



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

---

## **DISCUSIÓN**



## 5.- DISCUSIÓN

El sistema nervioso puede ser susceptible a multitud de efectos tóxicos inducidos por compuestos químicos. Se estima que entre el 3 y 28 % podrían ser compuestos potencialmente neurotóxicos (US EPA 1998). El objetivo principal del presente trabajo se ha centrado en la evaluación, descripción y utilización de métodos *in vitro* alternativos al uso de animales en el campo de la neurotoxicología, y en la evaluación de la neurotoxicidad inducida por metilmercurio (MeHg) en cultivos primarios de células granulares de cerebelo mediante la aplicación de metodologías proteómicas y de ensayos de neuroprotección.

En los últimos años distintas organizaciones internacionales han aunado esfuerzos para desarrollar y validar métodos alternativos que aporten el mismo nivel de información que el obtenido a partir de ensayos *in vivo*. La Unión Europea se enfrenta a la necesidad de evaluar la toxicidad de aproximadamente 30.000 compuestos como consecuencia de la nueva normativa para el Registro, Evaluación y Autorización de Compuestos Químicos (REACH). En el campo de la neurotoxicología, el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) promovió la creación de una base de datos de métodos no animales, objetivo al que ha contribuido el trabajo desarrollado en la presente tesis. La revisión de más de 20 años de literatura científica ha dado lugar a la descripción de seis métodos específicos para la detección de toxicidad general en neuronas y glía, de axonopatías, mielinopatías y alteraciones en la transmisión nerviosa. Estos métodos se han incluido en la base de datos de métodos alternativos en neurotoxicidad del ECVAM *Scientific Information Service* (SIS, <http://ecvam-sis.jrc.it/>; Roi 2002).

El potencial neurotóxico de los compuestos organofosforados (OP) podría evaluarse a través de la determinación de las actividades de las enzimas AChE y NTE. Algunos compuestos OPs pueden producir polineuropatía retardada (OPIDN) caracterizada por la aparición de ataxia después de un periodo de latencia de 7 – 14 días evolucionando hacia una debilidad muscular y parálisis. El desarrollo de la OPDIN se ha relacionado con una inhibición de la NTE superior al 70% o 50 % en los casos de exposición única o múltiple al OP, respectivamente (Johnson 1982, Ecobichon 2001). Además, la inhibición de las colinesterasas proporciona evidencias directas del potencial agudo tóxico de estos compuestos al mismo tiempo que proporciona información útil para la valoración de los pesticidas como agentes anticolinesterásicos (US EPA 2000). Los resultados obtenidos

en la evaluación de diferentes compuestos OPs (neuropáticos y no neuropáticos) frente a la actividad de las esterasas neurales en distintos modelos experimentales mostró la existencia de una correlación lineal entre la inhibición de la AChE o la NTE en líneas celulares humanas y de ratón en homogenados de cerebro de pollo. Cabe destacar que, en general, las líneas celulares de origen humano resultaron ser más sensibles en comparación a las no humanas. Por otro lado, los resultados existentes permitieron evaluar la reproducibilidad inter-laboratorio tras comparar los resultados obtenidos para los compuestos diisopropil fosfofluoridato (DFP) y mipafox ensayados en 3 y 4 laboratorios distintos, respectivamente. En estos casos, la reproducibilidad inter-laboratorio fue superior al 95%. Los estudios realizados por Johnson (1977) y Lotti (1978) con homogenados de cerebro de pollo permitieron formular un modelo de predicción basado en la potencia relativa de los OP en inhibir la AChE y la NTE. Así pues, valores de  $IC_{50} \text{ AChE} / IC_{50} \text{ NTE} (X) \geq 1$ ,  $1 \geq X \geq 0.025$  o  $\leq 0.025$  indicarían el potencial neuropático de los compuestos OPs inductores de OPIDN a concentraciones inferiores a  $LD_{50}$ , a dosis superiores a la  $LD_{50}$  o del potencial no neuropático de los compuestos OPs, respectivamente. En el modelo experimental de la línea neuronal SH-SY5Y los valores de predicción de la ratio  $IC_{50} \text{ AChE} / IC_{50} \text{ NTE}$  se situaron en valores  $> 0.188$  e  $< 0.024$  para compuestos inductores y no inductores de OPIDN (Ehrich et al. 1997). Independientemente del valor de la ratio  $IC_{50} \text{ AChE} / IC_{50} \text{ NTE}$  en los diferentes sistemas experimentales, este método mostró capacidad predictiva del potencial neuropático de compuestos OPs (figura 4.3). Así pues, mipafox, cresil-saligenin-fosfato y el fenil-saligenin-fosfato son OPs que producen OPIDN en pollos a dosis efectivas de 25, 5 y 2 mg/kg, respectivamente. Compuestos con valores de X intermedios como el DFP y el dietil diclorvos producen neuropatía a dosis cercanas a la  $LD_{50}$  (1 y 3 mg /kg, respectivamente) en las que se produce toxicidad colinérgica aguda (Lotti y Johnson, 1978; Henschler et al. 1992; Ehrich et al. 1997). Finalmente, el diclorvos produce OPIDN a concentraciones ~ 20 veces superiores a la  $LD_{50}$  (11mg/kg). Así pues y para concluir, los modelos *in vitro* propuestos en el método confirmaron el potencial inductor de OPIDN de los compuestos OPs mipafox, fenil-saligenin-fosfato y el tri-cresil-fosfato a concentraciones inferiores a la  $LD_{50}$  y de los compuestos diclorvos, dietil diclorvos, fosfomidon y DFP sólo a concentraciones superiores a la  $LD_{50}$ . Al mismo tiempo, verifiqué también el carácter no neuropático de los compuestos clorpirifos, paratión, malation (con sus respectivas formas activas, clorpirifos, paraoxon y malaixon, respectivamente) y triclorfon.

Por otro lado, la axonopatía es un desorden neurotóxico que afecta principalmente al axón de las neuronas. Existen muchos compuestos tóxicos capaces de inducir axonopatía. Para la detección de estos tipos de agentes tóxicos se propuso un método basado en la determinación del crecimiento de las neuritas, la cuantificación de los niveles de neurofilamento y la evaluación del transporte axonal. Hasta el momento, en la literatura científica no existe un modelo de predicción del potencial axonopático aunque Henschler et al. (1992) y Schmuck y Ahr (1997) observaron la existencia de una correlación lineal entre la reducción del crecimiento de las neuritas *in vitro* y la cantidad de neurofilamento de 200kDa (NF-H) no fosforilado en neuronas diferenciadas. A partir de los resultados reportados en la bibliografía, esta correlación se observó en compuestos OPs claramente inductores de OPIDN (mipafox, tri-o-cresil-fosfato y cresil-saligenin-fosfato), produciéndose la inhibición del crecimiento de las neuritas a concentraciones no citotóxicas. Los compuestos tri-m y tri-p-cresil-fosfato (isómeros no activos del tri-o-cresil-fosfato) y el paraoxon, compuestos no inductores de OPIDN, no fueron capaces de reducir los niveles de NF-H. En el caso del clorpirifos (insecticida OP en uso), existe controversia sobre su capacidad para inhibir la elongación de neuritas (Henschler et al. 1992, Schmuck y Ahr 1997, Sachana et al. 2001). Es de destacar que el clorpirifos (compuesto OP considerado no neuropático) produce una neurotoxicidad de tipo crónico con sintomatologías neurológicas, neurocomportamentales y neuropsicológicas de larga duración o permanente (Anthony et al. 2001, Cañadas et al. 2005). A parte de los compuestos OP, existen otros compuestos como la acrilamida, la colchicina, la vincristina, la vinblastina, el cisplatino y el carbaril capaces de inhibir el crecimiento de neuritas *in vitro*, sugiriendo su potencial como agentes axonopáticos (Brat y Brimijoin 1993, Malgrange et al. 1994, Konings et al. 1994, Nicolini et al. 1998, Flaskos et al. 1998, Krah y Meller 1999, Theiss y Meller 2001).

La valoración de la neurotoxicidad a través de marcadores (endpoints) neuroquímicos es necesaria si éstos están relacionados con el mecanismo de toxicidad y si se espera la correlación entre estos marcadores y los efectos neurofisiológicos, neuropatológicos o neurocomportamentales (US EPA 1998, OECD 2000). Para la evaluación de la neurotoxicidad de compuestos con capacidad de alterar los procesos implicados en la transmisión nerviosa se propusieron 3 métodos que permiten identificar la neurotoxicidad mediada por los receptores GABA<sub>A</sub>, por los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje o por los receptores ionotrópicos de glutamato.

