

DEPARTAMENTO DE LABORATORIO DE
NEUROBIOLOGÍA

EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A
CONTAMINANTES PRESENTES EN LOS ALIMENTOS
(PCBs Y METILMERCURIO) SOBRE LA CAPACIDAD DE
APRENDIZAJE EN RATAS. PAPEL DE LAS
ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN DE LA VÍA
GLUTAMATO-ÓXIDO NÍTRICO-GMP CÍCLICO EN EL
CEREBELO

BLANCA PIEDRAFITA BAUDÍN

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 19 de
Desembre de 2007 davant un tribunal format per:

- D^a. Amparo Ruiz Torner
- D^a. Consuelo Guerri Sirera
- D^a. María Luisa Rebagliato Ruso
- D^a. Carmen Montoliu Félix
- D. Enrique Lanuza Navarro

Va ser dirigida per:
D. Vicente Felipo Orts

©Copyright: Servei de Publicacions
Blanca Piedrafita Baudín

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7057-5

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

“Efectos de la exposición prenatal a contaminantes presentes en los alimentos (PCBs y metilmercurio) sobre la capacidad de aprendizaje en ratas. Papel de las alteraciones en la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en el cerebelo.”

Tesis doctoral

Presentada por: Blanca Piedrafita Baudín

Dirigida por: Dr. Vicente Felipo Orts

Valencia, 2007



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

El Dr. Vicente Felipo Orts, Investigador y Jefe del Laboratorio de Neurobiología del Centro de Investigación Príncipe Felipe

CERTIFICA:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D^a Blanca Piedrafita Baudín, titulada “Efectos de la exposición prenatal a contaminantes presentes en los alimentos (PCBs y metilmercurio) sobre la capacidad de aprendizaje en ratas. Papel de las alteraciones en la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en el cerebelo”, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

En Valencia, a 27 de Septiembre de 2007

Fdo. Dr. Vicente Felipo Orts

A mis padres y a mi hermana Marta

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el resultado de una “aventura” científica, profesional y personal que no habría podido ser llevada a cabo sin la inestimable ayuda de un gran número de personas a las que quiero agradecer su tiempo y apoyo... y hay mucho que agradecer.

Gracias a mi director, el doctor Vicente Felipo, por ofrecerme la oportunidad de trabajar en su equipo y por su guía. Gracias a todos mis compañeros, los que están, los que marcharon y los que llegaron recientemente: Carmina, Marta, Nisrin, Pili, Omar, Regina, Slaven, Gennaro, Amparo y Jordi. A nuestras estupendas técnicas: Isa, Mar, Maribel, Mari Carmen, Paqui y Rosa. Sin duda el trabajo sería imposible sin todos vosotros, vuestras risas y vuestras manos.

También quiero dar las gracias al doctor Paco Olucha, mi tutor, por darme ese pequeño empujón que me sacó de un gran bache cuando hizo falta, y a tantas personas que diariamente u ocasionalmente han compartido su espacio y su tiempo para echar un cable, comentar un chascarrillo por los pasillos y conseguir hacerte sonreír cuando las cosas se ponen fastidiosas.

Gracias a toda mi familia: mis padres, hermana, abuelos, primos y tíos por su fe en mí, su apoyo incondicional y sus frecuentes consejos. Gracias a Pascual por toda su ilusión, optimismo y esa sonrisa maravillosa; a mi “pandi” de Jaca por estar siempre que he necesitado desconectar y reírme un buen rato... y por pagar mis cafés cuando me despisto; también a esos amigos que, aun estando lejos, siguen tan cerca, y a la tribu de Kendo, con quienes comparto actividades “kendoñiles” y otras más surrealistas. Todos sois estupendos y no sería nadie sin vosotros.

Y por último, aunque no menos importante, gracias a las ratitas. Ellas saben bien por qué.



INDICE

| | |
|---|-------|
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS | XVII |
| ÍNDICE DE FIGURAS | XIX |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | XXIII |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1. Los humanos estamos expuestos a sustancias tóxicas a través de la comida y la bebida. | 3 |
| 1.2. Los PCBs y el metilmercurio, contaminantes habituales en los alimentos. | 7 |
| 1.2.1 El metilmercurio..... | 7 |
| 1.2.2 Los bifenilos policlorados (PCBs)..... | 10 |
| 1.3. Vulnerabilidad del sistema nervioso en desarrollo a los contaminantes ambientales..... | 13 |
| 1.4. Memoria y aprendizaje | 16 |
| 1.4.1 Bases neurofisiológicas de la memoria y el aprendizaje | 16 |
| 1.4.1.1. <i>Papel del cerebelo en los procesos de aprendizaje y memoria</i> | 18 |
| 1.4.1.2. <i>Estructura del cerebelo</i> | 18 |
| 1.4.2 Tests de aprendizaje que requieren memoria espacial | 20 |
| 1.4.3 Tarea de discriminación condicional en un laberinto en forma de Y..... | 22 |
| 1.5. La neurotransmisión glutamatérgica en procesos de aprendizaje..... | 23 |
| 1.5.1 Receptores de glutamato | 24 |
| 1.5.1.1. <i>Receptores metabotrópicos de glutamato</i> | 24 |
| 1.5.1.1. <i>Receptores ionotrópicos de glutamato</i> | 25 |
| 1.5.2 La vía de transducción de señales glutamato - óxido nítrico - GMPC. | 29 |

| | | |
|----------|--|----|
| 1.5.3 | Papel de la vía Glu-NO-GMPc en procesos de aprendizaje y memoria..... | 31 |
| 1.6. | Las neuronas granulares de cerebelo en cultivo como Modelo para investigar los mecanismos de las alteraciones en la función de la vía Glu-NO-GMPc..... | 34 |
| 2. | OBJETIVOS | 37 |
| 3. | MATERIAL Y MÉTODOS | 43 |
| 1.7. | Material..... | 43 |
| 1.7.1 | Productos y material fungible..... | 43 |
| 1.7.2 | Aparatos | 46 |
| 1.7.3 | Animales | 47 |
| 1.8. | Métodos..... | 48 |
| 1.8.1 | Métodos empleados en los experimentos realizados <i>in vivo</i> | 48 |
| 1.8.1.1. | <i>Selección de la dosis de MeHg utilizada en los estudios in vivo</i> | 48 |
| 1.8.1.2. | <i>Selección de las dosis de PCB153 y PCB126 utilizadas en los estudios in vivo</i> | 49 |
| 1.8.1.3. | <i>Modelo de exposición a PCB153, PCB126 y/o Metilmercurio</i> | 52 |
| 1.8.1.4. | <i>Cuidado y observación de las camadas nacidas</i> | 54 |
| 1.8.1.5. | <i>Test de aprendizaje: discriminación condicional en un laberinto en Y</i> | 54 |
| 1.8.1.6. | <i>Procedimientos quirúrgicos: Implantación de cánulas en el cerebelo y Microdiálisis cerebral in vivo</i> . 55 | |
| 1.8.1.7. | <i>Determinación del grado de recuperación de GMPc a través de la membrana de la sonda de microdiálisis</i> | 59 |
| 1.8.2 | Métodos empleados en los experimentos realizados en cultivos primarios de neuronas: | 60 |

| | |
|--|----|
| 1.8.2.1. Cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo | 60 |
| 1.8.2.2. Selección de las dosis utilizadas en cultivos primarios | 62 |
| 1.8.2.3. Tratamientos <i>in vitro</i> de neuronas granulares de cerebelo con PCB153, PCB126, MeHg o combinaciones de los PCBs con MeHg..... | 63 |
| 1.8.2.4. Viabilidad de las neuronas granulares de cerebelo tras la exposición <i>in vitro</i> a PCB153, PCB126 y MeHg. | 64 |
| 1.8.2.5. Estudio de los efectos de la exposición <i>in vitro</i> a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc. Estudios <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> | 65 |
| 1.8.3 Medida de la concentración de GMPc en muestras de microdiálisis cerebral y homogenados de neuronas mediante inmunoensayo. | 66 |
| 1.8.4 Cuantificación del contenido de proteínas implicadas en la vía Glu-NO-GMPc en homogenados de áreas cerebrales de animales y de neuronas en cultivo. | 67 |
| 1.8.4.1. Preparación de homogenados de áreas cerebrales..... | 67 |
| 1.8.4.2. Preparación de homogenados de células | 67 |
| 1.8.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot | 68 |
| 1.8.5 Análisis estadístico | 70 |
| 4. RESULTADOS | 73 |
| 1.9. Experimentos <i>in vivo</i> | 73 |
| 1.9.1 Efectos de la exposición perinatal a MeHg, PCB153 ó PCB126 solos o en combinación sobre la ganancia de peso de las crías. | 73 |
| 1.9.2 Efecto de la exposición perinatal a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y de las ratas a los tres meses de edad. | 76 |

| | |
|---|----|
| 1.9.3 Estudio de los efectos de la exposición perinatal a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo. Microdiálisis cerebral <i>in vivo</i> | 78 |
| 1.9.4 Cuantificación del contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en homogenados de cerebelo de ratas de tres meses de edad expuestas perinatalmente a los diferentes neurotóxicos..... | 85 |
| 1.9.5 Efectos de la exposición perinatal a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y de las ratas a los 8 meses de edad. | 88 |
| 1.9.6 Estudio de la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo de ratas de 8 meses de edad perinatalmente expuestas a PCB153, PCB126 y/o MeHg. Microdiálisis cerebral <i>in vivo</i> | 90 |
| 1.9.7 Evaluación de la influencia de la edad y de la exposición perinatal a neurotóxicos en la capacidad aprendizaje y en la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo. Análisis comparativo de los resultados obtenidos en ratas de 3 y 8 meses de edad..... | 95 |
| 1.9.7.1. Efecto de la edad sobre la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y. | 95 |
| 1.9.7.2. Efecto de la edad y de la exposición perinatal a los PCBs y/o MeHg sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo <i>in vivo</i> | 97 |
| 1.2. Estudios <i>ex vivo</i> en cultivos primarios de neuronas | 98 |
| 1.2.1 Estudio de los efectos de la exposición perinatal a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre la vía Glu-NO-GMPc en cultivos primarios de neuronas de cerebelo procedentes de animales expuestos. ... | 98 |
| 1.2.2 Estudio de los efectos de la exposición perinatal a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre el | |

| | |
|--|-----|
| contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas de cerebelo ex vivo. | 100 |
| 1.3. Efectos de la adición <i>in vitro</i> de los PCBs y/o MeHg a cultivos primarios de neuronas control sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc. | 101 |
| 1.3.1 Estudio de los efectos del PCB126, PCB153 y/o MeHg añadidos <i>in vitro</i> a cultivos de neuronas de cerebelo control sobre la viabilidad neuronal. . | 101 |
| 1.3.2 Estudio del efecto de los PCBs y/o MeHg añadidos <i>in vitro</i> sobre la función de la vía Glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en neuronas de cerebelo. | 104 |
| 1.3.2.1. <i>Estudio de los efectos del tratamiento in vitro con Metilmercurio sobre la función de la vía Glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en neuronas de cerebelo</i> | 105 |
| 1.3.2.1. <i>Estudio de los efectos del tratamiento in vitro con PCB153 sobre la función de la vía Glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en neuronas de cerebelo</i> | 105 |
| 1.3.2.2. <i>Estudio de los efectos del tratamiento in vitro con PCB126 sobre la función de la vía Glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en neuronas de cerebelo</i> | 107 |
| 1.3.3 Efecto de los tratamientos con combinaciones de PCBs con MeHg sobre la vía Glu-NO-GMPc..... | 111 |
| 1.3.3.1. <i>Efecto del tratamiento in vitro con la combinación de PCB153 y metilmercurio</i> | 111 |
| 1.3.3.2. <i>Efecto del tratamiento in vitro con la combinación de PCB126 y metilmercurio</i> | 112 |
| 1.3.4 Efecto de la exposición <i>in vitro</i> a PCBs y/o MeHg sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc..... | 115 |
| 5. DISCUSIÓN | 123 |

| | |
|--|-----|
| 1.4. La exposición perinatal a PCB126 solo o combinado con MeHg disminuye el peso de las crías en sus primeras semanas de vida. | 123 |
| 1.5. La exposición perinatal a MeHg, PCB153 o PCB126 pero no a sus combinaciones disminuye la capacidad de aprendizaje de las ratas a los 3 meses de edad. | 124 |
| 1.6. La exposición perinatal a PCB153, PCB126 o MeHg, pero no a combinaciones de PCB con MeHg, reduce la función de la vía Glu-NO-GMPc en el cerebelo de las ratas a los 3 meses de edad..... | 129 |
| 1.7. La capacidad de aprendizaje y la función de la vía Glu-NO-GMPc se deterioran con la edad en ratas control y machos expuestos perinatalmente a PCB153 + MeHg pero no en ratas expuestas a MeHg, PCB153, PCB126 ó PCB126 + MeHg | 132 |
| 1.8. Posible utilidad de los cultivos de neuronas de cerebelo <i>ex vivo</i> en el estudio de las alteraciones causadas por PCB153, PCB126, y/o metilmercurio en la vía Glu-NO-GMPc | 134 |
| 1.8.1 La exposición a PCB153 solo o en combinación con MeHg o a PCB126 reduce la función de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas de cerebelo cultivadas <i>ex vivo</i> a partir de ratas expuestas perinatalmente. | 135 |
| 1.9. Utilidad del tratamiento <i>in vitro de</i> cultivos primarios de neuronas control con PCB153, PCB126, y/o metilmercurio como modelo para estudiar los mecanismos de las alteraciones en la vía Glu-NO-GMPc..... | 137 |
| 1.9.1 La exposición a MeHg <i>in vitro</i> reduce la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc por NMDA y la activación de la guanilato ciclasa soluble por NO en neuronas de cerebelo en cultivo. | 138 |

| | |
|--|-----|
| 1.9.2 La exposición crónica a PCB153 <i>in vitro</i> aumenta los niveles basales de GMPC y reduce la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPC por NMDA y la activación de la guanilato ciclasa por NO. | 139 |
| 1.9.3 La exposición crónica a PCB126 <i>in vitro</i> aumenta los niveles basales de GMPC y reduce la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPC por NMDA. | 140 |
| 6. CONCLUSIONES | 145 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 151 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------|---|
| APS | Persulfato de Amonio |
| BCIP | Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato |
| CM | Calmodulina |
| DTT | Ditiotreitol |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EGTA | Ácido etilenglicol-bis-N',N',N',N'-tetraacético |
| GMP | Guanosín 3', 5' - monofosfato |
| GC α | Guanilato Ciclasa soluble, subunidad alfa |
| GCB | Guanilato Ciclasa soluble, subunidad beta |
| GCs | Guanilato ciclasa soluble |
| GD7 | Día 7 de gestación |
| Glu | Glutamato |
| GMPc | Guanosín monofosfato cíclico |
| GTP | Guanosín-5' -trifosfato |
| MeHg | Cloruro de Metilmercurio |
| mGluR | Receptores metabotrópicos de glutamato |
| NBT | Nitroblue tetrazolium |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| NO | Óxido nítrico |
| nNOS | Óxido nítrico sintasa neuronal |
| NR1 | Subunidad NR1 del receptor de NMDA |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCB ó PCBs | Bifenilo/s policlorados/s |
| PCB153 | 2,2',4,4',5,5N-hexaclorobifenilo |
| PCB126 | 3,3',4,4',5-pentaclorobifenilo |
| PMSF | Fenilmetilsulfonilfluoruro |
| PND | Día postnatal (postnatal day) |
| PVDF | Polivinildifluorido |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SNAP | S-nitroso-N-acetil-penicilamina |
| TEMED | N', N', N',N' - Tretrametilenetilendiamina |
| Tris Base | Tris-(hidroximetil)-aminometano |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Fig. 1. Representación de la bioacumulación de los bifenilos policlorados (PCBs). | 5 |
| Fig. 2. Evolución de los umbrales tóxicos de mercurio para los que se han observado efectos adversos por exposición prenatal. | 9 |
| Fig. 3. Estructura química de los PCBs 153 y 126..... | 10 |
| Fig. 4. Clasificación de la memoria..... | 17 |
| Fig. 5. Representación de la composición neuronal de la corteza del cerebelo | 19 |
| Fig. 6. Laberinto en Y. | 23 |
| Fig. 7. El receptor NMDA | 28 |
| Fig. 8. Vía Glutamato - NO - GMPC..... | 30 |
| Fig. 9. Procedimiento quirúrgico de colocación de la guía de microdiálisis..... | 57 |
| Fig. 10. Representación del funcionamiento de la sonda de microdiálisis cerebral CMA/12. | 60 |
| Fig. 11. Evolución de la ganancia de peso de las crías macho. | 73 |
| Fig. 12. Evolución de la ganancia de peso de las crías hembra. | 74 |
| Fig. 13. Las crías expuestas a PCB126 solo o combinado con MeHg, tenían un peso significativamente menor que el resto al nacer. | 75 |
| Fig. 14. La exposición perinatal a MeHg, PCB153 o PCB126 pero no a sus combinaciones disminuye la capacidad de aprendizaje de las ratas a los 3 meses de edad..... | 77 |
| Fig. 15. La exposición perinatal a PCB153, PCB126 o MeHg, pero no a combinaciones de PCB con MeHg, reduce la función de la vía Glu-NO-GMPC en el cerebelo de las ratas macho a los 3 meses de edad..... | 80 |
| Fig. 16. La exposición perinatal a PCB153, PCB126 o MeHg, pero no a combinaciones de PCB con MeHg | |

| | |
|--|----|
| reduce la función de la vía Glu-NO-GMPc en el cerebelo de las ratas hembra a los 3 meses de edad. .. | 81 |
| Fig. 17. La exposición perinatal a PCB153, PCB126 o MeHg, pero no a combinaciones de PCB con MeHg, reduce la función de la vía Glu-NO-GMPc en el cerebelo de las ratas a los 3 meses de edad..... | 83 |
| Fig. 18. Imágenes representativas de “Western blot” de homogenados de cerebelo de ratas de 3 meses expuestas perinatalmente a PCB153, PCB126 y/o MeHg | 87 |
| Fig. 19. A los 8 meses de edad, la capacidad de aprendizaje de las ratas perinatalmente expuestas a PCB153, PCB126 y/o MeHg no es diferente de la de las ratas control. | 89 |
| Fig. 20. Las ratas macho control o perinatalmente expuestas a MeHg, PCB153, PCB126 o sus combinaciones tienen a los 8 meses de edad una función de la vía Glu-NO-GMPc similar. | 91 |
| Fig. 21. Las ratas hembra control o perinatalmente expuestas a MeHg, PCB153, PCB126 o sus combinaciones tienen a los 8 meses de edad una función de la vía Glu-NO-GMPc similar. | 92 |
| Fig. 22. Las ratas control o perinatalmente expuestas a MeHg, PCB153, PCB126 o sus combinaciones tienen a los 8 meses de edad una función de la vía Glu-NO-GMPc similar. | 93 |
| Fig. 23. La capacidad de aprendizaje se deteriora con la edad en ratas control y machos expuestos perinatalmente a PCB153 + MeHg pero no en ratas expuestas a MeHg, PCB153, PCB126 ó PCB126 + MeHg. Los valores representan el número de ensayos que el animal necesita para aprender la tarea. | 96 |
| Fig. 24. Los niveles basales de GMPc intracelular están aumentados en neuronas cultivadas a partir de cerebelos de ratas expuestas perinatalmente a PCB153 o a PCB153 + MeHg. Los valores son la media ± SEM de muestras duplicadas de cinco cultivos diferentes. | 98 |

-
- Fig. 25. La exposición a PCB153 solo o en combinación con MeHg o a PCB126 reduce la función de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas de cerebelo cultivadas *ex vivo* a partir de ratas expuestas perinatalmente. 99
- Fig. 26. Imágenes representativas tomadas en el microscopio de fluorescencia de neuronas de cerebelo tratadas *in vitro* con los diferentes compuestos 102
- Fig. 27. El PCB153, añadido *in vitro* al medio de cultivo, reduce significativamente la viabilidad neuronal a partir de una concentración 50 μ M..... 102
- Fig. 28. El PCB126, añadido *in vitro* al medio de cultivo, reduce significativamente la viabilidad neuronal a partir de una concentración 1 nM. 103
- Fig. 29. El MeHg, añadido *in vitro* al medio de cultivo, reduce significativamente la viabilidad neuronal a partir de una concentración 10 pM..... 104
- Fig. 30. La exposición a MeHg *in vitro* reduce la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc por NMDA y la activación de la guanilato ciclasa soluble por NO en neuronas de cerebelo en cultivo. 106
- Fig. 31. La exposición crónica a PCB153 *in vitro* aumenta los niveles basales de GMPc y reduce la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc por NMDA y la activación de la guanilato ciclasa por NO..... 108
- Fig. 32. La exposición crónica a PCB126 *in vitro* aumenta los niveles basales de GMPc y reduce la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc por NMDA. 109
- Fig. 33. La exposición crónica *in vitro* a la mezcla de MeHg con PCB153 potencia el descenso en la función de la vía Glu-NO-GMPc. 112
- Fig. 34. El tratamiento *in vitro* con MeHg no impide el aumento de GMPc basal inducido por PCB126 en neuronas de cerebelo en cultivo. Los valores significativamente diferentes de las neuronas control se indican por asteriscos. (* $p < 0.05$, ** < 0.01) 113

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Resumen del aumento de GMPc extracelular en cerebelo inducido por la activación de la vía Glu-NO-GMPc con NMDA en ratas de 3 meses de edad expuestas perinatalmente a PCB153, PCB126 o MeHg solos o a combinaciones de PCB y MeHg. | 84 |
| Tabla 2. Contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en homogenados de cerebelo de ratas de 3 meses expuestas perinatalmente a PCB153, PCB126 y/o MeHg. | 86 |
| Tabla 3. La exposición perinatal a los neurotóxicos no afecta al aumento de GMPc inducido por NMDA en ratas de 8 meses | 94 |
| Tabla 4. Comparación de la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo en ratas de 3 y 8 meses de edad. | 97 |
| Tabla 5. Efecto de la exposición perinatal a los neurotóxicos sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas de cerebelo <i>ex vivo</i> | 100 |
| Tabla 6. Resumen de los efectos de los tratamientos <i>in vitro</i> con PCB153, PCB126 o MeHg. | 114 |
| Tabla 7. Efecto de la exposición crónica a MeHg <i>in vitro</i> sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas granulares de cerebelo. | 115 |
| Tabla 8. Efecto de la exposición crónica a PCB153 <i>in vitro</i> sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas granulares de cerebelo | 116 |
| Tabla 9. Efecto de la exposición crónica a PCB153 + MeHg <i>in vitro</i> sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas granulares de cerebelo. | 117 |
| Tabla 10. Efecto de la exposición crónica a PCB126 <i>in vitro</i> sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas granulares de cerebelo | 117 |
| Tabla 11. Efecto de la exposición crónica a PCB126 + MeHg <i>in vitro</i> sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas granulares de cerebelo. | 118 |
| Tabla 12. Resumen del contenido de proteína en homogenados de cerebelo, cultivos celulares <i>ex vivo</i> y tratados <i>in vitro</i> | 119 |

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS HUMANOS ESTAMOS EXPUESTOS A SUSTANCIAS TÓXICAS A TRAVÉS DE LA COMIDA Y LA BEBIDA.

