188$  son indicativos de compuestos no capaces o capaces de inducir OPIDN, respectivamente (Ehrich et al. 1997). Teniendo en cuenta estos hechos, analizamos el potencial de predicción del método en 10 de los 15 compuestos ensayados de los cuales teníamos información de las actividades AChE y NTE en los diferentes modelos *in vitro*. Estos 10 compuestos OPs fueron: clorpirifos oxon (CPO), DFP, diclorvos, dietil diclorvos, malaoxon, mipafox, paraoxon, cresil-saligenin-fosfato (cresil-S-P), fenil-saligenin-fosfato (fenil-S-P) y triclorfon. La figura 4.3 muestra la ratio X ( $\text{AChE IC}_{50} / \text{NTE IC}_{50}$ ) para estos compuestos en homogenados de cerebro de pollo, en las células humanas SH-SY5Y y en las células de ratón NB41A3.



**Figure 4.3.-** Modelo de predicción para la aparición de neuropatía retardada inducida por compuestos organofosforados en diferentes modelos *in vitro* basado en la ratio  $\text{AChE IC}_{50} / \text{NTE IC}_{50}$ : homogenado de cerebro de pollo (eje de la izquierda) y líneas neuronales (eje de la derecha). Datos procedentes de Lotti y Johnson 1978, Ehrich et al. 1997

Así pues, este modelo predice que el mipafox, el cresil-saligenin-fosfato y el fenil-saligenin-fosfato son compuestos neuropáticos, mientras que el clorpirifos, el diclorvos, el malaoxon, el paraoxon y el triclorfon no producen OPIDN. Compuestos como el DFP y el dietil diclorvos producirían OPIDN a dosis cercanas a la dosis letal 50.

La utilización de líneas celulares, a diferencia de la utilización de homogenados de cerebro, permite evaluar la toxicidad de un compuesto a tras exposiciones múltiples en células vivas (Barber y Erich 2001). Así pues, la exposición de la línea celular SH-SY5Y durante 28 días a la forma inactiva y activa de los compuestos OPs (Clorpirifos/clorpirifos oxon; paratión/paraoxon; tri-cresil fosfato / fenil-saligenin-fosfato) mostró una inhibición de la AChE por parte de la forma activa del compuesto superior a la observada en tratamientos a exposición única. Entre todos los pares de compuestos ensayados, sólo el compuesto neuropático fenil-S-P inhibió la NTE después de los 28 días de exposición. Ni el clorpirifos oxon ni el paraoxon inhibieron la NTE, incluso a concentraciones que inhiben la AChE en un 70%, indicando su bajo potencial como agentes inductores de OPIDN (Barber y Erich 2001).

#### 4.1.1.5.- Ventajas e inconvenientes del modelo *in vitro*. *Status*.

Una de las ventajas del método propuesto es que la determinación bioquímica de las actividades enzimáticas NTE y AChE es una tarea fácil de realizar que no requiere instrumentos muy sofisticados. En referencia a los modelos *in vitro*, un homogenado de cerebro de pollo proporciona suficiente material como para evaluar 6 compuestos. Por otro lado, la disponibilidad en el mercado de diferentes líneas celulares de origen humano junto con la selección correcta de la línea más apropiada, para los objetivos del método, pueden facilitar la evaluación de la toxicidad a dosis múltiples (Barber y Ehrich 2001). El principal inconveniente del método radica en la carencia de sistemas de bioactivación, es decir, si un determinado compuesto necesita ser metabolizado para ser activo, este método no es capaz de predecir su potencial neurotóxico. No obstante, existen estudios direccionados a solucionar este problema (Barber et al. 1999).

#### *Status*

*No existe ningún estudio de validación inter-laboratorio en los 20 años de historia científica evaluada.*

#### **4.1.2.- Determinación del crecimiento de neuritas para la evaluación de compuestos que producen axonopatías**

Este método *in vitro* fue propuesto para la identificación de compuestos (plaguicidas, fármacos o agentes ocupacionales) capaces de producir alteraciones en los axones. El potencial axonopático de un compuesto puede ser predecido por su capacidad de afectar al crecimiento de las neuritas en neuronas en cultivo. El desarrollo de este método está en consonancia con los requerimientos internacionales existentes para la valoración y evaluación de la capacidad de los compuestos organofosforados en producir neuropatía retardada (EC; OEDC; US EPA) (Dir 96/54/EC B37 y B38).

##### 4.1.2.1.- Axonopatías. Marco toxicológico

Las neuronas constan de un cuerpo neuronal, un axón y de dendritas. La extensión de neuritas (axón y dendritas) es una característica fundamental de las neuronas que depende de los distintos elementos que conforman el citoesqueleto (microtúbulos, microfilamentos y neurofilamentos). La principal función de los neurofilamentos es mantener la integridad de los axones mielinizados y su velocidad de conducción (Nixon y Sihag, 1991, Julien 1999, Anthony et al. 2001).

La axonopatía se define como aquella patología en la que el axón pero no el cuerpo neuronal es la diana de acción de un determinado agente tóxico. Morfológicamente, la axonopatía se caracteriza por la degeneración de los axones de nervios centrales y periféricos. La degeneración axonal con acumulación de neurofilamentos y orgánulos, y la eventual atrofia y rotura de los axones son marcadores de axonopatías dístales observadas en humanos y animales de laboratorio tras ser expuestos a compuestos tóxicos como la acrilamida, n-hexano, 2,5-hexanediona y compuestos organofosforados. El análisis microscópico de axones mediante colorantes específicos de axones es un requisito de las directivas internacionales que regulan la valoración del potencial de los OPs de producir OPIDN en pollos (Dir/96/54/EC, B37 y B38; OECD N° 418 y 419; US EPA OPPTS 870.6100). Existen distintos tipos de compuestos químicos capaces de producir axonopatías (acrilamida, dicetonas - n-hexano y n-butil cetona -, los compuestos organofosforados, insecticidas piretroides, disulfuro de carbono -ditiocarbamato-, vinca alcaloides (Anthony et al. 2001). La mayoría de estos compuestos inducen axonopatías dístales. En éstas, la degeneración axonal se traduce clínicamente con la aparición de neuropatía periférica cuyas primeras manifestaciones están relacionadas con la

alteración de la capacidad sensorial y motora en pies y manos. La progresión y persistencia del daño involucra zonas más cercanas del cuerpo neuronal y los axones de la médula espinal. El potencial de regeneración es grande cuando la lesión se limita a los nervios periféricos y podría ser completo en axonopatías en las cuáles el proceso desencadenante se determina y elimina (Anthony et al. 2001).

#### 4.1.2.2.- Bases del método

El método propuesto analiza el potencial axonopático de un compuesto basándose en cambios en la morfología neuronal así como en la determinación bioquímica de componentes integrantes del citoesqueleto. En concreto, el método se basa en la capacidad de las neuronas en cultivo de extender neuritas y de mantener la expresión de las proteínas de neurofilamento en las neuritas. Las neuritas son procesos equivalentes al axón y a las dendritas de los sistemas *in vivo*. La cuantificación del crecimiento de las neuritas, la determinación de la proteína de neurofilamento de 200 kDa (NF-H) y la visualización del transporte axonal del movimiento de orgánulos membranosos *in vitro* fueron utilizados por Henschler, Schumck, Brad y Brimijoin como posibles marcadores (end-points) para la valoración del potencial axonopático de diferentes compuestos (Henschler et al. 1993, Schumck et al. 1997 y Brad y Brimijoin 1992). El crecimiento de neuritas se determinó midiendo la longitud y número de neuritas por célula y el porcentaje de neuronas que extienden neuritas. En general, una neurita se define como un proceso citoplasmático cuya longitud es el doble del diámetro del soma (Flaskos et al. 1994) dado que las neuritas largas son más sensibles al daño que las cortas. La valoración de los efectos tóxicos sobre los elementos del citoesqueleto se realizó mediante la utilización de anticuerpos contra la forma no fosforilada del NF-H. Por otro lado, el transporte axonal (anterogrado o retrogrado) se determinó midiendo la velocidad de transporte de trazadores por medio de técnicas de microscopía. (Brad y Brimijoin 1992). Existe un protocolo de análisis cuantitativo de la dinámica de orgánulos en células no-neuronales propuesto por Lindl (1992) (INVITTOX protocol nº 52, Comisión Europea – Joint Research Center -JRC-, ECVAM's database service, <http://ecvam-sis.jrc.it/>).

La elaboración del método se basó en el trabajo reportado por 10 laboratorios, realizado con 19 compuestos de distintas naturalezas y analizado en distintos modelos *in vitro* (tabla 4.4).

**Tabla 4.4.-** End-points, sistemas experimentales y agentes tóxicos utilizados para la evaluación del potencial axonopático de agentes tóxicos.

<b>Marcadores (end-point)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Crecimiento de neuritas (nº de neuritas, longitud y nº de neuronas con neuritas)</li> <li>- Elementos del citoesqueleto axonal (determinación NF-H mediante ELISA)</li> <li>- Transporte axonal (velocidad o capacidad de transporte)</li> </ul>		
<b>Sistemas experimentales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Líneas celulares humanas o de roedores: C6 de rata; N18 y N2a de ratón; N1E115, SH-Y5Y</li> <li>- Cultivos primarios de rata, ratón y pollo (neuronas de ganglio de raíz dorsal, corticales); cultivos de explantes</li> </ul>		
<b>Parámetros</b>	IC <sub>50</sub> para la inhibición del crecimiento de neuritas y para los niveles de NF-H		
<b>Compuestos</b>	Clorpirifos (3)	Leptofos (2)	Cresil-saligenin-fosfato (2)
	paraoxon (2)	Mipafox (2)	Fenil-saligenin-fosfato (1)
	Trifenil fosfato (1)	Diclorvos (1)	Tri-o-cresil fosfato(3)
	O-Ethyl-O-4-nitrophenyl phosphonothioate (EPN) (2)		
	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (1)		
	Vinblastina (2)	Vincristina (2)	Cisplatín (3) DFP (1)
	Colchicina (3)	Aluminio (1)	Carbaril (1) Acrilamida (3)
	Entre paréntesis se indica el nº de laboratorios que ensayaron el compuesto		

#### 4.1.2.3.- Resultados

Distintos autores han descrito que los compuestos que inducen axonopatías *in vivo* (organofosforados, acrilamida, colchicina y vinca alcaloides) producen la inhibición del crecimiento de las neuritas *in vitro* determinado por ensayos morfológicos y bioquímicos (Henschler et al. 1992, Brat and Brimijoin 1992,1993, Konings et al. 1994, Flaskos et al. 1994, 1998, 1999, Schmuck and Ahr 1997, Geldof et al. 1998, Li and Casida, 1998, Nicolini et al. 1998, Schmuck et al. 2000, Fowler et al. 2001). El crecimiento de las neuritas, utilizado como marcador del potencial axonopático, fue significativamente reducido por los OPs que producen claramente OPIDN a concentraciones no citotóxicas. Así pues, clorpirifos, EPN y leptofos inhibieron el crecimiento de las neuritas a concentraciones próximas a la citotoxicidad. Otros trabajos realizados con clorpirifos mostraron también una reducción del crecimiento de las neuritas en células N2a a concentraciones no citotóxicas (Sachana et al. 2001). El compuesto tóxico tri-o-cresil-fosfato (ToCP; isómero neuropático del tri-cresil-fosfato), indujo la inhibición del crecimiento de las neuritas y una reducción de los niveles de NF-H (fosforilado y no fosforilado) en células N2a acompañado de una disminución de los niveles NF-H (Flaskos

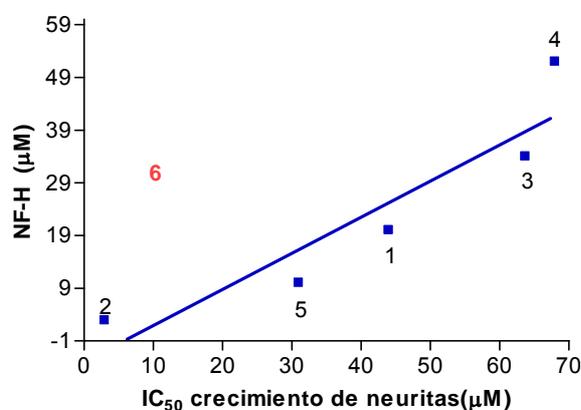
et al. 1998, Fowler et al. 2001), mientras que estos efectos no fueron provocados por los isómeros no neuropáticos del tri-cresil-fosfato (tri-p- y tri-m-cresil fosfato). Además, la inhibición del crecimiento de las neuritas ejercida por ToCP (pero no por el isómero TpCP) fue incrementada tras la activación metabólica del ToCP con microsomas de hígado de rata, resultados que verifican la capacidad neuropática del ToCP observada *in vivo*. En contraposición, el paraoxon y otros OPs que no producen OPIDN no inhibieron el crecimiento de neuritas a concentraciones no citotóxicas. Sin embargo, uno de los compuestos ensayados (trifenil fosfato) mostró una inhibición del crecimiento de las neuritas en células N18 y C6 a pesar de que no existen resultados conclusivos sobre su capacidad neurotóxica *in vivo* (Henshler et al. 1992).

Por otro lado, el potencial axonopático fue evaluado también en compuestos no organofosforados como la acrilamida, disruptores de microtúbulos (colchicina y vinca alcaloides), el aluminio e insecticidas del tipo carbamato. Compuestos como la colchicina, la vinblastina y el aluminio provocaron la reducción de la capacidad de transporte a lo largo del axón (Brat y Brimijoin 1993, Flaskos et al. 1998, Krah y Meller 1999; Theiss y Meller 2001). En referencia al crecimiento de las neuritas, la acrilamida, la colchicina, los vinca alcaloides (vincristina, vinblastina, cisplatin) y el carbaril fueron capaces de inhibir su crecimiento *in vitro* (Malgrange et al. 1994, Brat y Brimijoin 1993, Konings et al. 1994, Nicolini et al. 1998). Al mismo tiempo, el carbaril redujo los niveles de NF-H (Flaskos et al. 1999). No se han encontrado estudios sobre los efectos de los vinca alcaloides en el NF-H, si bien no modifican los niveles del NF-H fosforilado (Malgrange et al. 1994, Anthony et al. 2001). Por último, y en relación al potencial axonopático de la acrilamida (conocido agente neurotóxico) existen evidencias contradictorias sobre su capacidad de alterar el transporte axonal (Harris et al. 1994, Brat y Brimijoin 1993; Stone et al. 1999).

#### 4.1.2.4.-Modelos de predicción

Hasta el momento, no existe un modelo de predicción para la valoración del potencial axonopático. No obstante, Henschler et al. 1992 y Schmuck y Ahr (1997) propusieron la utilización de los métodos *in vitro* basados en la determinación morfométrica y bioquímica del crecimiento de neuritas y de elementos del citoesqueleto de los axones para evaluar el potencial neuropático de compuestos organofosforados, ya que observaron la existencia de una correlación entre la neurotoxicidad de los compuestos OPs que producen OPIDN *in vivo* con la reducción *in vitro* del crecimiento de las neuritas y de la cantidad de neurofilamento no fosforilado de 200 kDa en neuronas diferenciadas. Así

pues y teniendo en cuenta este hipotético modelo predictivo, cinco compuestos OP (cresil-saligenin-fosfato, tri-o-cresil fosfato, clorpirifos, mipafox y leptofos, pero no EPN) (ver apartado 4.1.1) mostraron una correlación lineal entre la capacidad de reducir la longitud de las neuritas y la cantidad de NF-H en neuronas de la línea de neuroblastoma N18 ( $r^2 = 0.8511$ ,  $*p = 0.0256$ ) con resultados cualitativos y cuantitativos similares (figura 4.4). Todos estos compuestos a excepción del clorpirifos son OP capaces de producir OPIDN. En el caso del clorpirifos, leptofos y EPN la inhibición del crecimiento de las neuritas tuvo lugar a concentraciones cercanas a las que producen citotoxicidad, mientras que para los compuestos mipafox, tri-o-cresil-fosfato y cresil-saligenin-fosfato la inhibición del crecimiento se produjo a concentraciones subcitotóxicas. No obstante, resultados procedentes de la utilización de otras líneas celulares mostraron la capacidad del clorpirifos de inhibir el crecimiento de neuritas a concentraciones no citotóxicas (Sachana et al. 2001). Además, el compuesto tri-o-cresil fosfato pero no los isómeros tri-p o tri-m-cresil fosfato (isómeros no activos) inhibió el crecimiento de las neuritas tanto en la línea celular N-18 como en la N2a. Finalmente, el paraoxon (compuesto no neuropático) no fue capaz de inhibir el crecimiento de las neuritas a concentraciones no citotóxicas.



**Figura 4.4.-** Efectos de los compuestos organofosforados sobre el crecimiento de las neuritas ( $IC_{50}$ ) y el neurofilamento H (NF-H) en la línea N18 de ratón. (1) clorpirifos, (2) c-saligenin-fosfato, (3) leptofos, (4) mipafox, (5) tri-o-cresil-fosfato, (6) EPN (en rojo, valor no incluido en la correlación). Datos procedentes de Schmuck et al 1997 y Henschler et al. 1992.

La ausencia de más estudios que hayan utilizado la función axonal como parámetro de neurotoxicidad, dificulta la elaboración de un método de predicción basado en la capacidad de los compuestos de reducir el transporte axonal.

#### 4.1.2.5.- Ventajas e inconvenientes del modelo *in vitro*. *Status*

El análisis morfométrico del crecimiento de las neuritas es un ensayo relativamente fácil de realizar que precisa de un microscopio con un sistema de captación de imágenes (para facilitar el trabajo). Sin embargo su mayor problema es que es un proceso costoso en términos de tiempo y sujeto a una desviación experimental ya que se basa en la observación del experimentador. Las alteraciones a nivel de citoesqueleto están directamente relacionadas con las axonopatías. La detección del NF-H por ELISA requiere equipos instrumentales típicos de cualquier laboratorio. En contraposición, la determinación del transporte axonal, aunque proporciona información sobre la capacidad de un compuesto en alterar o no el proceso de transporte a lo largo del axón, precisa de un equipamiento muy especializado y de personal altamente entrenado.

#### *Status*

*El método propuesto para la detección de compuestos axonopáticos necesita ser investigado más profundamente antes de utilizarlo como método de rastreo de compuestos potencialmente neurotóxicos. En la literatura científica, no existe ningún estudio inter-laboratorio de validación del método descrito anteriormente.*

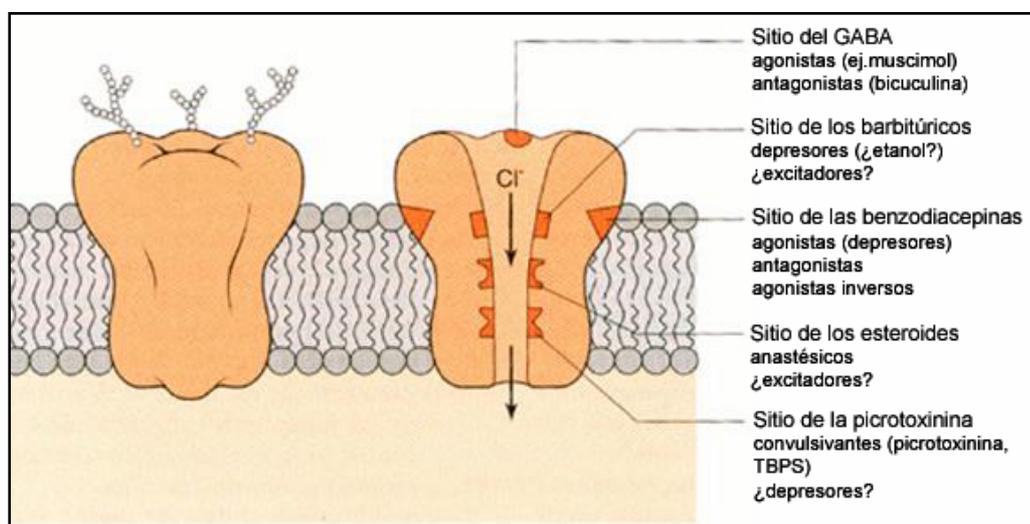
#### **4.1.3.- Evaluación de neurotoxicidad mediada por el receptor GABA<sub>A</sub>**

El método *in vitro* a continuación propuesto, basado en la funcionalidad del receptor GABA<sub>A</sub>, permite identificar aquellos compuestos potencialmente neurotóxicos que ejerzan una inhibición o activación de la transmisión nerviosa a través del receptor GABA<sub>A</sub>.

##### 4.1.3.1.- La transmisión nerviosa inhibitoria: receptor GABA<sub>A</sub>

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor con actividad inhibitoria del SNC de vertebrados. El sistema GABAérgico está involucrado en multitud de funciones fisiológicas y alteraciones neurológicas y psiquiátricas. Se han descrito dos tipos de receptores de GABA: (1) el receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub> (canal permeable al ión cloruro -Cl<sup>-</sup>) y (2) el receptor metabotrópico GABA<sub>B</sub> (acoplado a proteína G que regula la actividad de canales de potasio y calcio). Los receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> son complejos proteicos formados por 5 subunidades que pueden pertenecer a 8 subclases diferentes. La unión de GABA al receptor GABA<sub>A</sub> conduce a una entrada de iones cloruro (Cl<sup>-</sup>) que en la mayoría de neuronas es interpretado como una señal inhibitoria. El bloqueo del receptor GABA<sub>A</sub> por antagonistas (competitivos y no-competitivos) conduce a

la hiperexcitación del SNC, convulsiones y muerte, mientras que una excesiva activación del canal por agonistas GABA o activadores conduce a ataxia, parálisis y muerte. En la estructura del receptor GABA<sub>A</sub> se han identificado múltiples sitios de unión para diferentes compuestos que pueden modular su actividad, tal y como se muestra en la figura 4.5. La picrotoxina y el *t*-butilbiciclofosforotionato (TBPS) son agentes convulsionantes que comparten un sitio de unión, en el canal del receptor GABA<sub>A</sub>. Son antagonistas no competitivos que actúan bloqueando el canal cloruro provocando una disminución del tiempo de apertura. El sitio de unión de la picrotoxina es dónde se unen también muchos plaguicidas y antihelmínticos.



**Figura 4.5.-** Modelo estructural del receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub>. El corte transversal muestra las dianas de los diferentes compuestos que pueden modular la respuesta del receptor, sin implicar una localización específica. Esquema modificado de Olsen y DeLorey (1999).

El receptor GABA<sub>A</sub> es la diana de distintos insecticidas organoclorados, compuestos convulsionantes, del componente activo de la absenta ( $\alpha$ -tujone), de antihelmínticos (avermectina) y del muscimol (veneno procedente de la *Amanita muscaria*).

#### 4.1.3.2.- Bases del método

El método aquí propuesto para evaluar la neurotoxicidad inducida por compuestos de naturalezas diferentes a través del receptor GABA<sub>A</sub>, se centra en la determinación del flujo del ión cloruro (Cl<sup>-</sup>) y en la unión de radioligandos en los diferentes sitios de unión del receptor GABA<sub>A</sub>. El flujo de Cl<sup>-</sup> a través del receptor GABA<sub>A</sub> se determinó electrofisiológicamente (patch-clamp) o mediante la determinación de flujos del ión Cl<sup>-</sup>

radioactivo ( $^{36}\text{Cl}^-$ ). Los experimentos de patch-clamp determinan la amplitud de las corrientes de cloro inducidas por GABA y como éstas se ven modificadas (inhibidas o incrementadas) por la presencia de los compuestos tóxicos (Nagata y Narahashi 1994, 1995; Nagata et al., 1994, 1996; Belelli et al., 1996; Aspinwall et al., 1997; Maskell et al., 2001). En el caso de las corrientes de cloro radioactivo, éstas se determinan tras incubación simultáneamente los modelos experimentales con GABA,  $^{36}\text{Cl}^-$  y el compuesto tóxico a analizar (Bloomquist et al. 1986, Gant et al. 1987, Obata et al. 1988, Pomés et al. 1994a, b, Huang and Casida 1996, Vale et al. 1999, 2003). Por otro lado, los ensayos de unión de radioligandos al receptor  $\text{GABA}_A$  permiten determinar si los compuestos tóxicos modulan de alguna forma la actividad del receptor según el radioligando utilizado. Así pues, la utilización de los radioligandos  $^{35}\text{S}$ -t-butil biciclofosforotioato ( $^{35}\text{S}$ -TBPS),  $^3\text{H}$ Flunitrazepam ( $^3\text{H}$ -FLZ),  $^3\text{H}$ muscimol o  $^3\text{H}$ GABA permitirán marcar los sitios de unión a picrotoxina (sitio de unión de convulsionantes), benzodiazepinas y a GABA, respectivamente (Horng and Wong 1979, Squires et al. 1983, 1990, Maksay 1988, Mehta y Ticku 1987, 1988, 1992, Llorens et al. 1990, Harris et al. 1993, Pomés et al. 1993, 1994a, Vale et al. 1997, 1998, 1999, Elster et al. 2000, Ali y Olsen 2001, Fonfría et al. 2001).