El método *in vitro* propuesto para la identificación de compuestos capaces de alterar el funcionamiento del receptor GABA<sub>A</sub> se basa en la determinación de la unión de radioligandos en distintos puntos del receptor y en la determinación de los flujos del ión cloruro (Cl<sup>-</sup>). A pesar de la carencia de modelos de predicción, los resultados reportados por distintos grupos muestran una asociación entre la capacidad de los agentes convulsionantes en inhibir la unión de [<sup>35</sup>S]TBPS (al sitio de unión de la picrotoxina) y las corrientes de Cl<sup>-</sup> inducidas por GABA con la toxicidad observada en los mamíferos (Lawrence and Casida, 1984, Squires et al. 1984, Abalis et al. 1985, Bloomquist et al. 1986, Cole and Casida, 1986, Gant et al. 1987, Obata et al. 1988, Casida 1993). Las corrientes de Cl<sup>-</sup> inducidas por GABA y la unión de [<sup>35</sup>S]TBPS al sitio de unión de la picrotoxina en el receptor GABA<sub>A</sub> fueron inhibidas por los insecticidas organoclorados de la familia de los cicloalcanos (dieldrín y  $\alpha$ -endosulfán) y de los hexaclociclohexanos ( $\gamma$ -HCH o lindano) confirmando el potencial convulsionante de estos compuestos observado en humanos y animales de experimentación (Abalis et al. 1985, Cole et al. 1986, Gant et al. 1987, Obata et al. 1988, Llorens et al. 1990, Pomés et al., 1993, 1994a, Huang et al. 1996b, 1997, Aspinwall et al. 1997, Vale et al. 1997, Maskell et al., 2001; Ratra et al., 2001a, 2002). Por otro lado, el incremento de las corrientes de Cl<sup>-</sup> inducidas por GABA en presencia del isómero  $\delta$ -HCH en modelos *in vitro* concuerda con el potencial depresor del compuesto (Aspinwall et al. 1997).

El segundo método propuesto para la identificación de sustancias capaces de alterar la transmisión nerviosa mediada por los canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje, se centró en la evaluación del funcionamiento del canal de Na<sup>+</sup> en modelos *in vitro* por métodos directos (ensayos de unión de radioligandos y flujos del ión Na<sup>+</sup>) y/o métodos indirectos (ensayos de viabilidad celular). Entre los compuestos capaces de producir desordenes neurológicos y toxicidad en mamíferos, a través del canal de Na<sup>+</sup>, nos encontramos con neurotoxinas sintetizadas por dinoflagelados y presentes como contaminantes en mariscos (saxitoxina, brevetoxina, ciguatoxina), insecticidas organoclorados (como el DDT) y piretroides. Se han identificado métodos *in vitro* para la detección de PSP que están en fase de desarrollo o de validación. Estos métodos incluyen ensayos realizados en la línea de neuroblastoma humano N2a centrados en la determinación de la viabilidad neuronal y la unión de [<sup>3</sup>H]STX (Jellet et al. 1992, Manger et al. 1993, 1995, Doucette et al. 1997). En concreto el ensayo desarrollado por Manger et al. (1995, 2000, 2001), basado en la determinación de la viabilidad neuronal en la línea de neuroblastoma humano N2a, ha sido utilizado por la FDA americana para la detección de la presencia de

ciguatoxinas en muestras marinas. La capacidad de predicción de estos dos modelos *in vitro* correlaciona con la obtenida con el modelo animal en muestras marinas que contienen PSP con un bajo porcentaje de falsos negativos y un moderado porcentaje de falsos positivos. En cambio, el ensayo de citotoxicidad para muestras marinas que contienen ciguatoxina o brevetoxina presentan un porcentaje superior de falsos positivos y negativos (Manger et al. 1995, Dickey et al. 1999, Truman et al. 2002). La inclusión de la saxitoxina en el convenio de Armas químicas impide la utilización del ensayo de unión con [<sup>3</sup>H]STX como modelo *in vitro* para la cuantificación de PSP, por lo que se está trabajando en la búsqueda de radioligandos que sustituyan al [<sup>3</sup>H]STX (Doucette et al. 2000, comunicación personal). En la actualidad, la detección de la toxina paralizante (PSP) en moluscos se realiza con un modelo animal aceptado por la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC, 2000), si bien está previsto que durante el presente año, la UE apruebe la determinación de PSP mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Lawrence et al. 2005). Por otra parte, los ensayos *in vitro* de unión del radioligando [<sup>3</sup>H]BTX y la determinación del flujo de <sup>45</sup>Na<sup>+</sup>, incluidos en el método propuesto, fueron capaces de predecir el potencial neurotóxico del insecticida organoclorado DDT y de los piretroides de tipo II (deltametrin y cipermetrina). Sin embargo, la utilización únicamente de los ensayos de unión de [<sup>3</sup>H]BTX no fueron capaces de detectar la toxicidad de los compuestos menos potentes como los piretroides de tipo I (cispermetrina o permetrina) indicando la necesidad de complementar estos resultados con ensayos funcionales como la determinación de las corrientes de Na<sup>+</sup> por ensayos de electrofisiología o de captación de <sup>45</sup>Na<sup>+</sup> (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 alteración de la capacidad de contracción espontánea de la musculatura puede ser un síntoma de la existencia de toxicidad aguda. Gül den et al. (1994) desarrollo un modelo *in vitro* de cultivos de miotubos destinado a la detección de compuestos que actuaran en membranas excitables. La exposición aguda a concentraciones no citotóxicas de los insecticidas DDT, deltametrin, cipermetrina y lindano indujo la reducción de la contracción espontánea sugiriendo la alteración del funcionamiento del canal de Na<sup>+</sup> dependiente de voltaje (Gül den et al. 1994, Gül den y Seibert 1996, Ekwall et al. 1999, Gül den 2001).

El tercer método propuesto para la detección de sustancias tóxicas que alteran la transmisión nerviosa se centra en la identificación de aquellos compuestos capaces de alterar la neurotransmisión excitadora mediada por los receptores ionotrópicos de



glutamato. Una excesiva estimulación de los receptores ionotrópicos produce degeneración y muerte neuronal por excitotoxicidad. Los ensayos *in vitro* incluidos en el método pueden dividirse en ensayos cuyo objetivo se centra en la evaluación de la funcionalidad de los receptores NMDA y no NMDA (ensayos de unión de radioligandos específicos) o en ensayos centrados en la detección de excitotoxicidad (ensayos de citotoxicidad y cuantificación del ARNm de c-fos). De todos los ensayos *in vitro* incluidos en el método, sólo existe un método de predicción para la determinación de los niveles del agonista de glutamato, ácido domoico. Un exceso de ácido domoico en muestras de marisco puede ser el responsable de la existencia de intoxicaciones asociadas al consumo de marisco. Por esto, existen directivas internacionales que regulan el nivel de ácido domoico en las partes comestibles de los moluscos en 20 mg/kg (niveles detectados por HPLC) (Dir 97/61/EC, 1997). Los niveles de ácido domoico cuantificados por el método *in vitro* desarrollado por Van Dolah et al. (1997) y Crawford et al. (1999), basado en la inhibición de la unión del radioligando [<sup>3</sup>H]ácido kaínico en membranas de insecto que sobreexpresan el receptor GluR6, fueron comparables a los niveles obtenidos por HPLC. El ensayo de la determinación del incremento de los niveles de ARNm de c-fos fue capaz de predecir el potencial excitotóxico del ácido domoico (Griffiths et al. 2000). La capacidad de predicción del método *in vitro* propuesto para la detección de excitotoxicidad basado en la cuantificación de los niveles de ARNm de genes de expresión temprana sigue estando en desarrollo con el objetivo de encontrar genes que sean mejor predictores de excitotoxicidad (Griffiths y Williams 2003, comunicación personal).