Desde hace más de un siglo, el estilo de vida de las sociedades industriales ha ido aumentando la existencia de sustancias químicas contaminantes en nuestro medio ambiente. Muchas de estas sustancias permanecen durante largos periodos de tiempo y pueden incorporarse a diversos ciclos medioambientales que incluyen su paso por los organismos vivos. La gran mayoría de sustancias tóxicas ambientales nos acompañan desde la segunda guerra mundial y cada año se incorporan entre 2000 y 3000 nuevas (Moriarty, 1988). En las últimas décadas ha habido diversas manifestaciones desastrosas de esta situación, como fueron las contaminaciones masivas de la población por metilmercurio en la bahía de Minamata en Japón en la década de los 50, accidentes como la tragedia de Bophal en la India en los 80, en la que 500,000 personas fueron expuestas al pesticida metilisocianato, o el peligro medioambiental del DDT y otras sustancias industriales en países del llamado “primer mundo”. Debido a todo esto, existe una preocupación creciente ante los efectos que la contaminación ambiental puede tener sobre la vida salvaje y sobre la salud de la población humana. El grado en el que estas sustancias interfieren en nuestros procesos fisiológicos y, en particular, en el desarrollo cerebral es un asunto de considerable importancia que ha sido abordado por diversas agencias gubernamentales e internacionales implicadas en lo que denominamos “evaluación de riesgos”.

Los alimentos pueden actuar como vehículo de entrada al organismo de una serie de contaminantes ambientales que se incorporan al alimento por diversas circunstancias. Estos contaminantes llegan a nuestros alimentos a través de fertilizantes, insecticidas o herbicidas usados en agricultura, fármacos aplicados en la cría del ganado, contaminantes industriales que se acumulan en la cadena alimentaria (Figura 1), compuestos utilizados en el envasado o como resultado de un proceso de cocción (Faroon *et al.*, 2003; Moriarty, 1988).

De entre todos estos contaminantes, en los últimos años se ha centrado la investigación en los efectos de productos químicos industriales biopersistentes que se degradan muy lentamente y se acumulan en la cadena alimentaria, por ejemplo, en el pescado. En este sentido, se han estudiado especialmente los efectos del metilmercurio y de los bifenilos policlorados (PCBs) (Braune *et al.*, 2005; Kunisue *et al.*, 2006). Estas sustancias pueden alterar el desarrollo y la función del cerebro de manera específica y de forma permanente. Unas pocas sustancias han sido ampliamente estudiadas (plomo, mercurio, algunas drogas como alcohol, nicotina, cocaína u opiodes) mientras que la mayoría se han investigado muy poco o nada. El potencial neurotóxico de muchas sustancias es desconocido.

Habitualmente se aborda el estudio de la toxicidad de una sustancia una vez que se ha detectado alguna alteración en la población expuesta. Es raro el caso en el que un compuesto es investigado antes de su utilización o dispersión en el ambiente, aunque los casos son cada vez más frecuentes (Environmental Protection Agency, 2004)

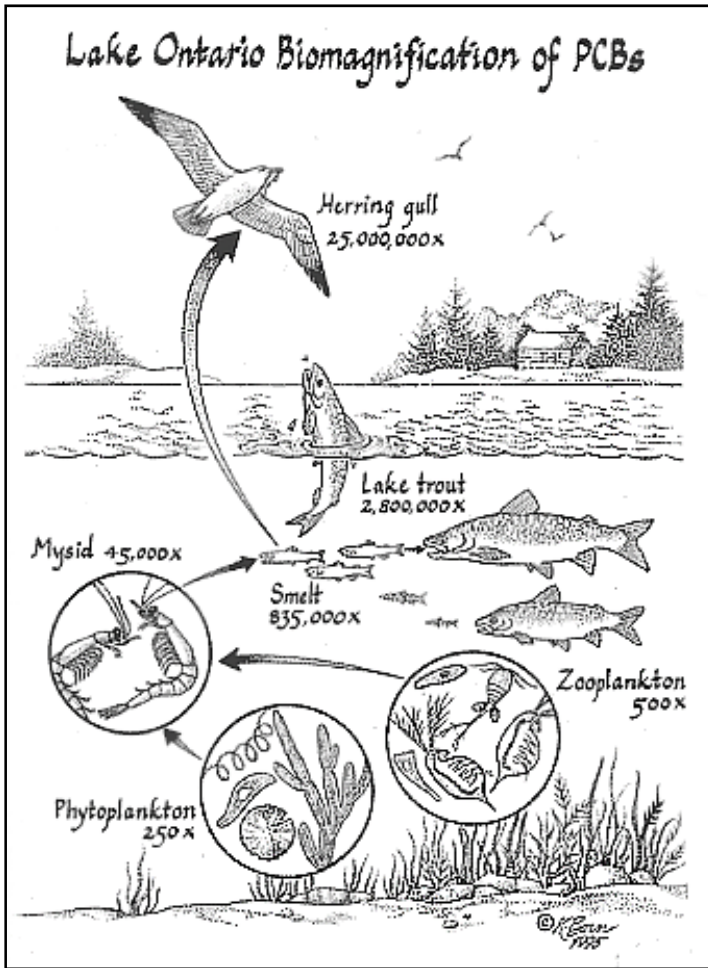


Fig. 1. Representación de la bioacumulación de los bifenilos policlorados (PCBs). Los PCBs son un tipo de contaminante ambiental del que hablaremos con detalle más adelante. Conforme los PCBs avanzan a través de la cadena trófica, sus concentraciones en el tejido animal pueden aumentar hasta 25 millones de veces. Los organismos microscópicos (phyto- y zooplankton) recogen grandes cantidades por compuestos biopersistentes de los sedimentos, origen continuo de contaminación, y del agua. Especies más grandes denominadas mísidos consumen el zooplankton, los peces se comen a los mísidos y así continua la cadena hacia peces de mayor tamaño, aves, mamíferos marinos y, por último, los seres humanos. (Colborn et al., 1997)

Se ha observado a menudo que las alteraciones atribuidas a algunas sustancias tóxicas se manifiestan en poblaciones que habitan ciertas regiones del globo. Diferentes desastres de contaminación ambiental, la concentración de industrias en algunas regiones, la ecología de los mares y el estilo de vida y alimentación de las diferentes comunidades humanas hacen que la exposición a los contaminantes ambientales no sea homogénea en la población mundial (Moriarty, 1988). Hay que tener en cuenta que las corrientes marinas y atmosféricas y las migraciones de aves y animales marinos hacen que frecuentemente los contaminantes se concentren en determinadas zonas. Los estudios sobre población humana suelen centrarse en comunidades claramente expuestas por cualquiera de estas causas, como pueden ser las costas de latitudes polares, poblaciones isleñas cuya alimentación se basa en el pescado y zonas altamente industrializadas. Numerosos autores informan de un aumento en la incidencia de deficiencias cognitivas en la población infantil de estas regiones, que se asocian a alteraciones durante el desarrollo embrionario (Grandjean y Landrigan, 2006). De nuevo se ha atribuido un papel importante a los PCBs y el metilmercurio en estos estudios (Landrigan, 2001; Mendola *et al.*, 2002; Prickaerts *et al.*, 2002). Aunque actualmente se ha prohibido o regulado su uso para minimizar su dispersión en el ambiente (Environmental Protection Agency, 2004), sus residuos ya existentes son contaminantes persistentes y el consumo de alimentos es la principal vía de exposición tanto para humanos como para la mayor parte de la vida salvaje y el ganado (Borga *et al.*, 2004; Wania, 2006).

1.2. LOS PCBs Y EL METILMERCURIO, CONTAMINANTES HABITUALES EN LOS ALIMENTOS.

En la realización de esta tesis doctoral hemos estudiado los efectos de tres contaminantes muy habituales en la dieta europea: el mercurio y dos congéneres de la familia de los bifenilos policlorados.

1.2.1 *El metilmercurio*

Numerosos estudios han confirmado la relación de la exposición a metilmercurio con alteraciones del neurodesarrollo (Davidson *et al.*, 2004; Myers y Davidson, 1998). El mercurio es un metal pesado presente en el medio ambiente de forma natural, aunque la actividad industrial humana ha aumentado considerablemente sus niveles en la biosfera. El origen del mercurio orgánico, capaz de incorporarse a la cadena alimentaria, se debe a la actividad metiladora de bacterias reductoras de sulfato presentes en ríos, lagos y océanos, que generan metilmercurio o, más correctamente, catión monometilmercurio (CH_3Hg^+), que se suele combinar con cloruros, nitratos o hidróxidos.

Este metilmercurio se incorpora y se acumula en la cadena trófica y sigue una ruta similar a la descrita en la figura 1 para los PCBs. La principal fuente de exposición humana es la ingestión de pescado, marisco y mamíferos marinos, por lo que las poblaciones humanas con un estilo de vida ligado al mar suelen estar más expuestas. Los efectos tóxicos del metilmercurio sobre el sistema nervioso en desarrollo se pusieron de manifiesto como consecuencia de trágicos incidentes de envenenamiento en Japón durante los años 50 (Takeuchi, 1982) y en Irak en los 70 (Bakir *et al.*, 1980). En el caso de Japón, el vertido de mercurio industrial en la bahía de

Minamata produjo sus efectos sobre recién nacidos en lo que es conocido como “la enfermedad de Minamata” (Takeuchi, 1982). Los síntomas de esta enfermedad incluyen ataxia, alteración sensorial en las manos y los pies, problemas de visión y de oído, debilidad muscular y, en casos extremos, convulsiones, ataques de psicosis, parálisis y muerte temprana. Los médicos que durante años atendieron numerosos casos, informaron de la ausencia de síntomas de intoxicación con mercurio en las madres, y la aparición de los mismos en los bebés a partir del segundo trimestre de vida (Matsumoto *et al.*, 1965).

El estudio histológico del sistema nervioso central en autopsias de enfermos de Minamata reveló una clara disminución en el número de neuronas tanto corticales como del cerebelo, siendo la población más afectada principalmente las neuronas granulares. Esto causa un menor volumen del encéfalo claramente apreciable (Eto *et al.*, 1992). La disminución en el número de neuronas granulares de cerebelo se consideró una de las características principales en el diagnóstico de envenenamiento por metilmercurio en humanos adultos. Según aumentó el número de autopsias de enfermos de Minamata, se observó que las lesiones histológicas en estos niños eran difusas y las encontradas en las cortezas precentral, postcentral y temporales se asociaron con las alteraciones motoras observadas (Choi, 1989).

Se cree que las causas de las alteraciones histológicas y celulares pueden ser cambios en la estructura del citoesqueleto de las células del sistema nervioso, estrés oxidativo, alteraciones de membrana y de transducción de señales, disminución en la síntesis de proteínas y cambios en la neurotransmisión (Costa *et al.*, 2004; Gilbert y Grant-Webster, 1995).

Los niveles de MeHg alcanzados en la bahía de Minamata eran muy altos, pero existen numerosas publicaciones que indican que la exposición prenatal a niveles muy bajos de metilmercurio también interfiere el desarrollo cerebral (Castoldi *et al.*, 2001; Dare *et al.*, 2003; Gimenez-Llort *et al.*, 2001; Schantz *et al.*, 1996). Como se aprecia en la figura 2, un estudio realizado en las Islas Feroe demostró que la exposición prenatal a niveles de metilmercurio menores del 3% del umbral tóxico indicado por los datos iraquíes causa deficiencias en las capacidades de lenguaje, memoria y atención (Grandjean *et al.*, 1997).

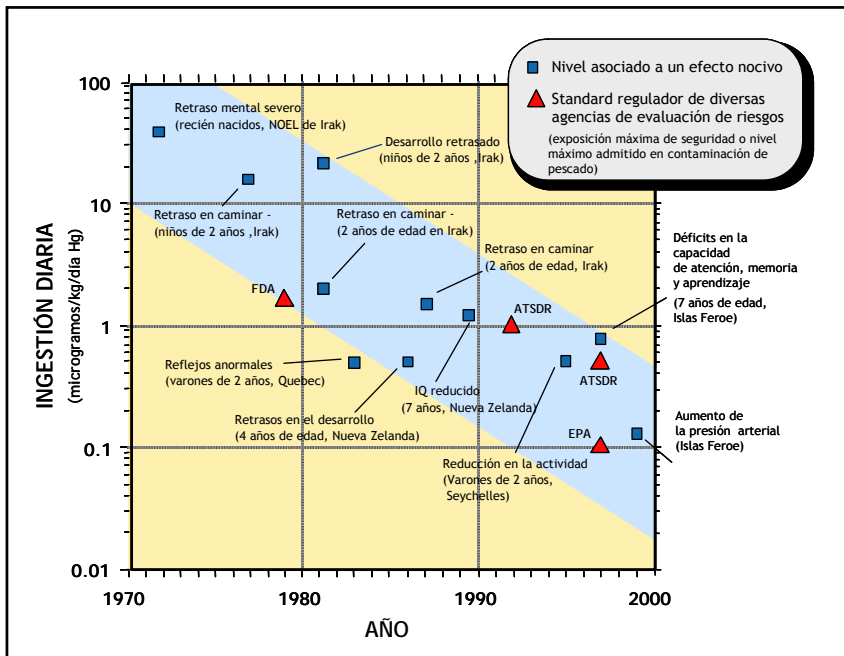


Fig. 2. A lo largo de los años, diversos estudios han ido reduciendo los niveles de mercurio para los que se han observado efectos adversos por exposición prenatal. En el esquema se observa cómo se correlaciona la ingestión diaria de mercurio de la madre a través del pescado con alteraciones, a diferentes edades, en sus hijos. Las agencias de evaluación de riesgos han reducido los niveles admisibles de exposición de acuerdo con estos informes. (Adaptado de Schettler, 2001)

1.2.2 Los bifenilos policlorados (PCBs)

Los PCBs son una familia de 209 compuestos altamente tóxicos y biopersistentes formados por dos anillos de benceno con un número variable de sustituciones de cloruro (Figura 3).

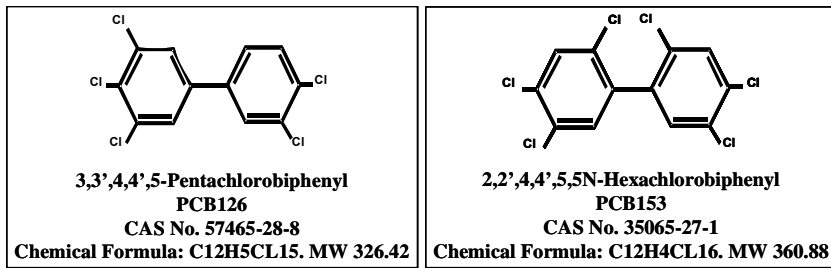


Fig. 3. Estructura química de los PCBs 153 y 126

Estos compuestos artificiales son sintetizados artificialmente y fueron comercializados en forma de mezclas de composición variable llamadas Aroclor. Se utilizaron en numerosos productos industriales como disolventes, fluidos hidráulicos, fluidos dieléctricos para transformadores y condensadores, fluidos de transmisión de calor, etc. Debido a su naturaleza lipofílica y resistencia a la biotransformación, los PCBs se acumulan en el medio ambiente y en la cadena alimentaria (Figura 1), (Faroon *et al.*, 2003). Los PCBs se acumulan en el tejido adiposo y el hígado y es conocida su capacidad de atravesar la placenta y también pasar a la leche materna. Esta característica los ha hecho objeto de numerosas investigaciones ante el posible peligro para el lactante (DeKoning y Karmaus, 2000; Jacobson *et al.*, 1984).

Como en el caso del metilmercurio, los efectos adversos de los PCBs en el desarrollo infantil no se reconocieron hasta una catastrófica exposición accidental en Japón en los años 70 que dio

origen a un síndrome conocido como “enfermedad de Yusho” (Aoki, 2001). Al mejorar las estimaciones de la exposición, se ha determinado que incluso niveles comúnmente experimentados por la población general pueden causar efectos adversos (Faroon *et al.*, 2003). A la exposición prenatal a PCBs se han asociado deficiencias cognitivas, disminución de las habilidades verbales y reducción del desarrollo psicomotor (Schantz *et al.*, 1996). La familia de PCBs se divide en subtipos según estructura y propiedades químicas del compuesto. Uno de estos grupos lo componen 12 congéneres que pueden adoptar una estructura coplanar y son capaces de unirse a receptores hormonales, por lo que tienen propiedades similares a las dioxinas (efectos sobre el hígado, hormonas tiroideas, función inmunitaria, reproducción y comportamiento). Este grupo se conoce como “dioxin-like PCBs” (DL-PCB) o “PCBs similares a dioxina” (Van den Berg *et al.*, 2006). El PCB126 es un miembro de este grupo.

El otro grupo de PCBs no tiene una toxicidad “dioxin-like”, sino que tiene un perfil toxicológico totalmente diferente, en particular en lo referente a los efectos sobre el sistema nervioso en desarrollo y neurotransmisión, y no se considera que tenga efectos endocrinos. Este segundo grupo es denominado “non-dioxin-like PCBs” (NDL-PCB) o “no similar a dioxina”. A este grupo pertenecen los otros 197 PCBs, entre los que se encuentra el PCB153.

Al ser una familia tan grande y variada, se han descrito diversas alteraciones asociadas a diferentes congéneres. Por ejemplo, algunos congéneres son conocidos carcinógenos. Además, como ya hemos comentado, algunos PCBs alteran la función del sistema endocrino, lo que implica que a sus efectos sobre el sistema nervioso en desarrollo pueden también contribuir alteraciones hormonales.

Teniendo en cuenta la información disponible, en nuestros estudios hemos seleccionado dos congéneres con propiedades muy distintas. El PCB153 es una molécula no coplanar y es considerado uno de los menos tóxicos a pesar de su alto número de cloruros. El PCB153 tiene interés en nuestros estudios por ser el que se encuentra con más frecuencia y abundancia en las muestras humanas de suero y leche materna (Fangstrom *et al.*, 2005a; Rogan y Ragan, 1994; Stellman *et al.*, 1998).

El PCB126 es menos frecuente, pero es un PCB coplanar con estructura similar a las dioxinas y en la actualidad se le considera el congénere más tóxico de toda la familia (Giesy y Kannan, 1998).

Actualmente sabemos que los primeros datos obtenidos en animales y en humanos adultos sobre neurotoxicidad del mercurio orgánico, los bifenilos policlorados (PCBs) y el plomo tendían a subestimar la sensibilidad del cerebro humano durante el desarrollo embrionario de 2 a 4 órdenes de magnitud (Rice, 1995). Los umbrales de neurotoxicidad del metilmercurio y los PCBs están en constante revisión por parte de las agencias gubernamentales (US EPA, EFSA) y van descendiendo conforme avanzan las investigaciones en la población humana (Figura 2).

Además, estudios previos indican que la exposición a mezclas de estos contaminantes, que es la situación más frecuente en la cadena alimentaria, produce efectos diferentes que la exposición a los compuestos individuales, pudiendo potenciarse sus efectos neurotóxicos (Castoldi *et al.*, 2006; Newland y Paletz, 2000; Roegge *et al.*, 2004). Para la mayoría de las sustancias químicas, no se conocen los efectos de la exposición a mezclas de compuestos que podrían interactuar entre sí.

1.3. VULNERABILIDAD DEL SISTEMA NERVIOSO EN DESARROLLO A LOS CONTAMINANTES AMBIENTALES.

El sistema nervioso en desarrollo es una diana muy vulnerable que se ve afectada por diferentes sustancias neurotóxicas, incluso a niveles de exposición que no inducen efectos duraderos en el sistema nervioso adulto. Las causas de esta especial vulnerabilidad son diversas, ya que el neurodesarrollo es un proceso extremadamente complejo que se desarrolla en el espacio y en el tiempo (Grandjean, 2006).

Las edades relativas en las que suceden la formación de las estructuras anatómicas y los desarrollos histológicos principales son comparables entre humanos y roedores, aunque las edades cronológicas no coincidan (Bayer *et al.*, 1993). Las estructuras cerebrales de todos los mamíferos se forman en una secuencia fija de proliferación celular, migración y diferentes pasos de diferenciación y la función normal de las estructuras requiere un número mínimo de células con características concretas y en la localización correcta (Rodier, 1994). Por ejemplo, en el cerebelo, las células de Purkinje se desarrollan tempranamente (días 13-15 de gestación en la rata y semanas 5-7 en el embrión humano), mientras que las neuronas granulares se generan mucho más tarde tanto en el embrión humano como en el roedor: días postanatales 4-19 en la rata, que corresponden a las semanas de gestación 24-40 en el embrión humano (Bayer *et al.*, 1993). Cualquier sustancia que interfiera con la proliferación hará que ciertas poblaciones neuronales no se formen, y no puedan ejercer su función.

La migración celular es también un proceso muy importante en el neurodesarrollo, pues permite a las neuronas alcanzar su

localización final, donde se incorporarán a complejos circuitos. Al igual que la proliferación celular, la migración sucede en etapas cronológicamente ordenadas y asociadas a diferentes tipos celulares. Es esencial la señalización molecular, por lo que una sustancia que interfiera con la misma, puede provocar efectos muy deletéreos de forma permanente (Rodier, 1995).

Cuando han llegado a su destino definitivo las neuronas deben generar sus conexiones durante el proceso de sinaptogénesis para alcanzar su función. Aunque sabemos que este proceso se da durante toda la vida, el periodo de desarrollo es crítico para la formación de la circuitería básica del sistema (Rodier, 1995). Además, existen evidencias de que los neurotransmisores que se liberan en estos procesos tienen más funciones que la simple comunicación interneuronal: son responsables de modular la proliferación de células madre neurales, neuroblastos y glioblastos, regulan la migración e inducen diferenciación (Emerit *et al.*, 1992; Levitt *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 2001). Como en todos los procesos de neurodesarrollo, la sinaptogénesis es un periodo altamente dependiente de una correcta señalización molecular. Cualquier sustancia que interfiera con la neurotransmisión en esta época, estará afectando a un enorme número de procesos.

Otra de las características del neurodesarrollo de mamíferos es que, durante la neurogénesis, se forman más del doble de neuronas de las que sobrevivirán en el organismo adulto (Henderson, 1996). Este número excesivo inicial de neuronas se reduce mediante procesos de apoptosis, o muerte celular programada, que suceden en un periodo de tiempo relativamente corto, el cual difiere en duración de unas áreas cerebrales a otras. Este proceso fisiológico está controlado por factores de crecimiento, citoquinas y

neurotransmisores que desencadenan cascadas intracelulares de señalización. Una sustancia que interfiera con esta señalización puede provocar la muerte de neuronas que deberían sobrevivir o, por el contrario, inducir la supervivencia de células que deberían desaparecer.

Además de todos los procesos relacionados con neuronas, es ya conocida la importancia de las células gliales como piezas relevantes de la función cerebral así como durante el desarrollo. Un periodo especialmente importante en el neurodesarrollo es el llamado “brain growth spurt”, un periodo transitorio de rápido crecimiento del cerebro. Este ocurre durante las dos primeras semanas tras el nacimiento en la rata y durante el tercer trimestre de gestación en el feto humano. Una de las características principales de esta etapa en todos los mamíferos es que el número de neuronas adulto ya ha sido establecido (exceptuando algunos grupos como las neuronas granulares de cerebelo) y comienza entonces la fase principal de multiplicación de células gliales (Dobbing, 1974). Los astrocitos y oligodendrocitos aumentan su número de forma considerable y sucede la mielinización de axones. Este periodo es muy sensible a los efectos tóxicos de algunas sustancias como alcohol, algunos pesticidas y nicotina (Miller, 2006).

Por último, debemos recordar que el sistema nervioso en desarrollo carece de barrera hematoencefálica, cuya formación es un proceso gradual que comienza *in utero* y se completa a los casi 6 meses de edad en los humanos (Dobbing, 1968; Rodier, 1995). Ya que la función de esta barrera es evitar la llegada de sustancias tóxicas al sistema nervioso desde la sangre, su ausencia convierte al sistema nervioso fetal en una diana fácil para diversos compuestos.