La elaboración del método aquí propuesto se basó en el trabajo reportado por 8 laboratorios, realizado con 10 compuestos y en diferentes modelos *in vitro* (tabla 4.5).

**Tabla 4.5.-** Resumen de los marcadores, sistemas experimentales y agentes tóxicos utilizados para la evaluación de la toxicidad mediada por el receptor  $\text{GABA}_A$

<b>Marcadores (end-point)</b>	- Función del receptor $\text{GABA}_A$ (flujo de $\text{Cl}^-$ ) - Interacción con los sitios de unión del receptor $\text{GABA}_A$		
<b>Sistemas experimentales</b>	- Preparaciones de tejidos de cerebro (membranas, membranas sinápticas, de células Sf9 y HEK233) - Cultivos primarios de neuronas de rata y ratón - Líneas celulares modificadas - Ovocitos de <i>Xenopus</i> que expresan el receptor $\text{GABA}_A$		
<b>Parámetros</b>	—		
<b>Compuestos</b>	Hexaclorociclohexanos (6)	$\alpha$ -endosulfan (4)	Dieldrina (5)
	Picrotoxina (3)	Pentilenetetrazol (1)	$\alpha$ -tujone (1)
	Fipronil (2)	Avermectina B1a (2)	Anisatina (1)
	Trimetilopropano fosfato (1)		
	Entre paréntesis se indica el nº de laboratorios que ensayado el compuesto		

#### 4.1.3.2.- Resultados

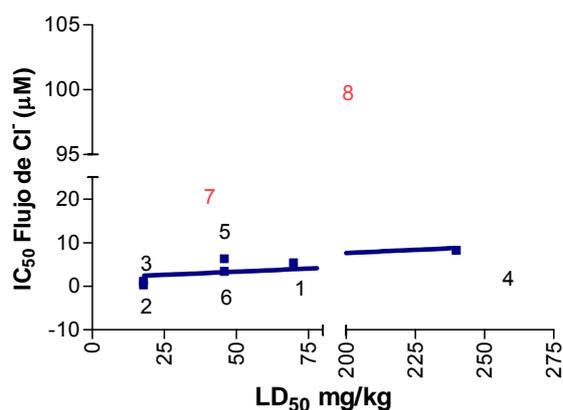
La determinación de las corrientes de Cl<sup>-</sup> inducidas por GABA y los ensayos de unión de radioligandos han demostrado que los pesticidas organoclorados lindano y los ciclodienos (dieldrina y endosulfán) bloquean el receptor GABA<sub>A</sub> de acuerdo con sus propiedades convulsionantes observadas en animales de experimentación (Schaumburg 2000, Spencer y Schaumburg 2000, Ecobichon 2001). Así pues, en trabajos reportados por distintos autores se ha observado la potencia inhibitoria del lindano, de la dieldrina y del endosulfán sobre la unión del radioligando [<sup>35</sup>S]TBPS y sobre las corrientes de Cl<sup>-</sup> mediadas por el receptor GABA<sub>A</sub>, indicando la interacción de estos compuestos con el sitio de unión a la picrotoxina situado en el canal del receptor (Abalis et al. 1985, Cole et al. 1986, Gant et al. 1987, Obata et al. 1988, Llorens et al. 1990, Pomés et al., 1993, 1994b, Huang et al. 1996, 1997, Aspinwall et al., 1997; Vale et al., 1997; Grant et al. 1997, Maskell et al., 2001; Ratra et al., 2001, 2002). Todos los resultados descritos sobre la toxicidad de los isómeros del hexaclociclohexano ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - y  $\gamma$ -HCH o lindano) coinciden en remarcar el potencial de inhibición de la unión del [<sup>35</sup>S]TBPS y las corrientes de Cl<sup>-</sup> ejercida por el lindano y la capacidad del isómero delta en incrementar las corrientes de Cl<sup>-</sup> confirmando así la hiperexcitación y depresión del SN observada en modelos animales provocada por el lindano ( $\gamma$ -HCH) y el isómero  $\delta$ -HCH, respectivamente (Abalis et al. 1985, Llorens et al. 1990, Pomés et al. 1993, 1994a y b, Nagata et al. 1995, 1996, Aspinwall et al. 1997, Rauh et al. 1997, Ratra et al. 2001, 2002). En el caso del ciclodieno endosulfán los resultados existentes apuntan hacia el isómero alpha como el isómero más potente en la inhibición del receptor GABA<sub>A</sub> y de los efectos como agente convulsionante (Abalis et al. 1985, Grant et al. 1987, Pomés et al. 1993, Ratra et al. 2001). Por otro lado, la inhibición de la unión del [<sup>35</sup>S]TBPS y de las corrientes de Cl<sup>-</sup> observadas en presencia de picrotoxina confirman el potencial antagonista no competitivo de este compuesto hacia el canal de cloro del receptor GABA<sub>A</sub> al mismo tiempo que corrobora su capacidad de provocar convulsiones en humanos y animales (Ludolph y Spencer 2000). Además, la inhibición de la unión de radioligandos al sitio de unión de la picrotoxina observada en presencia de otros agentes convulsionantes no organoclorados, como el pentilene tetrazol (utilizado en la búsqueda de agentes anticonvulsionantes y ansiolíticos), el  $\alpha$ -tujone (terpeno hidrocarbonado componente de la absenta) y la anisatina (sesquiterpeno utilizado en la medicina China) concuerdan con el potencial convulsionante observado *in vivo* (Squirres et al. 1984, Ikeda et al. 1999, Hold et al. 2000, Ratra et al. 2001). La evaluación del potencial neurotóxico del

trimetilolpropano fosfato, subproducto de la pirólisis de ciertos componentes de lubricantes, mediante la utilización de redes de microelectrodos mostró una inhibición en la duración e intervalos de descarga similares a los observados en presencia de bicuculina (antagonista del sitio de unión a GABA en el receptor GABA<sub>A</sub>). Estos resultados sugieren el potencial epileptogénico de este compuesto.

A parte de los pesticidas organoclorados, existen otros compuestos capaces de interferir en el funcionamiento del receptor GABA<sub>A</sub>. La avermectina B1a es una lactona macrocíclica utilizada en veterinaria como acaricida y antihelmíntico que en roedores induce la aparición de temblores y ataxias (Ludolph 2000, Ecobichon 2001). Respecto a su acción sobre el receptor GABA<sub>A</sub>, se ha observado que a bajas concentraciones produce un incremento de la permeabilidad neuronal a Cl<sup>-</sup> revertida por antagonistas GABAérgicos. Sin embargo, a concentraciones altas bloquea el receptor GABA<sub>A</sub>. Por otro lado, la unión de alta afinidad de la avermectina B1a al receptor GABA<sub>A</sub> transcurre con interacciones de tipo alostérico entre los lugares de reconocimiento a GABA, benzodiazepinas, barbitúricos y TBPS (Abalis et al. 1986, Huang y Casida 1997). El fipronilo, insecticida de nueva generación que actúa a nivel del receptor GABA<sub>A</sub>, es capaz de inhibir la unión de radioligandos al sitio de unión de la picrotoxina y disminuir las corrientes de Cl<sup>-</sup> inducidas por GABA. No obstante, la coaplicación de fipronil y picrotoxina demuestra que ambos compuestos no se unen al mismo sitio del receptor GABA<sub>A</sub> (Huang et al. 1996, Hainz et al. 1998, Ratra et al. 2000, 2001, Ikeda et al. 2001).

#### 4.1.3.2.- Modelo de predicción

Hasta el momento no existe un modelo de predicción para la toxicidad mediada por el receptor GABA<sub>A</sub>. No obstante los resultados reportados en la bibliografía muestran una clara correlación entre la inhibición de la unión de [<sup>35</sup>S]TBPS y la capacidad convulsionante de un compuesto dentro de su familia química estructural y la inhibición de la corriente de Cl<sup>-</sup> inducida por GABA en mamíferos (Lawrence y Casida 1984, Squires et al. 1984, Abalis et al. 1985, Cole y Casida 1986, Gant et al. 1987, Bloomquist et al. 1986, Obata et al. 1988, Casida 1993). La figura 4.7 muestra la relación entre LD<sub>50</sub> *in vivo* de compuestos convulsionantes con la capacidad de inhibir las corrientes de Cl<sup>-</sup> en modelos *in vitro*. Se observa una tendencia lineal ( $r^2= 0.6145$ ,  $p= 0.065$ ) entre la LD<sub>50</sub> de compuestos con potencial convulsionante de las familias de cicloalcanos y hexaclorohexanos ( $\alpha$  y  $\beta$  endosulfán, dieldrina y lindano) y la inhibición de las corrientes de Cl<sup>-</sup> inducidas por GABA.



**Figura 4. 6-** Relación de la LD<sub>50</sub> *in vivo* de compuestos con potencial tóxico para el receptor GABA<sub>A</sub> respecto la inhibición del flujo del ión cloruro *in vitro*. (1) γ-HCH o lindano; (2) α endosulfán laboratorio 1; (3) α-endosulfán laboratorio 1; (4) β-endosulfán; (5) dieldrina (laboratorio 1); (6) Dieldrina (laboratorio 2); (7) α-tujone; (8) α-,β-, δ-HCH. En rojo, los compuestos que no han sido utilizados para el análisis de correlación.

#### 4.1.3.5.- Ventajas e inconvenientes del modelo *in vitro*. *Status*

Este método es útil para detectar agentes que actúan a nivel del receptor GABA<sub>A</sub>. Los ensayos de unión y los de electrofisiología proporcionan información suficiente sobre el mecanismo de acción de los agentes tóxicos que puede ser utilizada para la predicción de toxicidad. Además, la determinación de la actividad de un receptor o canal iónico mediante técnicas de electrofisiología, en casi cualquier tipo celular, muestra un elevado grado de precisión y tiempo de resolución aunque precisa de un equipo específico y personal altamente especializado. La determinación de la funcionalidad del receptor GABA<sub>A</sub> mediante los ensayos de unión [<sup>35</sup>S]TBPS o las corrientes de Cl<sup>-</sup> puede informar del potencial convulsionante o depresor de un compuesto. El principal inconveniente de los ensayos de unión de radioligandos radica en el uso de radiactividad si bien son fáciles de realizar y aportan información del funcionamiento del receptor. Los ensayos propuestos en el método carecen de sistemas de bioactivación.

#### *Status*

*Avances en las técnicas de electrofisiología, desarrollo de sondas fluorescentes que permitan la detección de las corrientes de cloruro como alternativa a los ensayos radioactivos así como la elección del sistema in vitro para la valoración del potencial neurotóxico a través del receptor GABA<sub>A</sub> necesitan ser desarrollados con más*

*profundidad para poder ser utilizados como herramientas para la identificación de compuestos potencialmente neurotóxicos.*

#### **4.1.4.- Evaluación de neurotoxicidad mediada por canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje**

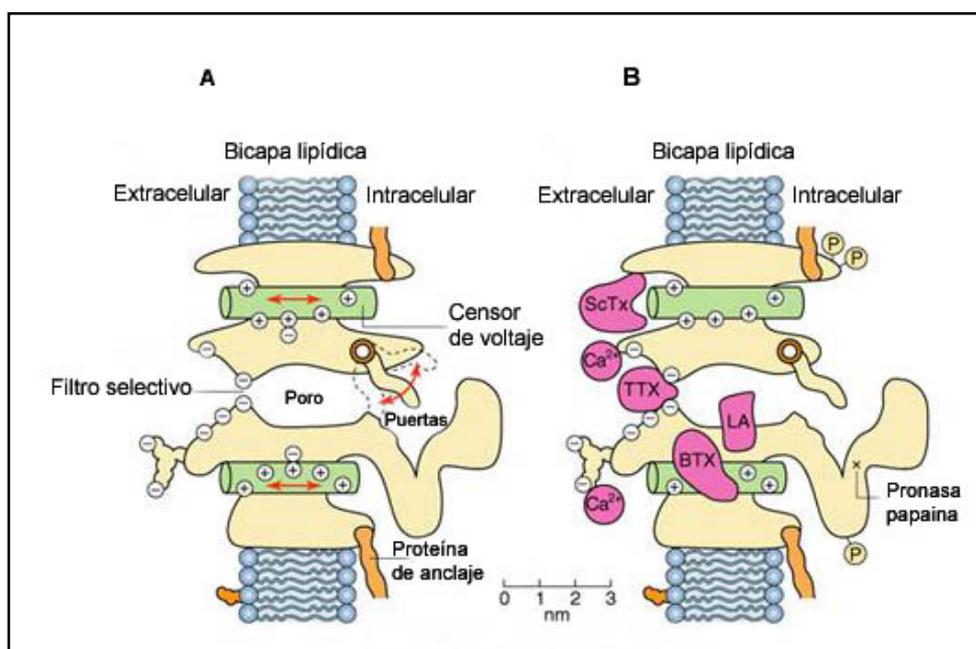
El método *in vitro* aquí propuesto permitirá predecir el potencial neurotóxico excitatorio o inhibitorio de un determinado compuesto en función de los efectos activadores o inhibidores producidos sobre los canales de sodio dependientes de voltaje. Algunos de los ensayos incluidos en el método fueron desarrollados como métodos alternativos *in vitro* al modelo animal utilizado en los programas de monitorización de las neurotoxinas marinas en consonancia con la Directiva Europea 91/492/EEC.

4.1.4.1.- Características de los canales de sodio dependientes de voltaje. Posibles moduladores.

La actividad eléctrica neuronal, regulada por los canales permeables a los iones Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>, desempeña un papel importante en el funcionamiento fisiológico neuronal. Los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje son proteínas transmembrana responsables del incremento de la permeabilidad al ión Na<sup>+</sup> que inicia el potencial de acción en membranas excitables eléctricamente, nervios y músculo. Agentes neurotóxicos capaces de perturbar el funcionamiento de estos canales pueden provocar en animales una hiperexcitabilidad, convulsiones, parálisis y hasta la muerte.

Los canales de sodio son dianas moleculares de distintas neurotoxinas cuya unión a lugares específicos del receptor provocan la alteración de su funcionamiento. La estructura y función de los canales de sodio, en referencia a la permeabilidad y las propiedades de apertura del canal, han sido descubiertas aprovechando la elevada afinidad y especificidad de las neurotoxinas hacia el receptor (Catterall 2000, Cestèle y Catterall 2000). El mecanismo molecular de acción de las neurotoxinas sobre canales de sodio se divide en: (1) bloqueo del poro, (2) modulación alostérica indirecta de la apertura del poro y (3) alteración del sensor de voltaje que regula la puerta del canal. En los canales de sodio de mamíferos se han identificado como mínimo 5 lugares distintos de unión a neurotoxinas (figura 4.7). El lugar de unión a neurotoxinas identificado con el número 1, es diana de agentes bloqueantes del canal como la tetradotoxina y la saxitoxina que interaccionan directamente con la cara extracelular del poro bloqueándolo.

En contraposición, la unión específica de la batracotoxina y veratridina al sitio n° 2 del receptor y de las ciguatoxinas y brevetoxinas al n° 5, dan lugar a una activación persistente del receptor que permite la entrada del  $\text{Na}^+$  a la célula. Por otro lado, la unión de la toxina  $\alpha$  de escorpión, de anémonas marinas y de arañas al lugar n° 3 lentifica o bloquea la inactivación del canal. Por último, la interacción de la toxina  $\beta$  de escorpión con el lugar n° 4 del receptor provoca tanto una activación en la dirección de hiperpolarización como una reducción de la amplitud de la corriente de  $\text{Na}^+$ .



**Figura 4.7.-** Diagrama de las unidades funcionales del canal de  $\text{Na}^+$  dependiente de voltaje (A) y de los hipotéticos sitios de unión a toxinas y fármacos (B): tetrodotoxina (TTX); toxina de escorpión y anémonas (ScTx); batracotoxina, aconitina, veratridina y grayanotoxina (BTX); anestésicos locales (LA). Esquema modificado de Hille y Catterall, 2006.

Entre las neurotoxinas que producen desordenes neurológicos y toxicidad en mamíferos a través del canal de  $\text{Na}^+$  dependiente de voltaje destacan la saxitoxina (STX), la tetrodotoxina (TTX), la ciguatoxina (CTX), la brevetoxina (PbTx), la  $\alpha$ - y  $\beta$ - toxina de escorpión y los insecticidas como el DDT, los piretrinas, las dihidropirazolas y las oxadiazinas (Vijverberg et al. 1982, Yamamoto 1983, Narahashi et al. 1994, Miyamoto et al. 1995, Cestèle y Catterall 2000, Spencer et al. 2000, Vijverberg 2000, Narahashi 2000, 2002, Ecobichon 2001, Soderlund et al. 2002). En humanos, existen 3 tipos de intoxicaciones provocadas por el consumo de marisco contaminado según el tipo de toxina responsable. Así pues, hablamos de la intoxicación por toxina paralizante

(“*paralytic shellfish poisoning*”, PSP), cuando la toxina responsable es la saxitoxina (STX) producida por dinoflagelados y culpable de las mareas rojas; de intoxicaciones por ciguatoxina (sintetizada por dinoflagelados y acumulada en las vísceras de los peces) y de la intoxicación por la toxina neurotóxica (“*neurotoxic shellfish poisoning*”, NSP) cuando la toxina responsable es la brevetoxina (PbTx) (toxina sintetizada por dinoflagelados) (Pelegriño 2000, Kaplan 2000, Ludolph 2000).

Los piretroides son compuestos extensamente utilizados como insecticidas en la agricultura para combatir plagas o de uso doméstico en multitud de repelentes contra insectos. Los piretroides derivan de las piretrinas naturales obtenidas de *Chrysanthemum spp.* A pesar de su elevada potencia como insecticidas, la toxicidad en mamíferos es en general baja. Los piretroides pueden clasificarse en piretroides de tipos I o II en función de su estructura química (según si carecen o poseen un grupo –ciano, respectivamente) y de los efectos inducidos. Así pues, intoxicaciones agudas por piretroides de tipo I en ratas provocan una hiperexcitación, temblor, agresividad y prostración mientras que las producidas por los piretroides de tipos II inducen convulsiones clónicas, salivación y ocultación (Ecobichon 2001, Vijverberg 2000, Spencer). Los efectos inducidos por los piretroides en mamíferos se deben en primera instancia a su interacción con los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Vijverberg 2000).

#### 4.1.4.2.- Bases del método

El objetivo del método es la identificación y clasificación de compuestos neurotóxicos (neurotoxinas, muestras marinas biológicas, plaguicidas y fármacos) que modifiquen la funcionalidad de los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje. La determinación de la funcionalidad del canal se realiza por métodos directos sobre el canal (ensayos de electrofisiología en patch-clamp, de unión de radioligandos y de captación de Na<sup>+</sup> radioactivo -<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>-) o por métodos indirectos (mediante ensayos de citotoxicidad, potencial de membrana y contractibilidad celular). Existen dos tipos de ensayos de unión según el radioligando utilizado: uno basado en la capacidad de inhibición de la unión [<sup>3</sup>H]saxitoxina (agente bloqueante del canal; [<sup>3</sup>H]STX) con el objetivo de identificar el potencial neurotóxico de muestras de marisco debido a la presencia de neurotoxinas y un segundo, basado en la detección de las interacciones alostéricas con los distintos lugares de unión y de la unión de la [<sup>3</sup>H]batracotoxina ([<sup>3</sup>H]BTX) al sitio 2 en presencia del agente tóxico. Por último, los ensayos de captación de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> determinaron la capacidad de los agentes tóxicos de inducir o inhibir las corrientes de Na<sup>+</sup> inducidas por veratridina

(Jacques et al. 1980, Bidard et al., 1984, Soderlund 1985, Ghiasuddin y Soderlund 1985, Couraud et al. 1986, Gordon et al., 1986, Ruigt et al. 1987, Lombet et al. 1988, Brown et al. 1988, Creveling y Daly 1992, Rubin et al. 1993, Vieytes et al. 1993, Song y Narahashi, 1996a, Doucette et al. 1997, Smith y Soderlund 1998, Powell y Doucette 1999, Soderlund et al. 2000, Motomura y Narahashi 2001). Por otro lado, las sustancias que alteran el funcionamiento del canal de  $\text{Na}^+$  dependiente de voltaje producen cambios en el nivel de despolarización de la membrana. La despolarización de la membrana inducida por veratridina se cuantifica mediante el uso de sondas fluorescentes. Una reducción de la fluorescencia refleja la existencia de sustancias capaces de bloquear al canal de  $\text{Na}^+$  como por ejemplo la saxitoxina (Louzao et al. 2001). Finalmente, otro método desarrollado plantea la utilización de cultivos primarios de miotubos de ratón para detectar la toxicidad aguda de compuestos neurotóxicos que interfieren en la excitabilidad espontánea de la membrana (Gülden et al. 1994a, b; Seibert et al. 1996) (INVITTOX protocol nº 93, Comisión Europea – Joint Research Center -JRC-, ECVAM's database service, <http://ecvam-sis.jrc.it/>).

Hasta el momento, la detección de toxinas marinas (PSP) en muestras biológicas se realiza con un bioensayo en ratones aceptado por la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC, 2000). Como alternativa al modelo animal, se ha desarrollado un modelo *in vitro* patentado en US basado en la determinación de la viabilidad neuronal (células Neuro-2a) tras la exposición a los agentes tóxicos (Manger 1995b, 1999, 2001). El método consiste en determinar la capacidad de las muestras a analizar en proteger de la muerte neuronal inducida por la mezcla veratridina (activador del canal de  $\text{Na}^+$ ) y ouabaína (inhibidor  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa). Así pues, la presencia de STX o PSP (bloqueantes del canal de  $\text{Na}^+$ ) o de brevetoxinas (NSP/ciguatoxinas) (activadores del canal de  $\text{Na}^+$ ) en las muestras a analizar provocará una protección o exacerbación de la muerte, respectivamente. La concentración de las toxinas presentes en las muestras marinas (PSP o NSP/ciguatoxina) se determina comparando la viabilidad del cultivo con estándares de saxitoxina o brevetoxina, respectivamente.

La elaboración del método aquí propuesto se basó en el trabajo reportado por 15 laboratorios, realizado con 10 compuestos y con diferentes modelos *in vitro* (tabla 4.6).

**Tabla 4.6.-** Resumen de los marcadores, sistemas experimentales y agentes tóxicos utilizados para la evaluación de la toxicidad sobre los canales de Na<sup>+</sup>

<b>Marcadores (end-point)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Función del canal de Na<sup>+</sup></li> <li>- Interacción con los sitios del canal</li> <li>- Viabilidad celular</li> <li>- Despolarización de la membrana</li> <li>- Contracción espontánea de miotubos</li> </ul>			
<b>Sistemas experimentales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tejido de cerebro</li> <li>- Cultivos primarios de neuronas y miotubos de rata y ratón</li> <li>- Líneas celulares humanas y de roedores</li> <li>- Ovocitos de <i>Xenopus</i> que expresan subunidades del canal de Na<sup>+</sup></li> </ul>			
<b>Parámetros</b>	—			
<b>Compuestos</b>	Deltametrin (5)	Cipermetrin (2)	Cismetrin (1)	Fenflutrin (1)
	Permetrin (2)	DDT (3)	Lindano (1)	Saxitoxina (9)
	Ciguatoxina (3)	Brevetoxina (3)		
	Entre paréntesis se indica el nº de laboratorios que ensayaron el compuesto			

#### 4.1.6.3.- Resultados

La utilización de los ensayos de unión a [<sup>3</sup>H]BTX permite identificar compuesto capaces de interactuar de forma alostérica con algunos de los sitios de unión al canal de Na<sup>+</sup>. Tanto los ensayos de unión de radioligandos como la determinación de las corrientes de Na<sup>+</sup> son herramientas útiles para detectar compuestos que actúen a nivel del canal de Na<sup>+</sup>. El DDT, insecticida organoclorado, modula el canal de Na<sup>+</sup> potenciando la captación de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> y la unión de [<sup>3</sup>H]BTX a los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje. Estos dos parámetros fueron también potenciados por los pesticidas piretroides de tipos II como el deltametrin y la cipermetrina. No obstante, la unión de [<sup>3</sup>H]BTX no identifica los piretroides menos tóxicos (tipo I) como la cispermtrina o permetrina, incluso cuando producen pequeños incrementos en las corrientes de Na<sup>+</sup>. Estos datos sugieren que la información obtenida de los ensayos de unión de [<sup>3</sup>H]BTX en presencia de piretroides deberían ir acompañados por ensayos de funcionalidad del canal de Na<sup>+</sup> (captación de <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> o por patch clamp) para poder valorar la toxicidad de estos compuestos (Soderlund et al. 1985, Brown et al. 1988, Lombet et al. 1988, Rubin et al. 1993, Smith y Soderlund 1998, 2001, Motomura et al. 2001).