Finalmente, el último método propuesto se centró en la utilización de cultivos reagregados de cerebro como modelo *in vitro*. Éstos son sistemas tridimensionales compuestos por distintos tipos celulares (neuronas y glía) que pretenden simular, a pequeña escala, la organización de un SN *in vitro*. Estos tipos de cultivos son capaces de sintetizar y liberar neurotransmisores, de expresar componentes del citoesqueleto, proteínas antioxidantes y receptores de neurotransmisores simulando una situación *in vivo*. La utilización de estos modelos para la evaluación del potencial neurotóxico de compuestos químicos permitiría evaluar en un único sistema el tipo de daño producido (axonopatía, neuronopatía, mielinopatía y toxicidad en la neurotransmisión) en los diferentes tipos celulares y estadios de diferenciación. Los marcadores propuestos en este método se centran en la determinación de citotoxicidad general (disminución del contenido de proteínas, ADN y determinación LDH) y de efectos específicos sobre los

distintos tipos celulares (neuronas, astrocitos y microglía) mediante la determinación de enzimas relacionados con la actividad y procesos típicos de cada tipo celular (ChAT, GAD, TH, NSE, GS, GFAP, CNP y MBP). Hasta el momento no existe un modelo de predicción aunque la utilización de los reagregados de cerebro como modelo experimental puede aportar información relacionada con la toxicidad específica neuronal (de neuronas GABAérgicas, colinérgicas o dopaminérgicas) y glial (astrocitos y microglía) en los diferentes estadios de diferenciación. Se ha propuesto la utilización de estos modelos en la segunda fase de evaluación secuencial del potencial neurotóxico de compuesto químicos (Atterwill et al. 1993, 1994, Fielder et al. 1997). La utilización de los cultivos reagregados de cerebro confirmó el potencial neurotóxico de compuestos ensayados en otros modelos *in vivo* o *in vitro*. Los compuestos OP clorpirifos y paratión (formas no activas) fueron capaces de inhibir la AChE en cultivos reagregados de cerebro (tal y como se había observado en otros modelos *in vitro*) sugiriendo la capacidad de estos cultivos en metabolizar y activar los compuestos OP, debido a la actividad de P450 en estos cultivos. En cambio, mientras que el clorpirifos (o su forma activa clorpirifos-oxón) afectó selectivamente a neuronas colinérgicas y GABAérgicas (dependiente del estado de maduración), el paratión (o su forma activa paraoxon) afectó selectivamente al proceso de mielinización y depósito de mielina (Monnet-Tschudi 2000). Compuestos como la metanfetamina (que afecta a neuronas monoaminérgicas) y el NMDA (agonista de los receptores NMDA) ensayados en este modelo celular produjeron una alteración del sistema dopaminérgico y serotoninérgico, y una toxicidad neuronal y glial revertida por MK801, respectivamente (Heller et al. 2000, Hayes et al. 2000). La exposición de los cultivos reagregados de cerebro a plomo (contaminante ambiental) y a propofol (anestésico) desveló la toxicidad selectiva de ambos compuestos para neuronas GABAérgicas si bien el plomo afectó también a los astrocitos (Zurich y Monnet-Tschudi 1994, Honegger et al. 1996).

Los datos extraídos de la revisión bibliográfica de la literatura científica del periodo 1980 – 2002, relacionada con la neurotoxicidad producida por compuestos potencialmente neurotóxicos, y utilizados para la descripción y propuesta de los métodos alternativos incluidos en la base de datos del SIS, proporcionan información útil para los procesos de validación de las metodologías no animales en toxicología, específicamente, en neurotoxicología. Estos métodos cumplen algunos de los siete módulos en los que se divide el proceso de validación de un método *in vitro* describiendo la base, el objetivo científico del método y los protocolos de trabajo, y proporcionando estudios de

variabilidad inter-laboratorio, modelos de predicción y la área de aplicabilidad del método (Hartung et al. 2004). Además, los métodos *in vitro* propuestos incluyen ensayos que permiten evaluar mecanismos de toxicidad de compuestos potencialmente neurotóxicos de distintas naturalezas. A pesar de que no se incluyen modelos validados de predicción de toxicidad para los métodos descritos en la tesis, sí que existen correlaciones o asociaciones entre los marcadores biológicos (endpoints) y la toxicidad de los compuestos químicos. Existen otros mecanismos, a través de los cuales los compuestos químicos podrían producir neurotoxicidad, que no han sido incluido en este trabajo al no haber suficientes datos bibliográficos que permitieran describir un posible método de evaluación de neurotoxicidad. Este sería el caso, por ejemplo, de la neurotoxicidad que podría cursar por estrés oxidativo, sobreactivación de receptores nicotínicos, segundos mensajeros, etc. Los avances actuales en nuevas tecnologías (por ejemplo la genómica y la proteómica) podrá dar lugar a la identificación de nuevos marcadores proteicos de neurotoxicidad.

Tras la propuesta y evaluación de métodos *in vitro* para la detección de compuestos químicos potencialmente neurotóxicos, nos propusimos la evaluación de los efectos neurotóxicos y la detección de marcadores proteicos de toxicidad del MeHg utilizando como modelo experimental cultivos primarios de células granulares de cerebelo debido a su especial vulnerabilidad frente al MeHg. En concreto, nos centramos en el análisis de la neurotoxicidad de una exposición prolongada (a largo plazo, *vide infra*).

Han transcurrido 50 años de la aparición de los dos grandes brotes tóxicos de MeHg sucedidos en Japón e Irak y todavía continúan existiendo incógnitas sobre el mecanismo de acción del MeHg. La toxicidad del mercurio, y en particular de la forma orgánica de este metal (MeHg), ha sido ampliamente estudiada en modelos animales expuestos de forma aguda o crónica al metal y en modelos *in vitro* (Kunimoto et al. 1994, Nagashima et al. 1996, Castoldi et al. 2000, Usuki et al. 2001). En el año 2001, Pfaller y colaboradores sugirieron la sustitución de la expresión exposición aguda o crónica a un agente tóxico en modelos *in vitro* por la expresión a corto o a largo plazo, respectivamente; definidas como exposiciones no superiores a 72h (a corto plazo) o superiores a 5 días (a largo plazo). Así pues y teniendo en cuenta estas sugerencias, todos los estudios *in vitro* publicados sobre la toxicidad del MeHg corresponderían a exposiciones a corto plazo. Como se ha comentado con anterioridad, el MeHg es un agente neurotóxico con toxicidad selectiva para el SNC especialmente durante el periodo de desarrollo así como para ciertas

estructuras cerebrales como el cerebelo (Korogi et al. 1994, Davis et al. 1994, Nagashima et al. 1996). Los cultivos primarios de células granulares de cerebelo han sido ampliamente utilizados como modelo *in vitro* para evaluar los efectos tóxicos inducidos por exposiciones a corto plazo a MeHg sobre la neurotransmisión, la homeostasis del calcio, el estrés oxidativo (producción de ROS), la alteración de la actividad mitocondrial, la toxicidad selectiva para neuronas y mecanismos de muerte (Sarafian y Verity 1990, 1991, Sarafian 1993, Kunimoto 1994, Marty y Atchinson 1997, 1998, Castoldi et al. 2000, Daré et al. 2000, Gassó et al. 2001, Fonfría et al. 2001, 2002, 2005, Sakaue et al. 2003, 2005). La idoneidad de estos cultivos para el estudio de los efectos tóxicos del MeHg fue aprovechada para la evaluación de los efectos neurotóxicos producidos por exposiciones prolongadas a MeHg.

En este trabajo nos propusimos utilizar las herramientas proteómicas, y en particular la 2DE para la separación de las proteínas y la espectrometría de masas para su identificación, con la finalidad de describir las proteínas expresadas en estos cultivos e identificar posibles marcadores de la neurotoxicidad inducida por la exposición prolongada a concentraciones subcitotóxicas de MeHg. En los últimos años, el avance en las técnicas proteómicas y su aplicación en el campo de la neurociencia ha permitido la identificación de más de 1000 proteínas distintas expresadas en diferentes fracciones de cerebro humano, rata o ratón y la creación de un mapa parcial de las proteínas expresadas en cerebro (Fountoulakis et al. 2004). En general, las bases de datos 2DE están formadas a partir de extractos totales de proteínas de cerebro o de regiones cerebrales como corteza, cerebelo e hipotálamo de sistemas adultos o en desarrollo (Gauss et al. 1999, Taoka et al. 2000, Fountoulakis et al. 1999, 2002, 2005, Oguri et al. 2002, Yang et al. 2004). Recientemente, han aparecido distintas bases de referencia de 2DE de proteínas de cerebelo (tabla 5.1). La mayoría de los resultados se obtuvieron a partir de estudios realizados con tejido fresco de rata, ratón o cerdo (Friso and Wilström 1999, Taoka et al 2000, Beranova-Giorgianni et al. 2002, Pollak et al. 2005).