En definitiva, el sistema nervioso en desarrollo es particularmente vulnerable a los agentes tóxicos. A diferencia del organismo adulto, la exposición a sustancias neurotóxicas durante las ventanas de vulnerabilidad en períodos críticos del desarrollo del cerebro puede hacer que el individuo sufra una alteración de la función cerebral de por vida, que puede aparecer en periodos tempranos o bien en su etapa adulta. Hay que tener en cuenta que, incluso si la estructura histológica y conexiones neuronales se generan con éxito, las células de por sí pueden también haber sufrido alteraciones moleculares irreversibles que impidan su correcto funcionamiento de forma permanente. Por ejemplo, la exposición prenatal a metilmercurio provoca en el cerebro de ratas un aumento en especies reactivas de oxígeno y calcio intracelular en neuronas (Limke *et al.*, 2004), altera el transporte de glutamato en astrocitos (Aschner *et al.*, 2000) y provoca alteraciones en la función de la monoamino oxidasa (MAO), enzima responsable de regular los niveles de dopamina, serotonina y noradrenalina (Beyrouthy *et al.*, 2006).

1.4. MEMORIA Y APRENDIZAJE

La exposición a sustancias neurotóxicas durante el desarrollo pueden provocar alteraciones en diversos procesos cerebrales incluyendo los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria.

1.4.1 Bases neurofisiológicas de la memoria y el aprendizaje

La memoria incluye el conjunto de estructuras y procesos cognitivos que permite registrar, codificar, consolidar, almacenar y recuperar la información (Kandel *et al.*, 2000).

El aprendizaje y la memoria son dos procesos inseparables, interdependientes y estrechamente relacionados. Se pueden definir como dos momentos en la serie de procesos a través de los cuales los organismos adquieren y elaboran la información proporcionada por los sentidos. El aprendizaje es el proceso de adquirir conocimiento, habilidades o actitudes, a través de la experiencia o la enseñanza, dicho suceso origina un cambio persistente, cuantificable y específico en el comportamiento de un individuo. El aprendizaje implica siempre alguna forma de adquisición de información y, por tanto, una modificación del estado de la memoria del sujeto (Kandel *et al.*, 2000).

Existen diversas hipótesis sobre la organización y estructura de la memoria aunque en general existe una organización básica admitida. La memoria se puede clasificar según diversos parámetros, como se resume en la figura 4.

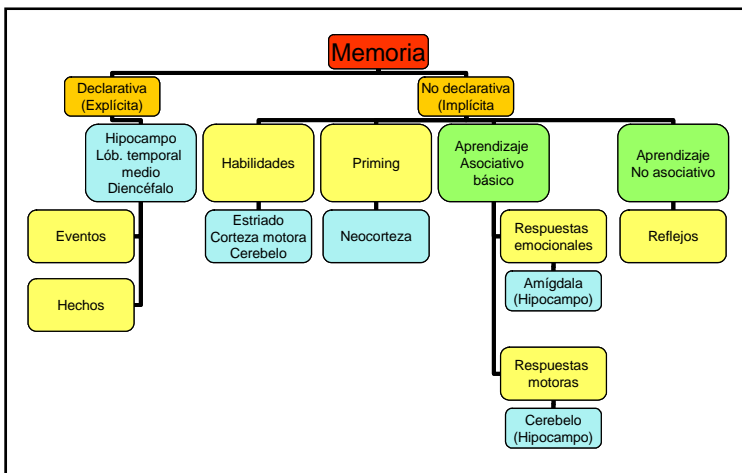


Fig. 4. Clasificación de la memoria. La memoria se divide en dos tipos según su función (naranja). Cada una requiere una entrada sensorial de datos de diferente tipo durante el proceso de aprendizaje, será origen de diferentes tipos de comportamientos (amarillo) y se fundamenta en diferentes sustratos neurales (azul) (Kandel *et al.*, 2000; Robertson, 2002).

Cada tipo de aprendizaje y memoria depende de un sustrato neural más o menos específico, aunque en el sistema nervioso los circuitos están interconectados. En nuestras investigaciones, hemos empleado tareas cuyo sustrato principal parece ser el cerebelo.

1.4.1.1. Papel del cerebelo en los procesos de aprendizaje y memoria

Sabemos que el cerebelo está implicado en el aprendizaje de respuestas adquiridas por condicionamiento clásico. Observaciones clínicas realizadas desde hace décadas han mostrado que el cerebelo es la estructura responsable de regular el movimiento coordinado y el control motor (Schmahmann, 1991; Snider *et al.*, 1976). Más allá de la regulación, el cerebelo tiene un papel en el aprendizaje de las conductas motoras (Kim *et al.*, 1994), e igualmente está implicado en la memoria de trabajo y las memorias implícita y explícita (Desmond *et al.*, 1997; Wiggs *et al.*, 1999). También se ha postulado la implicación del cerebelo en algunas actividades cognitivas no motoras (Arriada-Mendicoa *et al.*, 1999).

1.4.1.2. Estructura del cerebelo

Como hemos comentado en el apartado 1.2.1, el metilmercurio y otras sustancias neurotóxicas parecen tener como diana preferente las neuronas granulares de cerebelo. Estas neuronas se encuentran en la corteza cerebelosa, formada por una delgada capa superficial muy plegada formando los lobulillos, las láminas y las laminillas. La corteza está constituida por tres capas. La más externa es la capa molecular, la media es la capa de las neuronas de Purkinje y la interna es la capa granular. (Figura 5)

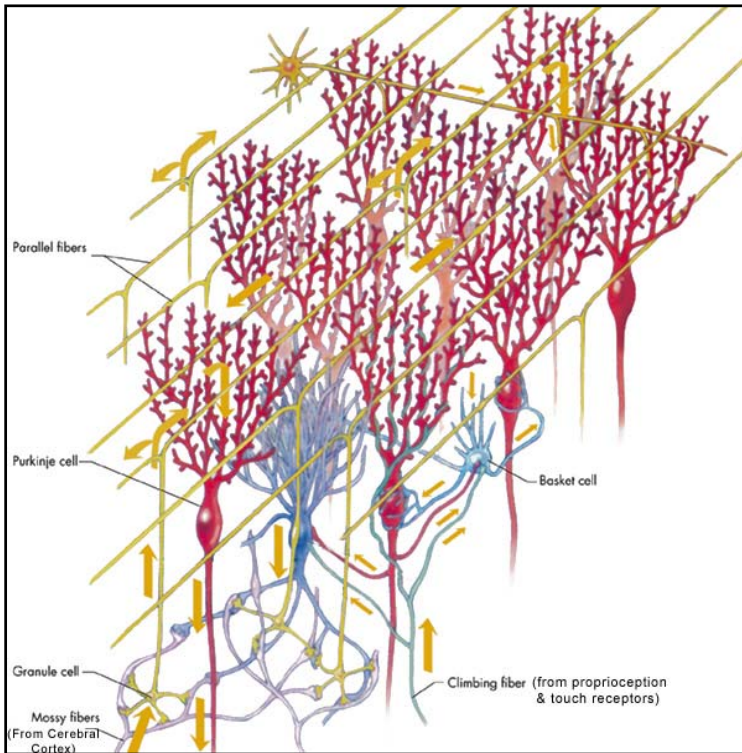


Fig. 5. Representación de la composición neuronal de la corteza del cerebelo. (Kalat, 2001)

La capa molecular tiene dos tipos de neuronas: las células estrelladas que son más externas y las células en canasto ubicadas más internamente. Estas neuronas son poco numerosas y se encuentran distribuidas entre las arborizaciones dendríticas de las neuronas de las capas más profundas y las fibras paralelas. La capa de las células de Purkinje la forma un sólo estrato de neuronas. Las dendritas de estas neuronas se expanden como en abanico en la capa molecular transversalmente al eje longitudinal de la laminilla cortical.

La capa granular está llena de numerosas neuronas pequeñas con el núcleo densamente teñido y escaso citoplasma. Por ello se llaman células granulares. Además se encuentran algunas neuronas tipo golgi que arborizan sus dendritas en la capa molecular y cuyos axones establecen sinapsis con las dendritas de las células granulares. Los axones de las células granulares se dirigen a la capa molecular donde se bifurcan en forma de T para constituir las fibras paralelas cuyo recorrido es longitudinal respecto del eje de las laminillas de la corteza. Estos axones conectan con las dendritas de las células de Purkinje. Los axones de las células de Purkinje se proyectan hacia la sustancia blanca hasta llegar los núcleos intra-cerebelosos (Kalat, 2001).

1.4.2 Tests de aprendizaje que requieren memoria espacial

Los animales necesitan para su supervivencia disponer de un buen sistema de orientación espacial para encontrar el alimento y agua en determinados lugares. Para ello desarrollan estrategias de navegación que les permiten localizar y memorizar el lugar donde se encuentra la comida o el agua. El paso final es la construcción de mapas cognitivos del entorno interpretando la información sensorial captada durante la exploración.

La orientación espacial se puede investigar en roedores en el laboratorio realizando diferentes tipos de test que nos permiten estudiar los mecanismos de este tipo de memoria. Los más empleados para evaluar la capacidad de memoria espacial del animal son: el laberinto radial de 8 brazos, el laberinto en T, el laberinto acuático de Morris y el laberinto en forma de Y.

En el laberinto radial de 8 brazos, la ejecución de la tarea requiere un tipo de memoria espacial cuyo sustrato es esencialmente en el hipocampo (Magni *et al.*, 1979). Se trata de un test sensible a la edad y al daño en esta área cerebral. El procedimiento es sencillo: al comienzo de cada ensayo se colocan pequeñas dosis de comida al final de cada uno de los brazos y se permite al animal explorar el laberinto hasta que ha recogido la comida de todos los brazos. Con la práctica, los animales aprenden a obtener la comida en el menor número de visitas posible (determinado por el número total de brazos con comida), entrando a cada brazo sólo una vez, incluso si se les impide utilizar la estrategia de girar sistemáticamente hacia cada brazo consecutivo. La tarea requiere la habilidad de llevar un registro de los brazos visitados en cada ensayo (memoria de trabajo) para poder realizar futuras elecciones de brazos diferentes.

El laberinto en T es otro tipo de test que evalúa la memoria espacial (Patel *et al.*, 1998). El animal debe explorar el ambiente que le rodea y aprender en qué brazo está localizada la comida. Es similar a la tarea de discriminación condicional en el laberinto en Y descrita en el apartado siguiente. Es sensible a los efectos de lesiones en varias áreas del cerebro, particularmente en el hipocampo, y a los de numerosas drogas o toxinas que pueden mejorar o empeorar la memoria espacial.

El laberinto acuático de Morris es el test más utilizado para investigar aspectos específicos de la memoria espacial (Morris *et al.*, 1986). En este test el roedor se coloca en una piscina redonda de diámetro específico (1 m para ratones y 2 m para ratas) en la que hay una plataforma escondida a pocos centímetros bajo la superficie del agua que el animal debe encontrar. En este caso el incentivo no es comida, sino el poder apoyarse y dejar de nadar. Con los

sucesivos ensayos, deberá aprender dónde está localizada la plataforma y nadar directamente hacia ella. Este test permite numerosas variantes de protocolo, por lo que es útil en el estudio de diversas alteraciones en el aprendizaje y es muy sensible a los efectos del envejecimiento.

1.4.3 Tarea de discriminación condicional en un laberinto en forma de Y

El laberinto en Y es la tarea de discriminación condicional visuoespacial que hemos elegido en este trabajo para evaluar los efectos de la exposición perinatal a las sustancias neurotóxicas seleccionadas sobre la capacidad de aprendizaje.

El procedimiento de este test es descrito con detalle en el apartado de métodos. Se realiza en un laberinto de madera con forma de Y en el cual uno de los brazos es el brazo de salida, donde se coloca al animal, y los otros dos son los brazos de elección, de manera que en función del color del laberinto (blanco o negro) la comida se colocará al final de uno u otro brazo (Figura 6). El objetivo del test es el aprendizaje de la asociación entre el color de las paredes del laberinto y el brazo en el que encontrará la comida. Es una tarea de discriminación porque el sujeto (la rata) aprende a desarrollar la estrategia para orientarse en su medio basada en un estímulo condicional (color de los paredes del laberinto) (Aguilar *et al.*, 2000).

Este test ha sido utilizado en nuestro laboratorio en la investigación de los mecanismos de alteraciones cognitivas en la encefalopatía hepática. Estudios previos mostraron que la hiperamonemia crónica causada por el fallo hepático disminuye la capacidad de aprendizaje de esta tarea de discriminación

condicional (Aguilar *et al.*, 2000). También ha sido una herramienta útil en la investigación de posibles fármacos que reviertan las alteraciones cognitivas asociadas a la encefalopatía hepática (Erceg *et al.*, 2005a; Erceg *et al.*, 2005b) y en el estudio de las alteraciones cognitivas provocadas por otra sustancia neurotóxica, la hexanodiona (Hernandez-Viadel *et al.*, 2003).

Todos estos estudios indican que la capacidad de aprendizaje de esta tarea está modulada por la función de la vía Glu-NO-GMPC asociada a receptores de glutamato tipo NMDA.

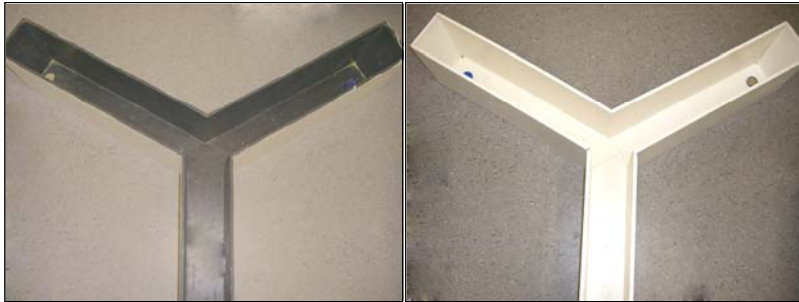


Fig. 6. Laberinto en Y. El color de las paredes está asociado con el brazo que contiene el premio.

1.5. LA NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN PROCESOS DE APRENDIZAJE.

Los principales neurotransmisores en el sistema nervioso central son aminoácidos, como el glutamato, el ácido gamma-aminobutírico (GABA) o la glicina. El glutamato es responsable de un tercio de la neurotransmisión sináptica excitadora, siendo así el principal neurotransmisor excitador, y es utilizado por las principales vías neuronales del cerebro, mientras que el GABA es liberado por un

30-40% de las sinapsis, siendo principal neurotransmisor inhibitorio. En el caso del cerebelo, la mayoría de las neuronas son glutamatérgicas (neuronas granulares). El glutamato liberado actúa sobre diversos subtipos de receptores presinápticos y postsinápticos (Delgado *et al.*, 1998).

1.5.1 Receptores de glutamato

Los receptores de glutamato son una familia muy heterogénea de proteínas de membrana particularmente abundantes en corteza cerebral, hipocampo, ganglios basales y en el cerebelo. Existen dos clases principales de receptores de glutamato: ionotrópicos y metabotrópicos.

1.5.1.1. Receptores metabotrópicos de glutamato

Los receptores metabotrópicos son proteínas transmembrana y no canales iónicos, aunque indirectamente pueden actuar sobre estos últimos. Existen varias clases que se diferencian en su localización, afinidades por diferentes ligandos y por las vías de transducción de señales que activan. Estos receptores transducen la señal a través de proteínas G, denominadas así por su actividad GTPasa, que a su vez modulan la actividad de diferentes proteínas efectoras intracelulares (Gudermann *et al.*, 1995). Existen 2 tipos de proteínas G: las monoméricas y las heteroméricas. Estas últimas están formadas por tres subunidades distintas llamadas α , β y γ , y son las que se activan por receptores acoplados a proteínas G o RAPG, grupo al que pertenecen estos receptores de glutamato (Gudermann *et al.*, 1995; Nurnberg *et al.*, 1995).

Los receptores metabotrópicos de glutamato tienen una estructura de 7 segmentos transmembrana y un extremo amino

terminal extracelular bastante grande que los diferencia del resto del grupo de RAPG (Gudermann *et al.*, 1995; Pin y Bockaert, 1995). Es en este extremo amino terminal donde se cree que se une el glutamato y está implicado en la selectividad de los diferentes agonistas no fisiológicos. El extremo carboxiterminal es intracelular, de longitud variable según el tipo de receptor y está implicado en la interacción con proteínas de las vías de transducción de señales intracelulares (Bockaert *et al.*, 1993; Pin y Bockaert, 1995).

1.5.1.1. Receptores ionotrópicos de glutamato

Los receptores iónotropicos son canales regulados por ligando. La unión del neurotransmisor o agonista al receptor provoca la apertura del canal con el consiguiente paso de los iones. Existen tres tipos de receptores ionotrópicos de glutamato denominados según el agonista que los activa:

1. Receptores NMDA (N-metil -D-aspartato)
2. Receptores AMPA (ácido-amino-3 hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato)
3. Receptores de kainato.

En esta tesis nos hemos centrado únicamente en la transducción de señales asociada a los receptores NMDA.

Los receptores NMDA son abundantes en el sistema nervioso y están implicados en importantes procesos cerebrales como el aprendizaje o la memoria (Ozawa *et al.*, 1998). También están implicados en procesos patológicos como los mecanismos de degeneración y muerte neuronal, en situaciones como la isquemia y en algunas enfermedades neurodegenerativas (Mori y Mishina, 1995).

El receptor NMDA es una proteína muy compleja que posee una serie de características distintivas que lo hacen único entre todos los tipos de receptores iónotropicos (Figura 7). Una de ellas, quizás la más relevante, es su alta permeabilidad al Ca^{2+} . En condiciones de potencial de reposo o hiperpolarización, el canal iónico del receptor está ocupado por Mg^{2+} , que lo bloquea impidiendo el flujo iónico. Solamente cuando se despolariza la membrana se libera el Mg^{2+} y el canal permite el paso de los iones Ca^{2+} , además de Na^+ y K^+ , por lo que su activación conduce a un aumento del Ca^{2+} intracelular. Para la apertura de canal se precisa, además de glutamato, la presencia de un coagonista, el aminoácido glicina (Moriyoshi *et al.*, 1991; Ozawa *et al.*, 1998). Ciertas poliaminas, al igual que la glicina, modulan positivamente el canal, mientras que el Zn^{2+} o un exceso de protones lo modulan negativamente (Mori y Mishina, 1995; Moriyoshi *et al.*, 1991; Sucher *et al.*, 1996).

El receptor NMDA se forma por la combinación de 5 subunidades no homólogas que forman en el centro el canal por el que pasarán los iones cuando se active el receptor. Estas subunidades se clasifican en tres grupos: NR1, NR2 y NR3. La subunidad NR1 posee todas las propiedades fundamentales necesarias para constituir un canal funcional sin intervención de otros tipos de subunidad y puede tener 8 variantes de procesamiento alternativo de un mismo gen. La subunidad NR2 se clasifica en 4 subtipos denominados NR2A, NR2B, NR2C, NR2D codificados por genes diferentes (Dunah *et al.*, 1999; Mori y Mishina, 1995). Cada subunidad contiene 3 segmentos transmembrana (M1, M3 y M4) y un segmento embebido en la membrana pero que no llega

a cruzarla llamado M2. Se cree que es este segmento el que forma parte del canal iónico debido a su alto contenido en aminoácidos polares. Cada subunidad contiene un extremo amino terminal extracelular y el extremo carboxi terminal citoplásmico (Dunah, 1999; Ozawa, 1998).

El receptor NMDA se encuentra distribuido por todo el cerebro, aunque la composición de subunidades varía según las distintas regiones cerebrales y con el estadio de desarrollo. La subunidad NR1 es ubicua en el cerebro de rata adulta, sin embargo, la distribución de las subunidades NR2 es más variable: las subunidades NR2B y NR2D se expresan prenatalmente, mientras que NR2A y NR2C empiezan a expresarse alrededor del nacimiento y en muchas ocasiones sustituyen a las primeras. NR2A se expresa en casi todas las regiones del cerebro adulto, NR2C casi exclusivamente en el cerebelo, NR2B se expresa principalmente en el hipocampo, corteza y bulbo olfatorio y la NR2D a niveles muy bajos en tálamo y bulbo olfatorio (Mori y Mishina, 1995; Ozawa *et al.*, 1998). La función y propiedades fisiológicas del receptor NMDA dependen en gran medida de la composición de subunidades del receptor.

1.5.2 *La vía de transducción de señales glutamato - óxido nítrico - GMPc.*

La vía de transducción de señales Glutamato (Glu)-óxido nítrico (NO)-GMP cíclico (GMPc) (Figura 8) asociada al receptor NMDA modula importantes procesos cerebrales como comunicación intercelular, control de ritmos circadianos y potenciación a largo plazo, un proceso considerado la base de algunas formas de aprendizaje y memoria (Boulton *et al.*, 1995; Hawkins, 1996). Esta vía parece ser una diana importante para diversos agentes neurotóxicos. El aluminio o el amonio alteran la transmisión glutamatérgica, afectando al funcionamiento de la vía tanto en cultivos primarios de neuronas de cerebelo como en el cerebelo de rata *in vivo* (Cucarella *et al.*, 1998; Hermenegildo *et al.*, 1998; Llansola *et al.*, 1999).

Como ya hemos mencionado, la activación del receptor NMDA conduce a un aumento del Ca^{2+} intracelular, que modula la actividad de diversas enzimas y proteínas dependientes de Ca^{2+} , activando las diversas vías de señalización intracelular. El Ca^{2+} se une, entre otras proteínas, a la calmodulina que se encuentra en la densidad postsináptica (Zhang *et al.*, 1998), formando un complejo Calcio-calmodulina que activa diferentes enzimas, incluyendo la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) que sintetiza óxido nítrico a partir de L-arginina (Garthwaite *et al.*, 1988; Kiedrowski *et al.*, 1992; Rodriguez-Alvarez *et al.*, 1996). El óxido nítrico a su vez activa la guanilato ciclasa soluble al unirse al grupo hemo, aumentando la formación de GMPc. El óxido nítrico es un gas y puede difundir a través de la membrana plasmática y entrar en células vecinas activando la guanilato ciclasa de las mismas.

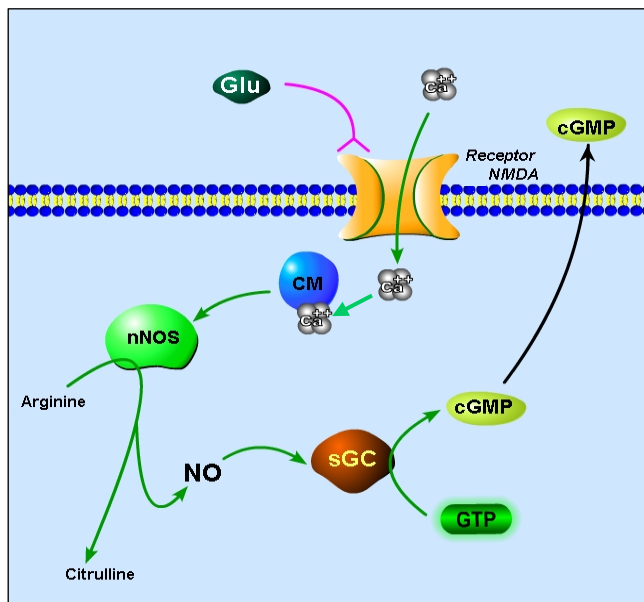


Fig. 8. Vía Glutamato - NO - GMPc. La activación del receptor NMDA induce la entrada de Ca^{2+} a través del mismo. Este Ca^{2+} se une a calmodulina y activa la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). La nNOS genera óxido nítrico y citrulina a partir de arginina. El óxido nítrico activa la guanilato ciclasa soluble que produce GMPc a partir de GTP. El GMPc es un segundo mensajero implicado en diversas cascadas de señalización. Parte de este GMPc saldrá al exterior de la célula.

La guanilato ciclasa soluble es una hemoproteína heterodimérica constituida por una subunidad α y otra β , ambas necesarias para la actividad de la enzima. Esta enzima cataliza la conversión de guanosín trifosfato (GTP) a guanosín 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) (Harteneck *et al.*, 1990; Kamisaki *et al.*, 1986). Cuando el óxido nítrico se une al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble se producen cambios conformacionales en la enzima que aumentan su actividad hasta 400 veces (Humbert *et al.*, 1991; Stone y Marletta, 1996). El GMPc formado actúa como segundo mensajero y es una molécula señalizadora importante en las células eucariotas.