La toxicidad aguda de algunos compuestos químicos puede deberse a los efectos ejercidos sobre membranas excitables. La evaluación de la capacidad de un compuesto en interferir sobre la contractibilidad espontánea de miotubos en cultivo sin aparición de muerte es reflejo de la selectividad para membranas excitables. La exposición aguda a deltametrin, cispermtrina y DDT (compuestos que actúan a nivel del canal de Na<sup>+</sup>) y

lindano provoca una disminución de la contractibilidad espontánea de los miotubos en ausencia de muerte celular (Gülden et al. 1994, Gülden y Seibert 1996, Ekwal et al. 1999).

La comparación del contenido de toxinas marinas (PSP) cuantificadas en diferentes muestras de moluscos y por diferentes grupos tanto por el método *in vivo* aprobado por la AOAC o por métodos alternativos *in vitro* (determinación de la viabilidad celular, la despolarización de la membrana o por ensayos de unión de [<sup>3</sup>H]STX) mostró una correlación significativa entre los niveles de PSP detectados en el modelo animal versus los ensayos de unión de [<sup>3</sup>H]STX y los ensayos de citotoxicidad. En general, los métodos no-animales utilizados como alternativa al ensayo con ratones muestran una mayor sensibilidad en la detección de los niveles de neurotoxinas así como un bajo porcentaje de falsos negativos y un moderado porcentaje de falsos positivos (Jellett et al., 1992; Manger, 1993, 1995; Truman et al., 1996; Doucette et al., 1997, 2000; Nicholson et al., 2002, Velez et al. 1993). Por otro lado, si bien los niveles de NSP (brevatoxina) o ciguatoxina determinados por el ensayo de citotoxicidad producen en general el mismo nivel de toxicidad que el detectado en el modelo animal, presentan un alto porcentaje de falsos positivos y negativos (Manger et al., 1995; Dickey et al., 1999; Truman et al., 2002).

#### 4.1.6.4.- Modelo de predicción

Existen modelos de predicción para la evaluación del potencial neurotóxico de muestras marinas que contengan PSP. El modelo *in vitro* utilizado se basa en el ensayo de citotoxicidad determinado en la línea de neuroblastoma N2a y de unión de [<sup>3</sup>H]STX. Ambos permiten la cuantificación del contenido de PSP expresado como equivalentes de STX. El valor máximo permitido de PSP en las partes comestibles de moluscos destinados al consumo es de 80 µg de PSP/100 g (~ 400 ng STX / ml) (EU Dir 91/492/EEC).

#### 4.1.6.5.- Ventajas e inconvenientes del método. *Status*

Los ensayos de unión y los de electrofisiología proporcionan información relacionada con el mecanismo de acción de los agentes tóxicos al mismo tiempo que esta información es relevante para la predicción de toxicidad. El principal inconveniente de los ensayos de unión de radioligandos radica en el uso de radiactividad si bien son fáciles de realizar y

aportan información del funcionamiento del receptor. Los ensayos propuestos en el método carecen de sistemas de bioactivación. En el caso de los ensayos de unión a [<sup>3</sup>H]STX, a pesar de los buenos resultados obtenidos en la cuantificación de PSP, la inclusión de la saxitonina en el Convenio de Armas químicas dificultan su utilización como modelo alternativo al modelo animal. Los ensayos de citotoxicidad y de potencial de membrana son métodos fáciles de realizar. La determinación de la actividad de un receptor o canal iónico mediante técnicas de electrofisiología, en casi cualquier tipo celular muestra un elevado grado de precisión y tiempo de resolución aunque precisa de un equipo específico y personal altamente especializado.

#### *Status*

*Los métodos alternativos para la detección de PSP en muestras marinas están en proceso de desarrollo o validación. El método desarrollado por Manger et al. ha sido utilizado por la FAO para confirmar la presencia de ciguatoxinas. Por otro lado, el método desarrollado por Jellet Biotek basado en la detección de PSP en muestras de marinas mediante un ensayo de viabilidad celular está en proceso de evaluación por la AOAC. En relación a los otros ensayos propuestos en el método para la detección de agentes tóxicos que actúen a nivel del canal de Na<sup>+</sup>, se necesitan más criterios para poder escoger los modelos in vitro apropiados así como las sondas y radioligandos adecuados.*

#### **4.1.5.- Evaluación de neurotoxicidad mediada por receptores ionotrópicos de glutamato**

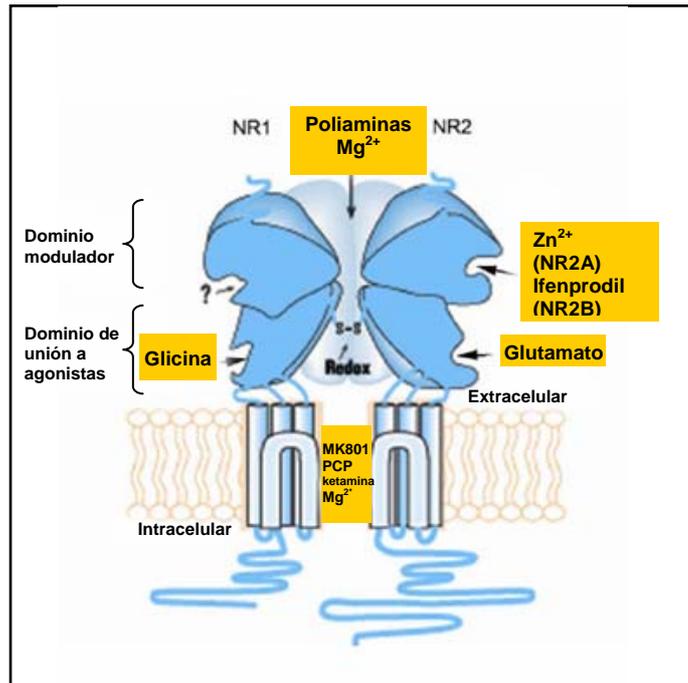
Los receptores de glutamato son proteínas claves para el control de la excitabilidad neuronal. Alteraciones en la transmisión nerviosa excitadora a través de los receptores ionotrópicos de glutamato pueden predecir el potencial neurotóxico de un compuesto. Uno de los ensayos incluidos en el método ha sido desarrollado como método alternativo para la detección de toxinas en muestras de marisco.

##### 4.1.5.1.- Transmisión nerviosa excitadora. Sistema glutamatérgico

El glutamato es el principal neurotransmisor con actividad excitadora del SNC de mamíferos responsable de una tercera parte de la neurotransmisión sináptica excitadora. Se han descrito dos tipos de receptores de glutamato: (1) receptores metabotrópicos (acoplados a proteína G que regulan la actividad de los canales de calcio) y (2) receptores ionotrópicos (canales iónicos permeables a cationes) divididos en 3 grupos

según su especificidad de unión a N-metil-D-Aspartato (NMDA), ácido kaínico (KA) y  $\alpha$ -amino-3hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA). La activación de los receptores NMDA produce una corriente de carácter lento y duradero mediada por el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la activación de los receptores AMPA y KA (receptores no-NMDA) inducen una transmisión sináptica excitadora rápida (Artigas y Suñol, 2005).

Los receptores NMDA son complejos proteicos formados por diferentes subunidades derivadas de 6 genes distintos. Los receptores contienen como mínimo 2 subunidades NR1 y 2 subunidades NR2. A parte del sitio de unión a glutamato, los receptores NMDA presentan un lugar de unión para la glicina que actúa como coagonista. Estos receptores son canales iónicos con una alta permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  sujeta al bloqueo voltaje-dependiente del ión  $\text{Mg}^{2+}$ . En condiciones de reposo, el receptor está bloqueado por el ión  $\text{Mg}^{2+}$  localizado en el interior del canal. Así, cuando se produce una despolarización de la membrana (iniciada por los receptores AMPA), el  $\text{Mg}^{2+}$  pierde afinidad por su sitio de unión permitiendo la entrada del ión calcio. Además, el receptor NMDA está sujeto a la regulación por ligandos endógenos ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ , poliaminas, redox) que influyen en la frecuencia de apertura del receptor (figura 4. 8). Los receptores NMDA desempeñan un papel importante en la plasticidad neuronal y la formación de sinapsis, ambos implicados en procesos de memoria y aprendizaje. Sin embargo, una sobreactivación del receptor NMDA y por consiguiente la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , induce muerte neuronal, fenómeno conocido como excitotoxicidad.



**Figura 4.8.-** Modelo del receptor NMDA en el que se indican los lugares de unión de los diferentes moduladores (esquema modificado de Kemp y McKernan 2002).

Los receptores no-NMDA (AMPA/KA) son receptores acoplados a canales catiónicos monovalentes independientes de voltaje permeables a Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Generalmente son canales impermeables a Ca<sup>2+</sup>. Aunque los receptores AMPA presentan una menor afinidad para glutamato que los receptores NMDA, su cinética de activación es más rápida y es la culpable de la fase inicial de los potenciales post-sinápticos excitadores. El receptor AMPA es una estructura pentamérica formado por 5 subunidades que se localiza mayoritariamente en neuronas post-sinápticas. A pesar de que la estructura del receptor KA no está tan bien caracterizada como la del receptor AMPA, se cree que tiene una estructura pentamérica y que se localiza en terminales pre- y post-sinápticas. Las neurotoxinas naturales ácido kaínico y domoico actúan como agonistas de los receptores AMPA/KA (Madsen et al. 2001, Heath et al. 2002, Artigas y Suñol 2005).

La excitotoxicidad, término utilizado para definir la muerte neuronal inducida por sobreestimulación de los receptores NMDA, puede ser inducida por glutamato y por otros aminoácidos endógenos (aspartato, el ácido homocisteico y quinolínico), análogos sintéticos del glutamato como NMDA, y neurotoxinas derivadas de plantas. Entre estas neurotoxinas, la exposición a través de la alimentación al ácido domoico, β-N-oxalilamino-L-alanina (BOAA), β-metilamino-L-alanina (BMAA) se barajan como sustancias responsables de enfermedades neurológicas y neurodegenerativas. El ácido domoico

(análogo al glutamato), sintetizado por organismos marinos y presente en el ambiente marino, es el agente responsable de las intoxicaciones por marisco que producen amnesia (*amnesic shellfish poisoning*; ASP) y el principal responsable de la epidemia tóxica que tuvo lugar en Canadá en el año 1987 derivada del consumo de mejillones contaminados (Cashman y Cendes, 2001). Se ha desarrollado un método *in vitro* para la valoración del potencial tóxico del ácido domoico en muestras de marisco basándose en la inhibición de la unión de [ $^3\text{H}$ ]kainato a los receptores AMPA/KA (Van Dohla et al. 1997). Hasta el momento, el método regulado por la Comunidad Europea para el control de la presencia de ácido domoico en muestras marinas utiliza técnicas analíticas cromatográficas para la cuantificación de la cantidad de ácido domoico (EU Directive 91/492/ECC).

#### 4.1.5.2.- Bases del método

El objetivo del método *in vitro* detallado a continuación es identificar y clasificar compuestos neurotóxicos (neurotoxinas, muestras marinas biológicas) capaces de alterar la transmisión nerviosa mediada por receptores ionotrópicos de glutamato. Los marcadores neuronales utilizados para evaluar el grado de afectación de la transmisión nerviosa se centran en la determinación de la funcionalidad de los receptores NMDA y no-NMDA (ensayos de unión y de flujos de iones) y en la capacidad de inducir excitotoxicidad (ensayos de citotoxicidad y cuantificación de la expresión de c-fos).

Los ensayos *in vitro* de unión de radioligandos a los receptores de glutamato son útiles para discernir si el mecanismo de acción de un agente tóxico interfiere en el funcionamiento de los receptores NMDA o AMPA/KA según el radioligando utilizado. Los radioligandos [ $^3\text{H}$ ]glutamato, [ $^3\text{H}$ ]3-(2-carboxipiperazin-4-il)-propil-1-ácido fosfónico ([ $^3\text{H}$ ]CPP), [ $^3\text{H}$ ] 5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d] ciclohepteno-5,10-imino maleato ([ $^3\text{H}$ ]MK-801) se utilizan para los receptores NMDA mientras que los radioligandos [ $^3\text{H}$ ]AMPA y [ $^3\text{H}$ ]ácido kaínico son específicos para los receptores no NMDA (Watling 2001). Se ha desarrollado un método alternativo para la detección de ácido domoico en muestras de marisco potencialmente contaminadas basándose en un ensayo de unión [ $^3\text{H}$ ]kainato en membranas de células SF9 de insecto que sobreexpresan el receptor de glutamato GluR6. La concentración de ácido domoico presente en una muestra se determina comparando los valores de inhibición de la unión inducidos por la muestra con la curva de inhibición de la unión de estándares de ácido domoico (Van Dolah et al. 1997). Las corrientes de iones a través de los receptores de glutamato registradas

electrofisiológicamente en ovocitos de *xenopus* que sobreexpresan receptores de glutamato determinan la amplitud de la corriente iónica inducida por agonistas glutamatérgicos y como ésta es modificada en presencia de agentes tóxicos (Ujihara y Alburquerque 1992a, Mushoff et al. 1999). Los influjos de calcio derivados de la actividad de los receptores de glutamato y en particular los de NMDA, pueden determinarse mediante ensayos de captación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  o bien mediante el uso de sondas fluorescentes sensibles a calcio (Frandsen et al. 1989a, Hartley et al. 1993, Eimerl and Schramm 1994, Sattler et al. 1998, Hyrc et al. 1997).

Por otro lado, la determinación de la capacidad excitotóxica de un determinado agente tóxico se valoró mediante métodos *in vitro* de cuantificación de la liberación de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa al medio de cultivo y mediante el recuento del número de neuronas viables tras la incorporación de colorantes vitales (Frandsen y Schousboe 1987, 1990; Kawai et al. 1992; Lockahart et al. 1995; Novelli et al. 1992). La inhibición de los efectos citotóxicos por antagonistas específicos de los receptores de glutamato permite elucidar si la toxicidad es mediada por mecanismos de excitotoxicidad. Modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* demostraron que en situaciones de excitotoxicidad se producía un incremento de los niveles de ARNm de genes de expresión temprana (IEG, c-fos, jun etc.) (Vendrell et al. 1991, Goodenough et al. 1997). Griffiths et al. (1997, 2000) desarrollaron un método *in vitro* para la identificación de compuestos excitotóxicos basado en la expresión sostenida en el tiempo del ARNm de c-fos en cultivos neuronales. Para ello, se cuantifican los niveles de ARNm de c-fos de cultivos neuronales expuestos durante 30 y 240 min al agente tóxico. La relación de los niveles de ARNm tras la exposición durante 240 y 30 min a aminoácidos excitatorios ( $Q^{240/30}$ ) correlacionó con la producción de excitotoxicidad. Así pues valores  $Q^{240/30} > 1$  e  $< 1$  son indicativos de procesos que cursan por mecanismos excitotóxicos o no, respectivamente.

La elaboración del método aquí propuesto se basó en el trabajo reportado por 13 laboratorios, realizado en 7 compuestos y en diferentes modelos *in vitro* (tabla 4.7).

**Tabla 4.7.-** Resumen de los marcadores, sistemas experimentales y agentes tóxicos utilizados para la evaluación de la toxicidad mediada por los receptores ionotrópicos de glutamato

<b>Marcadores (end-point)</b>	- Interacción con los receptores de glutamato (ensayos de unión de radioligandos) - Flujos iónicos a través de los receptores de glutamato - Excitotoxicidad (viabilidad celular y determinación ratio ARNm c-fos 240 min/c-fos 30 min.	
<b>Sistemas experimentales</b>	- Membranas de cerebro de rata y ratón - Cultivos primarios neuronales - células transfectadas y ovocitos de <i>Xenopus</i>	
<b>Parámetros</b>	—	
<b>Compuestos</b>	Ácido domoico (3)	Plomo (1)
	Compuestos hidroxamato (1)	Aminoácidos excitatorios (7)
	Isómeros de 2-carboxiciclopropil-glicina (1)	
	2-fenoxietanol y éteres derivados del glicol (1)	
	(RS)-2-amino-2-(3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-yl) ácido acético, (AMAA) (1)	
	Entre paréntesis se indica el n° de laboratorios que ensayaron el compuesto	

#### 4.1.5.3.- Resultados

Los ensayos de inhibición de la unión de [<sup>3</sup>H]ácido kaínico permiten determinar la potencia tóxica total de una muestra marina independientemente del congénero específico de ácido domoico presente en ellas, ya que todos los congéneros comparten la misma diana de acción en el sistema glutamatérgico (Van Dolah et al. 1997, Crawford et al. 1999). Por otro lado, la determinación de la ratio del ARNm de c-fos a los 240 min/ 30 min mostró valores < 1 y de 2.9 para concentraciones no tóxicas y tóxicas (100 µM) de ácido domoico, respectivamente (Griffiths et al. 2000).

La muerte neuronal por excitotoxicidad inducida por los aminoácidos excitadores (glutamato, NMDA, AMPA, AK) es una muerte de tipo concentración- y tiempo-dependiente revertida por antagonistas NMDA y AMPA/KA. Paralelamente, agonistas de receptores NMDA (glutamato, NMDA) inducen un incremento de la concentración de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> de forma concentración- y tiempo-dependientes que correlaciona con la muerte neuronal inducida por los agonistas NMDA (Frandsen y Schousboe 1987, Frandsen et al. 1989a y b, 1990, Hartley et al. 1993, Hyrc et al. 1997, Eirmerl y Scharamn 1994, Hyrc et al. 1997, Griffiths et al. 1997, 2000, Kristensen et al. 1999). Además, la utilización de los ensayos descritos en el método permitió describir el potencial neurotóxico y el mecanismo de acción de los isómeros de 2 carboxiciclopropil glicina (análogo del glutamato) demostrando que la neurotoxicidad de los isómeros activos se debe a la activación del receptor NMDA (Kawai et al. 1992). Los efectos neurotóxicos de algunos

compuestos hidroxamatos (agentes anti-proliferativos utilizados para combatir el HIV) son consecuencia de la interacción con los receptores NMDA (Lockhart et al. 1995). Por otro lado, el plomo es un contaminante ambiental potencialmente neurotóxico que actúa a nivel del receptor NMDA inhibiendo la unión de [<sup>3</sup>H]MK801 y las corrientes inducidas por NMDA (Ujihara y Albuquerque 1992).

#### 4.1.5.4.- Modelo de predicción

Existe un modelo de predicción para los ensayos dirigidos a valorar el potencial neurotóxico de muestras marinas que contengan toxinas relacionadas con el ácido domoico. El ensayo *in vitro* permitiría la cuantificación del contenido de ácido domoico cuya concentración debería ser inferior a los niveles establecidos por las directivas reguladoras internacionales. Los niveles de ácido domoico (determinados por HPLC) permitidos no deben superar los 20mg/kg de ácido domoico en las partes comestibles de los moluscos (Dir 97/61/EC). Hasta el momento, no existe ningún modelo de predicción de neurotoxicidad basado en los otros ensayos *in vitro* propuestos en este método.

#### 4.1.5.5.- Ventajas e inconvenientes. *Status*

Los ensayos de unión y los métodos electrofisiológicos proporcionan información útil sobre el mecanismo de acción que a su vez puede ser utilizada para la predicción de toxicidad. Además, la determinación de la actividad de un receptor o canal iónico mediante técnicas de electrofisiología, en casi cualquier tipo celular, muestra un elevado grado de precisión y tiempo de resolución aunque precisa de un equipo específico y personal altamente especializado. El principal inconveniente de los ensayos de unión de radioligandos radica en el uso de radiactividad si bien son fáciles de realizar y aportan información del funcionamiento del receptor. Los ensayos propuestos en el método carecen de sistemas de bioactivación.

#### *Status*

*A excepción del ensayo de unión de [<sup>3</sup>H]ácido kaínico para la cuantificación de ácido domoico en muestras marinas, el resto de ensayos requieren ser mejor analizados antes de ser utilizados como herramienta de rastreo de compuestos con potencial neurotóxico. Tampoco se ha encontrado ningún estudio inter-laboratorio que evalúe alguno de estos ensayos in vitro.*

#### **4.1.6.- Cultivos reagregados de células cerebrales para la evaluación de compuestos neurotóxicos**

Los cultivos de reagregados de cerebro son sistemas tridimensionales que permiten ensayar compuestos neurotóxicos a diferentes estadios de desarrollo. La característica distintiva de este tipo de cultivo en relación a otros tipos de cultivo radica en la capacidad de reproducir *in vitro* la complejidad celular del sistema nervioso *in vivo*. La utilización de este sistema experimental como base del método *in vitro* propuesto permitirá evaluar los efectos tóxicos inducidos por potenciales agentes neurotóxicos sobre los distintos tipos celulares que constituyen los reagregados (neuronas y glía) y en las diferentes fases de desarrollo (fase de desarrollo, diferenciación y madurez) en un único sistema.

##### 4.1.6.1.- Antecedentes del sistema experimental: cultivos reagregados de cerebro

Los cultivos reagregados de cerebro son cultivos tridimensionales formados por distintos tipos de células neuronales. Garber y Moscona (1972) fueron los primeros en describir la capacidad de células disociadas procedentes de regiones distintas de un cerebro embrionario de reasociarse y formar agregados de células en sistemas *in vitro*. Los reagregados celulares proporcionan un ambiente favorable para que las células evolucionen de un estado indiferenciado a una población integrada de neuronas diferenciadas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía. La primera fase del desarrollo corresponde al periodo de proliferación y diferenciación temprana asociada a un crecimiento axonal y dendrítico seguido de un periodo de intensa mielinización y progresión hacia la etapa de maduración caracterizada por la sinaptogénesis y mielinización (Garbin y Goslin 1991 Culturing nerve cells; Honegger y Monnet-Tschudi, 1997; Atterwill y Purcell, 1999; Monnet-Tschudi et al., 2000; Zurich et al., 2000). Los cultivos reagregados de cerebro tienen la capacidad de sintetizar y liberar neurotransmisores, expresar componentes del citoesqueleto, enzimas antioxidantes y receptores de neurotransmisores simulando una situación *in vivo*. (Honegger y Richelson, 1977, 1979; Hemmendinger et al., 1981; Atterwill et al., 1984; Riederer et al., 1992; Aspberg y Tottmar, 1992; Barnea et al., 1993). Por esto, estos cultivos proporcionan información sobre la neurobiología, neurofarmacología y aspectos neurotoxicológicos del cerebro. La preparación de los reagregados a partir de cerebros embrionarios de rata y su utilización en el campo de la neurotoxicología fue desarrollado originalmente por Honegger y Richelson (1976, 1977, 1979) y Trapp et al. (1979).

#### 4.1.6.2.- Bases del método

El elemento principal del método propuesto es la utilización de los cultivos reagregados de cerebro, como modelo de sistema nervioso (SN) *in vitro* equivalente al SN *in vivo*, para evaluar en un único sistema experimental los efectos neurotóxicos de un amplio espectro de compuestos químicos sobre distintos tipos celulares (neurona y glía), sobre la transmisión nerviosa, sobre la mielina y también sobre los diferentes estadios de desarrollo. Los modelos experimentales utilizados para el estudio de la toxicidad en los distintos periodos de maduración son: (1) de los 5 - 15 días *in vitro* (fase temprana de desarrollo), (2) de los 18 – 28 días *in vitro* (periodo de intensa mielinización) y (3) de los 25 – 35 días (avanzado estado de desarrollo). El análisis de los efectos tóxicos producidos en los reagregados se realizó mediante métodos bioquímicos y morfológicos así como mediante técnicas de biología molecular. Los marcadores (endpoints) utilizados para evaluar el tipo de daño generado por los agentes tóxicos en los reagregados celulares comprenden métodos de detección de viabilidad celular, de daño en la membrana celular, morfología celular, de efectos específicos de neuronas, glía y oligodendrocitos; alteraciones en la formación de la mielina y efectos en la microglía (tabla 4.5). En la actualidad existe un protocolo estandarizado (SOP) propuesto por C.K. Atterwill (2001) en el que se describe la preparación de estos cultivos así como su utilización en el campo de la neurotoxicología (INVITTOX protocol nº 11, Comisión Europea – Joint Research Center -JRC-, ECVAM's database service, <http://ecvam-sis.jrc.it/>).