**Tabla 5.1.-** Bases de datos de referencia de proteínas de cerebelo de distintas especies.

Especie	Sistema	Nº de proteínas identificadas		Referencias
		Totales	Individuales	
Cerdo	Proteínas de membrana	56	38	Friso y Wikström, 1999
Rata Wistar adulta	Extracto total	67	52	Taoka et al. 2000
Rata Wistar (<21 días)	Extracto total	29	19	
Ratón (B6CBACa-AwJ/A)	Extracto total	30	30	Beranova- Giorgianni, 2002
Ratón (29XI/svJ, C57BL/6J, nNOSwt)	Extracto total	53	48	Pollak et al. 2005
Rata Wistar	Cultivos primarios de células granulares	428	226	Yang et al. 2005

Actualmente, las técnicas de proteómica relacionadas con la 2DE presentan una serie de particularidades que deben tenerse en cuenta al hacer un análisis proteómico. Existe un conjunto de proteínas que son ubiquas y que constantemente son identificadas en proteomas de células o tejidos debido a las características físico-químicas de las proteínas (abundancia, solubilidad, hidrofobicidad, pI y PM). La detección de una proteína en un gel 2DE depende de (1) la abundancia de la proteína en el extracto proteico, (2) la estabilidad de la misma durante las etapas de separación, (3) de su pI y (4) PM. Generalmente, las proteínas poco abundantes son difíciles de detectar en fracciones totales de proteína. El fraccionamiento celular y el enriquecimiento de las fracciones proteicas son técnicas usadas para incrementar la detección de este tipo de proteínas. Las proteínas de membrana, debido a su hidrofobicidad y poca solubilidad, son difíciles de detectar, a pesar de que las soluciones utilizadas para la extracción de proteínas contienen agentes caotrópicos y detergentes. Proteínas con PM y pI extremos son difíciles de detectar. El 70% y el 8% de las proteínas identificadas en el cerebro de rata tienen PM comprendidos entre 20 – 70 y 10 – 20 kDa, respectivamente. Los PM > 120 y < 10 kDa están sub-representados. Respecto al pI, el 70% de las proteínas identificadas en los geles se localizan en el rango de pI de 5 – 8 y el 15 % en el rango de pI de 4 – 5 (Fountoulakis et al. 2004). En células granulares de cerebelo, de las 72 proteínas identificadas en este trabajo, el porcentaje de proteínas con PM comprendidos entre 20 – 70 y 10 – 20 kDa fueron 65% y 32%, respectivamente y el porcentaje de proteínas con pI de 5 – 8, 4 – 5 y >8 fueron 53 %, 14 % y 23%, respectivamente.

La caracterización proteómica de distintas regiones del cerebro ha demostrado que alrededor del 45 % del total de proteínas identificadas corresponden a proteínas catalíticas, de metabolismo intermediario, fosfatasas, quinasas y metaloproteínas (Fountoulakis et al. 2004). Otros grupos de proteínas frecuentemente identificadas pertenecen al grupo de proteínas de choque térmico, de señalización, antioxidantes, ribosomales, canales, factores de iniciación, elongación y de “corte y empalme” y proteínas relacionadas con el proceso de apoptosis. Tan sólo un 10% aproximadamente de las proteínas identificadas en el cerebro son específicas de neurona. Éstas suelen estar relacionadas con procesos de neuritogénesis y modelado neuronal, captación/secreción de neurotransmisores, formación de vesículas sinápticas y transmisión sináptica (Fountoulakis et al. 2004). En nuestros cultivos de células granulares de cerebelo el grupo mayoritario de proteínas caracterizadas corresponde también a proteínas con actividad catalítica (37%) al mismo tiempo que se identificaron también proteínas con actividades antioxidantes, de unión, transportadores y relacionadas con la síntesis y procesamiento de proteínas. Respecto al porcentaje de proteínas específicas de neurona éste fue del 4%. Tras la comparación de las distintas bases de datos de referencia 2DE publicadas de las proteínas expresadas en cerebelo (tabla 5.1), observamos que en todas ellas se expresaban las siguientes proteínas:  $\alpha$ -enolasa, VDAC, SOD  $\text{Cu}^{2+}$  / $\text{Zn}^{2+}$ , SOD  $\text{Mn}^{2+}$ , isoenzima L1 de la hidrolasa carboxi-terminal de la ubiquitina, fosfatidil inositol transferasa 1, GA3PDH, creatina quinasa B, fructosa bifosfato aldolasa A, malato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, factor de elongación 2 (EF-2), fructosa bifosfato aldosa A y peroxiredoxinas. Estas proteínas fueron detectadas también en nuestros geles. La mayoría de estas proteínas participan en procesos catalíticos, metabólicos o antioxidantes. Además, en nuestros cultivos se identificaron también 3 proteínas consideradas marcadores neuronales: el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC 1), la isoenzima L1 hidrolasa carboxi-terminal de la ubiquitina y la aspartato aminotransferasa. La caracterización de los cultivos primarios de astrocitos y de células granulares de cerebelo de rata desveló que alrededor del 75 % de las proteínas identificadas en ambos cultivos eran las mismas. Este resultado indica que tan sólo un cuarta parte de las proteínas identificadas eran específicas del tipo de célula neural cultivadas (Yang et al. 2005a).

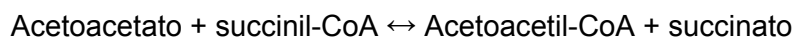
A continuación y tras la caracterización de los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo, procedimos a la identificación de marcadores de toxicidad. La utilización de la 2DE permite identificar marcadores biomoleculares sin necesidad de conocer el

mecanismo de acción del agente tóxico. Ya en el año 1990, Sarafian y Verity describieron la expresión diferencial de 4 proteínas fosforiladas de PM 28 kDa y pI 5.7 – 5.9, y el incremento de una proteína de 32 kDa en cultivos de neuronas granulares de cerebelo expuestas a concentraciones  $\mu\text{M}$  de MeHg durante 4 – 24 h, mediante la utilización de la 2DE. Además, un estudio realizado en ratas expuestas a MeHg durante 7 días mostró un cambio en el patrón de fosforilación de proteínas según la progresión de la toxicidad inducida por MeHg, de manera que el fosfoproteoma de extractos de cerebro de ratas asintomáticas fue diferente al observado en ratas sintomáticas, todas ellas tratadas con MeHg. En estos últimos se observó un incremento en la fosforilación de algunas subunidades de la tubulina (Yagame et al. 1994).

Una limitación importante de la técnica 2DE a tener en cuenta antes de realizar un estudio de expresión diferencial es la reproducibilidad de los geles. La variabilidad de los geles bidimensionales se debe a la existencia de un error indeterminado resultado de la suma de la variabilidad biológica de la muestra y de la variabilidad analítica asociada a la técnica. La variabilidad total hallada en nuestros geles bidimensionales de extractos totales de proteínas de células granulares de cerebelo, expresada como el coeficiente de variación (CV), fue del 38.8 %. Si bien es un valor relativamente elevado, concuerda con las variabilidades biológicas y analíticas descritas en otros modelos (Boo et al. 2006, Jorge et al. 2005 y Asirvastan et al. 2002). La comparación de los proteomas de células granulares de cerebelo expuestas a concentraciones subcitotóxicas de MeHg (30 y 60 nM) durante 10 días, teniendo en cuenta el CV determinado, mostró la expresión diferencial de 2 proteínas: la succinilCoA:3-cetoácidoCoA transferasa I de ratón (SCOT) implicada en el metabolismo energético y la isoforma no muscular de la cofilina relacionada con la actina y procesos de migración neuronal.