Parte del GMPc producido al activarse la vía Glu-NO-GMPc se libera al medio extracelular y puede ser medido mediante técnicas de microdiálisis cerebral *in vivo*. (Figura 8).

1.5.3 Papel de la vía Glu-NO-GMPc en procesos de aprendizaje y memoria

Diversos estudios han demostrado que la vía Glu-NO-GMPc está implicada en algunas formas de aprendizaje y de formación de memoria (Chen *et al.*, 1997; Danysz *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1998).

La administración de antagonistas del receptor NMDA tanto competitivos como no competitivos alteran los procesos de aprendizaje y memoria de algunas tareas concretas (Maurice *et al.*, 1994; Parada-Turska y Turski, 1990). En particular, la administración de antagonistas del receptor NMDA durante la fase de preentrenamiento altera el aprendizaje del test de evitación pasiva, (Riekkinen *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997), evitación activa, tareas visuo-espaciales (Murray y Ridley, 1997), tareas de condicionamiento clásico (Xu, 1997) y Laberinto en T (Patel *et al.*, 1998). Igualmente, la administración de los antagonistas después del entrenamiento disminuye la capacidad para aprender tareas espaciales en el laberinto acuático de Morris (Packard y Teather, 1997) y tareas de evitación pasiva y activa (Cestari y Castellano, 1997).

Existen también estudios genéticos que apoyan el papel de los receptores NMDA en ciertos tipos de aprendizaje (Huerta *et al.*, 2000; McHugh *et al.*, 1996; Rampon *et al.*, 2000; Tsien *et al.*, 1996).

Siguiendo la cascada de señalización de la vía, se ha sugerido que el NO juega un papel importante en los mecanismos de plasticidad sináptica y en la formación de la memoria espacial

(Chapman *et al.*, 1992; Yamada *et al.*, 1995) y diversos estudios realizados con ratas apoyan esta teoría. La inhibición de la óxido nítrico sintasa reduce el aprendizaje de diversas tareas espaciales como el 14-unit T-maze (Ingram *et al.*, 1998a; Ingram *et al.*, 1998b) o el laberinto radial (Zou *et al.*, 1998). También altera la memoria implicada en el reconocimiento de objetos (Prickaerts *et al.*, 2002) y el aprendizaje de tareas de evitación pasiva (Myslivecek, 1997).

Por último, el GMPc parece estar implicado en procesos tempranos de consolidación de la memoria (Bernabeu *et al.*, 1996; Bernabeu *et al.*, 1997). La microinyección bilateral intrahipocampal de un análogo de GMPc capaz de atravesar la membrana plasmática mejora el aprendizaje de una tarea de evitación pasiva (Bernabeu *et al.*, 1996) y, en cambio, un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble causa amnesia para dicha tarea cuando se administra inmediatamente después del entrenamiento (Bernabeu *et al.*, 1997). La administración de Zaprinast, un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa que degrada GMPc (PDE5 y 9) facilita la tarea de reconocimiento de objetos (Prickaerts *et al.*, 2002). El mismo grupo también mostró que la microinyección de 8-Br-GMPc en el hipocampo dorsal mejora tarea del reconocimiento de objetos (Prickaerts *et al.*, 2002). Estos datos indican que el GMPc formado por la guanilato ciclasa en respuesta al NO juega un papel en determinados tipos de aprendizaje.

Los efectos que producen algunas sustancias neurotóxicas sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc se han estudiado con anterioridad. Por ejemplo, Hernandez-Viadel *et al.* (2003) analizaron mediante microdiálisis cerebral el funcionamiento de esta vía en cerebro *in vivo* en ratas expuestas crónicamente a hexanodiona. En este estudio, la administración de NMDA a través de la sonda para

activar la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc produjo un aumento de GMPc extracelular significativamente menor en las ratas tratadas crónicamente con hexanodiona que en las ratas control. La exposición crónica a hexanodiona indujo también una disminución significativa de la capacidad para aprender el test de discriminación condicional del laberinto en Y.

Se ha analizado también por microdiálisis cerebral la función de la vía en cerebro *in vivo* en modelos de fallo hepático e hiperamonemia crónicos en ratas. Tanto el fallo hepático (modelo quirúrgico de anastomosis porta-cava) como la hiperamonemia crónica, causada por dieta conteniendo amonio, disminuyen la función de la vía Glu-NO-GMPc (Hermenegildo *et al.*, 1998; Monfort *et al.*, 2001) y la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y.

Los resultados obtenidos en diferentes modelos sugerían que la disminución de la función de la vía y, en consecuencia, de la formación de GMPc estaba implicada en la disminución de la capacidad de aprendizaje de esta tarea. Nuestro grupo formuló la hipótesis de que la normalización de los niveles de GMPc podría recuperar la capacidad de aprendizaje en modelos con función disminuida de la vía. Estudiamos por tanto esta hipótesis utilizando inhibidores de fosfodiesterasas (sildenafil y zaprinast). Las fosfodiesterasas son las enzimas responsables de degradar el GMPc y disminuir su concentración en la célula. El aumento del GMPc intracelular tras la inhibición de fosfodiesterasas restauró la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y de los animales tratados (Erceg *et al.*, 2005a; Erceg *et al.*, 2005b).

1.6. LAS NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO EN CULTIVO COMO MODELO PARA INVESTIGAR LOS MECANISMOS DE LAS ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN DE LA VÍA GLU-NO-GMPc.

Uno de nuestros objetivos en la realización de esta tesis fue determinar si cultivos de neuronas de cerebelo con metilmercurio y/o PCBs reproducen las alteraciones en la función de la vía Glu-NO-GMPc encontradas en los experimentos realizados *in vivo* y evaluar la utilidad de estos cultivos como modelo para la investigación de los mecanismos por los que los compuestos estudiados afectan a la vía. La elección de las células granulares de cerebelo se debe a que se trata de un tipo de neurona glutamatérgica y mayoritaria en el cerebelo. Como hemos mencionado con anterioridad, parecen ser una diana preferente del metilmercurio *in vivo*. Estos cultivos han sido utilizados en el estudio de los mecanismos de neurotoxicidad de muchas sustancias incluyendo el aluminio (Canales *et al.*, 2001), el metilmercurio (Park *et al.*, 1996; Sakaue *et al.*, 2005) o la hexanodiona (Hernandez-Viadel *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Durante los últimos años se ha puesto claramente de manifiesto que la exposición a sustancias contaminantes presentes en la cadena alimentaria tiene efectos deletéreos sobre la salud humana. Como hemos comentado en la Introducción, diversos estudios han mostrado que la exposición de madres gestantes o lactantes a contaminantes orgánicos persistentes (persistent organic pollutants o POPs) tiene consecuencias sobre el desarrollo cerebral de sus hijos que se manifiestan a corto o a largo plazo y conducen a alteraciones en la función cognitiva y en la actividad y coordinación motoras. Entre los contaminantes de la cadena alimentaria son especialmente preocupantes por su neurotoxicidad y por su bioacumulación los bifenilos policlorados (PCBs) y el metilmercurio. Los PCBs se clasifican en dos tipos principales: “dioxin-like” y “non dioxin like”. Los “dioxin-like”, como el PCB126, son muy tóxicos. No se conoce bien el grado de toxicidad de los “non-dioxin like”, como el PCB153, ni si tienen mecanismos de toxicidad similares o no a los de los “dioxin-like”.

Por otra parte, los PCBs y el metilmercurio se encuentran muchas veces presentes conjuntamente en la cadena alimentaria, especialmente en algunos tipos de pescado. No se conocen los mecanismos por los que estos compuestos conducen a las alteraciones en la función cognitiva y motora. Tampoco se sabe si la exposición a alimentos que contienen ambos tipos de sustancias conjuntamente produce efectos diferentes que los que contienen únicamente uno de los contaminantes. Además, no está claro si los efectos de la exposición perinatal se mantienen a largo plazo durante la juventud ó la madurez. Por último, algunos PCBs son disruptores endocrinos, por lo que pueden tener efectos diferentes en machos y en hembras.

En base a la información disponible, resumida en la Introducción, partimos de las siguientes HIPÓTESIS:

1. La exposición de ratas durante la gestación y lactancia a PCBs, metilmercurio o sus combinaciones deben producir en las crías un deterioro en la función cognitiva similar a la que producen en humanos expuestos a las mismas sustancias durante el mismo periodo de desarrollo (por ejemplo en las islas Feroe).

2. El deterioro en la función cognitiva podría ser consecuencia de alteraciones en la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en cerebro.

3. Los efectos sobre la función cognitiva pueden ser diferentes cuando las ratas perinatalmente expuestas a los contaminantes son jóvenes (3 meses) que cuando son maduras (8 meses).

4. Los efectos sobre la función cognitiva pueden ser diferentes en ratas macho y en ratas hembra.

5. Los cultivos primarios de neuronas de cerebelo podrían ser un buen modelo que reproduzca las alteraciones inducidas por los contaminantes en la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en cerebro. Si es así, serían un modelo útil para estudiar los mecanismos moleculares por los que los contaminantes afectan la función de la vía.

Los OBJETIVOS de este trabajo son:

1. Estudiar los efectos de la exposición de ratas durante el periodo de gestación y lactancia a PCBs “dioxin-like” (PCB126) o “non-dioxin-like” (PCB153), a metilmercurio o a mezclas de los PCBs con el metilmercurio sobre la capacidad de aprendizaje de las crías.

2. Estudiar los mecanismos moleculares responsables de las alteraciones en la capacidad de aprendizaje. En particular estudiar el efecto sobre la función de la vía de transducción de señales glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en cerebelo *in vivo* por microdiálisis cerebral.

3. Determinar si la exposición perinatal a combinaciones de MeHg con PCB153 ó PCB126 produce efectos similares o diferentes que la exposición individual a cada una de las sustancias sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc y la capacidad de aprendizaje.

4. Determinar si los efectos de la exposición perinatal a los PCBs, el metilmercurio o sus combinaciones sobre la capacidad de aprendizaje y sobre la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico *in vivo* son similares o no cuando las ratas tienen 3 u 8 meses de edad.

5. Determinar si los efectos de la exposición perinatal a los PCBs, el metilmercurio o sus combinaciones sobre la capacidad de aprendizaje y sobre la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico *in vivo* son similares o no en ratas macho y en ratas hembra.

6. Comprobar si los cultivos primarios de neuronas de cerebelo son un buen modelo para estudiar los mecanismos moleculares por los que los PCBs y/o el metilmercurio alteran la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico y la capacidad de aprendizaje. Estudiar si el tratamiento crónico *in vitro* de las neuronas con estas sustancias produce en ellas las mismas alteraciones en la vía encontradas en cerebro *in vivo* de los animales expuestos perinatalmente.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

1.7. MATERIAL

Todas las siglas y abreviaturas que aparecen a lo largo de los siguientes apartados aparecen explicadas en la lista correspondiente al inicio de la tesis.

Salvo indicación contraria, los productos químicos empleados para las soluciones y tampones son de la casa MERK (Darmsatdt, Alemania).

1.7.1 Productos y material fungible

- A las ratas hembra preñadas se les administraron los productos enumerados a continuación según el procedimiento descrito en el apartado 3.2.1.1:

- Metilmercurio (Sigma)
- PCB153 (Fluka)
- PCB126 (Larodan Fine Chemicals AB)
- Transgel® (Charles River Labs)
- DMSO (Sigma)
- Aceite de Maíz (Artúa)

- Durante los experimentos de aprendizaje las ratas fueron premiadas con pellets de precisión (bolitas de comida) de $\varnothing = 0,5$ cm. de la casa BioServ.

- La cirugía y los experimentos de microdiálisis cerebral se realizaron con el siguiente material:

- Halotano (Astro Zeneca)
- Cemento dental (Selecto)
- Guías de microdiálisis (CMA/12 guide cannula; CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Sweden)
- Tornillos de $\varnothing = 2\text{mm}$ (Fine Science tools)
- Instrumental quirúrgico estándar (bisturís, pinzas, tijeras, sutura...)
- Manguera de microdiálisis para conducción de fluido y conectores a jeringas e inyectores (BASi, West Lafayette, IN, USA)
- Sondas de microdiálisis con membrana de policarbonato con diámetro de poro para 20kDa (CMA/12; 3 mm de longitud, 500 μm de \varnothing externo)

- Para la realización de los cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo y experimentos con las mismas se utilizó:

- Medio Basal Eagle, (BME) de Gibco, sin glutamina.
- Glutamina (Gibco)
- Gentamicina (MP Biochemicals)
- Suero Fetal Bovino (Gibco)
- Polilisina (Sigma)
- DNAsa I (Roche Diagnostics GmbH)
- Dispasa II (Roche Diagnostics GmbH)

- Citosín-β-arabinofuranósido (Sigma)
- Glucosa (D-Glucosa monohidratada, Merk)
- Dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma)
- Diacetato de Fluoresceína, FDA (Sigma)
- Yoduro de propidio, PI (Sigma)
- Pipetas (Sarstedt)
- Frascos, tubos y placas de cultivo (Orange y Corning)
- SNAP (S-nitroso-amino-penicilamina, Molecular Probes)
- Rascadores de placas (Corning)

Se realizaron “immunoblottings” tanto de áreas cerebrales de animales expuestos perinatalmente a los neurotóxicos como de neuronas de cerebelo *in vitro*. Se empleó lo siguiente:

- Membranas de PVDF para western blot (Westran[®] S, Whatman[®] Schleicher y Schuell)
- Acrilamida (BioRad)
- TEMED (Sigma)
- APS (Biorad)
- Seroalbúmina bovina, BSA (Sigma).
- Nitro Blue Tetrazolium, NBT (Sigma), stock de 50 mg/ml en dimetilformamida (Sigma) al 70%
- Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, BCIP (Sigma), stock de 50 mg/ml en dimetilformamida (Sigma).

Algunos productos fueron comunes a varios tipos de experimentos y se enumeran a continuación:

- Kits de ELISA para medir GMPc BIOTRAK (GE Healthcare)
- NMDA (N-metil-D-aspartato; Sigma, St. Louis, Missouri, USA)
- Placas de ELISA de 96 pocillos (Corning)
- Kit para medir concentración de proteínas: BCA™ Protein Assay (Pierce)

1.7.2 Aparatos

Además de la dotación habitual de laboratorio (pipetas, balanzas, medidores de pH, recipientes, centrífugas, agitadores...) para la realización de los experimentos se emplearon los siguientes aparatos y piezas:

- Laberinto en Y. (Construcción por encargo)
- Sistema de anestesia con halotano (MSS, USA)
- Un sistema para cirugía esterotáxica (David Kopf Instruments, Tujunga, CA)
- Microscopio de cirugía.
- Cinco sistemas para microdiálisis cerebral en rata *in vivo* (BASi Beekeeper; Bionalytical Systems, Lafayette, IN, USA)
- Cinco Bombas de microperfusión (BASi Baby Bee; Bionalytical Systems, Lafayette, IN, USA)
- Cinco cambiadores de jeringas (CMA/Microdiálisis AB, Stockholm, Sweden)

- 10 jeringas de vidrio para microdiálisis (BASi Beekeeper, Lafayette, IN)
- Campana de flujo laminar tipo II “Bio-II-A” (Telstar)
- Incubador para cultivos celulares “Series II Water Jacketed CO₂ incubator” (ThermoForma)
- Espectrofotómetro (Multiskan Ascent; Thermo)
- Microscopio de fluorescencia Zeiss Axioscop 2 Plus.

1.7.3 *Animales*

Para la realización de los experimentos se emplearon ratas Wistar Hannover. Estas ratas debían estar expuestas durante la gestación y lactancia a los diferentes tóxicos seleccionados, por lo que se criaron en el animalario del propio Instituto. Para ello, ratas hembra procedentes de Charles River Laboratories fueron cruzadas en nuestro animalario con machos sementales. Las hembras preñadas fueron expuestas durante la gestación y lactancia a los tóxicos a través del agua y la comida tal y como se describe en el apartado 3.2.1.1 y sus crías fueron destinadas a la realización de experimentos *in vivo* al alcanzar la edad de 3 u 8 meses. Las camadas de otros grupos de hembras se destinaron a la realización de cultivos primarios de neuronas de cerebelo cuando alcanzaron los 7 días de edad, como se describe en el apartado 3.2.2.1. Todos los animales se mantuvieron alojados con periodos alternativos de luz durante 12 horas y oscuridad 12 horas, temperatura controlada (20-22 °C) y con acceso a agua y comida *ad libitum*. En los casos indicados el agua contenía el tratamiento con metilmercurio. Los PCBs se administraron a través de una porción de aproximadamente 1,5 cm³ de Transgel® (ver la sección productos y métodos).

1.8. MÉTODOS

1.8.1 Métodos empleados en los experimentos realizados in vivo.

1.8.1.1. Selección de la dosis de MeHg utilizada en los estudios in vivo

Todavía existe controversia entre los expertos respecto a los umbrales de toxicidad de esta sustancia para diferentes parámetros del neurodesarrollo humano, ya que la exposición humana es muy variable según regiones y estilo de vida, y existen factores relacionados con el tipo de alimentación, entorno familiar y de tipo cultural que parecen tener influencia en los datos. La recopilación de datos en diversos informes de organismos gubernamentales (Washington Department of Health, 1999) muestra que algunas poblaciones isleñas están expuestas a 10-20 ppm (mg/Kg/día) lo que, según un estudio llevado en las Seychelles en autopsias neonatales daría un contenido medio de MeHg en cerebro de 300 ppb (ug/Kg), sin daños histológicos aparentes (Lapham *et al.* 1995). En realidad, la mayor parte de la población nunca se ve expuesta a estos niveles, sino a dosis muy por debajo, rondando los 0,5-1 mg/Kg en zonas consideradas ya “contaminadas”. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, uno de los organismos íntimamente ligados a la evaluación de riesgos de este tipo, estableció una dosis máxima segura de exposición en humanos de 0.3-1 ug/kg/day (US EPA, ATSDR 1999), que aún en la actualidad está siendo discutida. Como contraste, sabemos que la exposición media a MeHg en la bahía de Minamata en los años 50 fue de 200 ppm (200 mg/Kg/día).

En los estudios con ratas ha habido hasta ahora bastante consenso respecto a la dosis adecuada para el estudio de efectos neurológicos de la exposición prenatal a MeHg. Se seleccionan dosis superiores a las consideradas “seguras”, pero similares a las que algunas poblaciones humanas se ven expuestas crónicamente. Algunos autores optan por 0,375 mg/Kg y día (Szasz *et al.* 1999; Vilagi *et al.* 2000) para estudios de electrofisiología, Rossi *et al.* (1997) y Gimenez-Llort *et al.* (Gimenez-Llort *et al.* 2001) coinciden en la dosis, siendo 0,5 mg/Kg/día y Kakita *et al.* administraron a las madres 1 mg/Kg/día para estudios de alteraciones locomotoras en las crías expuestas. Según Goldey *et al.* (1995), dosis por debajo de 1 mg/Kg/día no causan efectos adversos en cuanto a supervivencia de las crías, cambios de peso o alteraciones apreciables en el comportamiento normal de las ratas si no se aplican tests específicos. Según Rossi *et al.* (1997) 0,5 mg/Kg/día de MeHg administrado a la madre durante la gestación produce unos niveles de aproximadamente 1 ug/g de tejido en el cerebelo de las crías a los 7 días de edad. Nosotros seleccionamos 0,5 mg/Kg y día por ser esta una dosis baja similar a la encontrada en algunos estudios de exposición humana y adecuada para estudios crónicos de toxicidad prenatal en animales.

1.8.1.2. Selección de las dosis de PCB153 y PCB126 utilizadas en los estudios *in vivo*

Como se ha comentado anteriormente, la exposición en humanos a PCBs nunca se da a un solo contaminante puro, sino a mezclas. Casi todos los estudios llevados a cabo sobre exposición humana a estos contaminantes tienen en cuenta el conjunto o determinan algunos PCBs “frecuentes” para estimar la exposición a la familia de PCBs en general, por lo que es sumamente complicado

extraer de estos datos una dosis de exposición en la población a los PCBs estudiados en este trabajo. Existen sin embargo algunos datos que se refieren en particular al PCB153 y al PCB126.

Según un informe de la US EPA (ATSDR,2000), en 1999 se cuantificaban entre 2 y 4 ug/l de PCBs (sin especificar) en suero de la población norteamericana de regiones lacustres. Hasta 1993 se midió la presencia de varios congéneres de la familia PCBs en muestras de leche materna en diferentes países industrializados y la media para PCB153 fue de 200 ng/g de grasa y para el PCB126, 90 ng/g de grasa (informe de la WHO, (Faroon *et al.* 2003). En la década de los 90, la media de PCB153 en suero entre diversos estudios llevados a cabo en diferentes regiones industrializadas de USA y Europa era de aproximadamente 140 ng/g de lípido en suero, con una enorme variabilidad entre países y estados (Longnecker *et al.* 2003). Los alimentos en sí también han sido analizados en diversos estudios. En el año 2000, el contenido de organoclorados en muestras de carne y lácteos de Polonia estaba entre 0-501 ng/g de (Lulek 2002). En Bélgica, tras un desastre provocado por piensos contaminados en los 90, los niveles de PCBs en productos cárnicos, lácteos y huevos estuvieron sobre una media de 200 ng/g de grasa, llegando a máximos de hasta 50 ug/g de grasa en algunas muestras (van Larebeke *et al.* 2001).

Varios autores han publicado hasta la fecha estudios de exposición a PCB126 durante la gestación y lactancia en modelos animales. En todos estos estudios, han optado por dos niveles de exposición a PCB126, 0,25 y 1 ug/Kg día, para medir diversos parámetros neurológicos como son los potenciales auditivos (Crofton and Rice 1999), tests de alternancia espacial (Rice 1999a), aprendizaje espacial (Schantz *et al.* 1996; Rice 1999b). En estos experimentos, ninguna de las dosis utilizadas produjo alteraciones a

nivel de capacidad reproductiva de las madres o desarrollo de las crías más allá de los parámetros de neurodesarrollo estudiados. Siguiendo la línea de estos trabajos, iniciamos nuestro estudio con una dosis de 1 ug/Kg y día pero, a diferencia de los estudios citados, el resultado fue la muerte de un enorme porcentaje de las crías en las primeras 24 horas de vida. Por otro lado, la dosis es en realidad bastante alta si comparamos con la exposición real de la población humana y que el PCB126 no suele ser el componente más predominante en los análisis. Decidimos hacer un estudio piloto con diferentes dosis de tóxico y tras ver los resultados en el número de crías y su estado de salud, optamos por utilizar 100 ng/Kg día.

El PCB153 ha sido comúnmente considerado uno de los menos tóxicos de la familia. Es el PCB hallado con mayor frecuencia y concentración tanto en las muestras humanas de suero y leche materna como en los tejidos de animales y sedimentos (WHO,1993). En la mayor parte de estudios de exposición prenatal con ratas, las dosis de PCB153 empleadas son bastante altas: 16 ó 64 mg/Kg/día (Ness *et al.* 1993; Schantz *et al.* 1995) para un estudio de alteraciones hormonales y uno de aprendizaje en laberinto radial respectivamente; 1.25, 5 y 20 mg/kg/día (Hussain *et al.* 2000; Carpenter *et al.* 2002) en estudios de electrofisiología en hipocampo de ratas jóvenes (potenciación a largo plazo, un proceso relacionado directamente con el aprendizaje) y de aprendizaje. Las dosis mayores en estos estudios superan con mucho la exposición que la población humana pueda tener a esta sustancia, por lo que resultaban inadecuadas en nuestro estudio, a pesar de no tener efectos aparentes en el número y salud de las crías nacidas. La dosis empleada en nuestros estudios, 1mg/Kg/día, se acerca más a la posible exposición humana.