La elaboración del método propuesto se basó en el trabajo reportado por 4 laboratorios y realizado con 11 compuestos de naturalezas distintas utilizando como modelo experimental cultivos de reagregados cerebrales (tabla 4.8).

**Tabla 4.8.-** Resumen de los marcadores y agentes tóxicos ensayados en cultivos reagregados de cerebro

<b>Marcadores (end-point)</b>	Viabilidad celular (contenido proteína, ADN, captación de colorantes, apoptosis); Daño membrana plasmática (liberación de LDH y enolsa específica de neurona –NSE-); morfología celular; Efectos específicos en (1)neuronas (determinación AChE, NTE, ChAT, GAD, TH; MAP2 –proteína citoesqueleto-, y proteínas sinápticas –sinapsina y sinaptofosina-); (2) astrocitos (glutamina sintetasa –GS-, GFAP); (3) oligodendrocitos (CNP, MBP y galactocerosida); (4) formación de mielina (MBP); microglía (isolectina B4)		
<b>Sistemas experimentales</b>	Cultivos agregados de cerebro fetal o de áreas específicas del cerebro de rata, ratón, pollo o humano.		
<b>Parámetros</b>	—		
<b>Compuestos</b>	Clorpirifos (1)	Fumonisina (1)	Lead acetate (1)
	Methamphetamine (1)	NMDA (1)	Organotin compounds(1)
	Parathion (1)	Propofol (1)	Ochratoxin A (1)
	Diisopropil fosfluoridato (DFP; gas nervioso) (1)		
	Etilcolina mustard aziridinium (ECMA) (1)		
	Entre paréntesis se indica el nº de laboratorios que ensayaron el compuesto		

ChAT (colina acetiltransfera); GAD (descarboxilasa del ácido glutámico); TH (tirosina hidroxilasa); AChE (acetil colinesterasa); NTE (esterasa diana neuronal); MAP2 (proteína asociada a microtúbulos); GS (glutamina sintetasa); GFAP (proteína ácida fibrilar de glía); CNP (2'3'-nucleotido cíclico 3'-fosfohidrolasa); MBP (proteína básica de la mielina)

#### 4.1.6.3.- Resultados

La utilización de este modelo experimental permitió definir los efectos neurotóxicos (neuronotoxicidad, gliotoxicidad, mielintoxicidad y toxicidad en la neurotransmisión) inducidos por agentes con toxicidad conocida (ver tabla 4.5) en los diferentes estados de diferenciación. Así pues, cultivos reagregados de cerebro de pollo expuestos a los compuestos organofosforados clorpirifos y paratión con sus respectivas formas activas clorpirifos oxon y paraoxon, confirmó la capacidad de ambos compuestos de inhibir la AChE independientemente del estado de diferenciación. La inhibición de la AChE ejercida por los compuestos no activos (clorpirifos y paratión) se debe a la activación metabólica de estos compuestos gracias a la actividad enzimática citocromo P450 expresada en estos cultivos. Por otro lado, el par clorpirifos / clorpirifos oxon mostró toxicidad neuronal específica (reducción de la actividad ChAT y GAD) dependiente del estado de maduración celular mientras que el par paration / paraoxon afectaron al proceso de mielinización y depósito de mielina. En ambos casos, el marcador neuronal más sensible a estos compuestos fue la AChE así como todos los efectos observados fueron potenciados por sus formas activas (Monnet-Tschudi et al. 2000).

Por otro lado, las micotoxinas funomisina B1 y ocratoxina A produjeron efectos neurotóxicos distintos en reagregados de cerebro. Mientras que la funomisina B1 ocasionó la muerte selectiva de los oligodendrocitos repercutiendo de forma negativa en el proceso de la mielinización y compactación de la misma, la ocratoxina A afectó selectivamente a las neuronas colinérgicas, astrocitos y oligodendrocitos (Monnet-Tschudi 1997, 1999). Sin embargo no existen evidencias de su neurotoxicidad en humanos (Ludolph y Spencer 2000). El plomo es un conocido contaminante ambiental cuya neurotoxicidad en humanos se asocia con neuropatía periférica y con encefalopatía aguda y crónica. La evaluación de la toxicidad del plomo en reagregados celulares mostró una toxicidad selectiva para neuronas GABAérgicas y astrocitos (Zurich y Monnet-Tschudi 1994, Cory-Slechta y Schaumburg 2000). La metanfetamina, droga de abuso cuya neurotoxicidad se asocia a las neuronas monoaminérgicas y en particular las dopaminérgicas (Heller et al. 2000), indujo una disminución de los niveles de dopamina y de serotonina en los cultivos reagregados celulares. Por otro lado, el N-metil-D-aspartato (NMDA, agonista de glutamato) provocó toxicidad neuronal y activación de la glía que al mismo tiempo fue revertida por el antagonista NMDA, MK-801. Estos hechos apuntan hacia NMDA como responsable de la gliosis reactiva observada como resultado de la excitotoxicidad mediada por receptor (Hayes et al. 2000). El propofol, compuesto utilizado como anestésico, afectó selectivamente a las neuronas GABAérgicas si bien no mostró ningún efecto sobre los marcadores gliales. Estos datos concuerdan con la muerte de neuronas GABAérgica inducida por propofol en otras preparaciones *in vitro* (Honegger and Matthieu 1996, Spahr-Schopfer et al. 2000). Por último, los compuestos organoestannicos (trimetilestano, trietilestano y dibutilestano), utilizados industrialmente como estabilizantes del plástico, como agentes fungicidas o pesticidas, indujeron una respuesta neurotóxica ligeramente diferente según el compuesto. Así pues, mientras la muerte neuronal inducida por trimetilestano fue acompañada por una reactivación glial, el trietilestano indujo una disminución drástica de los marcadores neuronales (GAD y ChAT) y gliales (GS y CNP) responsables de la desmielinización más severa durante la diferenciación. En cambio, el dibutilestano afectó selectivamente a neuronas colinérgicas y al contenido de mielina (Monnet-Tschudi et al. 1993, 1999; Eskes et al. 1999). Los efectos patológicos inducidos por estos compuestos en animales de experimentación, sugieren que el trimetilestano es un compuesto neuronotóxico que produce necrosis neuronal que podría ir acompañada de una gliosis astrocítica; mientras que el trietilestano provocaría mielinopatía (Krinke et al. 2000, Anthony et al. 2001).

En definitiva, la utilización de los cultivos reagregados de cerebro confirmó muchos de los efectos neurotóxicos de los compuestos tóxicos reportados *in vivo* o en modelos experimentales.

#### 4.1.6.4.- Modelo de predicción

Hasta al momento, no existe un modelo de predicción, si bien, la determinación de los diferentes marcadores (endpoints) son de gran utilidad para la identificación de los efectos neurotóxico inducido por el tóxico (Honegger y Werffeli 1998; Atterwill et al. 1993; Zurich et al. 2000; Won et al. 2002). Así pues, una disminución de la cantidad de proteínas, de ADN, del contenido celular de LDH y el incremento del LDH en el medio de cultivo son parámetros indicativos de citotoxicidad general. En cambio, la disminución de las proteínas del citoesqueleto o de la enolasa específica de neurona (NSE) son indicativos de la toxicidad neuronal. Por otro lado, alteraciones en los niveles de neurotransmisores o de enzimas implicadas en su síntesis (ChAT, GAD, TH) son indicadores de toxicidad específica para células colinérgicas, gabaérgicas o dopaminérgicas, respectivamente. Además, una disminución de la actividad AChE refleja la aparición de toxicidad colinérgica mientras que la disminución de la actividad NTE predice la inducción de neuropatía retardada inducida por compuestos organofosforados. Por último, cambios en los niveles de GS, GFAP, CNP y MBP son indicativos de los efectos tóxicos producidos en astrocitos y microglía. Por ejemplo, una disminución de la MBP indica la existencia de daño al nivel de la mielina.

La utilización de los cultivos reagregados de cerebro ha sido propuesto como el modelo experimental a ser usado en la segunda fase de evaluación de la neurotoxicidad de un compuesto *in vitro* ya que permite analizar distintos parámetros en un mismo cultivo, determinar la especificidad celular y el mecanismo de neurotoxicidad (Atterwill et al. 1993, 1994; Fielder et al. 1997).

#### 4.1.6.5.- Ventajas e inconvenientes del modelo *in vitro*. *Status*

Los cultivos reagregados permiten la evaluación de distintos parámetros de toxicidad en diferentes tipos de células (neuronas o glía) en un único sistema y en distintos estados de diferenciación. La posibilidad de mantener estos cultivos durante largos periodos de tiempo en cultivo, permite utilizarlos en estudios de toxicidad a largo plazo. Además, expresan biomarcadores con relevante importancia en la neurotoxicidad (GFAP y NTE).

A pesar de presentar cierta capacidad de metabolización debida a la expresión del citocromo P450, los reagregados de cerebro carecen de sistemas propiamente metabólicos. No son tampoco modelos adecuados para realizar ensayos de electrofisiología. La edad embrionaria del tejido cerebral, el requerimiento de un número elevado de animales gestantes, el coste económico y la necesidad de personal experimentado son algunos de los inconvenientes de la utilización de estos cultivos como modelo para la evaluación de toxicidad. Además, la reproducibilidad es otro de los puntos débiles del modelo.

#### *Status*

*A pesar de no existir un método de predicción, la entidad "Swiss National Research Foundation" encargó la evaluación de la utilización de cultivos reagregados celulares (reagregados de cerebro) y embriones enteros de pollo y rata con el objetivo de validar y establecer un modelo de predicción del potencial neurotóxico y teratogénico de compuestos potencialmente tóxicos. De los 12 compuestos ensayados, los más tóxicos (compuestos de ácido retinoico, 6-aminonicotinamida y el cetoconazol) produjeron neurotoxicidad a concentraciones en las que se observaron también efectos teratogénicos leves o severos en ambos modelos teratogénicos. Los compuestos menos tóxicos (4-hidroxipiridina, metronidazol, las sulfonamidas, las metilxantinas y los éteres de glicol) produjeron neurotoxicidad a concentraciones en las que no se observaron efectos teratogénicos o si se observaron, éstos fueron leves en ambos modelos in vitro. En 4 de los 6 pares de compuestos ensayados (los de ácido retinoico, las imidazolas, las piridinas y los éteres de glicol), se observó una clara diferencia de potencia entre los miembros de la misma clase. Finalmente, la utilización de los cultivos reagregados de cerebro permitió distinguir los efectos neurona- y glía-específicos. Así, la 6-aminonicotinamida mostró una toxicidad selectiva para las células gliales y el cetoconazol para las células neuronales.*

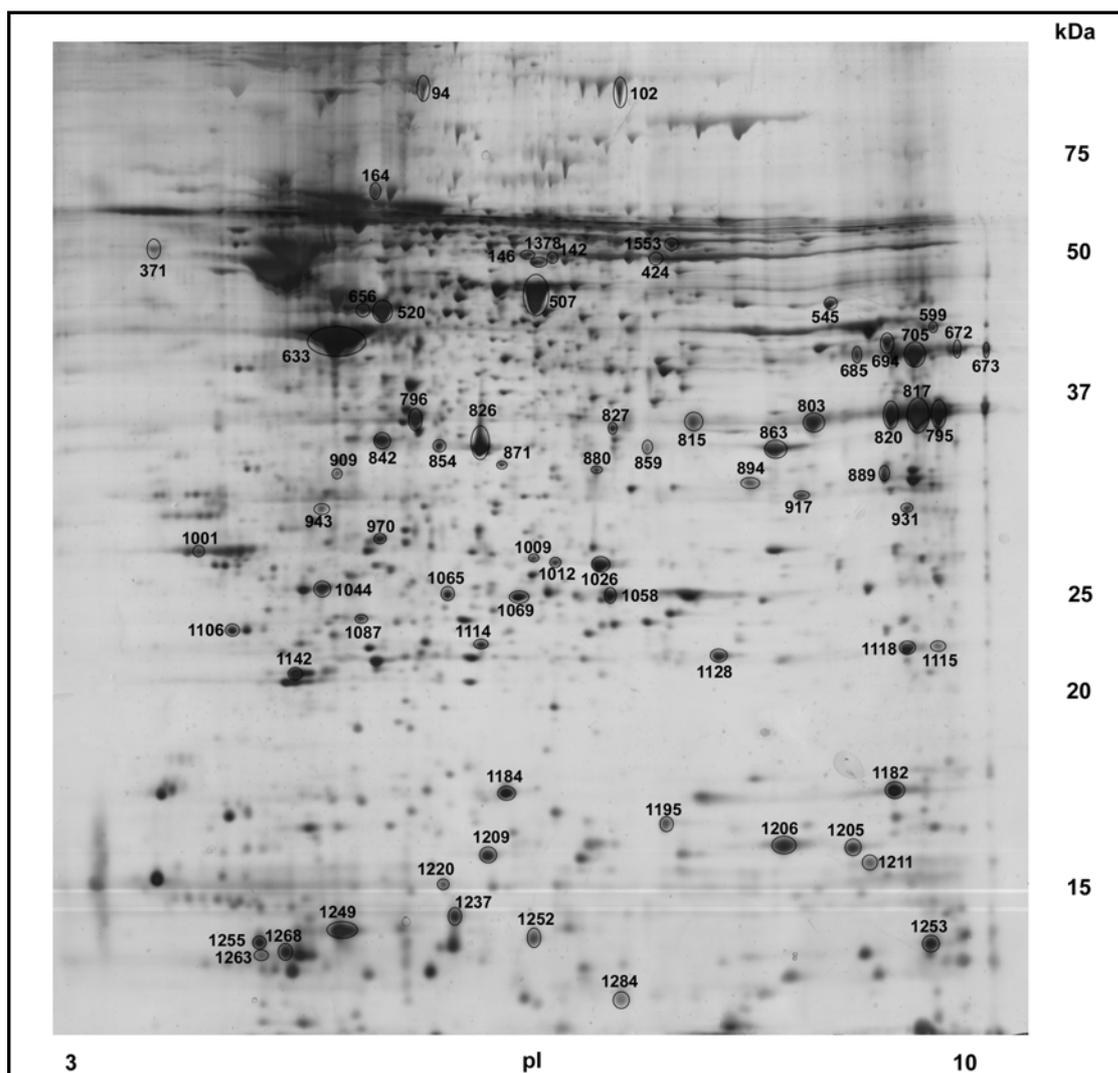
#### **4.2.- Aplicación de técnicas proteómicas para el estudio de la neurotoxicidad inducida por MeHg**

En este trabajo nos propusimos utilizar las técnicas proteómicas con el objetivo de identificar posibles marcadores de toxicidad en células granulares de cerebelo expuestas de forma prolongada a MeHg. Para ello, nos planteamos crear una base de datos de referencia de las proteínas expresadas en estos cultivos y realizar un estudio de la expresión diferencial de proteínas de células tratadas con MeHg.



#### **4.2.1.- Caracterización proteómica de los cultivos primarios de células granulares de cerebelo de ratón. Creación de una base de datos de referencia**

La caracterización de las proteínas expresadas en cultivos primarios de células granulares de cerebelo de ratón se realizó a partir de los extractos de proteína total de células recogidas a los 12 div. Las proteínas fueron separadas, en primer lugar, según su punto isoeléctrico (pI) y posteriormente según su peso molecular (PM) mediante la electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los geles fueron revelados con nitrato de plata. En estas condiciones, se detectaron aproximadamente unas 800 manchas de PM y pI comprendidos entre 13 – 91 kDa y 3.2 – 9.7, respectivamente. Para la creación de la base de datos de las proteínas expresadas en las células granulares de cerebelo, se recortaron las 100 manchas más abundantes, que posteriormente se analizaron mediante espectrometría de masas, y en particular mediante la digestión en gel con tripsina e identificación de las manchas por mapeo peptídico (PMF). Se caracterizaron 72 de las 100 manchas recortadas, 66 de las cuales fueron identificadas por MALDI-TOF y 6 por MALDI-TOF-TOF (figura 4.16 y tabla 4.4 y 4.5). Las 72 manchas identificadas correspondieron a 57 proteínas individuales, esto se debe a la presencia de isoformas y modificaciones postraduccionales que pueden afectar al pI y/o al PM de la proteína, modificando así su localización en un gel 2DE, lo cual también se ha descrito en bases de datos de referencia de proteínas de distintos tipos celulares y tejidos (Langen et al. 1999, Jiang et al. 2005, Yang et al. 2005a, b). La figura 4.9 muestra el perfil proteico del extracto de proteína total de cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de ratón así como la localización de las 72 proteínas identificadas.



**Figura 4.9.-** Imagen 2DE obtenida a partir de cultivos primarios de células granulares de cerebelo de ratón a los 12 días *in vitro*.

La información relacionada con la identificación de las proteínas mediante MALDI-TOF y MALDI-TOF-TOF (nombre de la proteína, número de acceso al SWISS-PROT, probabilidad de la identificación (score), peso molecular y punto isoeléctrico teórico y experimental) se describen en las tablas 4.9 y 4.10. Además, en la tabla 4.10 se muestran las secuencias peptídicas identificadas de las proteínas analizadas mediante MS/MS. En estas tablas, las proteínas aparecen clasificadas según su función molecular (ver apartado 4.2.1.1.1).

Tabla 4.9.- Proteínas identificadas por PMF - MALDI-TOF MS en cultivos primarios de células granulares de cerebelo.

Mancha	ID de acceso	Nº Swiss prot	Nombre completo	Score <sup>a</sup>	Nº Péptidos identif.	Teórico <sup>b</sup>		Experimental <sup>c</sup>	
						PM (kDa)	pI	PM (kDa)	pI
<b>Proteínas antioxidantes</b>									
**1065	PRDX6_MOUSE	O08709	Peroxiredoxin 6 (EC 1.11.1.15)	9.21e4	8	25	5.7	22 ± 1.4 (13)	5.8 ± 0.1 (13)
1069	PRDX6_MOUSE	O08709	Peroxiredoxin 6 (EC 1.11.1.15)	4.56e4	9	25	5.7	22 ± 1.4 (13)	6.4 ± 0.1 (13)
1118	PRDX1_MOUSE	P35700	Peroxiredoxin 1 (EC 1.11.1.15)	1.94e6	9	22	8.3	20 ± 0.8 (13)	9.5 ± 0.2 (13)
1211	PRDX5_MOUSE	P99029	Peroxiredoxin 5, mitochondrial precursor (EC 1.11.1.15)	1.41e3	5	22	9.1	15 ± 1.1 (13)	9.2 ± 0.2 (13)
<b>Proteínas de unión</b>									
**102	EF2_MOUSE	P58252	Elongation factor 2 (EF-2)	1.84e5	10	95	6.4	90 ± 3.5 (4)	7.2 ± 0.2 (4)
142	Q80V75_MOUSE	Q80V75	Fscn1 protein	2.75e11	18	51	6.6	55 ± 2.6 (11)	6.5 ± 0.1 (11)
146	Q80V75_MOUSE	Q80V75	Fscn1 protein	1.16e14	23	51	6.6	55 ± 2.5 (12)	6.7 ± 0.7 (12)
507b	EF1G_MOUSE	Q9D8N0	Elongation factor 1-gamma	3.6e4	9	50	6.3	49 ± 1.1 (13)	6.5 ± 0.1 (13)
842b	ANXA3_MOUSE	O35639	Annexin A3	7.69e6	12	37	5.3	31 ± 2.4 (13)	5.2 ± 0.1 (13)
871	PIPNA_MOUSE	P53810	Phosphatidylinositol transfer protein alpha	1.33e3	6	32	6.0	29 ± 2.3 (13)	6.2 ± 0.1 (13)
931	LEG3_MOUSE	P16110	Galectin 3	3.41e3	7	28	8.5	26 ± 2 (13)	9.5 ± 0.2 (13)
1001	1433Z_MOUSE	P63101	Protein kinase C inhibitor protein-1	5.18e4	7	28	4.7	24 ± 1.9 (12)	3.8 ± 0.2 (13)
1044	UCHL1_MOUSE	Q9R0P9	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (EC 3.4.19.12)	1.73e8	10	25	5.1	22 ± 1.5 (13)	4.7 ± 0.1 (13)
1106	TCTP_MOUSE	P63028	Translationally controlled tumor protein	1.03e5	7	19	4.8	20 ± 1.2 (12)	4.0 ± 0.2 (12)
**1114	PARK7_MOUSE	Q99LX0	DJ-1	6.33e4	8	20	6.3	20 ± 0.9 (13)	6.1 ± 0.1 (13)
1142	PEBP_MOUSE	P70296	Phosphatidylethanolamine-binding protein	1.06e5	8	21	5.2	20 ± 0.7 (13)	4.6 ± 0.2 (13)
1182	COF1_MOUSE	P18760	Cofilin, non muscle isoform	2.26e5	9	19	8.2	16 ± 0.7 (13)	9.4 ± 0.2 (13)
1184	COF1_MOUSE	P18760	Cofilin, non muscle isoform	1.37e5	8	19	8.2	16 ± 0.6 (13)	6.3 ± 0.2 (13)
1253	PROF1_MOUSE	P62962	Profilin I	1.04e3	4	15	8.5	14 ± 1.6 (13)	9.7
1255	PRVA_MOUSE	P32848	Parvalbumin alpha	1.89e3	5	12	5.0	14 ± 1.6 (13)	4.3 ± 0.2
1268	LEG1_MOUSE	P16045	Galectin-1	172	4	15	5.3	14 ± 1.7 (3)	4.6 ± 0.2 (3)
<b>Proteínas catalíticas</b>									
94	FTHFD_MOUSE	Q8R0Y6	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (EC 1.5.1.6)	8.13e8	13	99	5.6	97	5.6
424	ATPA_MOUSE	Q03265	ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)	9.11e10	13	60	9.2	53	7.4
520	KCRB_MOUSE	Q04447	Creatine kinase, B chain (EC 2.7.3.2)	2.04e13	20	43	5.4	46 ± 1.1 (13)	5.2 ± 0.1 (13)
**545	FUMH_MOUSE	P97807	Fumarate hydratase 1, mitochondrial precursor (EC 4.2.1.2)	1.48e4	7	54	9.1	48 ± 2 (13)	8.9 ± 0.1 (13)
656	KCRB_MOUSE	Q04447	Creatine kinase, B chain (EC 2.7.3.2)	5.06e9	15	43	5.4	46 ± 1.1 (13)	5.1 ± 0.1 (13)
672	AATM_MOUSE	P05202	Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor (EC 2.6.1.1)	2.1e9	15	47	9.1	40 ± 1.9 (7)	9.8 ± 0.2 (7)
673	AATM_MOUSE	P05202	Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor (EC 2.6.1.1)	4.77e7	11	47	9.1	39 ± 1.3 (4)	9.9 ± 0.0 (4)
685	ALDOA_MOUSE	P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13)	1.11e4	8	39	8.3	40 ± 2.1 (9)	9.2 ± 0.1(9)