El tratamiento prolongado con concentraciones subcitotóxicas de MeHg (60 nM) indujo una subexpresión de la succinil-coA: 3-cetoácidoCoA transferasa I (SCOT) en cultivos primarios de células granulares de cerebelo. La ausencia de un anticuerpo comercial contra SCOT impidió la comprobación de su subexpresión mediante western-blot. La cuantificación de los niveles de ARNm de la proteína no es un buen modelo de comprobación ya que no hay una relación directa entre los niveles de ARNm y de proteína (Gygi et al. 1999). La SCOT es una enzima mitocondrial relacionada con el metabolismo de los cuerpos cetónicos (cetolisis). La cetolisis se activa en periodos de ayuno o en situaciones de estrés en las cuáles la obtención de energía proviene de los

cuerpos cetónicos derivados de la degradación parcial de ácidos grasos. La cetolisis tiene lugar en tejidos extrahepáticos y en particular en cerebro, que en ausencia de glucosa, utiliza cuerpos cetónicos como fuente de energía. La capacidad cetolítica de los tejidos depende de la actividad succinil-CoA: 3-cetoácidoCoA transferasa I. En cerebro la actividad SCOT es de un 10%. La SCOT cataliza la activación del acetoacetato a acetoacetil-CoA que posteriormente se convertirá en acetil-CoA capaz de entrar en ciclo de Krebs y producir ATP. (Fukao et al. 1997, 2004).



La reducción de la expresión de esta proteína podría provocar una disminución de la capacidad de estas neuronas de utilizar los cuerpos cetónicos como fuente de energía cuando otras fuentes energéticas están reducidas por acción de la exposición continua a MeHg. En este sentido, se ha descrito que la exposición aguda de las células granulares de cerebelo a MeHg produce una disminución de los niveles intracelulares de ATP (Fonfría et al. 2005).

Por otro lado, la exposición prolongada a concentraciones subcitotóxicas de MeHg (30 y 60 nM) durante 10 días en cultivos primarios de células granulares de cerebelo indujo un incremento de los niveles de la variante no fosforilada de la isoforma no muscular de la cofilina (mancha 1182) en extractos de proteína total con una ratio de 1.5. Existe una segunda mancha (la 1184) identificada también, como la isoforma no muscular de la cofilina, aunque su expresión no fue modificada por MeHg. La principal diferencia entre ambas manchas radica en el pI. Según nuestros resultados, las manchas 1182 ( $pI_{\text{experimental}} 9.4$ ) y 1184 ( $pI_{\text{experimental}} 6.3$ ) corresponderían a la variante no fosforilada y fosforilada de la cofilina, respectivamente. El incremento de la cofilina observado en los geles 2DE fue comprobado por Western blot utilizando un anticuerpo que detecta los niveles totales de cofilina endógena. La cuantificación densitométrica de las bandas de la cofilina con respecto las de actina mostró un incrementó de un factor de 1.4 en células expuestas a 60 nM de MeHg durante 10 días que confirmaría la sobreexpresión observada en los geles 2DE. En la interpretación de este incremento, debe tenerse en cuenta que el incremento en los geles 2DE corresponde a la isoforma no fosforilada de la cofilina y que el anticuerpo utilizado no diferencia entre las variantes fosforiladas y no fosforiladas. Además, desconocemos si en los geles 2DE existe alguna otra mancha que pudiese corresponder a alguna otra variante de la cofilina. La identificación de cofilinas con pI diferentes en geles 2DE ha sido descrito también en distintas muestras biológicas.



La utilización de metodologías específicas para la detección de proteínas fosforiladas confirmó que la diferencia de pI entre las proteínas radicaba en la presencia de grupos fosfatos (Yamagata et al. 2002, Jiang et al. 2005).

La cofilina es una proteína citosólica de ~ 18.5 kDa que pertenece a la familia de los factores despolimerizantes de la actina (ADF). En mamíferos se han descrito 3 miembros de esta familia: la isoforma no muscular de la cofilina, la cofilina muscular y las proteínas ADF o dextrinas (Gurniak et al. 2005). La principal función de la cofilina consiste en la regulación del proceso de polimerización / despolimerización de los filamentos de actina aumentando la tasa de despolimerización y facilitando así el recambio de los filamentos de actina. Este proceso es un proceso activo que requiere el consumo de ATP. La actividad de la cofilina depende del estado de fosforilación de la Ser 3. La desfosforilación de la Ser 3 implica una activación de la cofilina aumentando la tasa de despolimerización de los filamentos. Además, las proteínas ADF/cofilina participan en el transporte axonal y en la extensión del cono de crecimiento (Meberg et al. 1998, Meberg and Bamberg 2000, Ghosh et al. 2004). La importancia de la cofilina no muscular en procesos de migración neuronal y formación del tubo neuronal ha sido demostrada tanto en modelos *in vivo* (Gurniak et al 2005) como *in vitro* (Kunimoto y Suzuki 1997, Tojima et al. 2004). Estudios realizados en embriones de ratones demostraron que la isoforma no muscular de la cofilina desarrolla un papel muy importante en la formación del tubo neural así como en la migración neuronal en las fases de desarrollo. Embriones de ratones gen anulados para la cofilina no muscular mostraron una migración anormal de las células de la cresta neural afectando al desarrollo de los tejidos derivados de la cresta neural al mismo tiempo que presentaban un déficit en el cierre del tubo neural (Gurniak et al. 2005). Rodajas de cultivos organotípicos de cerebelo expuestos a MeHg mostraron una alteración de la migración de las células granulares de cerebelo hacia las capas granulares internas de cerebelo de forma tiempo y concentración dependiente (Kunimoto y Suzuki 1997). Por otro lado, autopsias realizadas en fetos humanos expuestos a MeHg durante las intoxicaciones de Japón (1956, 1965) e Iraq (1971-72) mostraron una migración anormal e incompleta de las células neuronales hacia el cerebelo y la corteza cerebral (WHO 1990). Teniendo en cuenta que el MeHg induce una migración anormal e incompleta de las células neuronales hacia el cerebelo y la corteza cerebral (WHO 1990) y que la cofilina participa en procesos de migración neuronal y neuritogénesis (Gurniak et al. 2005, Kunimoto y Suzuki 1997, Tojima et al. 2004), podemos pensar que el incremento de los niveles de cofilina no fosforilada, observados en cultivos primarios de

células granulares de cerebelo expuestos de forma continua a concentraciones subcitóticas de MeHg, podría alterar el proceso de migración neuronal. Kekic y dos Remedios (1999) demostraron la interacción directa del acetato de mercurio con el complejo actina-cofilina en geles monodimensionales en condiciones no desnaturalizantes, probablemente por la interacción directa del Hg con la actina o cofilina a través de grupos SH de estas proteínas. Como hemos citado anteriormente, el proceso de polimerización / despolimerización de los filamentos de actina es un proceso activo. La disminución del pool de ATP celular puede conducir a una desfosforilación de la cofilina y por lo tanto a una despolimerización de los filamentos de actina (Bamburg y Wiggan 2002, Bernstein y Bambuerg 2003). Fonfría et al. (2005) demostraron la disminución de los niveles de ATP y de la actividad mitocondrial en cultivos primarios de células granulares de cerebelo sometidos a un estímulo tóxico de 30  $\mu$ M de MeHg durante 10 min. Una alteración de los niveles de ATP celular, debido al estrés inducido por el tratamiento prolongado a MeHg, podría explicar en parte el incremento de la cofilina no fosforilada observado en los cultivos de células granulares de cerebelo.

La cofilina es una proteína mayoritariamente citosólica si bien puede localizarse en otras fracciones celulares, como por ejemplo en núcleo y membrana (Abe et al. 1993, Suzuki et al. 1995). En fracciones enriquecidas con mitocondrias de células granulares de cerebelo no se observó la presencia de la variante fosforilada de la cofilina pero sí la de la variante no fosforilada, cuya expresión incremento 1.7 veces en células tratadas con MeHg respecto células controles. La cofilina no fosforilada puede encontrarse también en las mitocondrias. Recientemente, diferentes estudios demuestran la presencia de la cofilina no fosforilada en la mitocondria (Chua et al. 2003, Guillardon et al. 2005, Lovell et al. 2005). Chua et al. (2003) demostraron que la translocación de la cofilina no fosforilada desde el citosol a la mitocondria, en células expuestas a agentes inductores de apoptosis, era anterior a la liberación de citocromo c, sugiriendo su papel como marcador temprano de apoptosis. Además, la reducción de los niveles de cofilina mediante la utilización de los ARN de interferencia (ARNsi) inhibió la liberación de citocromo c y la apoptosis, demostrando la implicación de la cofilina en la apoptosis. Se conoce que la desfosforilación y activación de la cofilina sucede en procesos que requieren una reorganización de la actina. Teniendo en cuenta que la cofilina desfosforilada se une a la actina y se transloca a la mitocondria, cambios en la actina del citoesqueleto durante la apoptosis puede afectar al funcionamiento de la mitocondria, así como incrementar la translocación de otros factores pro-apoptogénicos hacia la mitocondria. Estos hechos

pueden alterar la función mitocondrial y provocar la liberación de citocromo c y otros factores pro-apoptóticos (Chua et al. 2003). Teniendo en cuenta estos antecedentes y que la exposición a largo plazo a MeHg induce apoptosis, el incremento de la cofilina no fosforilada en fracciones enriquecidas con mitocondrias de células tratadas con concentraciones subcitotóxicas de MeHg podría ser también indicativo de la activación del proceso de apoptosis.