1.8.1.3. Modelo de exposición a PCB153, PCB126 y/o Metilmercurio

Las ratas hembra fueron cruzadas con machos sementales durante la noche. Se realizaron lavados vaginales la mañana siguiente al cruce. Aquellas ratas que presentaban espermatozoides en el lavado vaginal fueron consideradas preñadas y se contó este momento como día 0 de gestación. Las hembras preñadas se alojaron en jaulas individuales durante toda la gestación y lactancia de las crías. En el día 7 de gestación (GD7) las hembras preñadas se distribuyeron aleatoriamente en grupos y se iniciaron los tratamientos con los diferentes neurotóxicos según se explica a continuación. Los tratamientos finalizaron en el día de destete de las crías (día 21 postnatal ó PND21) en el caso de aquellas destinadas a los experimentos de aprendizaje y microdiálisis, y en el día 7 postnatal en el caso de las camadas destinadas a la realización de cultivos primarios de neuronas de cerebelo.

Los neurotóxicos se administraron a las hembras preñadas de la forma siguiente:

- *Tratamiento oral con metilmercurio (MeHg)*: El MeHg disuelto en DMSO puro se administró a 0,5 mg/Kg y día a las hembras preñadas diluyéndolo en el agua de bebida. La concentración de MeHg se ajustó en función del peso del animal y su consumo diario de agua, que puede variar entre 40 y 80 ml durante el periodo de gestación y lactancia. Los animales control recibieron DMSO (vehículo) mezclado en su agua de bebida, en cantidad equivalente al volumen administrado a las hembras tratadas con metilmercurio (aproximadamente 50 µl/Kg y día).

- *Tratamiento oral con PCB153 ó PCB126*. Tanto el PCB153 como el PCB126 se prepararon diluidos en aceite de maíz (20 mg/ml

el PCB153 y 2 µg/ml el PCB126) y se administraron diariamente a las hembras correspondientes inyectando 50 µl por kilo del animal en una porción de un 1,5 cm³ de gelatina (Transgel®). La cantidad de PCB se ajustó diariamente en función del peso del animal. Los animales control recibieron una cantidad similar de aceite de maíz y gelatina. La preferencia de las ratas por esta gelatina dulce hizo innecesario un periodo de habituación y aseguró el consumo de la dosis completa de tóxico en cada administración.

Las hembras preñadas se distribuyeron aleatoriamente en el día 7 de gestación en diferentes grupos experimentales para recibir los siguientes tratamientos:

1. Grupo control: 1,5 cm³ de Transgel con aceite de maíz y DMSO añadido en el agua de bebida (5 µl/Kg y día)
2. Grupo PCB153: 1 mg/Kg y día de PCB153 en Transgel y DMSO (50 µl/Kg y día) en el agua de bebida.
3. Grupo MeHg: Cloruro de Metilmercurio (MeHg) 0,5 mg/Kg y día en el agua de bebida y 1,5 cm³ de Transgel con aceite de maíz.
4. Grupo PCB153 + MeHg: MeHg y PCB153 combinados a las dosis 0,5 mg/Kg/día y 1 mg/kg/día respectivamente. La vía de administración fue la descrita para cada compuesto individual.
5. Grupo PCB126: 100 ng/Kg/día de PCB126 en Transgel y DMSO en el agua de bebida.
6. Grupo PCB126 + MeHg: MeHg y PCB126 combinados en las dosis 0,5 mg/Kg/día y 100 ng/kg/día respectivamente. La vía de administración fue la descrita para cada compuesto individual.

Ante la posibilidad de que la gelatina, el aceite o el DMSO tuvieran efectos por sí mismos y para evitar una posible variabilidad por la administración de estos productos, todos los grupos recibieron ambos vehículos empleados en la administración de neurotóxicos como control.

1.8.1.4. Cuidado y observación de las camadas nacidas

Se contó el número de crías de cada camada nada más nacer. Las crías se pesaron cada dos días desde el nacimiento hasta el día del destete (PND 21) o cultivo (PND 7). Se estudió si había diferencias en el número de crías o ganancia de peso de las crías entre las hembras sometidas a diferentes tratamientos respecto a las crías de las madres control. Igualmente se determinó el sexo de las crías tan pronto como fue posible.

Las crías destetadas se separaron en jaulas por sexo y camada y se pesaron semanalmente hasta la edad de 3 meses.

1.8.1.5. Test de aprendizaje: discriminación condicional en un laberinto en Y.

Este test (Murray y Ridley, 1997) se realiza en un laberinto de tres brazos de madera, idénticos en forma y longitud, colocados en forma de Y (60 cm de largo, 11.5 cm de ancho y 25 cm de altura). Uno de los brazos se elige como brazo de salida y los otros dos son los brazos de elección. El color de las paredes y suelo del laberinto se puede modificar mediante la inserción de paneles encajados que cubren todas las superficies que ve la rata, pudiendo ser blanco o negro. En función del color del laberinto, el refuerzo (comida en forma de “pellets”) se colocará al final del brazo derecho o del

izquierdo. Cada ensayo en este test consiste en la colocación de la rata en el brazo de salida y esperar su elección de brazo (izquierdo o derecho), tras lo cual encontrará premio o no según haya acertado la asociación entre color y el brazo en el que se encuentra la comida.

La realización de este test requiere un periodo de familiarización de los animales al laberinto durante cuatro días antes de empezar. Para ello, se deja pasear a las ratas libremente durante diez minutos cada día por el laberinto, en el que se colocan “pellets” de la comida del tipo que se emplea durante la realización del test.

Una vez comenzado el experimento, cada animal es sometido diariamente a diez ensayos en los cuales se cambia el color del laberinto de forma aleatoria. El tiempo máximo de permanencia en el laberinto es de tres minutos. El resultado del ensayo puede ser “Acierto” si va hasta el final del brazo correcto y coge la comida, “Error” si camina hasta el final del brazo donde no está la comida o “Negativo” si el animal permanece en el brazo de salida hasta consumir los tres minutos.

Se considera que la tarea ha sido aprendida cuando la rata acierta los 10 ensayos seguidos de un mismo día.

El test se realiza diariamente en días consecutivos hasta un máximo de 25. A los animales que en 25 días no han sido capaces de aprender la tarea se les asigna el número máximo de ensayos correspondiente (250).

1.8.1.6. Procedimientos quirúrgicos: Implantación de cánulas en el cerebelo y Microdiálisis cerebral *in vivo*.

Una vez finalizado el periodo de test de aprendizaje, los animales fueron sometidos a cirugía de implantación de cánulas para

la realización de microdiálisis cerebral. Para ello, se anestesiaron las ratas con halotano. A continuación se inmovilizó la cabeza del animal en un sistema de estereotaxia para implantar en el cerebelo una guía de microdiálisis. La razón para elegir esta área cerebral es que en estudios previos se ha hallado una correlación entre los niveles de GMPc en cerebelo y la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y (Erceg *et al.*, 2006).

La implantación de guías de microdiálisis se realizó con ayuda de un soporte para cirugía estereotáxica (Figura 9). Tras la anestesia y fijación de la cabeza de la rata al soporte del sistema, se realizó una incisión sagital de aproximadamente 2 cm para dejar la superficie del cráneo al descubierto. Se retiró el tejido conectivo para permitir una buena adhesión del cemento dental que fija la guía a la superficie del cráneo.

Se realizaron dos pequeñas perforaciones para insertar unos tornillos de sujeción al cráneo. A continuación se marcaron las coordenadas de inserción de la cánula de acuerdo con Pellegrino *et al.* (1979) y las correcciones de Whishaw *et al.* (1977) para ratas mayores de 320 g (10.2 mm posterior y 1.6 mm a la derecha respecto a bregma). Se perforó un orificio de 1 mm de diámetro en el cráneo para permitir el acceso vertical al cerebelo. La cánula se insertó verticalmente a 1.0 mm de profundidad respecto a la superficie de la duramadre, la guía se fijó al cráneo con cemento dental, aprovechando el anclaje proporcionado por los tornillos, y se suturó la piel.

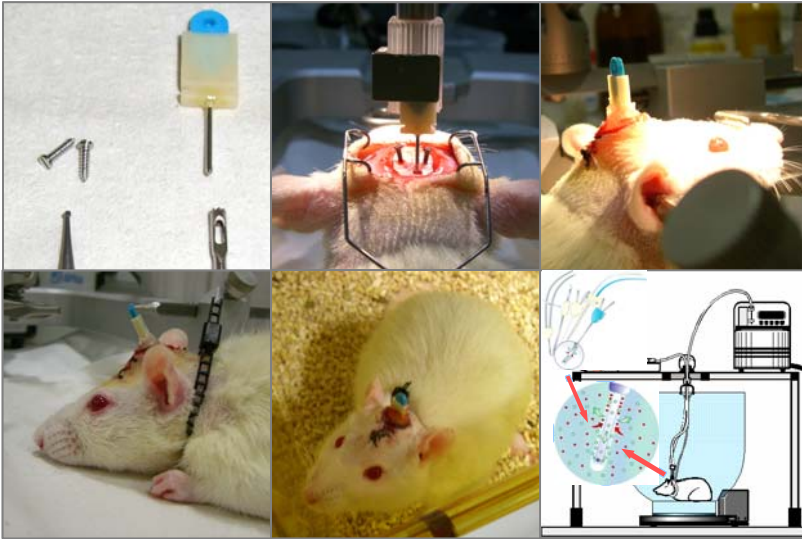


Fig. 9. Procedimiento quirúrgico de colocación de la guía de microdiálisis.

Tras la cirugía las ratas tuvieron un periodo de recuperación en su jaula con agua y comida *ad libitum* durante 48 horas antes de la realización del experimento de microdiálisis cerebral.

El día del experimento se insertó cuidadosamente la sonda de microdiálisis a través de la guía en el animal despierto. La sonda se perfundió continuamente con líquido cefalorraquídeo artificial (LCA. NaCl 145 mM, KCl 3.0 mM, CaCl₂ 2.26 mM, llevado a pH 7.4 con tampón fosfato 2 mM y filtrado a través de filtros Millipore de 0.45µm de tamaño del poro). El flujo de LCA fue de 3 µl/min, controlado mediante una bomba de microperfusión (Hermenegildo *et al.*, 1998). El dializado recogido durante una hora tras la inserción de la sonda se desechó porque estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que los niveles de GMPc precisan ese intervalo de tiempo para estabilizarse. Transcurrido este periodo, se

recogieron muestras con un colector de fracciones cada 20 minutos, ya que son necesarios 60 μl de dializado para cuantificar la concentración de GMPc mediante ELISA. Una vez tomadas las fracciones para medir los niveles basales de GMPc extracelular, se administró NMDA 0.3 mM en LCA a través de la misma sonda durante 20 minutos con un flujo de 3 $\mu\text{l}/\text{min}$. La administración de NMDA a través de la sonda conduce a un aumento de la concentración de GMPc extracelular en el cerebelo. El aumento de GMPc es lineal para concentraciones de NMDA entre 0.1-0.5 mM; la saturación se alcanza a 1 mM de NMDA.

La técnica de microdiálisis cerebral *in vivo* se emplea frecuentemente para estudiar la liberación de neurotransmisores y otras moléculas al espacio extracelular. La posibilidad de obtener muestras del sujeto experimental *in vivo*, despierto y en libre movimiento supone una enorme ventaja en el estudio de la señalización molecular (Bourne, 2003) y nos permite llevar a cabo estudios farmacocinéticos para correlacionar el comportamiento del animal con cambios en neurotransmisión y metabolismo, (Joukhadar y Muller, 2005) y, por supuesto, obtener una información muy importante sobre la neuroquímica del cerebro y sus relaciones con la conducta (Di Chiara, 1990; Parsons y Justice, 1994). Además, la microdiálisis nos permite ser muy precisos en el área cerebral de estudio, pudiendo administrar fármacos en zonas muy concretas, de forma individual o simultáneamente en varias zonas y diferentes compuestos.

Esta técnica ya ha sido empleada en estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio para el análisis de los efectos de la hiperamonemia y de una serie de sustancias neurotóxicas sobre la vía de transducción de señales Glu-NO-GMPc en el animal *in vivo*

(Canales *et al.*, 2001; Erceg *et al.*, 2005a; Erceg *et al.*, 2005b; Hermenegildo *et al.*, 1998; Hernandez-Viadel *et al.*, 2003).

1.8.1.7. Determinación del grado de recuperación de GMPc a través de la membrana de la sonda de microdiálisis

La sonda de microdiálisis introducida en el medio extracelular del cerebro es perfundida continuamente con el líquido cefalorraquídeo (LCA) y su membrana permite la difusión de las sustancias a través de ella, lo que permite recuperar moléculas del medio extracelular junto con el líquido de perfusión (Figura 10). Sin embargo, el proceso de transporte de las sustancias a través de la membrana no es suficientemente rápido para que la concentración alcanzada en el líquido de perfusión durante su flujo sea igual a la del medio exterior. Para conocer la concentración real de las sustancias en el medio exterior a partir de las medidas en el líquido de perfusión recuperado es necesario calcular que porcentaje de la sustancia se ha recuperado a través de la sonda.

La recuperación de GMPc se determinó colocando la sonda de microdiálisis en un recipiente que contenía una concentración de GMPc de 32 μM a 37 °C. Se perfundió con un flujo de 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ (idéntico al empleado en microdiálisis cerebral) y se midió la concentración de GMPc en la disolución de salida de la sonda de microdiálisis. La recuperación del GMPc fue del $10.3 \pm 1.3\%$ ($n = 7$). Los datos presentados en los resultados no se corrigieron teniendo en cuenta la recuperación.

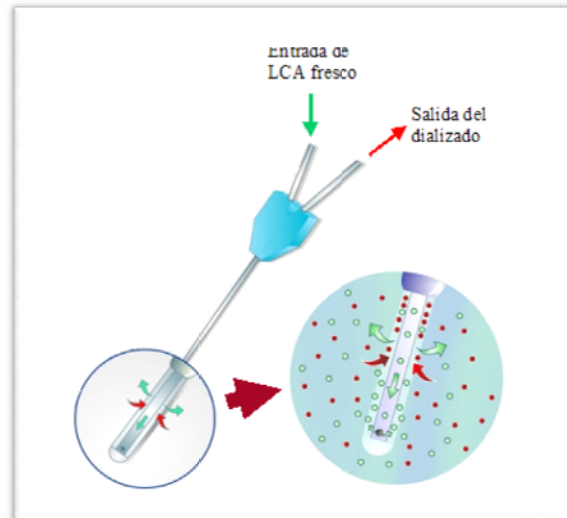


Fig. 10. Representación del funcionamiento de la sonda de microdialísis cerebral CMA/12.

1.8.2 Métodos empleados en los experimentos realizados en cultivos primarios de neuronas:

1.8.2.1. Cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo

Para realizar los cultivos primarios de neuronas de cerebelo se utilizaron crías de 7 días de edad. Se extrajeron los cerebros rápidamente y los cerebelos fueron colocados en placas petri en Tampón Fosfato salino frío (PBS: NaCl 0,8%, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 6,4 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM a pH= 7,4). Tras retirar el PBS, el tejido se cortó en pequeños fragmentos con cuchillas de escalpelo. Los fragmentos se incubaron con Dispasa, a una concentración de 3 mg/ml diluida en PBS, durante 30 minutos en una estufa con 5% de CO₂ y 37 °C para digerir la matriz extracelular

proteica. Se retiró la dispasa, se lavó una vez con EDTA 1 mM diluido en PBS para inactivar la dispasa y, tras retirar el PBS, se lavó con medio de cultivo BME. Se disoció el tejido absorbiendo y expulsando repetidas veces el homogenado con pipeta de plástico y se incubó con 40 mg/ml de DNasa diluidos en BME durante 20 minutos a 37 °C en estufa, para romper el DNA libre de las células rotas y permitir así una mejor dispersión de las células sembradas. El tejido se homogenizó de nuevo con pipeta y la suspensión celular se filtró a través de una malla con poro de 90 µm. Se centrifugó a 400 g durante 5 min y el botón de células se lavó dos veces con BME, centrifugando a 400 g en cada lavado. Finalmente, las células se resuspendieron en medio BME “completo” (Basal Medium Eagle, 10% de Suero Fetal Bovino inactivado, Glutamina 2 mM, Gentamicina 100 mg/ml y KCl 25 mM). Se realizó recuento celular al microscopio y medida de la viabilidad por tinción con Azul Tripán. Las células se sembraron en placas preparadas con polilisina a una densidad de 312,000 células/cm². Tras una incubación de 20 minutos a 37 °C y 5% CO₂ se retiró el medio de cultivo que contenía las células no unidas y se añadió medio fresco a las placas. Las células se mantuvieron a 37 °C y 5% CO₂ durante los 12-13 días de cultivo hasta el momento del ensayo. Para evitar el crecimiento de células no neuronales se añadió Citosín-arabinósido 10 µM pasadas 24 horas tras la siembra, directamente al medio de cultivo de cada placa. Las neuronas granulares de cerebelo condicionan su medio de cultivo, por lo que éste nunca es cambiado por medio fresco durante el tiempo de mantenimiento del cultivo. Para cubrir las necesidades energéticas de las células, se añadió glucosa (5,6 mM) dos veces por semana directamente al medio de cultivo de cada placa.

Las neuronas granulares de cerebelo se adhieren y extienden procesos neuronales pronto tras la siembra. Sobreviven largos

periodos de tiempo con una alta viabilidad. De cada cerebelo se obtienen entre 11 y 14 x 10⁶ células (Felipo *et al.*, 1993).

En la realización de esta tesis se llevaron a cabo cultivos de neuronas granulares de cerebelo a partir de dos “tipos” de crías de rata:

1. Para los estudios de exposición de las neuronas *in vitro* a las sustancias neurotóxicas, se realizaron los cultivos a partir de cerebelos de crías procedentes de madres no expuestas a neurotóxicos.

2. Para estudiar los efectos sobre las neuronas de la exposición perinatal de las crías a neurotóxicos (estudios *ex vivo*), se realizaron los cultivos a partir de cerebelos de crías expuestas durante la gestación y lactancia (hasta PND7) a alguno de los compuestos estudiados. El procedimiento de cultivo es el mismo descrito en ambos casos. En el caso de estudios *ex vivo*, los cultivos de camadas de ratas control y tratadas fueron realizados simultáneamente y en paralelo para llevar a cabo ensayos simultáneos con todos los tratamientos y con los controles. Los cultivos del modelo *ex vivo* no fueron expuestos a los neurotóxicos *in vitro*.

1.8.2.2. Selección de las dosis utilizadas en cultivos primarios

Es difícil hacer una comparativa de las dosis halladas en tejidos humanos, las utilizadas en estudios *in vivo* y las que se emplean en cultivos, debido a la particular naturaleza de estos últimos. Hay que destacar que, por ejemplo, aproximadamente el 50% del MeHg en tejido cerebral se encuentra alojado en los

elementos gliales (Lapham *et al.* 1995), que no forman parte del cultivo primario de neuronas de cerebelo.

Existen numerosos estudios de neurotoxicidad del MeHg en cultivos de células granulares de cerebelo en modelos de exposición aguda y algunos de PCBs. Las dosis utilizadas, que causaban neurotoxicidad por aumento del calcio intracelular, van de 0,1 a 5 μM (Sarafian *et al.* 1989; Sarafian 1993; Marty and Atchison 1998; Bemis and Seegal 2000). Estas dosis producen muerte celular en cuestión de horas y no resultan útiles para realizar estudios de exposición crónica. Debido a la ausencia de información sobre exposición crónica de cultivos neuronales a las sustancias que estudiamos, para seleccionar las dosis en cultivos *in vitro*, se realizaron curvas de toxicidad del compuesto tras 12-14 días de exposición, como se verá en el apartado de Resultados. Para los estudios de función de la vía Glu-NO-GMPc se utilizaron aquellas dosis que no producían muerte celular significativa durante este periodo.

1.8.2.3. Tratamientos *in vitro* de neuronas granulares de cerebelo con PCB153, PCB126, MeHg o combinaciones de los PCBs con MeHg.

Las placas de cultivos procedentes de ratas control fueron divididas aleatoriamente en grupos para su tratamiento *in vitro* con diferentes concentraciones de los tóxicos a partir de 24 horas tras la siembra.

Tanto los PCBs como el Cloruro de metilmercurio se disolvieron en DMSO puro estéril. Estas disoluciones stock fueron diluidas a su vez en agua estéril a un amplio rango de concentraciones, para evitar la adición de un exceso de DMSO en las

placas de cultivo. El rango de concentraciones utilizado fue de 0,001 a 100 μM para el PCB153 y el PCB126 y de 0,001 a 100 nM para el MeHg. Las placas control fueron tratadas con las mismas concentraciones de DMSO.

El MeHg y los PCBs se añadieron a las 24 horas de realizar del cultivo directamente al medio de cultivo de las placas correspondientes, por separado o combinando cada PCB con MeHg a diferentes concentraciones. El tratamiento se mantuvo durante los 12-14 días de cultivo hasta la utilización de las placas en los diferentes ensayos.

1.8.2.4. Viabilidad de las neuronas granulares de cerebelo tras la exposición *in vitro* a PCB153, PCB126 y MeHg.

La viabilidad celular se determinó tras 12-14 días en cultivo en cultivos primarios de neuronas de cerebelo expuestas *in vitro* a MeHg, PCB153 o a PCB126. Estos experimentos se llevaron a cabo para evaluar la sensibilidad de las células a los compuestos y establecer el rango de concentraciones con el que estudiar el efecto de los mismos sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas que se mantuvieran perfectamente viables.

Se determinó la viabilidad celular por doble tinción con Diacetato de Fluoresceína (FDA) y yoduro de propidio (PI). El Diacetato de fluoresceína marca con fluorescencia verde las células vivas y el yoduro de propidio marca con fluorescencia roja las células muertas. El procedimiento es el siguiente: las neuronas se cultivan sobre cubreobjetos de vidrio colocados en el fondo de placas petri, de forma que se puedan extraer los cubreobjetos para observar las células al microscopio una vez teñidas. Las placas se lavan 2 veces con solución Locke sin magnesio (154 mM NaCl, 5.6 mM

KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 2.3 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, 5 mM HEPES, pH 7.4.), y se añade Locke una tercera vez con la solución FDA (1,5 mM en acetona). Se incubó 4 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añade el yoduro de propidio (4,6 mM en Locke) y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. Lavamos una vez más con Locke y colocamos los cubres en un portaobjetos para realizar el recuento en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioscop 2 Plus. Para obtener una muestra representativa, se contaron aproximadamente 2000 células por placa en aproximadamente 10 campos seleccionados aleatoriamente.

Como control positivo de muerte celular se realizaron tratamientos con glutamato 1 mM durante 4 horas en Locke sin magnesio en el mismo día del ensayo.

1.8.2.5. Estudio de los efectos de la exposición *in vitro* a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc. Estudios *ex vivo* e *in vitro*.

Los cultivos de neuronas de cerebelo se utilizaron a los 12-14 días de su siembra para evaluar los efectos de las concentraciones seleccionadas de los neurotóxicos, en exposición individual o combinada, sobre los diferentes pasos de la vía Glu-NO-GMPc. A continuación se describe la metodología de los dos tipos de experimentos realizados.

- *Activación de la vía Glu-NO-GMPc mediante la adición de NMDA*: Las placas se lavaron 3 veces con solución Locke sin magnesio y las células se preincubaron en esta misma solución durante 20 minutos a 37°C y 5% CO₂. Pasado este tiempo, se añadió NMDA a una concentración final 0,3 mM, y se incubó durante 5 minutos. Se retiró la solución Locke y se homogeneizaron las células en el tampón de

ensayo del kit de GE Healthcare empleado para medir el GMPc al que se le añadió EDTA 4 mM para prevenir la degradación del GMPc por fosfodiesterasas. Posteriormente se determinó la concentración de GMPc siguiendo el protocolo del kit comercial.