Continuación de la tabla 4.9

Mancha	ID de acceso	Nº Swiss prot	Nombre completo	Score <sup>a</sup>	Nº Péptidos identif.	Teórico <sup>b</sup>		Experimental <sup>c</sup>	
						PM (kDa)	pI	PM (kDa)	pI
<b>Proteínas catalíticas</b>									
694	ALDOA_MOUSE	P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13)	2.22e6	11	39	8.3	39 ± 2.1 (12)	9.4 ± 0.1(12)
705	ALDOA_MOUSE	P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13)	1.17e4	7	39	8.3	39 ± 2.5 (13)	9.6 ± 0.2(13)
796	LDHB_MOUSE	P16125	L-lactate dehydrogenase B chain (EC 1.1.1.27)	5.29e5	8	37	5.7	33 ± 2.2 (13)	5.5 ± 0.1 (13)
803	G3P_MOUSE	P16858	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	6.94e5	7	36	8.4	33 ± 2.1 (13)	8.7 ± 0.1 (13)
815	G3P_MOUSE	P16858	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	4.73e3	6	36	8.4	34 ± 2.1 (13)	7.8 ± 0.1 (13)
**817	G3P_MOUSE	P16858	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	3.33e8	11	36	8.4	33 ± 2.5 (13)	9.6 ± 0.2 (13)
820	G3P_MOUSE	P16858	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	6.84e9	12	36	8.4	33 ± 2.4 (13)	9.4 ± 0.2 (13)
826	MDHC_MOUSE	P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic (EC 1.1.1.37)	4.25e9	9	36	6.2	31 ± 2.2 (13)	6.1 ± 0.1 (13)
854	MDHC_MOUSE	P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic (EC 1.1.1.37)	1.59e3	5	36	6.2	31 ± 2.2 (13)	5.7± 0.1 (13)
859	LDHA_MOUSE	P06151	L-lactate dehydrogenase A chain (EC 1.1.1.27)	397	5	36	7.6	31 ± 2.2 (13)	7.5 ± 0.1 (13)
863	LDHA_MOUSE	P06151	L-lactate dehydrogenase A chain (EC 1.1.1.27)	3.35e9	18	36	7.6	31 ± 2.1 (13)	8.5 ± 0.1 (13)
880	ESTD_HUMAN	P10768	Esterase D/formylglutathione hydrolase (EC 3.1.1.1)	5.2e4	5	31	6.7	29 ± 2.3 (13)	7.0 ± 0.2 (13)
**943b	CATB_MOUSE	P10605	Cathepsin B precursor (EC 3.4.22.1)	4.64e3	5	38	5.8	26 ± 2.1 (12)	4.7 ± 0.1 (12)
1009	PGAM1_MOUSE	Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1 (EC 5.4.2.1; EC 5.4.2.4; EC 3.1.3.13)	1.44e3	4	29	6.7	24 ± 1.7 (13)	6.5 ± 0.1 (13)
1012	PGAM1_MOUSE	Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1 (EC 5.4.2.1; EC 5.4.2.4; EC 3.1.3.13)	1.62e9	11	29	6.7	23 ± 1.7 (13)	6.7 ± 0.1 (13)
1026	PGAM1_MOUSE	Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1 (EC 5.4.2.1; EC 5.4.2.4; EC 3.1.3.13)	7.84e9	14	29	6.7	24 ± 1.8 (13)	7.1 ± 0.2 (13)
1058	TPIS_MOUSE	P17751	Triosephosphate isomerase	1.33e5	7	27	6.9	22 ± 1.4 (13)	7.2 ± 01 (13)
1195	NDKB_MOUSE	Q01768	Nucleoside diphosphate kinase B (EC 2.7.4.6)	433e3	3	17	7.0	15 ± 0.8 (13)	7.5 ± 0.2 (13)
1128	SODM_MOUSE	P09671	Superoxide dismutase (Mn) mitochondrial precursor (EC 1.15.1.1)	3.67e5	9	25	8.8	20 ± 07 (13)	8.0 ± 0.2 (13)
1205	PPIA_MOUSE	P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (EC 5.2.1.8)	1.48e4	7	18	7.8	15 ± 1.0 (13)	9.0 ± 0.1 (13)
1206	PPIA_MOUSE	P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (EC 5.2.1.8)	1.47e5	8	18	7.8	15 ± 1.0 (13)	8.5 ± 0.1 (13)

Continuación de la tabla 4.9

Mancha	ID de acceso	Nº Swiss prot	Nombre completo	Score <sup>a</sup>	Nº Péptidos identif.	Teórico <sup>b</sup>		Experimental <sup>c</sup>		
						PM (kDa)	pl	PM (kDa)	pl	
<b>Proteínas catalíticas</b>										
1252	HINT1_MOUSE	P70349	Histidina triad nucleotide-binding protein 1	2.4e5	7	14	6.4	14 ± 1.6 (13)	6.5 ± 0.2 (13)	
1378	ALDH2_MOUSE	P47738	Aldehyde dehydrogenase AHD-M1 (EC 1.2.1.3)	2.86e7	15	56	7.0	54 ± 2.3 (12)	6.5 ± 0.1 (13)	
1553	SCOT_MOUSE	P55809	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial precursor (EC 2.8.3.5)	3.25e8	11	56	7.13	57 ± 3.6	7.6 ± 0.2	
<b>Proteínas de plegamiento</b>										
164	GRP75_MOUSE	P38647	Stress-70 protein, mitochondrial precursor	2.42e9	19	73	5.9	66 ± 5.9 (4)	5.2 ± 0.2 (4)	
371	CRTC_MOUSE	P14211	Calreticulin precursor	5.29e5	9	48	4.3	54 ± 1.3 (2)	3.3 ± 0 (2)	
<b>Proteínas de transducción de la señal</b>										
917	GBLP_MOUSE	P68040	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2-like 1	1.33e7	10	35	8.1	28 ± 1.4 (9)	8.7 ± 0.1 (13)	
<b>Proteínas estructurales</b>										
633	ACTG_MOUSE	P63260	$\gamma$ -Actin or $\beta$ -actin	1.3e7	13	41	5.6	43 ± 1.5 (13)	4.9 ± 0.1 (13)	
	ACTB_MOUSE	P60710		7.75e6	13	40	5.8			
<b>Transportadores</b>										
889	VDAC1_MOUSE	Q60932	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1)	4.2e7	9	32	8.6	29	9.1	
**1087	NUHM_MOUSE	Q9D6J6	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24kDa subunit, mitochondrial precursor (EC 1.6.5.3; EC 1.6.99.3)	6.51e4	6	27	7.0	21 ± 1.2 (13)	5.1 ± 0.1 (13)	
1237	FABPE_MOUSE	Q05816	Fatty acid-binding protein, epidermal	1.96e4	6	15	6.1	14 ± 1.5 (13)	5.9 ± 0.2 (13)	
1249	FABPB_MOUSE	P51880	Fatty acid-binding protein, brain	2.22e6	8	15	5.5	14 ± 1.5 (13)	4.9 ± 0.2 (13)	
<b>Proteínas no clasificadas</b>										
507a	ENOA_MOUSE	P17182	Alpha enolase (EC 4.2.1.11)	7.67e12	19	47	6.4	49 ± 1.0 (13)	6.5 ± 0.1 (13)	
599	UQCR2_MOUSE	Q9DB77	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein 2, mitochondrial precursor (EC 1.10.2.2)	2.74e8	13	48	9.3	43 ± 2.0 (13)	9.7 ± 0.2 (13)	
795	MDHM_MOUSE	P08249	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.1.1.37)	4.6e8	11	36	8.8	33 ± 2.4 (13)	9.8 ± 0.2 (13)	
827	ALDR_MOUSE	P45376	Aldose reductase (EC 1.1.1.21)	8.21e3	6	36	6.7	33 ± 2.2 (13)	7.2 ± 0.2 (13)	
842a	Q99LW9_MOUSE	Q99LW9	Pyruvate dehydrogenase lipoamide beta	9e9	12	35	5.6	31 ± 2.4 (13)	5.2 ± 0.1 (13)	
909	MARE1_MOUSE	Q61166	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	1.2e3	5	30	5.1	27 ± 2.4 (12)	4.8 ± 0.1 (12)	
**943a	CLIC1_MOUSE	Q9Z1Q5	Chloride intracellular channel protein1	3.07e3	6	27	5.1	25 ± 2.1 (12)	4.7 ± 0.1 (12)	
970	PHB_MOUSE	P67778	Prohibitin	2.65e7	11	30	5.6	25 ± 1.9 (13)	5.2 ± 0.1 (13)	

\*\* Identificación confirmada por MALDI-TOF-TOF; <sup>a</sup>Mowse score obtenido tras realizar la búsqueda de proteínas con el programa Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>) (Pappin et al. 1993). <sup>b</sup>Valor calculado a partir del correspondiente nº de acceso en la base datos SWISS-PROT utilizando la herramienta *Expasy Compute pI/MW* ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)); <sup>c</sup>Valor calculado (media ± SD) a partir de la posición de las manchas en los geles 2DE.

**Tabla 4.10.-** Proteínas identificadas mediante búsqueda combinada de PMF - MALDI-TOF-TOF MS/MS de cultivos primarios de células granulares de cerebelo.

Mancha	Número de acceso	NºSwiss-prot	Nombre completo	Péptido secuenciado		score	Teórico		Experimental	
				Inicio-fin	Secuencia		PM (kDa)	pl	PM (kDa)	pl
<b>Antioxidante</b>										
1209	SODC_MOUSE	P08228	Cu/Zn superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	10 – 23 70 – 91 103 – 115	KGDGPVQGTIHFEQKA KKHGGPADEERHVGDLGNVT AGKD RVISLSGEHSIIGRT	49	16	6.0	15 ± 1.0 (13)	6.1 ± 0.2(13)
<b>Transportadores</b>										
894	VDAC1_RAT	Q9Z2L0	Voltage-dependent anion channel 1	64 – 74 97 – 109 121 – 139 164 – 174 237 – 256 237 – 256	WTEYGLTFTEK LTFDSSFSPNTGK EHINLGCDVDFDIAGPSIR VTQSNFAVGYK VNNSSLIGLGYTQTLKPGIK VNNSSLIGLGYTQTLKPGIK	68	31	8.6	29 ± 1.4 (7)	8.3 ± 0.2 (7)
1284	CX6A1_MOUSE	P43024	Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver, mitochondrial [Precursor] (EC 1.9.3.1)	2 – 13 40 – 55 40 – 55	SSGAHGEEGSAR HEEHERPPFVAYPHLR HEEHERPPFVAYPHLR	45	10	6.6	13 ± 2.1 (10)	7.2 ± 0.2(10)
<b>Función molecular desconocida</b>										
1263	SH3L1_MOUSE	Q9JJU8	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein like	77 – 86 77 – 86	GDYDAFFEAR GDYDAFFEAR	40	13	4.9	14 ± 1.8 (11)	4.3 ± 0.2(11)
<b>No clasificadas</b>										
1115	TAGL_MOUSE	P37804	Transgelin	30 – 47 79 – 89 90 – 99 90 – 99 90 – 99 109 – 121 129 – 140 173 – 183 15 – 33 34 – 53	LVEWIVVQCGPDVGRPDR VPENPPSMWFK QMEQVAQFLK QMEQVAQFLK pyroglu QMEQVAQFLK Oxidation (M) TDMFQTVLDLYEGK TLMALGSLAVTK HVIGLQMGSNR RLLAEPVPGIKAEPDESNARY RYFHVVIAGPQDSPFEGGTDF L	93	23	8.9	20 ± 1.0 (13)	9.8 ± 0.2(13)
1220	UBE2N_MOUSE	P61089	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N (EC 6.3.2.19)	54 – 98 75 – 85	KLELFLPEEYPMAAPKV KIYHPNVDKLGRI	62	17	6.1	14 ± 1.2 (13)	5.8 ± 0.2(13)

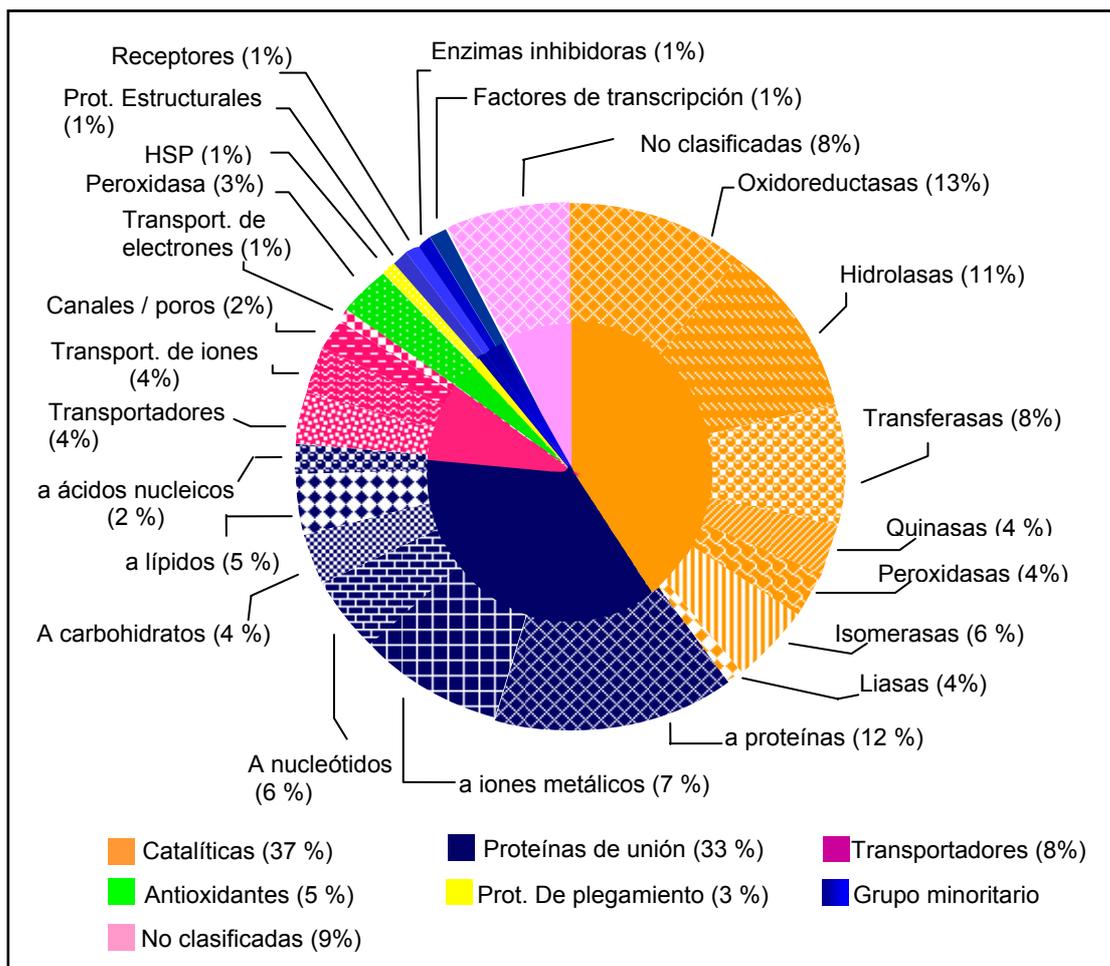
<sup>a</sup>Mowse score obtenido tras realizar la búsqueda de proteínas con el programa Mascot. Valores expresados como  $-10\log(P)$ , donde P es la probabilidad de que el match observado es un hecho al azar (<http://www.matrixscience.com/>) (Perkins et al. 1999). <sup>b</sup>Valor calculado a partir del correspondiente nº de acceso en la base datos SWISS-PROT utilizando la herramienta *ExPasy Compute pI/MW* ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)); <sup>c</sup>Valor calculado (media ± SD) a partir de la posición de las manchas en los geles 2DE

#### 4.2.1.1.- Clasificación de las proteínas

Las proteínas son moléculas implicadas en multitud de procesos celulares, por lo que resulta complicado clasificarlas en función de un solo criterio. Así, siguiendo los criterios geneontológicos, las proteínas identificadas en los cultivos primarios de células granulares de cerebelo se clasificaron según su localización subcelular, función molecular o proceso biológico en el que participan. Para ello se siguieron los criterios de clasificación de la *Gene Ontology Annotation* (GOA). A cada proteína se le asignó un número de locuslink adecuado (Pruitt et al. 2000) utilizando el programa, *Database for Annotation, Visualization and Integrates Discovery* (DAVID, <http://apps1.niaid.nih.gov/david/>) que estandariza la nomenclatura de las proteínas independientemente de la base de datos usada para su identificación a partir de los espectros de MS/MS. Para aquellas proteínas que no pudieron ser clasificadas siguiendo los criterios de GOA por falta de información, se clasificaron utilizando la base de datos SWISS – PROT ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) o bien utilizando como referencia la base de datos de las proteínas expresadas en cerebro de ratón descrita por Xixi et al. 2006. En el anexo I se muestra una tabla resumen de todas las proteínas identificadas en los cultivos primarios de células granulares de cerebelo en la que se describe su función molecular, el proceso biológico en el que participan y su localización celular.

##### 4.2.1.1.1.- Clasificación según su función molecular

Las proteínas identificadas se clasificaron según su función molecular en proteínas: catalíticas (37%), de unión (32%), transportadores (8%), antioxidantes (5%), de plegamiento (3%), enzimas reguladoras (1%), transductores de señal (1%), reguladoras de la traducción (1%), estructurales (1%) y en grupo de proteínas no clasificadas según este criterio (9%) (ver figura 4.10). La clasificación se realizó hasta el nivel 2 de clasificación de la *Gene Ontology Annotation*.



**Figura 4.10.-** Clasificación de las proteínas identificadas según su función molecular.

**A.- Proteínas con actividad catalítica**

Es el grupo más numeroso e incluye proteínas con actividad oxidoreductasa (13%), hidrolasa (11%), quinasa (4%), peroxidasa (4%), transferasa (6%), isomerasa (4%) y liasa (4%).

El grupo de las oxidoreductasas está formado por la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn<sup>2+</sup>), la citocromo c oxidasa, la catepsina B, la formiltetrahidrofolato, las peroxiredoxinas 1 y 6, la aldehído deshidrogenasa, la NADH deshidrogenasa y la lactato deshidrogenasa (LDH) cadenas A y B. La principal función de estas proteínas es catalizar reacciones de tipo redox. La superóxido dismutasa (SOD), aunque pertenece al grupo de las oxidoreductasas, es una proteína con actividad antioxidante. Forma parte de los sistemas de protección de las células frente la presencia de radicales libres. Su función es transformar los aniones de superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) en moléculas menos tóxicas para la célula, como el oxígeno o el peróxido de hidrogeno. La

creatina quinasa B es una enzima citosólica que participa en la transducción de energía en tejidos con un elevado requerimiento energético como es el caso del cerebro, músculo esquelético, el corazón o de los espermatozoides. Las hidrolasas (encargadas de hidrolizar los enlaces C-O, C-C, C-H, C-fosfato), las quinasas (capaces de añadir grupos fosfatos a las proteínas), las peroxidasas (capaces de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), las transferasas (encargadas de transferir grupos alquilos, acilos y fosfatos de un donador a un aceptor), las isomerasas (implicadas en los cambios geométricos y estructurales dentro de una misma molécula) y las liasas (implicadas en la ruptura de los enlaces C-C, C-O, C-N por mecanismos distintos a la hidrólisis o oxidación) son proteínas pertenecientes a este grupo. Entre las proteínas identificadas y pertenecientes a estos subgrupos nos encontramos con la cadena  $\alpha$  de la ATP sintetasa, el factor de elongación 2 (EF-2), la peroxiredoxina 6, la esterasa D, la catepsina B, la proteína G, la proteína de unión a la histidina, la nucleósido difosfato quinasa B, la fructosa bifosfato aldolasa A, la fumarato hidratasa 1, la triosafosfato isomerasa, la peptidil prolil isomerasa, la formiltetrahidrofolato deshidrogenasa, la fosfoglicerato mutasa 1, la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa y la aspartato aminotransferasa (para más información ver anexo I).

#### B.- Proteínas de unión

Este grupo de proteínas está representado por proteínas de unión a metales (7%), a nucleótidos (6%), a proteínas (12%), a carbohidratos (4%), a lípidos (5%) y a ácidos nucleicos (2%). Su principal característica es unirse a otros elementos necesarios para desarrollar su función. Además, las proteínas de unión se caracterizan también por desempeñar un papel importante como transportadores. Entre las proteínas identificadas y pertenecientes a estos subgrupos nos encontramos la parvalbumina (proteína de unión a calcio), la calreticulina (molécula de unión a calcio que participa en el control de la síntesis y procesado de las proteínas en el RE), la anexina A3 (inhibidor de la fosfolipasa A2), los factores de elongación 1 y 2 (proteínas de unión a/de nucleótidos participando en la traducción durante la síntesis de proteínas en los ribosomas), la DJ-1 (proteína de unión al ARN que actúa como censor de estrés oxidativo), la cadena  $\alpha$  de la ATP sintetasa (proteína de unión al ATP e implicada en la síntesis de ATP), la quinasa B de nucleósidos (proteína de unión al ATP implicada en la síntesis de nucleósidos trifosfato CTP, GTP y UTP), la proteína de choque térmico 70 o HSP 70 (proteína de unión al ATP involucrada en el plegamiento de las proteínas), la galectina 3 (lectina específica para la galactosa implicada en la unión a IgE), Fscn1 (proteína de unión a la actina involucrada en la organización y movimiento de elementos citoplasmáticos), la FABP (proteínas de unión a ácidos grasos encargadas del transporte de moléculas hidrofóbicas con potencial

morfogénico durante el desarrollo del SNC), la cofilina y la profilina I (proteínas de unión a la actina), el inhibidor de la proteína quinasa C (para más información ver anexo I).

#### C.- Transportadores

Este grupo de proteínas está constituido por transportadores de proteínas (4%), de iones (4%), del tipo canal / poro (2%) y de electrones (1%). Las proteínas identificadas y clasificadas en este grupo son, en todos los casos, proteínas localizadas en la mitocondria. Todas estas proteínas forman parte de la cadena respiratoria mitocondrial (la cadena  $\alpha$  de la ATP sintetasa, la NADH ubiquinona oxidoreductasa y la citocromo c oxidasa) excepto el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC1) que se localiza en la membrana externa de la mitocondria y se encarga de la difusión de moléculas hidrofílicas pequeñas (ver anexo I).

#### D.- Proteínas antioxidantes

Estas proteínas forman parte del sistema de defensa de las células. Las principales funciones de las proteínas antioxidantes son eliminar los peróxidos formados durante el metabolismo, reducir el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos de alquil y eliminar los radicales producidos en las células. En este estudio, este grupo está representado por las peroxiredoxinas 1, 5 y 6, y la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (SOD-Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>). La peroxiredoxinas son proteínas implicadas en la regulación de los procesos redox. Su función es reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las cadenas orgánicas cortas, los ácidos grasos y los fosfolípidos hidroperoxidados. Además tienen un papel importante en el recambio de los fosfolípidos así como en la protección del daño oxidativo. La principal diferencia entre la peroxiredoxina 1, 5 y 6 se halla en el tipo de protección que ejercen. Mientras que la peroxiredoxina 1 protege de los radicales sulfuros, la peroxiredoxina 5 presenta una actividad hidroperoxidasa de grupos alquilo específica para peróxidos orgánicos al tiempo que participa en la homeostasis del Mn<sup>2+</sup> y la peroxiredoxina 6 regula el recambio de fosfolípidos. Mayoritariamente son proteínas citoplasmáticas. Por otro lado, la SOD-Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> se encarga de convertir los aniones superóxidos a moléculas de oxígeno y peróxido de hidrógeno.