De las 72 proteínas identificadas en los cultivos primarios de células granulares de cerebelo, salvo para la SCOT y la cofilina, no se identificó ninguna otra proteína cuya expresión estuviese significativamente modificada por la presencia del MeHg. Es de destacar que la presencia de MeHg indujo una disminución del 29% de la expresión de la SOD-Mn<sup>2+</sup> en presencia de MeHg pero no de la SOD-Cu<sup>2+</sup>-Zn<sup>2+</sup>. Estos resultados estarían de acuerdo con la disminución tiempo-dependiente de la actividad SOD-Mn<sup>2+</sup> pero no de la SOD-Cu<sup>2+</sup>-Zn<sup>2+</sup> observada en ratas expuestas a MeHg durante 1, 5 o 12 días (Shinyashiki et al. 1996). La principal función de la SOD es proteger a las células contra el estrés oxidativo, concretamente secuestrando a los aniones superóxidos. Así pues una disminución de esta enzima estaría disminuyendo uno de los mecanismos de defensa celular contra el estrés oxidativo inducido por MeHg. Por último, la expresión de los marcadores neuronales VDAC, la isoenzima L1 hidrolasa carboxi-terminal de la ubiquitina y la aspartato aminotransferasa no fue alterada por MeHg.

En general, la muerte neuronal puede tener lugar por dos procesos bien diferenciados morfológica y molecularmente: la necrosis o la apoptosis. En el caso de MeHg, se ha descrito, tanto en modelos *in vivo* como en modelos *in vitro*, que la muerte neuronal puede transcurrir por ambos mecanismos dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición al metal, de manera que la muerte por necrosis se asocia a exposiciones cortas a concentraciones de MeHg > 10 µM y la muerte apoptótica a exposiciones prolongadas a concentraciones ≤ 1µM (18 – 72h) (Kunimoto 1994, Nagashima 1996, Daré et al. 2000, Castoldi 2000, Wilke et al. 2003, Toimela et al. 2004). En nuestros estudios, la tinción de los núcleos celulares con el colorante Hoechst, mostró un incremento significativo del número de núcleos apoptóticos en las células expuestas a 300 nM de MeHg durante 5 – 7 div. Aunque se desconoce cuales son los elementos desencadenantes de la muerte apoptótica inducida por MeHg a corto plazo, se sugiere que el estrés oxidativo, la disminución de los niveles de glutatión reducido (GSH), la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial con la consiguiente alteración de la

función mitocondrial, la alteración de la homeostasis de calcio y fragmentación del ADN podrían ser algunos de los factores responsables del inicio del daño neuronal (Castoldi et al. 2000, Daré et al. 2000, 2001, Belletti et al. 2002, Zhang et al. 2003, Gatti et al. 2004, Sakaue et al. 2005). Se desconoce cuál sería el orden secuencial de los efectos inducidos por el MeHg que desencadenarían la muerte apoptótica, si bien se ha sugerido que la disminución de los niveles de GSH o el incremento de ROS podrían situarse en la parte alta de la cascada de factores desencadenantes del daño (Belletti et al. 2002, Gatti et al. 2004).

La activación de la caspasa 3 es un elemento clave de la vía apoptótica intrínseca o dependiente de la mitocondria, iniciada por estímulos externos e internos (estrés oxidativo, daño en el ADN, agentes tóxicos etc). Sin embargo, existe controversia sobre si la muerte neuronal inducida por MeHg cursaría con activación de caspasa 3. Así, en la bibliografía existen estudios realizados en distintos modelos de células neurales con resultados dispares respecto la activación de la caspasa 3 como son los casos de la líneas celulares neuronales y gliales, de cultivos primarios de microglía, de células epiteliales de retina y de células madre neuronales corticales (Nishioku et al. 2000, Belletti et al. 2002, Gatti et al. 2004, Toimela et al. 2004, Tamm et al. 2006). Independientemente de la activación de la caspasa 3, la muerte neuronal inducida por MeHg en células granulares de cerebelo no fue protegida por inhibidores de caspasas (Castoldi et al. 2000, Daré et al. 2000). En nuestro modelo no se observó incremento de la actividad caspasa 3 tras 5 días de exposición a 300 nM MeHg.

Recientemente se ha descrito que no tan sólo la mitocondria desempeña un papel fundamental en la muerte apoptótica, sino que pueden intervenir también otros orgánulos tales como el lisosoma y el retículo endoplasmático. La rotura parcial de los lisosomas, como respuesta a una acción oxidante (incremento de ROS, disminución de GSH, etc. inducidos por estaurosporina y naftazarin), provocaría la liberación al citosol de la enzima proteolítica catepsina D en la etapa de apoptosis temprana, previa a la liberación de citocromo c y a la activación de caspasas (Roberg et al. 1999, Kagedal et al. 2001, Bidere et al. 2003, Johanson et al. 2003, Guicciardi et al. 2004, Yin et al. 2005). La implicación de la vía lisosomal en procesos de apoptosis fue demostrada en células PC12 en las que 24 h después de inducir apoptosis por privación de suero se observó un incremento del 300 % en la expresión de la catepsina D. (Shibata et al. 1998). Por otro lado, la sobreexpresión de la catepsina D en células PC12 mostró una reducción de la viabilidad neuronal revertida en presencia del inhibidor de la catepsina D pepstatina A, indicando la

participación de la catepsina D en la muerte apoptótica (Shibata et al. 1998). En el presente trabajo, la inhibición farmacológica de la catepsina D por pepstatina A en células granulares de cerebelo expuestas a 300 nM MeHg durante 5 – 7 días mostró una recuperación parcial de la muerte neuronal inducida por MeHg así como una disminución de los núcleos apoptóticos. Además, la señal fluorescente emitida por los lisosomas intactos, resultado de la interacción de la catepsina D con la pepstatina A conjugada con el fluorocromo BODIPY, disminuyó significativamente en los cultivos expuestos a MeHg como consecuencia de la lisis lisosomal y liberación de la catepsina D al citosol. Por el contrario, la presencia del antioxidante trólox revertió los efectos inducidos por el MeHg, de manera que se observó un incremento de la fluorescencia, comparable a la situación control. Así pues, estos resultados indicarían que la muerte neuronal inducida por MeHg cursaría en parte a través de la vía lisosomal. Estos resultados estarían de acuerdo con los resultados descritos por Daré et al. 2001 en los que demostraron que la exposición del astrocitoma humano D384 a 1µM de MeHg durante 1h provocaba una lisis de los lisosomas, sin alterar la integridad de la membrana plasmática, anterior a la afectación de la mitocondria ya que no observaron una reducción del potencial de membrana mitocondrial hasta las 8 h posteriores al tratamiento con MeHg. Además, la muerte celular de cultivos primarios de microglía de rata inducida por la exposición a 500 nM de MeHg durante 48 h fue parcialmente protegida por la co-exposición a pepstatina A indicando la participación de la vía lisosomal, entre otras vías, en la muerte por apoptosis inducida por MeHg (Nishioku et al. 2000). Además, la protección ejercida por trólox (análogo permeable de la vitamina E) frente a la liberación de la catepsina D al citosol coincidiría con los resultados reportados por Roberg y Öllinger 1998 en los que la liberación de la catepsina D al citosol y la muerte celular apoptótica inducida por estrés oxidativo en cardiomiocitos fueron protegidas por la vitamina E. Estos datos sugieren que la protección ejercida por la vitamina E frente al estrés oxidativo reduciría la alteración de la estructura lisosomal. Por otra parte, Bidère et al. (2003) han demostrado que la fase temprana de apoptosis en linfocitos T activados expuestos a estaurosporina dependía de la activación de la catepsina D y de la liberación del factor AIF. Esto es, la liberación de catepsina D a citosol activaría a Bax (proteína proapoptótica de la familia bcl-2) que se translocaría a la mitocondria abriendo un poro por el cual el factor AIF sería liberado a citosol. En tal caso, la utilización de inhibidores de la catepsina D suprimió la fase temprana de apoptosis inhibiendo la activación de bax y por consiguiente la liberación de AIF. Así pues, la inhibición de la catepsina D retardó la aparición de muerte neuronal durante unas horas hasta que otros mecanismos de muerte adquirieron más relevancia