- *Activación de la guanilato ciclasa soluble por óxido nítrico:*

La guanilato ciclasa soluble puede ser activada por óxido nítrico administrado a la célula, sin intervención del receptor de NMDA o de la nNOS, utilizando un compuesto donador de óxido nítrico. Nosotros hemos utilizado como tal el SNAP. Para ello, las placas se lavaron 3 veces con solución Locke sin magnesio y se preincubaron en esta misma solución durante 20 minutos a 37 °C y 5% CO₂. Se añadió el agente generador de óxido nítrico SNAP a una concentración final 0,1 mM y se incubó 3 minutos. Se retiró la solución Locke y se homogeneizaron las células en el tampón de ensayo del Kit comercial para medir GMPc.

1.8.3 Medida de la concentración de GMPc en muestras de microdiálisis cerebral y homogenados de neuronas mediante inmunoensayo.

El contenido de GMPc, tanto de muestras procedentes de cultivos primarios de neuronas como de las procedentes de microdiálisis cerebral *in vivo*, se midió mediante enzimo-inmunoensayo utilizando el kit de ELISA Biotrak para medir GMPc de GE Healthcare. Como se ha mencionado con anterioridad, el medio de homogenización de las células fue el tampón comercial del kit suplementado con EDTA 4 mM. A las muestras de microdiálisis se les añadió inmediatamente EDTA 4 mM antes de su almacenamiento para evitar la degradación del GMPc. Todas las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización para determinar el GMPc.

1.8.4 Cuantificación del contenido de proteínas implicadas en la vía Glu-NO-GMPc en homogenados de áreas cerebrales de animales y de neuronas en cultivo.

Las alteraciones en la vía Glu-NO-GMPc podrían estar causadas por un cambio en el contenido de proteínas implicadas en la misma. Se estudió el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc cuantificándolas mediante Western Blot.

1.8.4.1. Preparación de homogenados de áreas cerebrales

Los animales fueron sacrificados por decapitación y sus áreas cerebrales disecadas separando corteza, cerebelo, hipocampo y estriado. Las áreas se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido y fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

El día de la preparación de los homogenados, cada área se pesó y se trituró manualmente en un homogenizador de vidrio con 5 volúmenes de tampón de homogenado (Tris 50mM pH 7,5, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM NaF, 1mM PMSF, 1mM NaVO_3 , 5 mg/ml aprotinina, 5 mg/ml leupeptina). Posteriormente se sonicaron y se midió la concentración de proteína de la muestra mediante el método del ácido bicínico. Todo el proceso se realizó en hielo y los homogenados se almacenaron a -80°C .

1.8.4.2. Preparación de homogenados de células

Las neuronas de cerebelo en cultivo se lavaron tres veces con solución Locke sin magnesio. Las neuronas fueron separadas de las superficie de plástico de la placa mediante rascadores y

homogenizadas en tampón de homogenado (ver punto anterior) al que se añadió SDS al 1%.

1.8.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot

Los homogenados se diluyeron 1:2 en tampón de carga (Tris-HCl 20 mM a pH 6,8, Glicerol 20%, SDS 4 %, 2-Mercaptoetanol 10%, Bromofenol 1%) y se cargaron en geles de poliacrilamida al 8% (excepto para la calmodulina, que se usaron al 15%) para la realización de electroforesis y transferencia a membrana “Western Blot” como describimos a continuación (Felipo *et al.*, 1993). Los geles de poliacrilamida utilizados estaban formados por dos zonas horizontales de diferente concentración de acrilamida: gel “stacking” (Tris Base 0.125 M, 0,1% SDS. pH a 6,8, Acrilamida 3.9%, Bisacrilamida 0.015%, APS 0,04% y TEMED), que concentra la muestra en una banda estrecha antes del inicio de su separación y gel “running” (Tris Base 0.4 M, 0,1% SDS, pH a 8,8. Acrilamida 8%, Bisacrilamida 0.2%, APS 0,04% y TEMED), en el que las proteínas se separan según su masa molecular relativa. El tampón empleado para la electroforesis contenía Tris Base 0.3%, 0,02% SDS, Glicina 1,5 % y la intensidad de la corriente fue de 30 mA por gel. Una vez terminada la electroforesis se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF en tampón de transferencia (Tris Base 0.025 M, Glicina 0.05 M) y a una corriente de 400 mA durante 2 horas. Terminada la transferencia se bloquearon las membranas con 3% de BSA en TBS-T (NaCl 0.8%, Tris Base 0.1%) durante 45-60 minutos. Las membranas se lavaron durante 1 hora con sucesivos cambios de TBS-T y se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios diluidos en las concentraciones que aparecen a continuación en TBS-T y 1% de BSA. Las proteínas analizadas fueron nNOS, subunidades

alfa y beta de la guanilato ciclasa soluble, calmodulina y subunidad NR1 del receptor de NMDA. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

- Anticuerpo primario IgG monoclonal de ratón (6D4) frente a calmodulina (Abcam Ltd. Cambridge, UK). Dilución: 1:1000
- Anticuerpo primario IgG policlonal de conejo frente a la óxido nítrico sintasa neuronal -nNOS- (Abcam Ltd. Cambridge, UK). Dilución: 1:1000
- Anticuerpo primario IgG policlonal de conejo frente a la subunidad alfa-1 de la guanilato ciclasa soluble (SIGMA, St. Louis, MO, USA). Dilución: 1:1000
- Anticuerpo primario IgG policlonal de conejo frente a la subunidad beta-1 de la guanilato ciclasa soluble (SIGMA, St. Louis, MO, USA). Dilución: 1:1000
- Anticuerpo primario IgG monoclonal de ratón frente a la subunidad NR1 del receptor de NMDA(clone 54.1, Pharmingen, San Diego, CA, USA). Dilución: 1:1000
- Anticuerpo primario IgG monoclonal de ratón (AC-15) frente a Actina beta. (Abcam Ltd., UK). Dilución: 1:2000

Al día siguiente se lavaron las membranas de PVDF con TBS-T cambiando el tampón varias veces durante 1 hora y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora.

- Anticuerpo secundario IgG de cabra frente a IgG de conejo, conjugado con fosfatasa alcalina. (SIGMA, St. Louis, MO, USA). Dilución: 1:2000

- Anticuerpo secundario IgG de cabra frente a IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina. (SIGMA, St. Louis, MO, USA). Dilución: 1:2000

Las membranas de PVDF se lavaron de nuevo durante 1 hora con TBS-T y después se revelaron mediante un método colorimétrico para fosfatasa alcalina, (Solución de de revelado: NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, 100 mM Tris-HCl, 0.6% stock NBT, 0.35% stock BCIP pH= 9,5). Las imágenes de las bandas fueron capturadas en un escáner Hewlett Packard Scanjet 5300C. Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas con el programa Alphamager 2200 (AlphaEaseFC 2200 for Windows, Cambridge, UK). La intensidad de las bandas de las proteínas de interés se cuantificó en relación a las bandas de Actina de las mismas muestras, cuya intensidad no se ve afectada por los tratamientos, para controlar la posible variabilidad en la cantidad de proteína presente por la manipulación de muestras.

1.8.5 Análisis estadístico

Los resultados numéricos se expresan como media \pm SEM del número de muestras, cultivos o animales señalado en cada caso. Se analizaron realizando ANOVA de un criterio seguido de test de Tuckey o comparaciones t de Student según el caso con el programa Prism 4 (GraphPad Software, Inc.), salvo indicación expresa en el correspondiente apartado de resultados.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

1.9. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

1.9.1 Efectos de la exposición perinatal a MeHg, PCB153 ó PCB126 solos o en combinación sobre la ganancia de peso de las crías.

Las crías nacidas de madres expuestas a PCB153, PCB126 y/o MeHg durante la gestación y lactancia se pesaron periódicamente para evaluar posibles diferencias en su peso con respecto a las crías control. En las figuras 11 y 12 se presenta la evolución general de la ganancia de peso de los machos y de las hembras. Los pesos en algunas edades representativas se muestran en la figura 13.

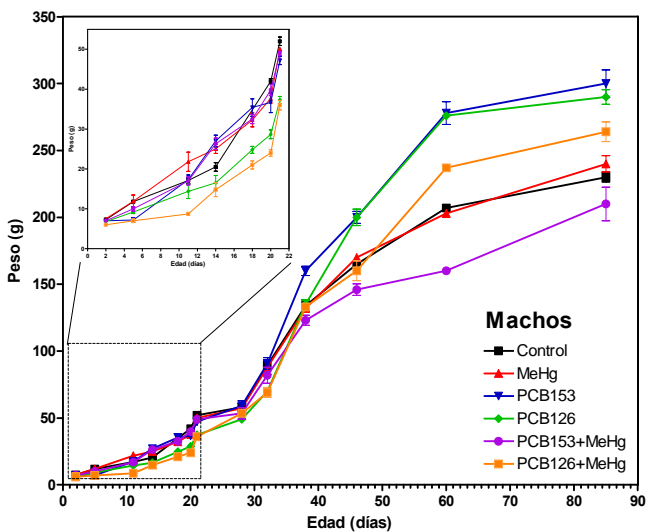


Fig. 11. Evolución de la ganancia de peso de las crías macho. La gráfica inserta amplía los 22 primeros días de vida.

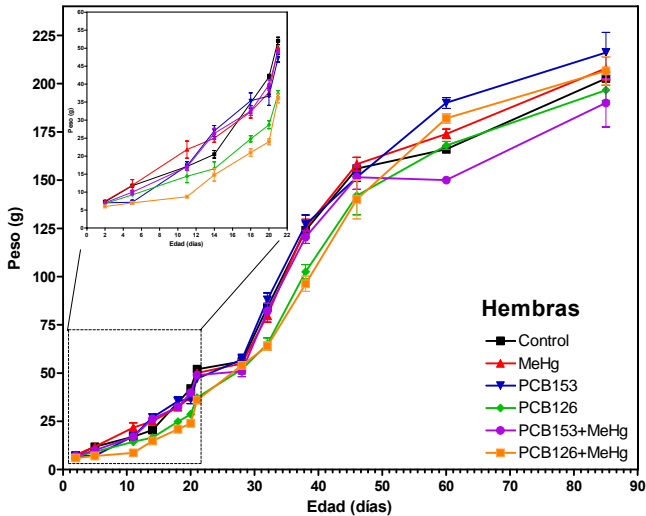


Fig. 12. Evolución de la ganancia de peso de las crías hembra. La gráfica inserta amplía los 22 primeros días de vida.

Hasta el destete (21 días) no hay diferencias de peso entre los machos y las hembras. Al nacer, las ratas control pesaron 7.3 ± 0.1 g, las expuestas a MeHg 7.5 ± 0.5 g, las PCB153 7.0 ± 0.1 g, las expuestas a PCB126 6.8 ± 0.2 g, a PCB153 + MeHg, 7.0 ± 0.2 g y a PCB126 + MeHg, 6.0 ± 0.1 g. Sólo las ratas expuestas a PCB126 mostraron diferencias significativas ($p < 0.01$) con respecto a las control, siendo éstas más marcadas en el caso de las expuestas a la combinación de PCB126 + MeHg ($p < 0.001$). Las ratas expuestas a PCB126 + MeHg además tenían en el nacimiento un peso significativamente menor a las expuestas a PCB126 solo ($p < 0.001$). Las diferencias entre las ratas expuestas a PCB126 y las expuestas a PCB126 + MeHg desaparecieron a los pocos días (Figura 13).

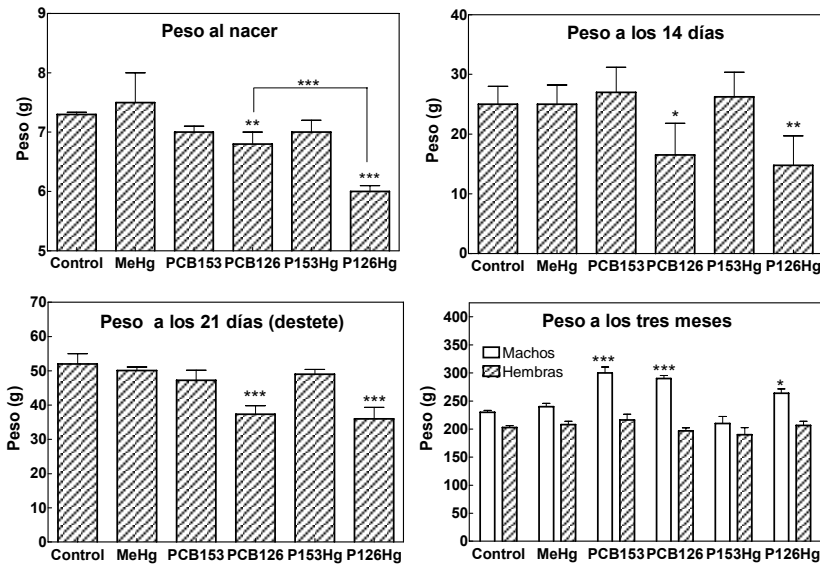


Fig. 13. Las crías expuestas a PCB126 solo o combinado con MeHg, tenían un peso significativamente menor que el resto al nacer. Estas diferencias se mantuvieron hasta el destete y no son apreciables en las ratas de 3 meses de edad. Cada barra representa la Media \pm SEM de los pesos de las crías de cada tratamiento. Los datos han sido analizados mediante ANOVA de un criterio seguido de Tuckey como post-hoc. ($n = 10$ en cada grupo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A los 14 días se mantenía el menor peso de las ratas expuestas a PCB126 (17 ± 5 g, $p < 0.05$) o PCB126 + MeHg (15 ± 5 g, $p < 0.01$) comparado con las ratas control (25 ± 3 g). Las ratas de los demás grupos tenían pesos similares a las control (entre 25 y 27 gramos). Estas diferencias se mantuvieron aún en el momento del destete. A los 21 días, todos los grupos tenían un peso entre los 47 y los 52 g, pero las ratas expuestas a PCB126 pesaban 37 ± 2 g ($p < 0.001$) y las expuestas a PCB126 + MeHg, 36 ± 3 g ($p < 0.001$).

En el momento de realización de los test del laberinto en Y, a los tres meses de edad, las ratas hembra de todos los grupos

presentaban pesos similares: Control: 203 ± 10 g, MeHg: 208 ± 17 g, PCB153: 196 ± 29 g, PCB126: 197 ± 15 g, PCB153 + MeHg: 206 ± 35 g y PCB126 + MeHg: 207 ± 21 g. Los machos expuestos a PCB153 o PCB126 solo o combinado tenían pesos significativamente mayores que los machos control (Control 230 ± 10 g, PCB153 300 ± 29 g, PCB126 290 ± 15 g, $p < 0,001$; PCB126 + MeHg 264 ± 21 g, $p < 0,05$). Los machos expuestos a MeHg o PCB153 + MeHg no tenían pesos diferentes del grupo control (240 ± 10 g y 210 ± 35 g respectivamente) (Figura 13).

1.9.2 Efecto de la exposición perinatal a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y de las ratas a los tres meses de edad.

Las ratas expuestas durante la gestación y la lactancia a PCB126, PCB153 y MeHg solo o en combinación con cada PCB fueron sometidas al test del laberinto en Y para evaluar su capacidad de aprendizaje a los tres meses de edad (Figura 14). Se analizaron los resultados en su conjunto y también considerando los machos y hembras por separado.

Las ratas hembra control necesitaron 58 ± 18 ensayos para aprender la tarea, mientras que las ratas expuestas a MeHg, PCB153 o PCB126 necesitaron 100 ± 18 , 110 ± 9 y 94 ± 21 respectivamente, siendo estos valores significativamente mayores que los del grupo control ($p < 0,001$). Esto indica que la exposición perinatal a PCB153, PCB126 ó MeHg disminuye la capacidad de aprendizaje cuando las ratas tienen 3 meses. Las hembras expuestas a las combinaciones de PCB153 con MeHg o PCB126 con MeHg necesitaron un número de ensayos similar al del grupo control para aprender la tarea, 55 ± 5 y 73 ± 5 respectivamente. (Figura 14A).

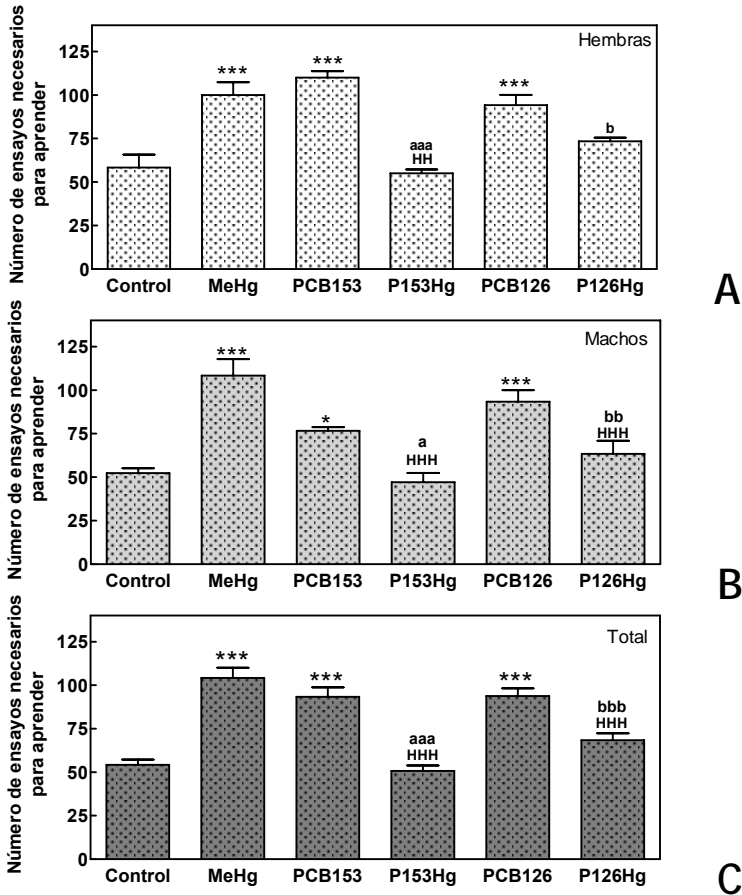


Fig. 14. La exposición perinatal a MeHg, PCB153 o PCB126 pero no a sus combinaciones disminuye la capacidad de aprendizaje de las ratas a los 3 meses de edad. Los valores son la media \pm SEM del número de ensayos necesarios para aprender la tarea. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (H) indica diferencia significativa respecto al grupo MeHg. (a) indica diferencia significativa respecto al grupo PCB153. (b) indica diferencia significativa respecto al grupo PCB126. (ANOVA de un criterio y Tuckey post-hoc)

- A. Ratas hembra (Control $n=6$; MeHg $n=6$; PCB153 $n=6$; PCB153 + MeHg $n=6$; PCB126 $n=12$; PCB126 + MeHg $n=6$)
- B. Ratas macho (Control $n=13$; MeHg $n=6$; PCB153 $n=6$; PCB153 + MeHg $n=7$; PCB126 $n=9$; PCB126 + MeHg $n=6$)

C. *Total de ratas, machos y hembras (Control n=19; MeHg n=12; PCB153 n=12; PCB153 + MeHg n=13; PCB126 n=21; PCB126 + MeHg n=12*

Las ratas macho control necesitaron 52 ± 3 ensayos para aprender la tarea, mientras que las ratas expuestas a MeHg, PCB153 o PCB126 mostraron una disminución en la capacidad de aprendizaje y necesitaron un número significativamente mayor de ensayos que el grupo control, 108 ± 10 , 77 ± 5 y 93 ± 7 respectivamente ($p < 0,001$ para el MeHg y el PCB126, $p < 0,05$ para el PCB153). Los machos expuestos a las combinaciones de PCB153 con MeHg o PCB126 con MeHg necesitaron un número de ensayos similar al grupo control, 47 ± 5 y 63 ± 8 respectivamente. (Figura 14B)

Para cada tratamiento, el número de ensayos necesario para aprender fue similar en machos y hembras. En ningún caso hubo diferencias estadísticamente significativas entre ratas de uno y otro sexo. Por esta razón se combinaron los resultados de machos y hembras para dar unos resultados totales (Figura 14C). Las ratas control necesitaron 55 ± 3 ensayos, y las ratas expuestas a MeHg 104 ± 8 , a PCB153 93 ± 5 , a PCB153 + MeHg 51 ± 3 , a PCB126 94 ± 4 y a PCB126 + MeHg 68 ± 4 ensayos.

1.9.3 Estudio de los efectos de la exposición perinatal a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo. Microdiálisis cerebral in vivo.

Se estudiaron mediante microdiálisis cerebral *in vivo* los efectos de la exposición perinatal a PCB153, PCB126 o MeHg solos o en combinación sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc en el cerebelo de las ratas a los 3 meses. En las figuras 15, 16 y 17 se representan los niveles de GMPc extracelular durante los

experimentos de microdiálisis. Se recogieron 5 fracciones de 20 minutos al inicio del experimento para establecer los niveles basales de GMPc extracelular. Pasado este tiempo, se perfundió con NMDA 0.3 mM durante 20 min en la fracción 6 para activar la vía Glu-NO-GMPc. Se repitió la adición de NMDA en la fracción 11. Se analizaron los resultados de machos y hembras por separado (Figuras 15 y 16) y también conjuntamente (Figura 17). Para facilitar la visualización, los resultados se presentan en dos gráficas. Cada una muestra los resultados de ratas expuestas a cada PCB solo o en combinación con MeHg, comparándolos con los mismos controles y ratas expuestas a MeHg en ambas gráficas.

En los machos de tres meses expuestos perinatalmente a MeHg, PCB153 ó PCB126, la adición de NMDA activó la vía e indujo un aumento de GMPc extracelular, pero el aumento fue significativamente menor que en las ratas control, indicando que, a los tres meses de edad, la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo *in vivo* está disminuida en las ratas perinatalmente expuestas a MeHg, PCB153 ó PCB126. Los machos expuestos a la combinación de PCB153 con MeHg o PCB126 con MeHg tuvieron un aumento de GMPc extracelular inducido por NMDA similar a las ratas control (Figura 15 A y B). Los aumentos de la concentración de GMPc inducidos por NMDA en los diferentes grupos de ratas macho y su análisis estadístico se resumen en la Tabla 1. (Página 80)

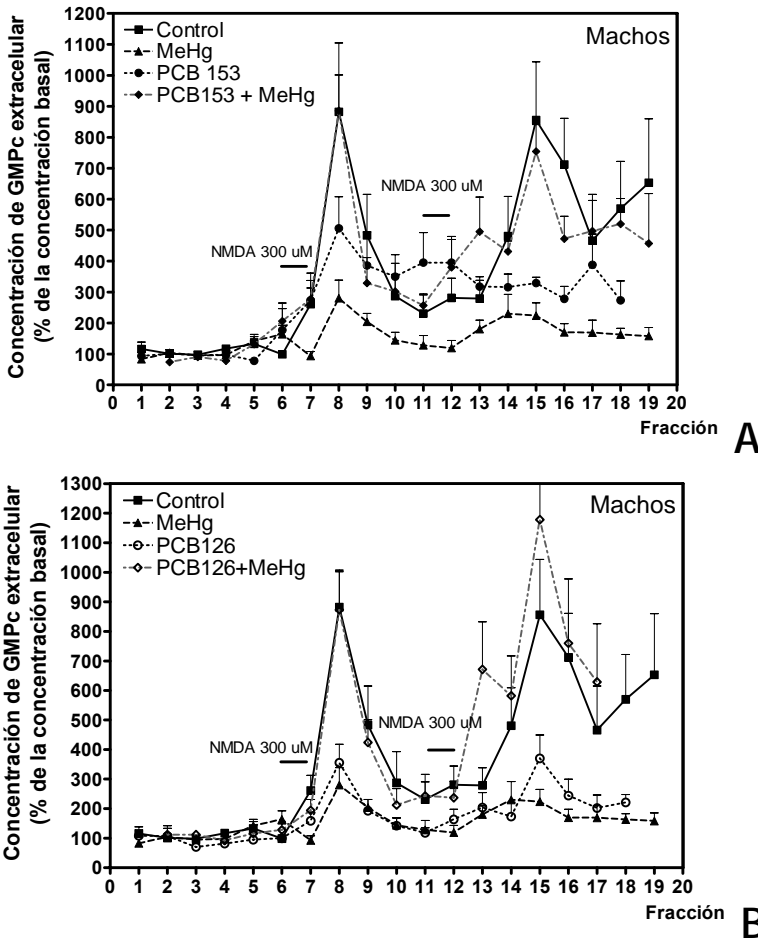


Fig. 15. La exposición perinatal a PCB153, PCB126 o MeHg, pero no a combinaciones de PCB con MeHg, reduce la función de la vía Glu-NO-GMPc en el cerebelo de las ratas macho a los 3 meses de edad. Los valores se expresan como porcentaje de la concentración basal (media de las fracciones 1-5) y son la media \pm SEM del número de experimentos indicado en cada caso.