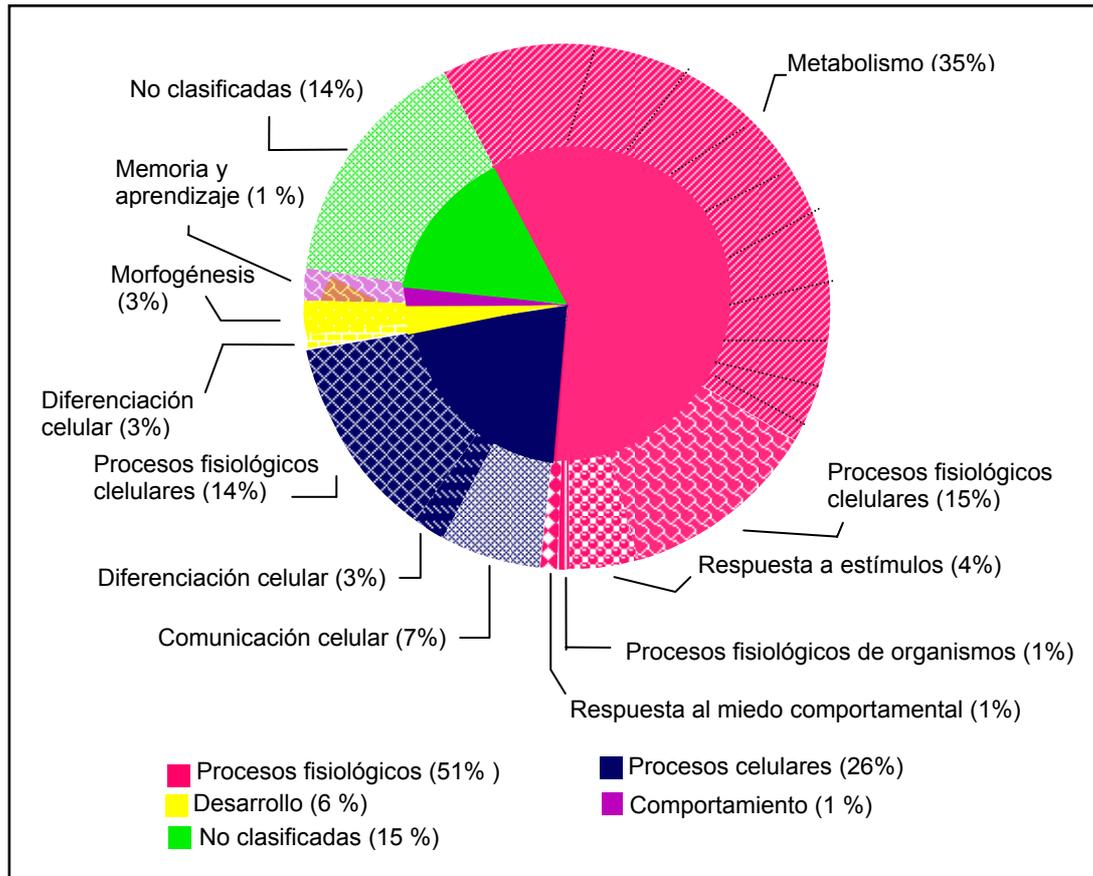
#### E.- Proteínas de plegamiento

La principal función de este grupo de proteínas consiste en proteger a las proteínas que se están sintetizando en los ribosomas hasta su destino final. Este grupo incluye la calreticulina y la proteína de choque térmico 70 o HSP 70. La calreticulina es una proteína de unión a calcio que se localiza en el lumen del RE. Esta molécula facilita el

plegamiento y la unión de los oligómeros a la vez que actúa como control de calidad a través del ciclo calreticulina / calnexina. La calreticulina interacciona de forma transitoria con muchas de las glicoproteínas monoglucosiladas sintetizadas en el RE. La HSP70, localizada en el citoplasma, la mitocondria y el retículo endoplasmático, participan en la prevención de la formación de agregados de proteínas, en la promoción del plegamiento de las proteínas de nueva síntesis, y en la identificación, solubilización y plegamiento de los agregados proteicos. El proceso de plegamiento está regulado por la actividad ATPasa. Además, se ha descrito también su implicación en la respuesta inflamatoria inducida por las citoquinas y en la inhibición de la apoptosis (Bromberg et al. 2005, Mayer et al. 2005).

#### *4.2.1.1.2.- Clasificación según el proceso biológico*

Teniendo en cuenta el proceso biológico celular, las 57 proteínas identificadas se clasificaron en proteínas relacionadas con procesos fisiológicos (51%) o celulares (26%), con el desarrollo (6%) y con el comportamiento celular (1%). Un 15 % de las proteínas identificadas no fueron clasificadas según este criterio (figura 4.11). La subclasificación de las proteínas según el proceso biológico llegó hasta el nivel 3 de clasificación de la *Gene Ontology Annotation* (ver anexo I).



**Figura 4.11.-** Clasificación de las proteínas según el proceso biológico en el que participan.

#### A.- Procesos fisiológicos

El grupo más numeroso de las proteínas de este subgrupo corresponde a las proteínas con actividad metabólica (35%) seguido por las relacionadas con los procesos celulares fisiológicos (15%) y con la respuesta a estímulos (4%) y al miedo (1%). La mayoría de estas proteínas con actividad metabólica participan en el catabolismo y metabolismo de los carbohidratos como la fructosa bifosfato aldolasa A, la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, la peroxiredoxina 6, la  $\alpha$ -enolasa, la fosfoglicerato mutasa 1, la catepsina B, la malato deshidrogenasa, la lactato deshidrogenasa y la fumarato hidratasa 1. No menos importantes son las proteínas que participan en el metabolismo de proteínas (como la proteína de choque térmico 70, EF-2, la catepsina B, la peptidilprolil isomerasa A y la proteína G), del alcohol (como la lactato deshidrogenasa A y B, la triosafosfato isomerasa y la fructosa bifosfato aldolasa A), de lípidos (peroxiredoxina 6 y la triosafosfato isomerasa) y de ácidos nucleicos/nucleótidos/nucleósidos (la cadena  $\alpha$  de la ATP sintetasa, la triosafosfato isomerasa, y la nucleósido difosfato quinasa B).

### B.- Procesos celulares

Las proteínas que constituyen este grupo se subclasifican en proteínas relacionadas con los procesos fisiológicos (14%), con la comunicación celular (7%) y diferenciación (3 %) celular. Entre las proteínas pertenecientes a estos grupos destacan la cadena  $\alpha$  de la ATP sintetasa, la proteína de choque térmico 70, la transgelina, la VDAC-1, la peroxiredoxina 5, las proteínas de unión a los ácidos grasos 5 y 7, la catepsina B, la actina, la calreticulina y la proteína G.

### C.- Desarrollo y comportamiento

El grupo de proteínas relacionadas con el desarrollo abarca todas las proteínas relacionadas con la diferenciación celular y la morfogénesis. Entre las proteínas identificadas en estos grupos nos encontramos con la galectina 3, la transgelina y la parvalbumina.

Las proteínas relacionadas con los procesos de aprendizaje y la memoria son proteínas incluidas también en el subgrupo de comportamiento.

#### ***4.2.2.- Estudio de la expresión diferencial de proteínas en cultivos primarios de células granulares de cerebelo expuestos a concentraciones subcitotóxicas de metilmercurio***

Para determinar los efectos del MeHg sobre el proteoma celular, los cultivos primarios de células granulares de cerebelo fueron expuestos a distintas concentraciones de MeHg (0, 30, 60 y 100 nM) durante 10 div. La exposición a 100 nM de MeHg indujo una reducción de la viabilidad neuronal del 50 % ( $p < 0.01$ ) tras 10 días de tratamiento con MeHg (ver figura 4.22, apartado 4.3). Sin embargo, concentraciones inferiores de MeHg (30 y 60 nM) no afectaron la viabilidad de los cultivos. El análisis de la expresión diferencial se centró en las concentraciones subcitotóxicas de MeHg con el objetivo de hallar posibles marcadores de toxicidad. Las células granulares de cerebelo cultivadas durante 12 div fueron recogidas con una solución salina (PBS) en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas. 100  $\mu$ g del extracto de proteína total, obtenido tras la sonicación de las muestras en presencia del detergente NP-40 y precipitación de las mismas con ácido tricloroacético, fue separado mediante la 2DE y la visualización de las proteínas en los geles 2DE tuvo lugar mediante la tinción con nitrato de plata. En el análisis de imagen de los geles se detectaron aproximadamente 800 manchas tal y como se indica en el apartado 4.2.1.

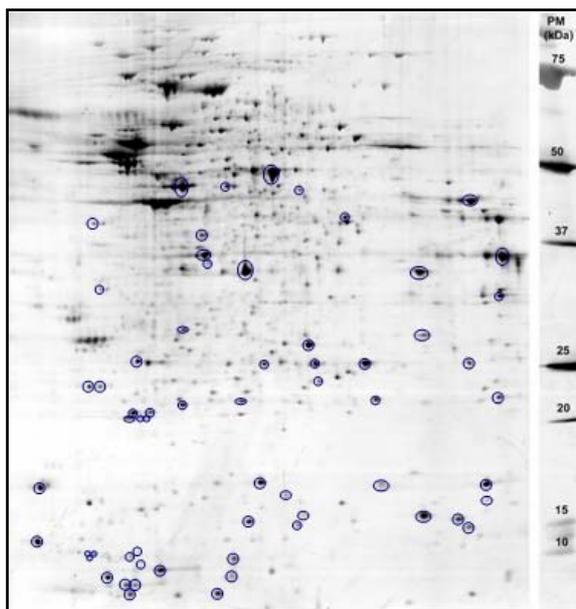
La 2DE es un método establecido de separación y análisis de las proteínas, pero a menudo es criticada por su baja reproducibilidad. La principal causa de esta baja reproducibilidad es la existencia del error indeterminado en el que se incluye tanto el error analítico como el biológico (Asirvatham et al. 2002). Teniendo en cuenta estos hechos, consideramos oportuno determinar el error asociado a nuestros geles ya que es fundamental para definir los criterios a seguir en los estudios comparativos para la identificación de manchas con posible expresión diferencial. Esto es especialmente importante en nuestro caso ya que utilizamos cultivos primarios de células con la variabilidad que esto implica.

#### 4.2.2.1.- Cuantificación del error asociado a los geles 2DE

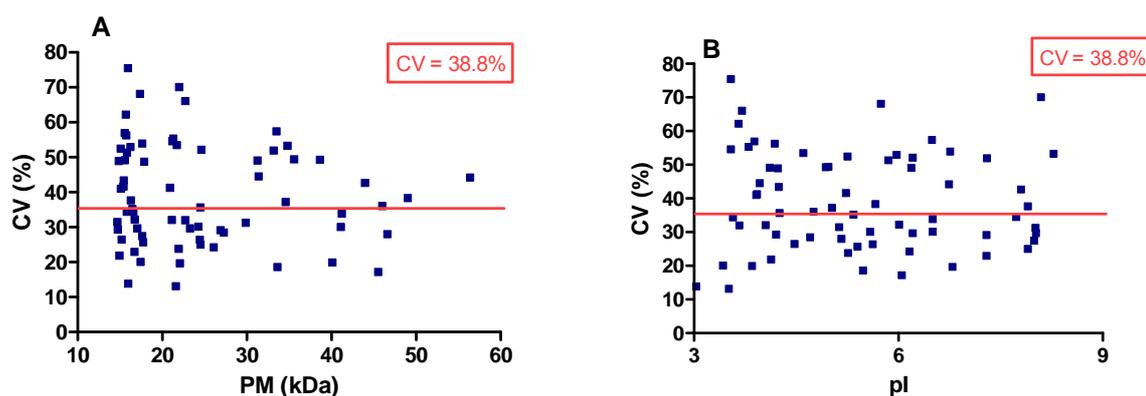
La variabilidad de los geles, expresada como el coeficiente de variación (CV), se determinó a partir de 70 manchas de distintos pesos moleculares (PM) y puntos isoeléctricos (pI) (figura 4.12) de 5 geles control. El CV se calculó a partir del volumen normalizado ( $V_N$ ) definido como el volumen de una mancha respecto el volumen de todas las manchas detectadas en los geles (70) (ver fórmula).

$$(V_N)_i = V_i / \sum V_i * \text{factor}$$

Los valores del CV de las manchas seleccionadas para el estudio de variabilidad cumplieron el test de normalidad siguiendo el perfil de una distribución gaussiana (según el test de normalidad D'Agostino & Pearson omnibus normality test,  $p = 0.22$ ). La media del CV en nuestros geles es de 38.8% (figura 4.13) y es independiente del PM o pI. Este CV incluye la variación analítica y la biológica. El CV determinado es relativamente alto, probablemente debido a que partimos de muestras procedentes de cultivos primarios y no de líneas celulares, con la variabilidad biológica que esto conlleva. No obstante, este valor está en consonancia con los valores de variación biológica (25 – 59%) y analítica (15 – 26 %) observados en distintas muestras biológicas (Asirvatham et al. 2002, Jorge et al. 2005, Ramírez-Boo et al. 2006).



**Figura 4.12.-** Manchas seleccionadas para la cuantificación del coeficiente de variación de geles controles de extractos totales de proteínas de cultivos primarios de células granulares de cerebelo.



**Figura 4.13.-** Representación gráfica del coeficiente de variación (CV) determinado a partir de 70 manchas presentes en 5 geles controles en función del PM (A) y del pI (B) de las manchas seleccionadas

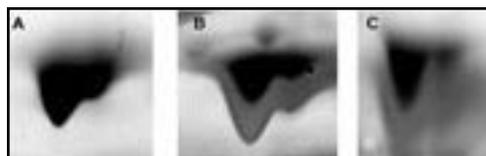
Los criterios de selección utilizados para determinar si una mancha presenta una expresión diferencial debido al tratamiento con MeHg están condicionados por el valor del CV determinado. Así pues, sólo aquellas manchas cuyo  $V_N$  tenga un valor  $CV < 38.8\%$ , en una misma condición, se tendrán en cuenta para la posterior comparación entre tratamientos.

#### 4.2.2.2.- Proteínas con expresión diferencial

Teniendo en cuenta los criterios indicados anteriormente, la comparación de los proteomas correspondientes a células control y células expuestas a MeHg permitió la identificación de dos proteínas cuya expresión estaba alterada por la presencia de concentraciones no citotóxicas del MeHg (30 y 60nM): la mancha 1553 y la 1182 (tabla 4.9, figura 4.9).

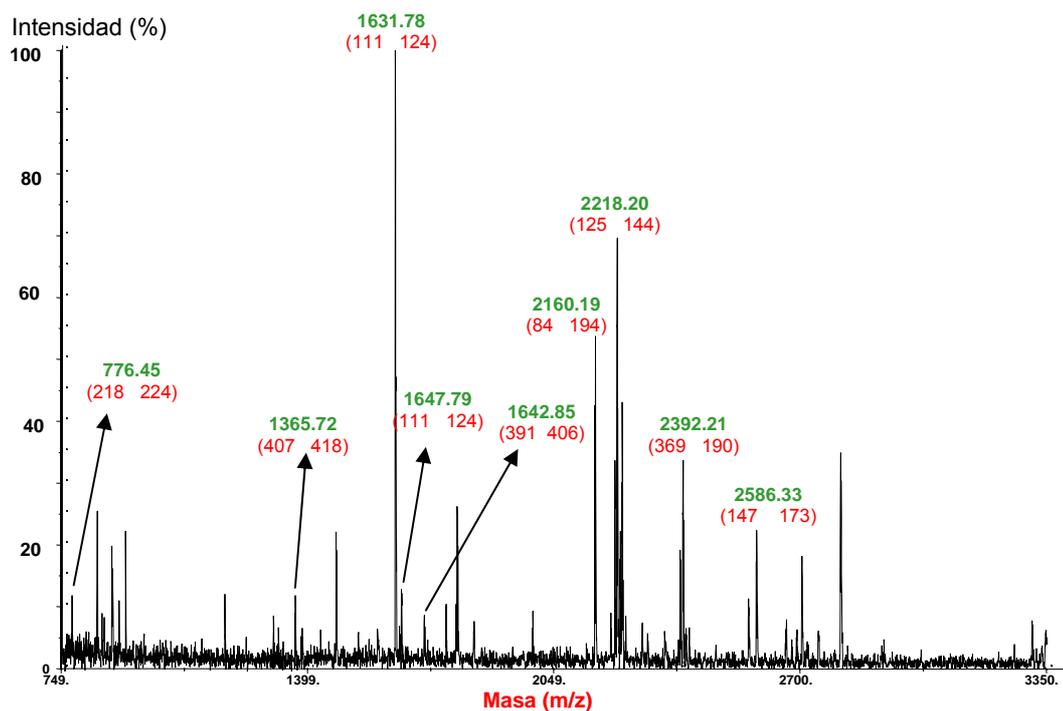
##### 4.2.2.2.1.- Subexpresión de la succinilCoA:3-cetoácido-CoA-transferasa I (SCOT; mancha 1553)

El coeficiente de variación de la mancha 1553 en geles controles de extractos de proteína total fue 19.6%. El tratamiento con concentraciones no citotóxicas del MeHg provocó una disminución de la expresión de la mancha. Los  $V_N$  de la mancha 1553 fueron  $65.38 \pm 12.8$  (5) y  $24.2 \pm 18.5^*$  (4) ( $p < 0.01$ ) para células controles y expuestas a MeHg durante 10 días, respectivamente (figura 4.14).



**Figura 4.14.** Expresión diferencial de la 3-cetoácido-coA transferasa I en cultivos de células granulares de cerebelo expuestos a MeHg de los 2 a los 12 días *in vitro*. Imagen representativa de un gel bidimensional de células control (A) y expuestas a 30 nM (B) y 60 nM MeHg (C).

Mediante la utilización de la espectrometría de masas (MALDI-TOF), la mancha 1553 fue identificada como la succinilCoA:3-cetoácido-CoA-transferasa I de ratón (P55809; SCOT) (figura 4.15). El pI y el PM determinados experimentalmente  $7.6 \pm 0.15$  y  $57.3 \pm 3.6$  coinciden con el pI y el PM teórico de 7.1 y 56, respectivamente.

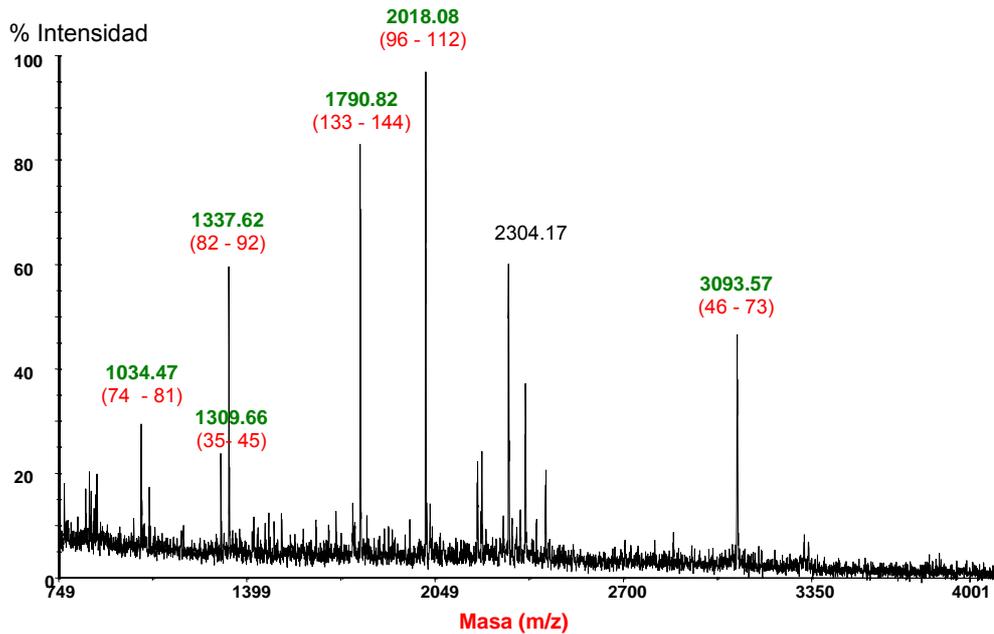


**Figura 4.15.-** Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF de la mancha 1553 correspondiente a la succinilCoA:3-cetoácido-CoA-transferasa I de ratón. En verde se marcan los péptidos correspondientes a huella peptídica y en rojo, entre paréntesis, se indica el fragmento peptídico reconocido.

La succinil CoA:3-cetoácido-CoA-transferasa I (P55809) es una enzima clave en el catabolismo de los cuerpos cetónicos. Por lo que la reducción de la expresión de esta proteína podría tener un papel importante en dicho proceso.

#### 4.2.2.2.2.- Sobreexpresión de la cofilina (mancha 1182)

El CV de la mancha 1182 en geles controles y expuestos a 30 y 60 nM MeHg fue 10.7, 11.1 y 7.1 %, respectivamente. Las células expuestas a concentraciones no citotóxicas de MeHg durante 10 div mostraron un incremento en la expresión de la mancha 1182. Los volúmenes normalizados fueron  $158 \pm 16.8$ ,  $301.5 \pm 21.5^*$  y  $228.0 \pm 14.6^{**}$  para células controles y células expuestas a 30 nM y 60nM MeHg, respectivamente ( $n=2 - 4$ ;  $*p < 0.01$ ;  $**p < 0.05$ ) (figura 4.18 A – C, página 144). Teniendo en cuenta los valores de pI ( $9.4 \pm 0.2$ ;  $n = 13$ ) y PM ( $16 \pm 0.7$ ,  $n=13$ ) determinados experimentalmente y la identificación de la proteína realizada mediante la digestión con tripsina y mapeo peptídico (MALDI-TOF), la mancha 1182 fue identificada como la isoforma no muscular de la cofilina (P18760) (tabla 4.9 y 4.10, figura 4.16).



**Figura 4.16.-** Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF de la mancha 1182 correspondiente a la isoforma no muscular de la cofilina. En verde se marcan los péptidos correspondientes a huella peptídica. Entre paréntesis (y en rojo) se indica el fragmento peptídico reconocido.

La movilidad de las proteínas en los geles 2DE depende tanto del pI como del PM, por lo que una misma proteína podría presentar distintas localizaciones en un gel 2DE, dependiendo de la presencia de algún tipo de modificación postraduccional (fosforilación, glicosilación, metilación, nitrosilación, oxidación) que afecte al PM o al pI. Dos de las 800 manchas detectadas en los cultivos primarios de células granulares de cerebelo (manchas 1182 y 1184) fueron identificadas como la isoforma no muscular de la cofilina. Estas dos manchas, aunque tienen el mismo PM, se diferencian por su pI, tal y como se muestra en la figura 4.17. La diferencia en la movilidad electroforética de estas dos proteínas durante la separación por pI se debe a la existencia de modificaciones postraduccionales que afectan a la carga total de la proteína pero no a su PM.



**Figura 4.17.-** Imagen de la localización de las manchas identificadas como cofilina en un gel bidimensional. En la figura se incluyen los valores de pI determinados experimentalmente.

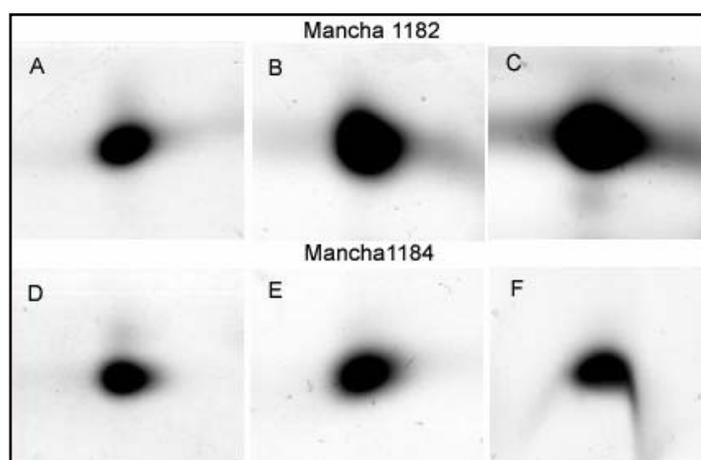
La diferencia de pI encontrada entre las dos manchas identificadas como la cofilina se debe básicamente al grado de fosforilación de la proteína. La cofilina posee 25 residuos aminoacídicos potencialmente fosforilables. La utilización de modelos de predicción de la fosforilación de proteínas (Phosphosite, [www.phosphosite.org](http://www.phosphosite.org)), permitió conocer los valores de pI teóricos de la cofilina según el número de fosforilaciones (tabla 4.11).

**Tabla 4.11.-** Predicción del pI de la cofilina según el número de fosforilaciones

Cofilina	Número de fosforilaciones					
	0	1	2	3	4	5
pI	8.26	7.78	6.84	6.0	5.61	5.36

Así pues, teniendo en cuenta estos valores de predicción, la mancha 1182 con un  $pI_{\text{experimental}}$  de 9.4 podría corresponder a la cofilina en el estado de no fosforilación (si bien el valor predicho sería de 8.3) mientras que la mancha 1184 con un  $pI_{\text{experimental}}$  de 6.3 podría contener 2 o 3 fosforilaciones. El análisis y comparación de los espectros de ambas cofilinas no permitió identificar ningún pico que pudiese corresponder a un fosfopéptido y que nos permitiera describir el grado de fosforilación de las cofilinas identificadas. Lo cierto es que la detección de fosfopéptidos en los espectros de MALDI-TOF, sin haber realizado una purificación previa de los fosfopéptidos, es muy difícil ya que éstos se ionizan peor que los péptidos no modificados (García et al. 2005). En trabajos futuros se intentará determinar el grado de fosforilación de la cofilina mediante la purificación de los fosfopéptidos por IMAC (*Immobilize Metal Affinity Chromatography*) y óxido de titanio y su posterior identificación por espectrometría de masas.