(Bidere et al. 2003). Paralelamente, también se describió que la inhibición farmacológica de la catepsina D por pepstatina A en linfocitos activados retrasaba la aparición de la muerte celular así como la liberación de citocromo c y la activación de la caspasa 3 (Kagedal et al. 2001, Johansson et al. 2003). Estos resultados podrían explicar la protección significativa de la muerte neuronal observada en los cultivos primarios de células granulares de cerebelo tras la exposición a largo plazo a 300 nM de MeHg en presencia de catepsina D. Por otra parte, resultados previos a nuestro grupo demostraron la translocación del factor AIF al núcleo de células granulares de cerebelo tras ser expuestas durante 8 h a 1  $\mu$ M de MeHg (Fonfría et al. 2002).

Una forma indirecta de estudiar el mecanismo de muerte puede ser a través de la evaluación de los mecanismos de protección. Así pues, la utilización de compuestos antioxidantes que protejan de la muerte neuronal inducida por MeHg puede ser una herramienta útil para poder entender mejor cómo el MeHg induce muerte neuronal. En el modelo de neurotoxicidad prolongada por exposición a 300 nM MeHg, la muerte neuronal fue protegida por los compuestos antioxidantes trólox, probucol, propil gallato, ácido ascórbico, N-acetil-cisteína y deferoxamina pero no por el antagonista del receptor NMDA, MK-801. Por otro lado, la peroxidación lipídica inducida por 300 nM MeHg fue protegida por probucol, pero no por ácido ascórbico o trólox.

Trólox es un análogo de la vitamina E que se caracteriza por actuar como secuestrador de radicales libres. El antioxidante trólox fue capaz de inhibir la muerte neuronal inducida por la exposición prolongada a 300 nM de MeHg en cultivos primarios de células granulares de cerebelo de la misma manera que se observó en este tipo de cultivos expuestos a 5  $\mu$ M de MeHg durante 24h (Gassó et al 2001). La protección de la muerte neuronal encontrada en este trabajo concuerda con la neuroprotección por trólox de células granulares de cerebelo en ratas expuestas crónicamente a MeHg (Usuki et al. 2001). Estudios realizados en neuronas corticales y granulares de cerebelo muestran la capacidad de la vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol de reducir el estrés oxidativo inducido por compuestos capaces de inducir estrés oxidativo (cloropropionato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Myhre et al. 2001, Numakawa et al. 2006). Existen diferentes trabajos que demuestran que la vitamina E y el trólox disminuyen la peroxidación lipídica (Sarafian y Verity 1991, Salgo et al. 1996, Numakawa et al. 2006, Klamt et al. 2005). Sin embargo, trólox no fue capaz de reducir la peroxidación lipídica inducida por la exposición a 300 nM MeHg en células granulares de cerebelo durante > 6 días in vitro. En cambio, Sarafian y Verity 1991 observaron una reducción de la peroxidación lipídica en células granulares de cerebelo tratadas a corto

plazo con concentraciones micromolares de MeHg en presencia de  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E (25  $\mu$ M). Estos datos sugieren que el mecanismo de protección de la vitamina E y el  $\alpha$ -tocoferol podría no ser exactamente iguales. Así, en neuronas corticales, la vitamina E pero no el  $\alpha$ -tocoferol protegió de la muerte inducida por  $H_2O_2$  mediante la implicación de la vía de señalización intracelular MAPK o PI3 quinasa, o la sobreexpresión de bcl-2 (Numakawa et al. 2006). Por otra parte, estudios realizados con liposomas demostraron que la vitamina E actuaría en el interior de la membrana lipídica del liposoma secuestrando radicales libres, mientras que el  $\alpha$ -tocoferol lo haría en la parte acuosa (Niki y Noguchi 2004).

El probucol fue capaz de revertir de forma parcial la muerte de células granulares de cerebelo y de forma total la peroxidación lipídica inducida por la exposición prolongada a 300 nM MeHg. La protección parcial de la muerte neuronal coincide con la observada en cultivos primarios de células granulares expuestas a 5  $\mu$ M MeHg durante 24h, cuya protección cursó con la reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  y una ligera reducción de ROS (Gassó et al. 2001). El probucol es un agente utilizado en clínica para tratar la hipercolesterolemia y prevenir la aterosclerosis, además de por su potencial antioxidante (Kita 1987, Buckley 1989). Debido a su carácter lipofílico, puede intercalarse en la membrana y prevenir el daño ocasionado por los hidroperóxidos (Kuzuya y Kuzuya 1993). La capacidad del probucol de reducir los niveles de peroxidación lipídica fue observada también en la línea neuronal PC12 tras ser expuesta a glutamato (Naito et al. 1995). Además, se ha descrito que el probucol puede incrementar la actividad del complejo I de la cadena respiratoria (NADH quinone oxidoreductasa) contribuyendo en la protección frente agentes que produzcan toxicidad electrofílica (Ceaser et al. 2003, Iqbal y Okada 2003). Así pues, el probucol podría inhibir la formación de radicales lipídicos en la membrana plasmática. Sarafian (1999) propone que el MeHg, debido a su carácter hidrofóbico, podría intercalarse e interactuar con los componentes de la membrana lipídica contribuyendo a la generación de radicales libres y peroxidación de los lípidos insaturados. Esto sería un hecho diferencial del probucol respecto la acción del  $\alpha$ -tocoferol, el cual podría estar actuando a nivel intracelular reduciendo los niveles de ROS intracelular.

Un tercer compuesto capaz de proteger la muerte neuronal inducida por la exposición prolongada a MeHg fue el ácido ascórbico o vitamina C, si bien fue incapaz de reducir la peroxidación lipídica. Las funciones del ácido ascórbico (AA) o vitamina C como agente antioxidante radican en su capacidad de reducir los niveles de ROS secuestrando los radicales de oxígeno (para revisión Beyer 1994). Las formas oxidadas del AA pueden

regenerarse mediante la utilización de GSH. También se ha descrito su papel en el reciclaje de la vitamina E a partir del correspondiente radical (Kodavanti 1999). Sin embargo, el ácido ascórbico es un arma de doble filo ya que puede actuar como antioxidante y como pro-oxidante dependiendo de su disponibilidad, concentración y del estado de la célula. En estudios realizados con conejos se observó que el ácido ascórbico era capaz de incrementar la peroxidación lipídica inducida por MeHg en riñón (Fujimoto et al. 1985, 1988).

Propil gallato protegió parcialmente de la muerte neuronal inducida por la exposición prolongada a 300 nM de MeHg en células granulares de cerebelo. No obstante esta protección fue total en cultivos primarios de células granulares de cerebelo de rata expuestas a 5  $\mu$ M MeHg durante 24h, observándose también una reducción total de los niveles de ROS y una reducción parcial del calcio intracelular (Gassó et al. 2001). De manera similar, propil gallato inhibió completamente la producción de ROS en cultivos primarios de astrocitos expuestos a 10  $\mu$ M MeHg durante 10 min (Shanker et al. 2005). El hecho de que en nuestro modelo de exposición prolongada a MeHg la protección por propil gallato fuese sólo parcial, podría deberse a la menor concentración de propil gallato utilizada (10  $\mu$ M, presente trabajo; 50 – 100  $\mu$ M, Gassó et al. 2001, Shanker et al. 2005). La exposición prolongada a concentraciones > 10  $\mu$ M produce efectos tóxicos en los cultivos de células granulares de cerebelo (resultados no mostrados).