- A. Ratas macho: control (n=7), MeHg (n=5), PCB 153 (n=6) and PCB153 + MeHg (n=6)
- B. Ratas macho: control (n=7), MeHg (n=5), PCB 126 (n=9) and PCB126 + MeHg (n=9).

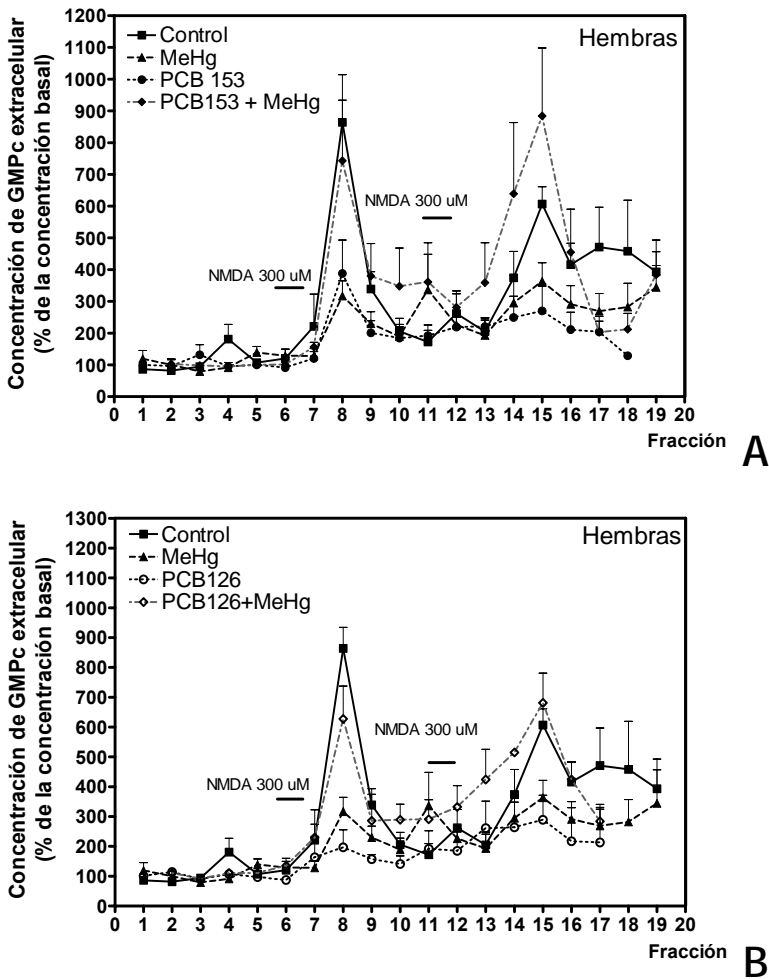


Fig. 16. La exposición perinatal a PCB153, PCB126 o MeHg, pero no a combinaciones de PCB con MeHg reduce la función de la vía Glu-NO-GMPc en el cerebelo de las ratas hembra a los 3 meses de edad. Los valores se expresan como porcentaje de la concentración basal (media de las fracciones 1-5 y son la media \pm SEM del número de experimentos indicado en cada caso).

- A. Ratas hembra: control (n=6), MeHg (n=6), PCB 153 (n=6) and PCB153 + MeHg (n=6).
- B. Ratas hembra: control (n=6), MeHg (n=6), PCB 126 (n=6) and PCB126 + MeHg (n=6).

En las hembras de tres meses expuestas perinatalmente a MeHg, PCB153 ó PCB126 el aumento de GMPc extracelular inducido por NMDA fue menor que en las ratas control (Figura 16 A y B). Las hembras expuestas a la combinación de MeHg con PCB153 o PCB126 con MeHg mostraron un aumento de GMPc inducido por NMDA similar al de las hembras control. Estos resultados indican que, a los tres meses de edad, la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo *in vivo* está disminuida en las ratas hembra perinatalmente expuestas a MeHg, PCB153 ó PCB126 pero no en las expuestas a combinaciones de PCBs con MeHg. Los aumentos de GMPc inducidos por NMDA en los diferentes grupos de ratas hembra y su análisis estadístico se resumen en la Tabla 1, (página 80).

Para cada tratamiento, el aumento de GMPc inducido por NMDA fue similar en machos y hembras. En ningún caso hubo diferencias estadísticamente significativas entre las ratas de uno y otro sexo. Por esta razón se combinaron los datos de machos y hembras para dar unos resultados totales (Figura 17).

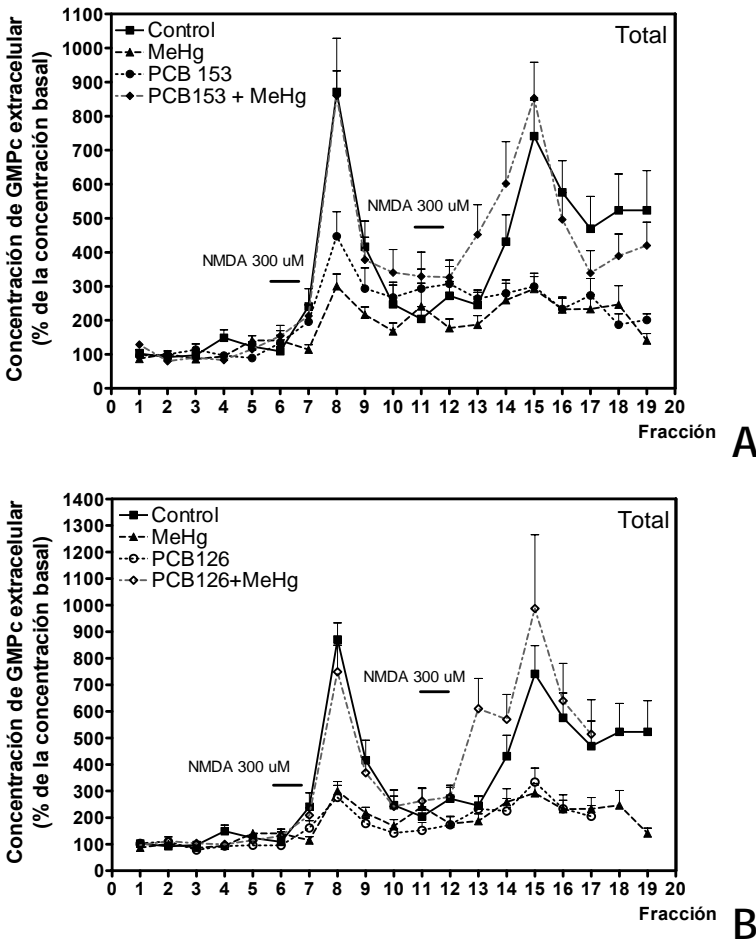


Fig. 17. La exposición perinatal a PCB153, PCB126 o MeHg, pero no a combinaciones de PCB con MeHg, reduce la función de la vía Glu-NO-GMPc en el cerebelo de las ratas a los 3 meses de edad. Los valores se expresan como porcentaje de la concentración basal (media de las fracciones 1-5) y son la media \pm SEM del número de experimentos indicado en cada caso:

- A. Total: control (n=13), MeHg (n=11), PCB 153 (n=12) and PCB153 + MeHg (n=12).
- B. Total: control (n=13), MeHg (n=11), PCB 126 (n=15) and PCB126 + MeHg (n=15).

RESULTADOS

Tabla 1. Resumen del aumento de GMPc extracelular en cerebelo inducido por la activación de la vía Glu-NO-GMPc con NMDA en ratas de 3 meses de edad expuestas perinatalmente a PCB153, PCB126 o MeHg solos o a combinaciones de PCB y MeHg.

| Aumento de la concentración de GMPc inducida por NMDA. | | | | Análisis estadístico de las diferencias entre distintos grupos | | | |
|--|----------|--------------|------------|--|-------------|---------------|---------------|
| <i>Machos</i> | <i>n</i> | <i>Media</i> | <i>SEM</i> | <i>Control</i> | <i>MeHg</i> | <i>PCB153</i> | <i>PCB126</i> |
| Control | 7 | 880 ± 120 | | | | | |
| MeHg | 5 | 280 ± 59 | | ** | | | |
| PCB153 | 6 | 506 ± 102 | | * | | | |
| PCB153+MeHg | 6 | 886 ± 219 | | ns | * | * | |
| PCB126 | 9 | 355 ± 51 | | ** | | | |
| PCB126+MeHg | 9 | 873 ± 134 | | ns | ** | | ** |
| <hr/> | | | | | | | |
| <i>Hembras</i> | <i>n</i> | <i>Media</i> | <i>SEM</i> | <i>Control</i> | <i>MeHg</i> | <i>PCB153</i> | <i>PCB126</i> |
| Control | 6 | 863 ± 70 | | | | | |
| MeHg | 6 | 319 ± 48 | | *** | | | |
| PCB153 | 6 | 388 ± 921 | | ** | | | |
| PCB153+MeHg | 6 | 743 ± 271 | | ns | ** | ** | |
| PCB126 | 6 | 197 ± 58 | | *** | | | |
| PCB126+MeHg | 6 | 627 ± 110 | | ns | ns | | * |
| <hr/> | | | | | | | |
| <i>Total</i> | <i>n</i> | <i>Media</i> | <i>SEM</i> | <i>Control</i> | <i>MeHg</i> | <i>PCB153</i> | <i>PCB126</i> |
| Control | 13 | 871 ± 62 | | | | | |
| MeHg | 11 | 300 ± 36 | | *** | | | |
| PCB153 | 12 | 447 ± 72 | | *** | | | |
| PCB153+MeHg | 12 | 814 ± 169 | | ns | ** | ** | |
| PCB126 | 15 | 276 ± 42 | | *** | | | |
| PCB126+MeHg | 15 | 750 ± 101 | | ns | ** | | *** |

Los experimentos son los mismos mostrados en las figuras 15, 16 y 17. Esta tabla resume los niveles de GMPc extracelular en cerebelo alcanzados en la fracción 8 tras la infusión de NMDA, expresados como porcentaje de la concentración basal (media de las fracciones 1-5). Se presentan conjuntamente los datos de machos y hembras. Los valores significativamente diferentes entre sí se han marcado de la siguiente manera: *(P<0.05), **(P<0.01) ó ***(P<0.001).

1.9.4 Cuantificación del contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en homogenados de cerebelo de ratas de tres meses de edad expuestas perinatalmente a los diferentes neurotóxicos.

El contenido de proteínas se analizó por electroforesis y “Western blot” de homogenados de cerebelo de las ratas expuestas perinatalmente a MeHg, PCB153 ó PCB126 solos o en combinación. En la Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos y en la figura 18 se muestran imágenes representativas de “immunoblottings” de las diferentes proteínas.

La exposición perinatal a MeHg produce un descenso significativo en el contenido de subunidad NR1 del receptor NMDA en cerebelo de machos, pero no de hembras. En las hembras expuestas perinatalmente a MeHg hay un descenso significativo en el contenido de nNOS, subunidad alfa de guanilato ciclasa y calmodulina en cerebelo. Estos cambios no ocurren en los machos.

La exposición perinatal a PCB153 no tiene ningún efecto sobre el contenido de proteínas estudiadas ni en machos ni en hembras.

La exposición perinatal a la combinación de MeHg con PCB153 previene la disminución inducida por el MeHg en NR1 en machos y en nNOS y calmodulina en hembras. Además, se observa un descenso significativo en el contenido de la subunidad alfa de guanilato ciclasa en cerebelo tanto en los machos como en las hembras expuestas a PCB153 + MeHg y también en la nNOS en los machos.

La exposición perinatal a PCB126 provoca un aumento significativo en el contenido de nNOS en el cerebelo de machos y hembras, así como en el contenido de calmodulina en las hembras,

pero no en los machos. También induce una disminución de NR1 en machos pero no en hembras.

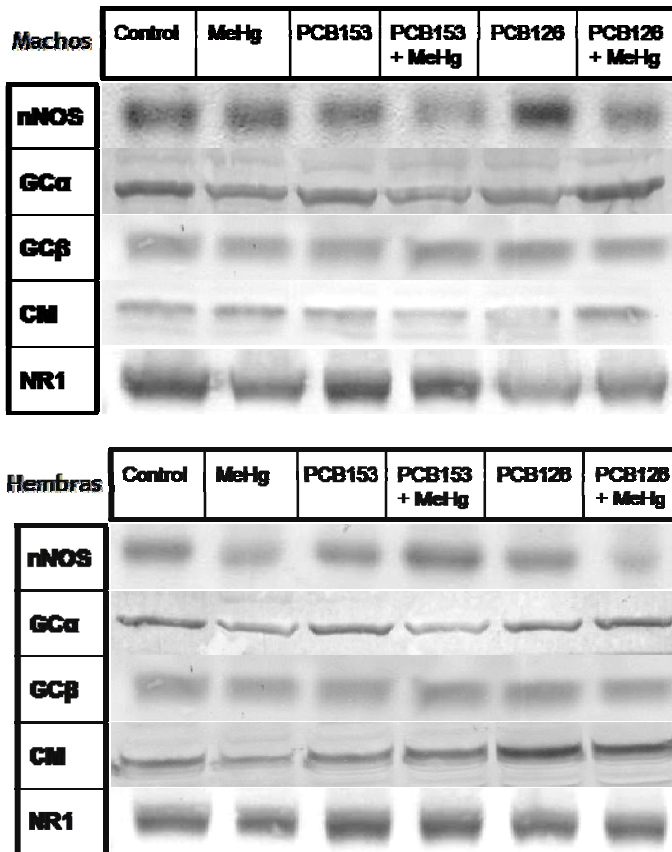
Tabla 2. Contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en homogenados de cerebelo de ratas de 3 meses expuestas perinatalmente a PCB153, PCB126 y/o MeHg

| Machos | | | | | |
|---------|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| | MeHg | PCB153 | PCB153Hg | PCB126 | PCB126Hg |
| nNOS | 105 ± 17 n = 5 | 110 ± 12 n = 6 | 59 ± 4 * ‡ n = 7 | 158 ± 29 * n = 6 | 106 ± 21 n = 6 |
| GCa | 84 ± 13 n = 3 | 89 ± 12 n = 3 | 78 ± 4 * n = 3 | 92 ± 7 n = 6 | 117 ± 6 * ‡ n = 5 |
| GCB | 91 ± 5 n = 3 | 102 ± 6 n = 3 | 102 ± 5 n = 4 | 85 ± 7 n = 8 | 60 ± 7 * ‡ n = 7 |
| CM | 104 ± 22 n = 3 | 108 ± 19 n = 3 | 89 ± 13 n = 3 | 93 ± 9 n = 5 | 132 ± 11 n = 5 |
| NR1 | 83 ± 3 * n = 5 | 94 ± 7 n = 6 | 100 ± 6 n = 5 | 73 ± 9 * n = 6 | 82 ± 7 * n = 5 |
| Hembras | | | | | |
| | MeHg | PCB153 | PCB153Hg | PCB126 | PCB126Hg |
| nNOS | 66 ± 6 * n = 6 | 87 ± 17 n = 7 | 134 ± 24 n = 7 | 145 ± 18 * n = 5 | 111 ± 13 n = 5 |
| GCa | 75 ± 12 * n = 5 | 91 ± 6 n = 5 | 71 ± 12 * n = 5 | 92 ± 12 n = 4 | 102 ± 13 n = 5 |
| GCB | 97 ± 5 n = 6 | 103 ± 5 n = 6 | 95 ± 2 n = 5 | 107 ± 6 n = 8 | 100 ± 5 n = 7 |
| CM | 62 ± 19 * n = 4 | 96 ± 27 n = 4 | 118 ± 24 n = 4 | 189 ± 42 * n = 5 | 140 ± 17 * n = 5 |
| NR1 | 98 ± 15 n = 6 | 114 ± 14 n = 6 | 113 ± 15 n = 5 | 104 ± 12 n = 5 | 108 ± 13 n = 5 |

Se analizó el contenido de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), subunidades alfa y beta de la guanilato ciclasa soluble (GCa y GCB), Calmodulina (CM) y de la subunidad NR1 del receptor de NMDA (NR1). Los valores significativamente diferentes del control se indican con asteriscos *($p < 0,05$) El símbolo ‡ indica diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la exposición a PCB solo y a la combinación con MeHg. Los valores son la media ± SEM de muestras triplicadas del número de ratas indicado y se expresan en porcentaje del contenido de la proteína en los homogenados de cerebelo de las ratas control (ANOVA de un criterio seguido de test t de Student).

El efecto sobre el contenido de nNOS desaparece en ratas expuestas a la combinación de PCB126 + MeHg, pero no así el aumento del contenido de calmodulina en hembras ni la disminución de NR1 en machos. Además, la exposición perinatal a PCB126 + MeHg produce en machos, pero no en hembras, un aumento de la subunidad α y una disminución de la subunidad β de la guanilato ciclasa soluble. (Tabla 2)

Fig. 18. Imágenes representativas de "Western blot" de homogenados de cerebelo de ratas de 3 meses expuestas perinatalmente a PCB153, PCB126 y/o MeHg



Las imágenes corresponden a "immunoblottings" de homogenados de cerebelo de machos y de hembras. En todos los casos se cargaron 40 μ g de proteína en cada pocillo.

1.9.5 Efectos de la exposición perinatal a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y de las ratas a los 8 meses de edad.

Se estudió la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y, realizando experimentos similares a los descritos en el apartado 4.1.2 para ratas de tres meses, con ratas de 8 meses de edad para estudiar la influencia de la maduración sobre la capacidad de aprendizaje de animales control o expuestos perinatalmente a MeHg, PCB153 o PCB126 solos o en combinación.

Las ratas hembra control necesitaron 98 ± 6 ensayos para aprender la tarea, mientras que las ratas expuestas a MeHg, PCB153 o a PCB126 necesitaron 85 ± 10 , 102 ± 15 y 70 ± 9 respectivamente, siendo estos resultados similares a los del grupo control. Las hembras expuestas a las combinaciones de PCB153 con MeHg o a PCB126 con MeHg también necesitaron un número similar de ensayos, 72 ± 11 y 88 ± 23 respectivamente. (Figura 19A).

Las ratas macho control necesitaron 89 ± 6 ensayos para aprender la tarea, mientras que las expuestas a MeHg, PCB153, PCB153 + MeHg, PCB126 o a PCB126 +MeHg necesitaron 102 ± 10 , 87 ± 7 , 96 ± 20 , 114 ± 15 y 74 ± 6 ensayos respectivamente, siendo estos resultados similares a los del grupo control (Figura 19B).

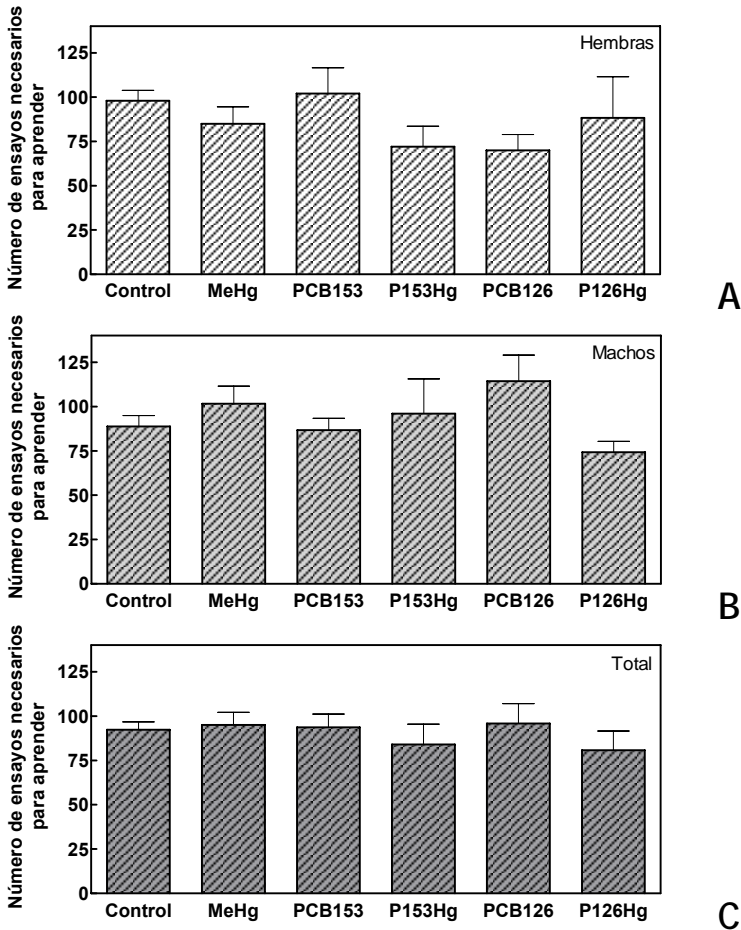


Fig. 19. A los 8 meses de edad, la capacidad de aprendizaje de las ratas perinatalmente expuestas a PCB153, PCB126 y/o MeHg no es diferente de la de las ratas control. Ratas de 8 meses de edad expuestas perinatalmente a los neurotóxicos fueron sometidas al test del laberinto en Y. Los valores son la media \pm SEM del número de ensayos necesarios para aprender la tarea. (ANOVA de un criterio y Tuckey post-hoc)

- A. Ratas hembra (Control n=8; MeHg n=6; PCB153 n=6; PCB153 + MeHg n=5; PCB126 n=7; PCB126 + MeHg n=7)
- B. Ratas macho (Control n=5; MeHg n=4; PCB153 n=5; PCB153 + MeHg n=5; PCB126 n=5; PCB126 + MeHg n=6)
- C. Total de ratas, machos y hembras (Control n=13; MeHg n=10; PCB153 n=11; PCB153 + MeHg n=10; PCB126 n=12; PCB126 + MeHg n=13)

Esto indica que, a los 8 meses de edad, la capacidad de aprendizaje es similar en las ratas control y en las expuestas perinatalmente a cualquiera de las sustancias neurotóxicas estudiadas.

No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de aprendizaje de los machos y las hembras en ninguno de los grupos, por lo que los resultados conjuntos de machos y hembras se muestra en la Figura 19C. Las ratas control necesitaron 95 ± 9 ensayos, y las ratas expuestas a MeHg 92 ± 12 , a PCB153 95 ± 11 , a PCB153+MeHg 84 ± 11 , a PCB126 88 ± 11 o a PCB126+MeHg 82 ± 13 ensayos.

A la edad de 8 meses, las ratas control mostraron un deterioro de su capacidad de aprendizaje comparada con la que tenían a los 3 meses. Este deterioro entre los tres y ocho meses no se observó en las ratas perinatalmente expuestas a los PCBs y/o MeHg (Figura 19).

1.9.6 Estudio de la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo de ratas de 8 meses de edad perinatalmente expuestas a PCB153, PCB126 y/o MeHg. Microdiálisis cerebral in vivo.