No obstante, el punto isoeléctrico no es la única diferencia entre la mancha 1182 y 1184. Como hemos citado anteriormente, el tratamiento a largo plazo con MeHg indujo un incremento en los niveles de expresión de la cofilina 1182 (figura 4.18, A - C) mientras que los niveles de la mancha 1184 no fueron diferentes en células controles y tratadas con 30 y 60 nM MeHg ( $162.7 \pm 13.9$  (4),  $131.9 \pm 7.6$  (2) y  $140.6 \pm 19.2$  (3), respectivamente) (figura 4.18 D - F).



**Figura 4.18.-** Expresión diferencial de la cofilina en cultivos primarios de células granulares de cerebelo expuestos a MeHg durante 10 div. Las manchas 1182 (A – C) y 1184 (D – F) fueron identificadas como la isoforma no muscular de la cofilina (P18760). La imagen del gel 2DE representa las células no tratadas (A y D) y tratadas con 30 nM (B y E) y con 60 nM (C y F) de MeHg. Imagen representativa de 3 – 4 geles por condición.

#### 4.2.2.2.1.- Western-blot

La existencia de un anticuerpo comercial contra la cofilina permitió utilizar la técnica del Western blot para comprobar la sobreexpresión de la cofilina 1182 observado con la técnica del 2DE. Para ello, extractos de células granulares de cerebelo de 12 div, expuestas a concentraciones subcitotóxicas de MeHg desde los 2 div, fueron separados por SDS-PAGE, transferidos a una membrana de nitrocelulosa e incubados con los anticuerpos policlonales contra la cofilina y la actina. La cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a la cofilina y a la actina mostró un incremento de la ratio cofilina/actina con un factor de 1.4 en células expuestas a 60 nM de MeHg (figura 4.19). No obstante, el anticuerpo utilizado contra la cofilina reconoce todas las formas endógenas de la cofilina con lo cual no permite diferenciar entre la variante fosforilada y la no fosforilada de la cofilina mientras que el incremento de la cofilina en los geles 2DE corresponde a la variante no fosforilada de la cofilina.



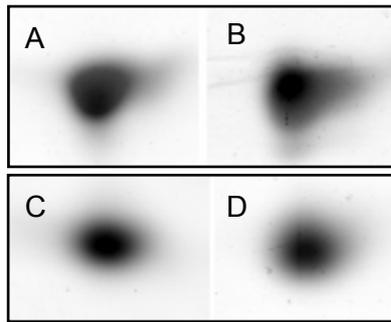
**Figura 4.19.-** Western blot de la cofilina (A y B) y de la actina (C y D) en células granulares de cerebelo no tratadas (A y C) y tratadas con 60nM (B y D) de MeHg durante 10 div. Imagen representativa de 3 geles.

La comprobación de la subexpresión de la succinilCoA:3-cetoácido-CoA-transferasa I (SCOT) por Western blot no pudo realizarse debido a la ausencia comercial de un anticuerpo específico para esta proteína.

#### 4.2.2.3.- Expresión diferencial de las proteínas de la base de datos de referencia de las células granulares de cerebelo. Identificación de marcadores neuronales

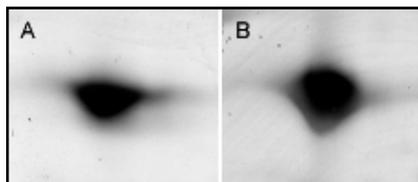
Como hemos citado anteriormente, la base de datos de referencia de neuronas granulares de cerebelo descrita en este trabajo está formada por 72 manchas de las cuáles sólo se hallaron dos manchas con expresión diferencial. La exposición prolongada a concentraciones no citotóxicas de MeHg no modificó significativamente la expresión de las 70 manchas restantes.

Existen estudios que demuestran una disminución de l'actividad superóxido dismutasa (SOD) en animales expuestos crónicamente a MeHg debido a su interacción con los grupos sulfhidrilos de la proteína. Shinyashiki et al. (1996) describió la disminución de la actividad SOD-Mn<sup>2+</sup> pero no la de la SOD- Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> en ratas expuestas a MeHg (10mg/kg) durante 1, 5 o 12 días. El análisis proteómico reveló una disminución del 29% de la SOD-Mn<sup>2+</sup> (mancha 1128) si bien esta disminución no fue estadísticamente significativa (los V<sub>N</sub> fueron de 119 ± 9.8 (4) y 83.8 ± 32.6 (3) para células control y tratadas con 60 nM MeHg, respectivamente) (figura 4.20 A – B). En cambio, la SOD-Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> (mancha 1209) no mostró diferencias entre los cultivos controles y tratados con MeHg (los V<sub>N</sub> fueron de 130.8 ± 20.6 (4) y 114.3 ± 20.3 (3), respectivamente) (figura 4.20 C – D).



**Figura 4.20.-** Imagen del gel 2DE de las manchas 1128 (A y B) y 1209 (C y D). Expresión no diferencial de la mancha 1128 identificada como SOD-Mn<sup>2+</sup> y la 1209 como la SOD-Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> controles (A y C) y tratadas con MeHg durante 10 div (By D). Imagen representativa de 3 – 4 geles por condición.

La lactato deshidrogenasa (LDH), representada por las manchas 796 (LDHB) y 859, 863 (LDHA), es una enzima citosólica implicada en el catabolismo de carbohidratos que regula la reacción enzimática reversible de transformación del lactato a piruvato. La actividad lactato deshidrogenasa es utilizada como indicador de citotoxicidad. Ninguna de las tres manchas presenta una expresión diferencial debido al tratamiento prolongado con MeHg. La proteína identificada como la cadena B de la LDH no presenta diferencias de expresión entre células control y células expuestas a 60 nM MeHg ( $64.8 \pm 8.4$  (4) y  $82.2 \pm 21.6$  (3), respectivamente) (figura 4.21).



**Figura 4.21.-** Imagen 2DE de la mancha 863 correspondiente a la LDH cadena A de células (A) control y (B) expuestas 60 nM MeHg durante 10 div. La presencia de MeHg no modificó la expresión de esta proteína. Imagen representativa de 3 – 4 geles por condición.

Entre las 72 proteínas identificadas en los cultivos primarios de células granulares de cerebelo se detectaron tres proteínas que pueden considerarse marcadores neuronales. Ninguno de estos marcadores presentó alteraciones significativas en su expresión debido al tratamiento prolongado a concentraciones subcitotóxicas de MeHg.

⇒ *VDAC 1 (canal selectivo de aniones dependiente de voltaje) (mancha 894).*

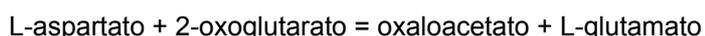
El VDAC 1 es un canal aniónico localizado en la membrana externa de la mitocondria que permite el intercambio de moléculas pequeñas hidrofílicas entre el citosol y la mitocondria. Este canal controla el flujo de metabolitos (como por ejemplo el ATP / ADP, el succinato y el citrato) a través de la membrana mitocondrial con lo cual se considera que ejerce como regulador de la actividad mitocondrial. Además, se ha descrito que miembros de la familia Bcl-2 se unen a VDAC para regular el potencial de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c. La liberación del citocromo c conduce a la activación de la vía intrínseca de apoptosis. (Yoo et al 2001, Lubec et al. 2003, Lawen et al 2005). El tratamiento prolongado a MeHg no indujo cambios estadísticamente significativos en la expresión de esta proteína en células controles y expuestas a 60 nM MeHg ( $25.6 \pm 12.3$  (3) y  $33.4 \pm 6.6$  (2), respectivamente).

⇒ *La isoenzima L1 hidrolasa carboxi-terminal de la ubiquitina (mancha 1044).*

Esta molécula es una tiol proteasa localizada en el citosol, la función de la cuál es reconocer e hidrolizar el enlace peptídico establecido entre la glicina y la ubiquitina en el C-terminal de la proteína. Participa en el procesamiento de los precursores de la ubiquitina así como en el procesamiento de las proteínas ubiquitinizadas (Klimaschewski 2003). La identificación de esta proteína en cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata pero no en cultivos primarios de astrocitos, refuerza la clasificación de la misma como marcador neuronal (Yang et al. 2005a, b). El tratamiento prolongado a MeHg no indujo cambios estadísticamente significativos en la expresión de esta proteína en células controles y expuestas a 60 nM MeHg ( $116.4 \pm 58.1$  (4) y  $82.1 \pm 36.9$  (3), respectivamente).

⇒ *La aspartato aminotransferasa (manchas 672,673).*

Es una proteína mitocondrial localizada en la matriz mitocondrial. Participa en la síntesis de glutamato a partir de aspartato y  $\alpha$ -oxoglutarato (ver la reacción) (Palaiologos et al. 1988, Hertz et al. 2000)



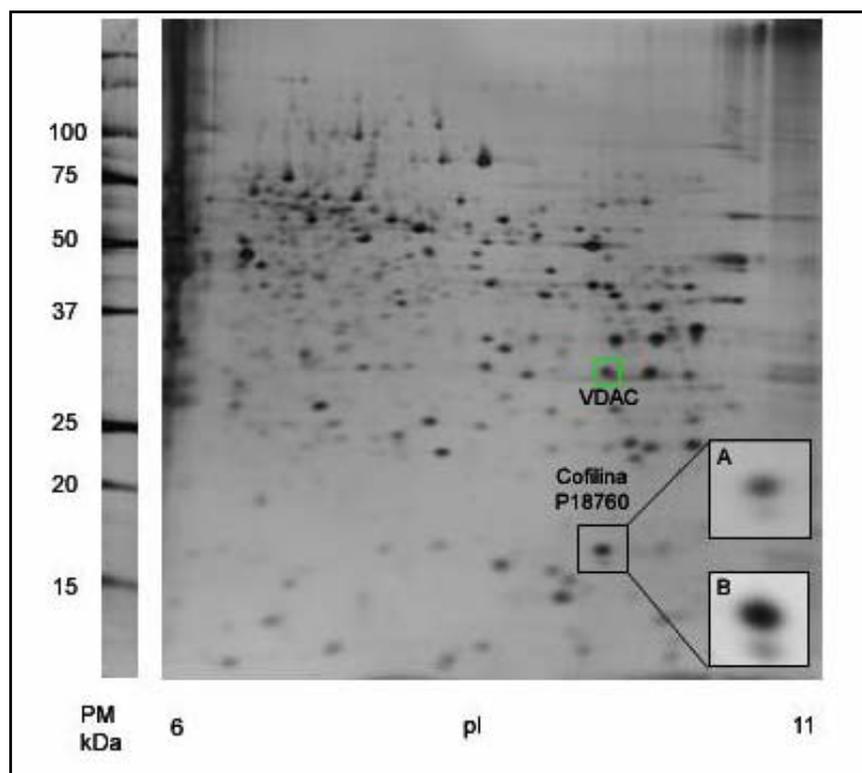
Los cultivos primarios de células granulares de cerebelo están formados mayoritariamente por células glutamatérgicas. Estudios realizados por Yang et al. (2005) demuestran la presencia de la aspartato aminotransferasa en cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata pero no en cultivos de astrocitos apoyando su papel como marcador neuronal. El tratamiento prolongado a MeHg no indujo cambios

estadísticamente significativos en la expresión de esta proteína entre células controles y expuestas a 60 nM MeHg ( $10.0 \pm 8.5$  (2) y  $7.9 \pm 6.4$  (2), respectivamente).

#### 4.2.2.4.- Expresión diferencial de la cofilina en fracciones enriquecidas con mitocondrias

Recientemente, se ha descrito que la forma no fosforilada de la cofilina se transloca a la mitocondria en situaciones de apoptosis (Chua et al. 2003, Gillardon et al. 2005, Bruneel et al. 2005). Teniendo en cuenta estos hechos y el incremento observado de la variante no fosforilada de la cofilina en extractos totales de proteínas de células expuestas a concentraciones no citotóxicas de MeHg, nos preguntamos si la exposición prolongada a MeHg induciría la translocación de la cofilina a la mitocondria. Para evaluar esta hipótesis, se realizaron geles 2DE de fracciones enriquecidas con mitocondrias de células controles y células tratadas con 60 nM MeHg durante 13 div. La figura 4.22 muestra una imagen de un gel 2DE de las proteínas de fracciones enriquecidas con mitocondrias de células granulares de cerebelo. En la figura se indica la mancha correspondiente a la proteína mitocondrial VDAC y la mancha correspondiente a la cofilina no fosforilada, esta última identificada por MALDI-TOF.

La comparación de los proteomas de fracciones enriquecidas con mitocondrias de células controles y expuestas a MeHg mostró, en ambas condiciones, la presencia de la cofilina no fosforilada ( $pI_{\text{experimental}}$  de  $9.2 \pm 0.2$ ) en las fracciones enriquecidas con mitocondrias así como un incremento del volumen normalizado ( $V_N$ ) con un factor de 1.7 en células expuestas a 60 nM MeHg respecto a células controles ( $V_N$   $3855.4 \pm 38.8$  y  $6553.3 \pm 444$ ,  $p < 0.05$  en células controles y tratadas, respectivamente,  $n=2$ ) (figura 4.22). El CV de la cofilina en las fracciones enriquecidas con mitocondrias en células controles y expuestas a 60 nM MeHg fue  $< 10\%$ . Además, en las fracciones enriquecidas con mitocondrias isoelectroenfocadas en tiras de pH 3 – 10 no se observó la presencia de la variante fosforilada de la cofilina ( $pI$   $6.3 \pm 0.2$ ), ni en las células control ni en las expuestas a MeHg.



**Figura 4.22.-** Expresión diferencial de la cofilina (P18760) no fosforilada en fracciones enriquecidas con mitocondrias de cultivos primarios de células granulares de cerebelo expuestas a MeHg durante 13 div. Las proteínas fueron isoelectroenfocadas en tiras de 7cm de longitud de rango de pH de 6–11. Ampliación de la mancha correspondiente a la cofilina (A) en células controles y (B) tratadas con 60 nM de MeHg. En verde se indica la localización de la VDAC (proteína mitocondrial).



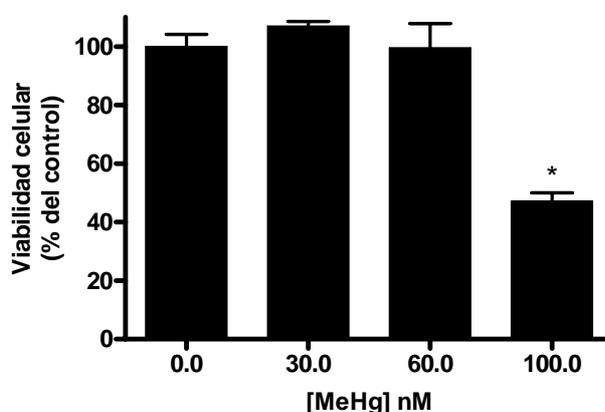
#### **4.3.- Mecanismos de muerte y neuroprotección en cultivos de células granulares de cerebelo expuestas a MeHg**

Hasta el momento, los modelos *in vitro* utilizados para la detección de la toxicidad inducida por metilmercurio (MeHg) son modelos de toxicidad a corto plazo (de minutos hasta 48 – 72 h de exposición). En este trabajo nos planteamos estudiar los efectos inducidos por la exposición a largo plazo ( $\geq 5$  días) a MeHg utilizando como modelo *in vitro* cultivos primarios de células granulares de cerebelo.



Como se comentó anteriormente en el apartado de materiales y métodos (ver 3.2.2.1), las neuronas se cultivaron en placas recubiertas con poli-lisina para favorecer su adhesión. Existen dos tipos de poli-lisinas: la poli-L y la poli-D-lisina. La principal diferencia entre ambas poli-lisinas radica en la resistencia de la poli-D-lisina a la acción de las proteasas liberadas por el propio cultivo al medio (Higgins y Banker 1998). El patrón de muerte inducido por MeHg es ligeramente diferente según si las células son cultivadas sobre poli-L o poli-D lisina.

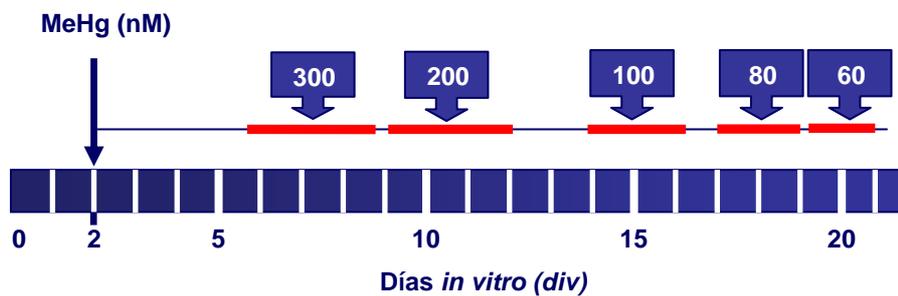
Para determinar el patrón de muerte inducido por MeHg, los cultivos fueron expuestos a distintas concentraciones de MeHg (0 – 300 nM) durante el periodo de desarrollo de las neuronas (a los 2 días de cultivo) y se mantuvieron en cultivo hasta la aparición de signos de toxicidad. Las células, crecidas sobre placas recubiertas con poli-L-lisina, fueron expuestas a 0, 30, 60 y 100 nM de MeHg a los 2 div y recogidas a los 12 div. En este momento, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (figura 4.23). La exposición a 100 nM de MeHg indujo una reducción de la viabilidad celular del 47 % tras 10 días de exposición mientras que concentraciones inferiores de MeHg no causaron citotoxicidad.



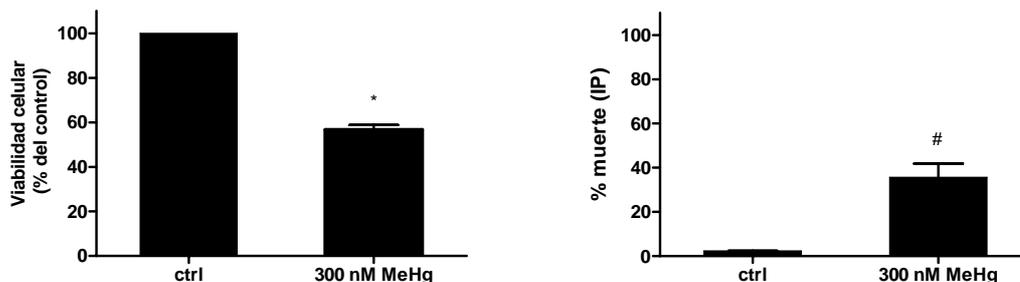
**Figura 4.23.-** Viabilidad neuronal determinada por el método del MTT en cultivos de células granulares de cerebelo expuestas a MeHg durante 10 días. Las células fueron cultivadas sobre placas recubiertas con poli-L-lisina. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM ( $n = 3-4$ ). \* $p < 0.001$  vs. control

Por otro lado, la figura 4.24 muestra el patrón de muerte inducido por MeHg en células granulares de cerebelo crecidas sobre poli-D-lisina. Los cultivos fueron expuestos a distintas concentraciones de MeHg (0, 10, 30, 60, 80, 100, 200 y 300nM) a los 2 días y la toxicidad se evaluó en base a la observación de los cultivos en un microscopio de

contraste de fases. La figura 4.25 muestra la reducción de la viabilidad neuronal inducida por la exposición a 300 nM de MeHg durante 6 días *in vitro* determinada por el ensayo de MTT (57% respecto las células control, \*  $p < 0.0001$ ). Paralelamente, la incorporación del yoduro de propidio mostró un incremento de la tinción de las células tratadas con el MeHg respecto las células no tratadas (35.6 % y 2.3 %, respectivamente, \* $p < 0.05$ ), indicando un incremento de la muerte neuronal. Por otro lado, las células granulares de cerebelo tratadas con 10 y 30 nM de MeHg durante 18 – 19 días (tiempo máximo de supervivencia de los cultivos) no presentaron signos de muerte.



**Figura 4.24.-** Cronograma de muerte neuronal inducida por exposición continua a concentraciones submicromolares de MeHg en placas recubiertas con poli-D-lisina. En rojo se marca el intervalo de tiempo en el que aparecen síntomas de muerte neuronal ocasionados por la exposición a MeHg.



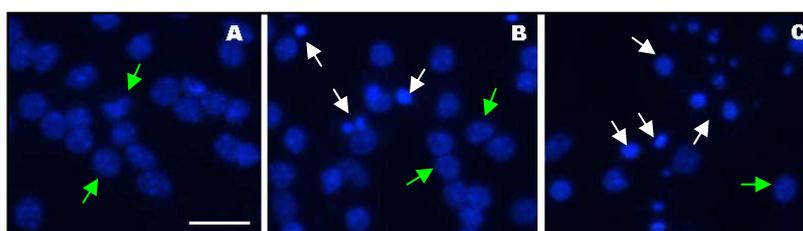
**Figura 4.25.-** Toxicidad del MeHg en cultivos primarios de células granulares de cerebelo sembradas sobre poli-D-lisina. (A) Viabilidad celular determinada mediante el ensayo de MTT y (B) mediante la incorporación de yoduro de propidio. Resultados expresados como la media  $\pm$  SEM de 5 – 7 experimentos realizados en triplicado. \* $p < 0.0001$ , # $p < 0.05$ .

Así pues, observamos que la muerte neuronal inducida por el MeHg en cultivos de neuronas granulares de cerebelo crecidos en placas recubiertas con poli-D-lisina mostró un retraso en el tiempo de aparición respecto a los cultivos crecidos sobre poli-L-lisina. Mientras que la exposición a 100 nM de MeHg indujo la disminución de la viabilidad

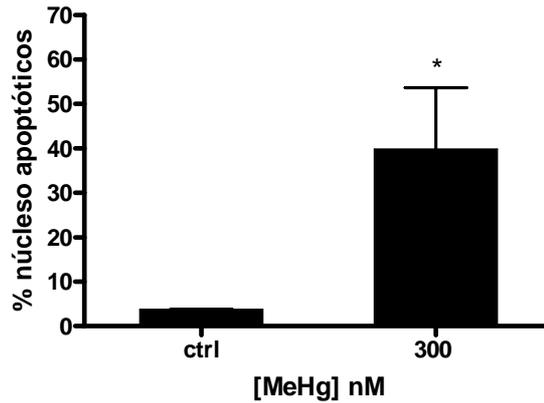
neuronal tras 10 días de exposición al tóxico, en células granulares de cerebelo crecidas en placas recubiertas con poli-L-lisina, esta disminución no se observó hasta los 12 – 14 días posteriores a la exposición en placas recubiertas con poli-D-lisina. Este retraso en el tiempo de aparición de la muerte neuronal inducida por MeHg en cultivos hechos con poli-L o poli-D-lisina, sugiere que la resistencia de la poli-D-lisina a la acción de las proteasas la convierte en una forma menos tóxica que la poli-L-lisina. Por esto, la mayoría de experimentos se realizaron en los cultivos crecidos en placas recubiertas con poli-D-lisina. Independientemente del tipo de poli-lisina usada, la muerte inducida por el MeHg en cultivos primarios de células granulares de cerebelo observada fue de tipo tiempo- y concentración-dependiente.

#### 4.3.1.- Mecanismos de muerte inducidos por MeHg

Para averiguar si el tipo de muerte neuronal inducida por la exposición prolongada a concentraciones nM de MeHg en nuestros cultivos era una muerte de tipo apoptótica, se procedió a la tinción de los núcleos de células expuestas a 100 y 300 nM de MeHg durante 5 – 6 div con el colorante Hoechst con el fin de observar la condensación y fragmentación del ADN. La tinción de los núcleos celulares con Hoechst mostró un incremento significativo de los núcleos apoptóticos en las células expuestas a 300nM de MeHg respecto las células control ( $84.2 \pm 17.6$  y  $3.7 \pm 1.3$ , respectivamente) (figura 4.26 y 4.27). Si bien la exposición a 100 nM de MeHg durante 5 – 6 días no indujo muerte neuronal, se observó un ligero incremento de los núcleos apoptóticos.



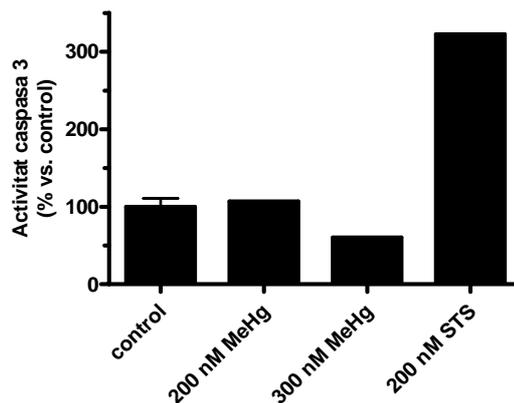
**Figura 4.26.-** Fotomicrografías de cultivos primarios de células granulares de cerebelo expuestos a MeHg desde los 2 hasta los 7 – 8 div. Visualización de los núcleos celulares por microscopia de fluorescencia mediante la tinción con Hoechst. (A) células control; (B) 100 nM MeHg y (C) 300nM de MeHg. Las flechas verdes señalan algunos de los núcleos de las células no-apoptóticas y en blanco los núcleos de células apoptóticas. La barra representa 20  $\mu$ m.