La N-acetil-cisteína (NAC) es un compuesto que puede actuar como antioxidante ejerciendo como secuestrador de ROS ya que posee un grupo tiol en su estructura. La protección de la muerte neuronal ejercida por NAC en los cultivos expuestos de forma prolongada a 300 nM MeHg, descrita en este trabajo, fue observada también en las líneas celulares PC12 y de glioma C6 tras la exposición a corto plazo a MeHg (Belletti et al. 2002, Gatti et al. 2004). Belletti et al. 2002 describen que el daño neuronal ocasionado por MeHg en las células C6 se debería al incremento sustentado de ROS observado inicialmente a los 30 min de exposición seguido por la fragmentación del ADN y disminución del potencial de membrana mitocondrial a las 3 h de exposición. Teniendo en cuenta que el estrés oxidativo podría ser uno de los primeros elementos desencadenantes de la neurotoxicidad del MeHg sugieren que la protección observada por NAC podría deberse a la actuación sobre ROS (Belletti et al. 2002).

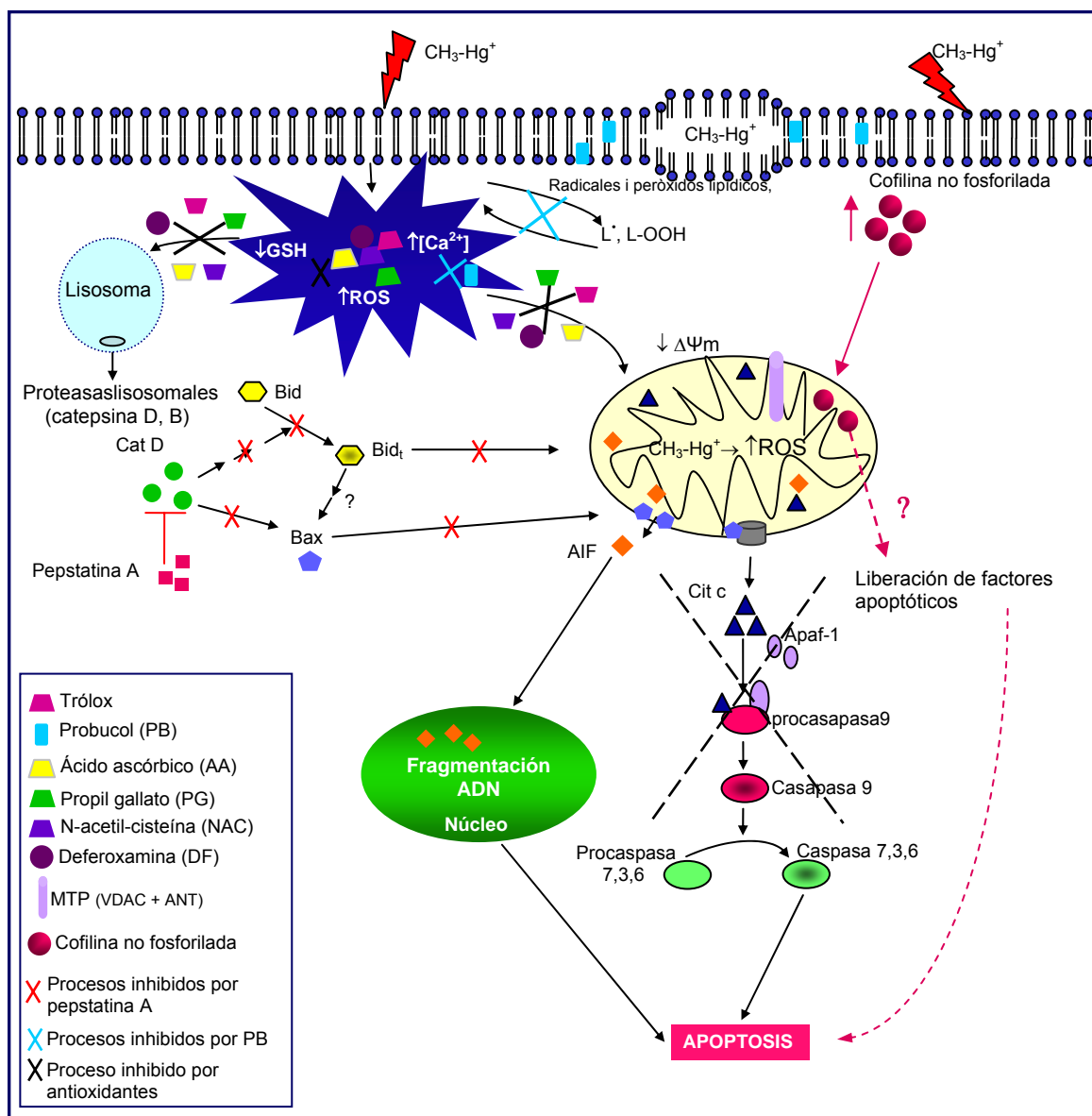
Finalmente, la deferoxamina (quelante de hierro) protegió de forma parcial la muerte neuronal inducida por la exposición prolongada a 300 nM de MeHg en neuronas



granulares de cerebelo. Se ha descrito que la deferoxamina es capaz de inhibir los efectos nocivos inducidos por MeHg en cultivos primarios de células granulares de cerebelo (20 $\mu$ M durante 3 h) y en ratas expuestas durante 7 días a MeHg. De estos estudios, se sugiere que el mecanismo protector de la deferoxamina se debe a la formación de radicales hidroxilos mediada por hierro y no por la formación de complejos deferoxamina – mercurio ya que la formación del complejo hierro – deferoxamina no se vió modificada por la presencia de un exceso de MeHg (Sarafian y Verity 1991, y LeBel et al. 1992).

Por otro lado, la incapacidad del antagonista del receptor NMDA, MK-801, de revertir la muerte de células granulares de cerebelo en cultivo expuestas de forma prolongada a 300 nM de MeHg sugieren que la muerte neuronal inducida por MeHg en neuronas granulares de cerebelo no es debida a la excitotoxicidad modulada por glutamato. Estos resultados concuerdan con los resultados reportados en modelos *in vitro* e *in vivo* de células granulares de cerebelo (Castoldi et al. 2000, Zhang et al. 2003). Además, la exposición a 100 nM MeHg durante 7 div indujo un incremento significativo de la concentración extracelular de glutamato (0.2 $\mu$ M), si bien esta concentración es inferior al umbral excitotóxico ( $\geq 2\mu$ M) determinado en células granulares de cerebelo excluyendo la excitotoxicidad como mecanismo principal de la muerte por MeHg en células granulares de cerebelo (Babot et al. 2005, Vendrell et al. 2006). Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que la muerte de neuronas corticales y de hipocampo inducida por MeHg en ratas, sí que fue revertida por MK-801 (Miyamoto et al. 2001, Juaréz et al. 2002, 2005, Zhang et al. 2003). Se necesitan más estudios para clasificar esta diferente vulnerabilidad excitotóxica de las neuronas corticales e hipocampales y de las neuronas granulares de cerebelo.

En la figura 5.1 se muestra un esquema resumen de los efectos producidos por la exposición a largo plazo a MeHg en células granulares de cerebelo sobre la muerte neuronal y posibles mecanismos de neuroprotección.



**Figura 5.1.-** Esquema resumen de los mecanismos implicados en la muerte neuronal inducida por MeHg y los hipotéticos sitios de acción de los agentes protectores de dicha muerte.

De los estudios de neuroprotección puede concluirse que *i)* la muerte por exposición prolongada a MeHg puede ser debida a un incremento de los niveles de ROS intracelular, ya que es inhibida por antioxidantes de amplio espectro; *ii)* el MeHg puede estar provocando peroxidación lipídica por interacción directa con los lípidos de la membrana. Esta peroxidación lipídica no sería un mecanismo crucial en el proceso de muerte inducida por MeHg en cultivos de neuronas granulares de cerebelo; *iii)* la muerte de células granulares de cerebelo expuestas a MeHg no es de tipo excitotóxica. Por otra parte, en el presente trabajo se ha demostrado la participación de la vía lisosomal mediada por catepsina D en la muerte apoptótica inducida por la exposición prolongada a

MeHg. Finalmente, los estudios proteómicos han permitido determinar dos proteínas afectadas por la exposición a MeHg, una de ellas (cofilina) probablemente relacionada con los procesos de apoptosis. Es importante destacar que estas alteraciones se produjeron en ausencia de signos de toxicidad.