**Figura 4.27.-** Recuento del número de células apoptóticas en cultivos primarios de células granulares de cerebelo expuestos durante a MeHg durante 5 – 6 div. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos realizados en triplicado. \*p < 0.01 vs. control.

#### 4.3.1.1.- Actividad caspasa 3

Para determinar si la muerte apoptótica inducida por el tratamiento prolongado a MeHg en nuestro modelo es dependiente de la activación de la caspasa 3, determinamos la actividad enzimática de la caspasa 3 en cultivos primarios de células granulares de cerebelo tratados con 200 y 300 nM de MeHg durante 5 – 6 div. Como control positivo de apoptosis, se usó el agente inductor de apoptosis estaurosporina (STS; 200nM durante 6 horas). Tal y como muestra la figura 4.28, el MeHg no indujo un incremento de la actividad caspasa 3. Estos resultados sugirieron que la muerte apoptótica observada por la exposición continua a MeHg podría ser independiente de caspasa 3.

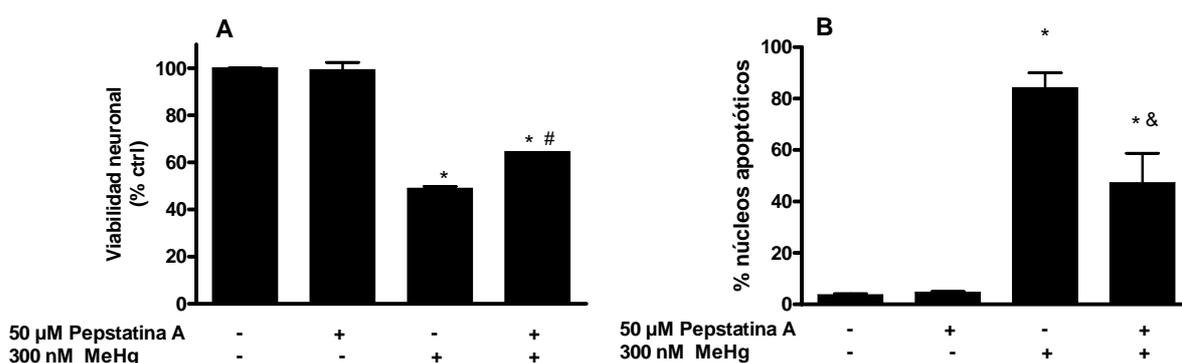


**Figura 4.28.-** Determinación de la actividad caspasa 3 en cultivos de células granulares de cerebelo tratadas con MeHg de los 2 a los 6 / 7 div y con 200nM de estaurosporina durante 6 horas.

#### 4.3.1.2.- Efectos del MeHg sobre la catepsina D

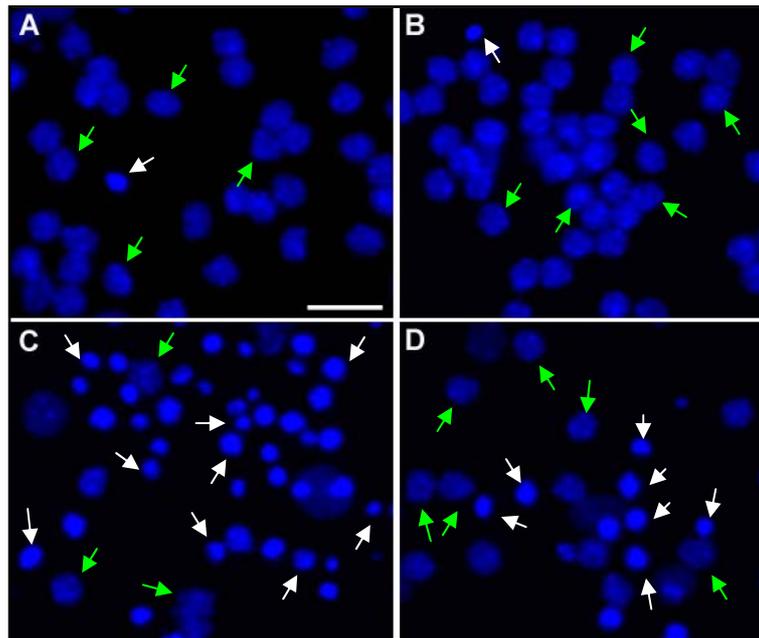
La catepsina D es una proteasa lisosomal que parece estar implicada en los procesos apoptóticos. La rotura parcial de los lisosomas, frente a una acción oxidante, provoca la liberación al citosol de las enzimas proteolíticas, como la catepsina D y B, durante la fase temprana de apoptosis, siendo esta translocación al citosol anterior a la liberación del citocromo c y de la activación de las caspasas (Nishioku 2000, Bidere et al. 2003, Guicciardi et al. 2004, Yin et al. 2005).

Teniendo en cuenta que los cultivos tratados con MeHg sufren una muerte por apoptosis sin una activación de la caspasa 3 y con una liberación del factor AIF, nos preguntamos si los lisosomas y en particular la catepsina D podrían estar implicados en la toxicidad inducida por una exposición crónica a MeHg (Castoldi et al. 2000, Daré et al. 2001, Fontría et al. 2002). Así pues, procedimos a estudiar los efectos de la inhibición farmacológica de la catepsina D con la pepstatina A sobre la muerte celular inducida por el MeHg. La co-exposición de los cultivos de neuronas granulares de cerebelo a 300 nM de MeHg y a 50  $\mu$ M de pepstatina A durante 5 – 7 días mostró una reducción significativa de la muerte neuronal inducida por el MeHg (figura 4.28 A y B). La viabilidad neuronal (determinada mediante el ensayo de MTT) experimentó un incremento significativo en células co-expuestas a MeHg y a pepstatina A comparado con las células expuestas a MeHg ( $64.48 \pm 0.0$  y  $49.01 \pm 0.76$ , respectivamente).



**Figura 4.28.-** Inhibición farmacológica de la catepsina D en presencia de la pepstatina A en cultivos primarios de células granulares de cerebelo expuestos a 300 nM de MeHg durante 5 – 7 días. Los efectos de la pepstatina A en cultivos tratados con MeHg fueron determinados mediante el ensayo del MTT (A) y el recuento de núcleos apoptóticos teñidos con Hoechst (B). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 2 experimentos realizados en triplicado. \*p < 0.001 vs. ctrl; #p < 0.05, & < 0.01 vs. 300 nM MeHg.

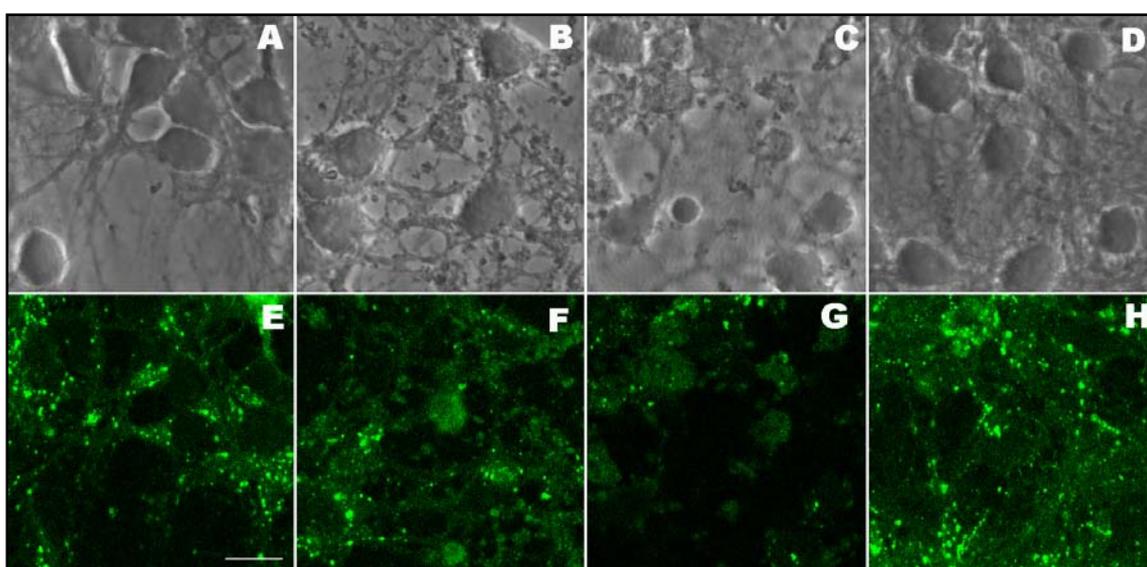
En la figura 4.29 se muestran microfotografías de células teñidas con Hoechst en las que observamos un incremento del número de núcleos apoptóticos caracterizados por ser más pequeños y más brillantes debido a la condensación y fragmentación del ADN en las células tratadas con MeHg (figura 4.29 C). El incremento de los núcleos apoptóticos fue significativamente reducido por la pepstatina A (Fig 4.29 D). Estos resultados muestran que la inhibición farmacológica de la catepsina D (proteasa lisosomal) mejora parcialmente la viabilidad de los cultivos, sugiriendo la participación de la catepsina D y por consiguiente el lisosoma en la muerte neuronal inducida por la exposición prolongada a MeHg.



**Figura 4.29.-** Fotomicrografías de fluorescencia de cultivos primarios de células granulares de cerebelo tratados con MeHg durante 5 – 6 div en presencia de la pepstatina A. (A) células control, (B) 50  $\mu$ M de pepstatina A, (C) 300 nM de MeHg y (D) 300 nM de MeHg + 50 $\mu$ M de pepstatina A. Las flechas verdes señalan algunos de los núcleos de células no-apoptóticas y en blanco los núcleos de células apoptóticas. La barra representa 20  $\mu$ m.

Para confirmar la protección de las neuronas granulares de cerebelo expuestas a 300 nM de MeHg observada tras inhibir farmacológicamente la catepsina D, utilizamos un conjugado de pepstatina A con el fluoróforo BODIPY. En las células vivas, el conjugado pepstatina A – BODIPY es internalizado y transportado a los lisosomas, dónde debido al pH ácido y a su unión a la catepsina D emite fluorescencia verde. La liberación del conjugado pepstatina A – BODIPY – catepsina D al citosol con pH neutro se traduce con una disminución de la fluorescencia. La figura 4.30 muestra las microfotografías de

contraste de fases y de fluorescencia de células granulares de cerebelo tratadas con MeHg durante 5 días en presencia o ausencia del antioxidante trólox (10  $\mu$ M) en las que se marcaron los lisosomas y en particular la catepsina D con el conjugado pepstatina A – BODIPY. Las células expuestas a 300 nM de MeHg (figura 4.30 C y G) mostraron una disminución significativa del punteado fluorescente correspondiente al marcaje de los lisosomas indicando la ruptura de los lisosomas con la consiguiente liberación de la catepsina D al citosol y disminución de la fluorescencia. La coexposición a 300 nM de MeHg y a trólox (figura 4.30 D, H) revertió los efectos inducidos por el MeHg indicando la capacidad protectora del trólox frente la ruptura lisosomal.

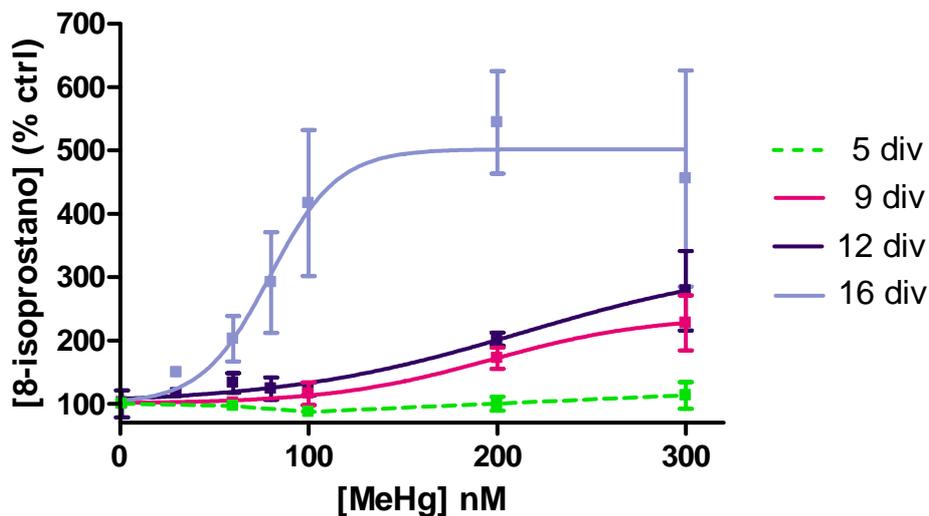


**Figura 4.30.-** Microfotografías obtenidas por microscopía confocal de células granulares de cerebelo tratadas con MeHg y con el antioxidante trólox durante 5 días. (A – D) microfotografías de contraste de fase, (E – H) microfotografías de fluorescencia de células cargadas con BODIPY-pepstatina A durante 1 hora a 37° C con el objetivo de marcar los lisosomas. (A, E) células control, (B, F) 200 nM MeHg, (C, G) 300 nM MeHg, (D, H) 300 nM MeHg + 10  $\mu$ M trólox, La barra representa 10  $\mu$ m.

#### **4.3.2.- Efectos de la exposición continua a MeHg sobre la peroxidación lipídica**

La exposición a concentraciones  $\mu$ M de MeHg durante periodos cortos de tiempo ( $\leq 3$  horas) produjo un incremento de la peroxidación lipídica en cultivos de células granulares de cerebelo (Sarafian et al. 1991, Verity et al. 1994). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos preguntamos si la exposición continua a concentraciones submicromolares de MeHg podría afectar los niveles de la peroxidación lipídica. Así pues

se procedió a la cuantificación de la peroxidación lipídica inducida por la exposición a distintas concentraciones de MeHg (0 – 300 nM) de los 2 días a los 16 div mediante la determinación de los niveles de 8-isoprostano. Los isoprostanos son ecosanoides de origen no enzimático originados durante la presencia de radicales de oxígeno que oxidan, de forma aleatoria, a los fosfolípidos. La figura 4.31 muestra los niveles del 8-isoprostano presente en el medio de cultivo recogido a los 5, 9, 12 y 16 div de células expuestas a distintas concentraciones de MeHg. Debe tenerse en cuenta, que el MeHg induce una muerte neuronal de tipo tiempo- y concentración-dependiente. El aumento de los niveles de 8-isoprostano observado en los medios recogidos a los 9, 12 y 16 div coincide con la aparición de toxicidad. Así, las concentraciones efectivas 50 de MeHg frente la producción de 8-isoprostano fueron de 79, 214 y 197 nM para los cultivos expuestos hasta los 16, 12 y 9 div, respectivamente.



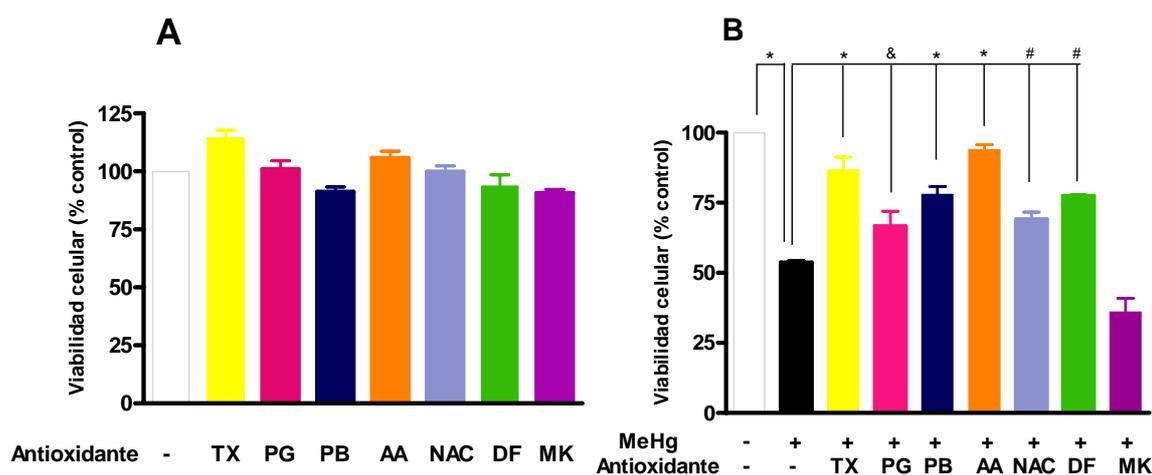
**Figura 4.31.-** Niveles de 8 – isoprostano en el medio de cultivo de células granulares de cerebelo expuestas a 0, 30, 60, 80, 100, 200 y 300 nM de MeHg desde los 2 hasta los 5, 9, 12 y 16 div. Resultados expresados como la media  $\pm$  SEM (n=3). \*p< 0.05 vs. control

#### **4.3.3.- Neuroprotección frente la toxicidad inducida por metilmercurio en células granulares de cerebelo**

Como hemos descrito anteriormente, la muerte de las neuronas granulares de cerebelo inducida por una exposición continua a MeHg es tiempo- y concentración- dependiente. Uno de los objetivos del presente trabajo fue la protección de esta muerte neuronal por distintas sustancias antioxidantes. Se considera que un compuesto actúa como

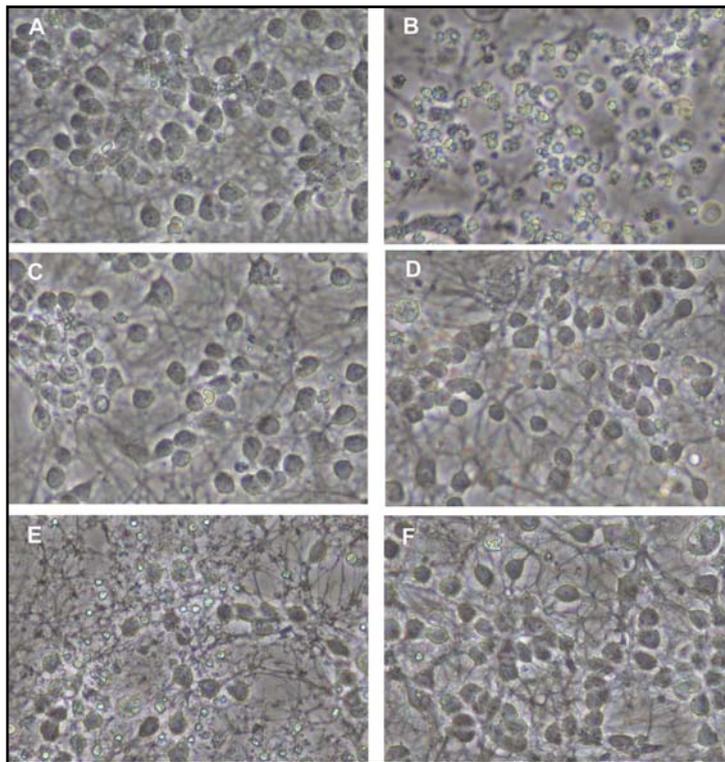
antioxidante, cuando usado a bajas concentraciones es capaz de retardar o prevenir el daño oxidante.

Con el fin de prevenir la muerte neuronal, usamos como modelo experimental cultivos primarios de células granulares de cerebelo expuestos a 300 nM MeHg durante 5 - 6 div en presencia de distintas sustancias con potencial antioxidante tales como el ácido ascórbico (vitamina C, AA), el trólox (análogo de la vitamina E, TX), la N-acetil-cisteína (NAC), el propil gallato (PG), la deferoxamina (DF) y el probucol (PB). Las concentraciones de los compuestos antioxidantes usadas no modificaron significativamente la viabilidad neuronal de los cultivos (figura 4.32A). La muerte neuronal inducida por 300 nM MeHg fue revertida de forma significativa por todos los compuestos antioxidantes ensayados (figura. 4.32B).



**Figura 4.32.-** Protección de la muerte neuronal inducida por MeHg. Viabilidad celular de las neuronas granulares de cerebelo expuestas desde los 2 hasta los 7 - 8 div a 10  $\mu$ M trólox (TR), a 10  $\mu$ M propil gallato (PG), a 3  $\mu$ M probucol (PB), a 200  $\mu$ M ácido ascórbico (AA), a 100  $\mu$ M N-acetil-cisteína (NAC), a 3  $\mu$ M deferoxamina (DF), y 5  $\mu$ M MK-801 (MK) en ausencia (A) o presencia (B) de 300 nM MeHg. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 3-5 experimentos en triplicado (n= 5 – 12). \*p< 0.001; #p < 0.01; &p <0.05.

La figura 4.33 muestra las microfotografías correspondientes a la reversión total y parcial de la muerte neuronal inducida por el MeHg en presencia del ácido ascórbico, trólox, probucol y propil gallato. El AA, el TX y el PB fueron escogidos para estudios posteriores debido a que fueron los que ejercieron una mayor protección.



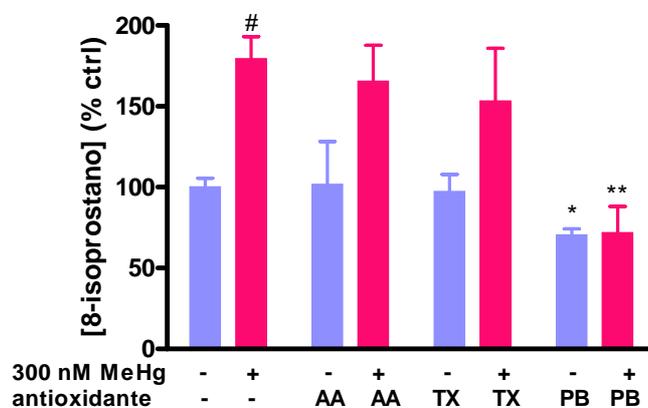
**Figura 4.33.-** Microfotografías de contraste de fase de cultivos primarios de células granulares de cerebelo tratados con MeHg durante 3 – 5 div en ausencia o presencia de antioxidantes. (A) células control, (B) 300 nM MeHg, (C) 300 nM MeHg + 100μM Trólox, (D) 300nM MeHg + 3 μM Trólox, (E) 300 nM MeHg + 10 μM propil gallato, (F) 300 nM MeHg + 200 μM ácido ascórbico.

Por otra parte, la muerte neuronal inducida por MeHg no fue revertida en presencia de MK-801 (antagonista no competitivo del receptor NMDA de glutamato) (figura 4.32 B), sugiriendo la ausencia de un componente de excitotoxicidad.

#### 4.3.3.1.- Efectos de los antioxidantes ácido ascórbico, trólox y probucol sobre la peroxidación lipídica

Se determinaron los niveles del 8-isoprostano en los medios de cultivos de células expuestas a 300 nM de MeHg en presencia de los antioxidantes durante 6 div. El tratamiento con 300 nM de MeHg indujo un incremento de los niveles de peroxidación lipídica ( $179.4 \pm 45.4^*$  % vs. control) que fueron reducidos significativamente por el probucol ( $71.7 \pm 28.4^*$ , % vs. control, respectivamente). Por el contrario, ni el ácido ascórbico ni el trólox fueron capaces de modificar los niveles del 8-isoprostano (figura 4.34). Además, la exposición únicamente a probucol produjo también una reducción de la peroxidación lipídica. El hecho de que el ácido ascórbico, el trólox y el probucol fueron capaces de prevenir la muerte neuronal inducida por 300 nM MeHg, mientras que tan

sólo el probucol fue capaz de reducir los niveles de peroxidación lipídica inducida por MeHg, sugiere que la peroxidación lipídica no es la causa de la muerte neuronal.



**Figura 4.34.-** Peroxidación lipídica de células granulares de cerebelo expuestas de forma simultánea a 300 nM de MeHg y a los antioxidantes ácido ascórbico (AA; 200  $\mu$ M), trólox (TX; 10  $\mu$ M) y probucol (PB; 3  $\mu$ M) durante 6 div. Controles (barras azules), 300 nM MeHg (barras rosas). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n = 4). #p < 0.01, \*p < 0.05 vs. control; \*\*p < 0.005 vs. 300 nM MeHg.