Se analizó la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo por microdiálisis en las ratas de 8 meses del mismo modo que en las de 3 meses (apartado 4.1.3) para estudiar la influencia de la maduración en la función de la vía y en los efectos sobre la misma de los PCBs y/o MeHg. Las figuras 20, 21 y 22 muestran los niveles de GMPc extracelular (basales y tras activación de la vía con NMDA) en machos, hembras y el total de ratas respectivamente. Para facilitar la visualización, los resultados se presentan en dos gráficas. Cada

una muestra los resultados de las ratas expuestas a cada PCB solo o en combinación con MeHg, comparándolos con los mismos controles y ratas expuestas a MeHg en ambas gráficas.

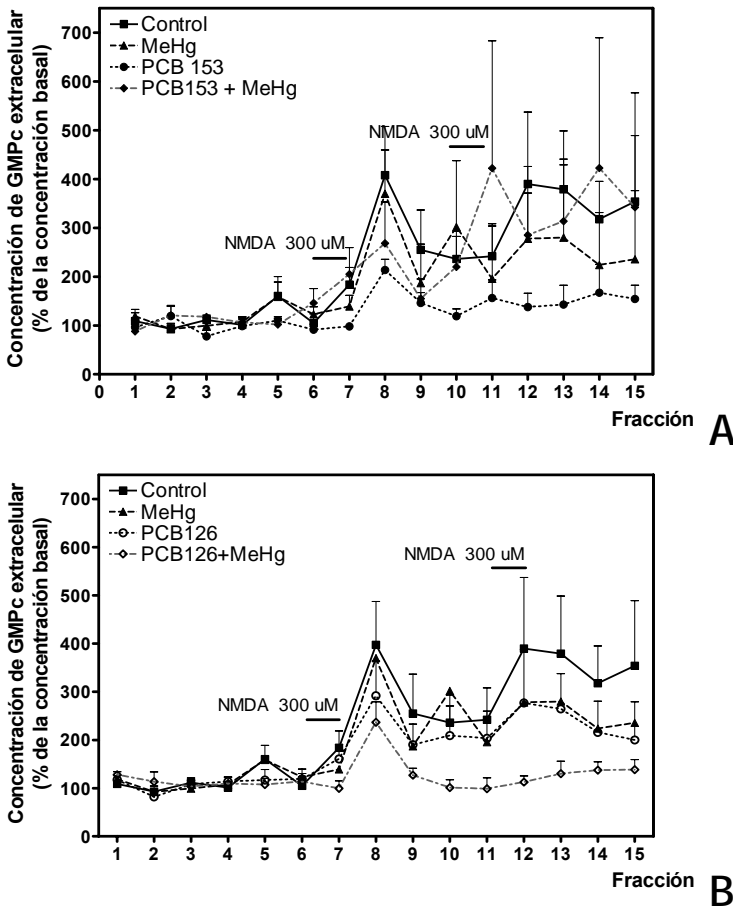


Fig. 20. Las ratas macho control o perinatalmente expuestas a MeHg, PCB153, PCB126 o sus combinaciones tienen a los 8 meses de edad una función de la vía Glu-NO-GMPc similar. Los valores se expresan como porcentaje de la concentración basal de GMPc (media de las fracciones 1-5) y son la media \pm SEM del número de ratas indicado en cada caso:

- A. Ratas macho (control n=8; MeHg n=6; PCB 153 n=6; PCB153 + MeHg n=7)
- B. Ratas macho (control n=8; MeHg n=6; PCB 126 n=8; PCB126 + MeHg n=9)

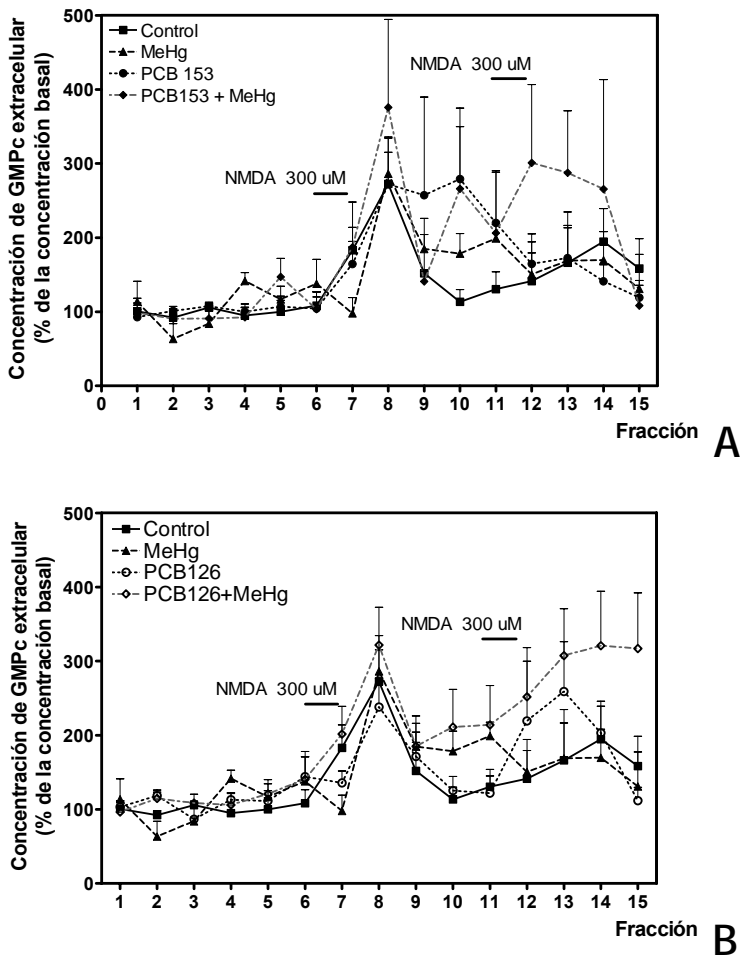


Fig. 21. Las ratas hembra control o perinatalmente expuestas a MeHg, PCB153, PCB126 o sus combinaciones tienen a los 8 meses de edad una función de la vía Glu-NO-GMPc similar. Los valores se expresan como porcentaje de la concentración basal de GMPc (media de las fracciones 1-5) y son la media \pm SEM del número de ratas indicado en cada caso:

- A. Hembras (control n=7; MeHg n=5; PCB 153 n=6; PCB153 + MeHg n=7)
- B. Hembras (control n=7; MeHg n=5; PCB 126 n=6; PCB126 + MeHg n=10)

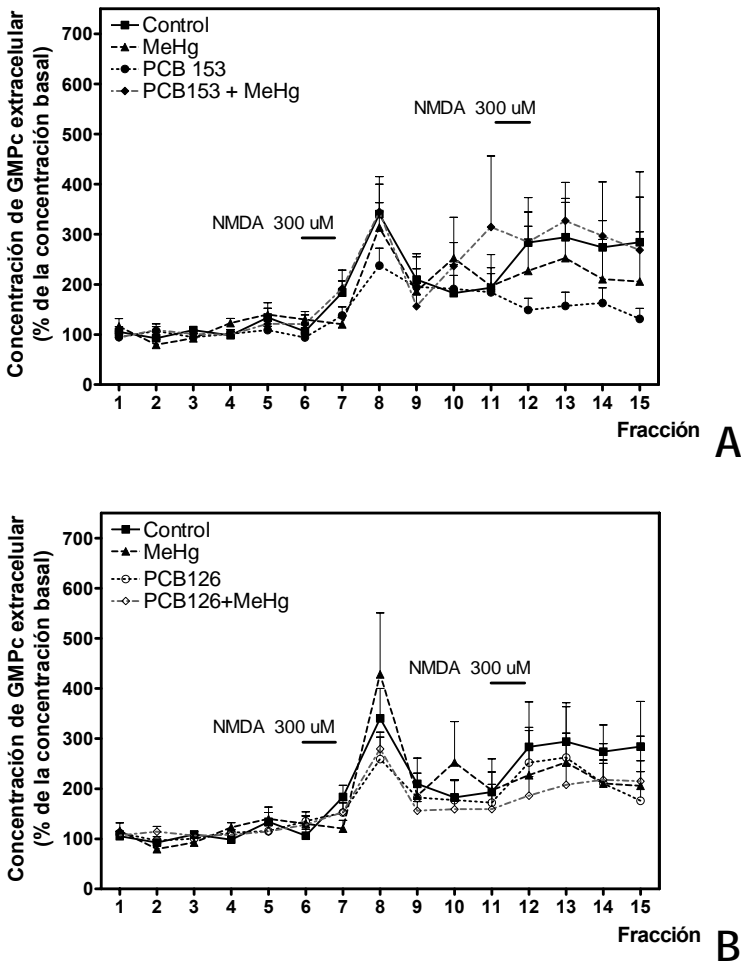


Fig. 22. Las ratas control o perinatalmente expuestas a MeHg, PCB153, PCB126 o sus combinaciones tienen a los 8 meses de edad una función de la vía Glu-NO-GMPc similar. Los valores se expresan como porcentaje de la concentración basal de GMPc (media de las fracciones 1-5) y son la media \pm SEM del número de experimentos indicado en cada caso. Se han combinado los datos de las figuras 20 y 21

- A. Machos y hembras (control n=15; MeHg n=11; PCB 153 n=12; PCB153 + MeHg n=14)
- B. Machos y hembras (control n=15; MeHg n=11; PCB 126 n=14; PCB126 + MeHg n=19)

Tanto las ratas macho como las hembras de 8 meses de edad de todos los grupos tuvieron un aumento de GMPc extracelular inducido por NMDA similar al de las ratas control. Esto indica que los animales de todos los grupos y sexos tienen una función similar de la vía Glu-NO-GMPc a esta edad. Los aumentos de la concentración de GMPc inducidos por NMDA en los diferentes grupos de ratas y su análisis estadístico se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. La exposición perinatal a los neurotóxicos no afecta al aumento de GMPc inducido por NMDA en ratas de 8 meses.

| Aumento de GMPc extracelular inducido por NMDA. | | | | Análisis estadístico de las diferencias entre distintos grupos | | | |
|---|----|-----------|-----|--|------|--------|--------|
| Machos | n | Media | SEM | Control | MeHg | PCB153 | PCB126 |
| Control | 8 | 408 ± 244 | | | | | |
| MeHg | 6 | 370 ± 201 | | ns | | | |
| PCB153 | 6 | 214 ± 54 | | ns | | | |
| PCB153+MeHg | 7 | 268 ± 224 | | ns | ns | ns | |
| PCB126 | 8 | 292 ± 203 | | ns | | | |
| PCB126+MeHg | 9 | 237 ± 127 | | ns | ns | | ns |
| Hembras | | | | Control | MeHg | PCB153 | PCB126 |
| Control | 7 | 272 ± 152 | | | | | |
| MeHg | 5 | 286 ± 65 | | ns | | | |
| PCB153 | 6 | 272 ± 157 | | ns | | | |
| PCB153+MeHg | 7 | 376 ± 314 | | ns | ns | ns | |
| PCB126 | 6 | 238 ± 103 | | ns | | | |
| PCB126+MeHg | 10 | 322 ± 153 | | ns | ns | | * |
| Total | n | Media | SEM | Control | MeHg | PCB153 | PCB126 |
| Control | 15 | 340 ± 206 | | | | | |
| MeHg | 11 | 314 ± 149 | | ns | | | |
| PCB153 | 12 | 237 ± 121 | | ns | | | |
| PCB153+MeHg | 14 | 345 ± 273 | | ns | ns | ns | |
| PCB126 | 14 | 259 ± 164 | | ns | | | |
| PCB126+MeHg | 19 | 279 ± 143 | | ns | ns | | ns |

*Resumen de los aumentos de GMPc extracelular inducidos por NMDA en cerebelo de ratas de 8 meses de edad expuestas perinatalmente a PCB153, PCB126 o MeHg solos o a combinaciones de PCB y MeHg. Los experimentos son los mismos mostrados en las figuras 20, 21 y 22. Esta tabla resume los aumentos de GMPc extracelular en cerebelo en la fracción 8, tras la infusión de NMDA, expresados como porcentaje de la concentración basal (media de las fracciones 1-5). Se presentan los datos de machos y hembras y del total de animales. Los valores significativamente diferentes entre sí se indican por asteriscos: *P<0.05. (ANOVA de 1 criterio seguido de test t de Student)*

1.9.7 Evaluación de la influencia de la edad y de la exposición perinatal a neurotóxicos en la capacidad aprendizaje y en la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo. Análisis comparativo de los resultados obtenidos en ratas de 3 y 8 meses de edad

Ante las diferencias observadas tanto en la capacidad de aprendizaje como en la función de la vía de Glu-NO-GMPc entre las ratas de 3 y 8 meses, realizamos un análisis comparativo de los resultados presentados en los apartados 4.1.2, 4.1.3, 4.1.5 y 4.1.6.

1.9.7.1. Efecto de la edad sobre la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y.

En la figura 23 se presenta una comparación de la capacidad de aprendizaje (Laberinto en Y) de ratas de 3 y 8 meses de edad expuestas o no perinatalmente a los diferentes neurotóxicos. Las ratas control, tanto machos como hembras, mostraron un deterioro significativo con la edad de su capacidad para aprender la tarea del laberinto en Y. Los machos de 8 meses necesitaron 97 ± 19 ensayos, frente a los 52 ± 10 de los de tres meses y las hembras de 8 meses 115 ± 18 ensayos frente a los 58 ± 7 ensayos de las de tres meses.

En cambio, los grupos expuestos a MeHg, PCB153, PCB126 o sus combinaciones mostraron una capacidad de aprendizaje similar a los 3 y a los 8 meses, con excepción de los machos perinatalmente expuestos a PCB153 + MeHg, que también necesitaron un número mayor de ensayos para aprender la tarea a los 8 meses (96 ± 19 ensayos) que a los 3 meses (47 ± 5 ensayos).

RESULTADOS

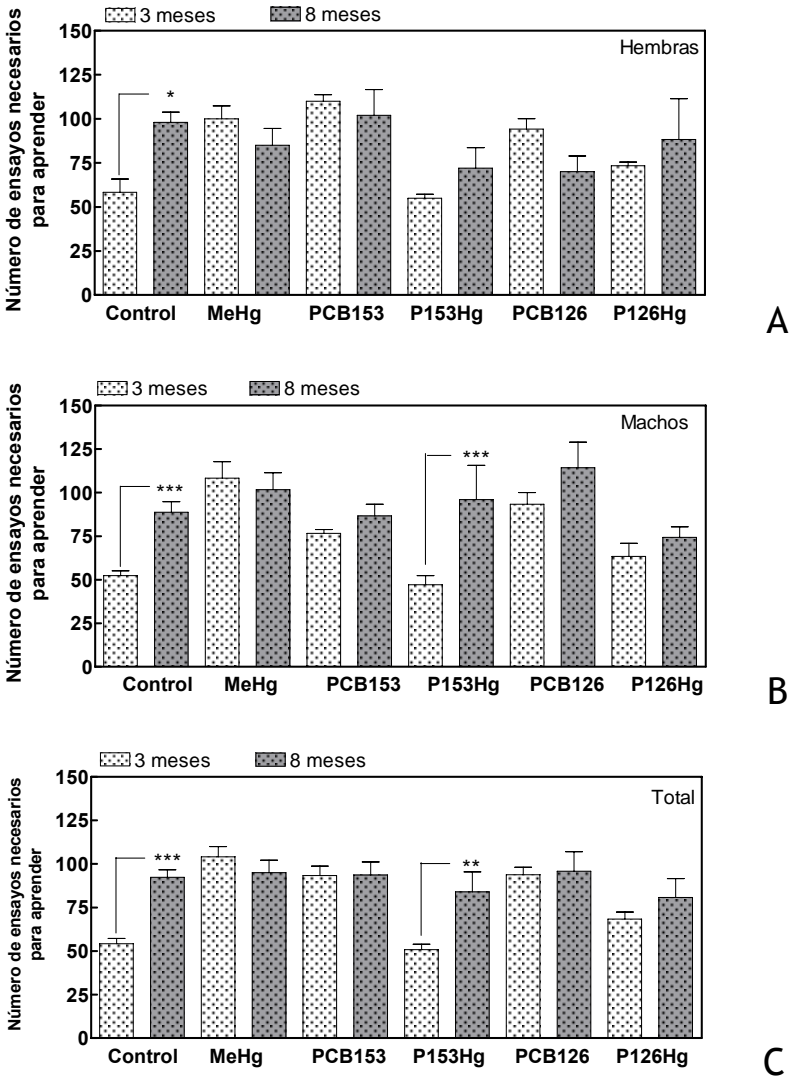


Fig. 23. La capacidad de aprendizaje se deteriora con la edad en ratas control y machos expuestos perinatalmente a PCB153 + MeHg pero no en ratas expuestas a MeHg, PCB153, PCB126 ó PCB126 + MeHg. Los valores representan el número de ensayos que el animal necesita para aprender la tarea. Los datos son los mismos que en los apartados 4.1.2 y 4.1.5. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos con el mismo tratamiento y diferente edad. (* $p < 0,05$; t-test de cada emparejamiento)

1.9.7.2. Efecto de la edad y de la exposición perinatal a los PCBs y/o MeHg sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo *in vivo*.

También observamos una reducción en el aumento de GMPc inducido por NMDA y, por lo tanto, un deterioro en la función de la vía Glu-NO-GMPc en ratas de 8 meses control y en las expuestas a las combinaciones de PCBs con MeHg, en comparación con las ratas de tres meses (Tabla 4). En las hembras, la función de la vía está, además, significativamente reducida a los 8 meses en las ratas perinatalmente expuestas sólo a PCB153 con respecto a la función a los 3 meses

Tabla 4. Comparación de la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo en ratas de 3 y 8 meses de edad.

Aumento de GMPc extracelular inducido por NMDA.

| | 3 meses | | | 8 meses | | | Diferencia entre edades |
|----------------|---------|---|-----------|---------|-----------|-----|-------------------------|
| | Machos | n | Media SEM | n | Media SEM | | |
| Control | | 7 | 880 ± 120 | 8 | 408 ± 244 | ** | |
| MeHg | | 5 | 280 ± 59 | 6 | 370 ± 201 | ns | |
| PCB153 | | 6 | 506 ± 102 | 6 | 214 ± 54 | ns | |
| PCB153+MeHg | | 6 | 886 ± 219 | 7 | 268 ± 224 | *** | |
| PCB126 | | 9 | 355 ± 51 | 8 | 292 ± 203 | ns | |
| PCB126+MeHg | | 9 | 873 ± 134 | 9 | 237 ± 127 | *** | |
| <i>Hembras</i> | | | | | | | |
| Control | | 6 | 863 ± 70 | 7 | 272 ± 152 | * | |
| MeHg | | 6 | 319 ± 48 | 5 | 286 ± 65 | ns | |
| PCB153 | | 6 | 388 ± 921 | 6 | 272 ± 157 | ** | |
| PCB153+MeHg | | 6 | 743 ± 271 | 7 | 376 ± 314 | *** | |
| PCB126 | | 6 | 197 ± 58 | 6 | 238 ± 103 | ns | |
| PCB126+MeHg | | 6 | 627 ± 110 | 10 | 322 ± 153 | * | |

*La función de la vía Glu-NO-GMPc se reduce con la edad en cerebelo de ratas control y en las expuestas perinatalmente a las combinaciones de PCB con MeHg. En las hembras, la función de la vía Glu-NO-GMPc se reduce además en las expuestas perinatalmente sólo a PCB153. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos con el mismo tratamiento y diferente edad. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; Student t-test). Los datos son los mismos que en los apartados 4.1.3 y 4.1.6*

1.2. ESTUDIOS *EX VIVO* EN CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS

1.2.1 *Estudio de los efectos de la exposición perinatal a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre la vía Glu-NO-GMPc en cultivos primarios de neuronas de cerebelo procedentes de animales expuestos.*

Una vez comprobado que la exposición a MeHg y/o los PCBs altera la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo *in vivo*, estudiamos si estos efectos se reproducen en cultivos primarios de neuronas preparados a partir de cerebelos de crías de 7-8 días expuestas perinatalmente a los diferentes neurotóxicos o vehículo. No se añadieron neurotóxicos al medio de cultivo.

La exposición perinatal a PCB153 o a PCB153 + MeHg aumenta significativamente ($p < 0,001$) los niveles basales de GMPc en las neuronas *ex vivo* ($171 \pm 15 \%$ y $147 \pm 13 \%$ respectivamente) (Figura 24).

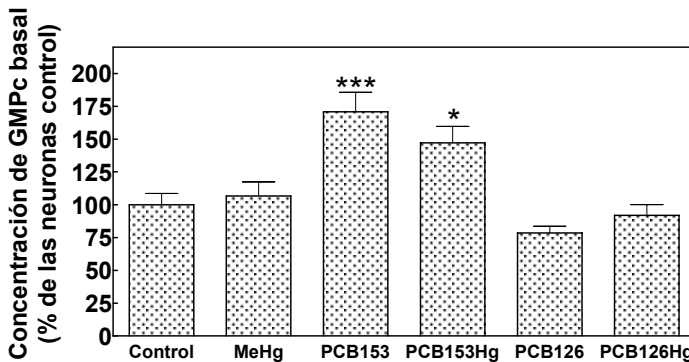


Fig. 24. Los niveles basales de GMPc intracelular están aumentados en neuronas cultivadas a partir de cerebelos de ratas expuestas perinatalmente a PCB153 o a PCB153 + MeHg. Los valores son la media \pm SEM de muestras duplicadas de cinco cultivos diferentes. Los valores significativamente diferentes de las neuronas control se indican mediante asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. ANOVA de un criterio).

La adición de NMDA al medio activa la vía Glu-NO-GMPc y aumenta el contenido de GMPc intracelular a un 455 ± 62 % del basal en neuronas control. El aumento de GMPc inducido por NMDA es significativamente menor en cultivos de neuronas preparados a partir de ratas expuestas perinatalmente a PCB153 (219 ± 27 %, $p < 0.05$), PCB153 + MeHg (167 ± 30 % $p < 0.01$) ó PCB126 (289 ± 24 % $p < 0.05$) (Figura 25). Estos resultados indican que el PCB153 solo o combinado con MeHg y el PCB126 disminuyen la función de la vía Glu-NO-GMPc en los cultivos *ex vivo* de neuronas de ratas expuestas *in vivo* a los neurotóxicos.

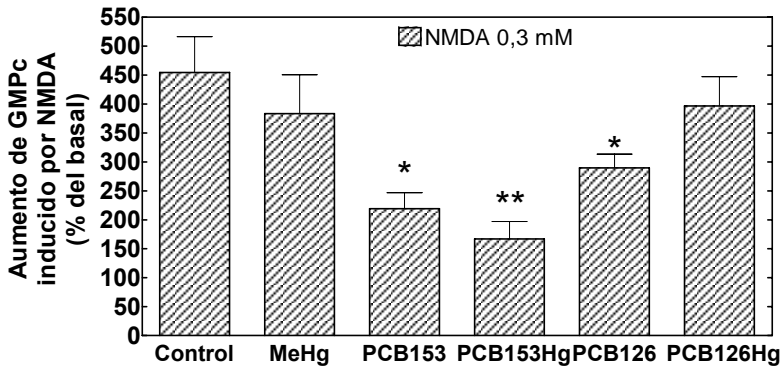


Fig. 25. La exposición a PCB153 solo o en combinación con MeHg o a PCB126 reduce la función de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas de cerebelo cultivadas *ex vivo* a partir de ratas expuestas perinatalmente. La función de la vía se determinó midiendo los niveles de GMPc en neuronas incubadas o no con NMDA 300 μ M durante 5 minutos. El aumento de GMPc inducido por NMDA es una medida de la función de la vía. Los valores son la media \pm SEM de muestras duplicadas de cinco cultivos diferentes. Los valores se expresan en porcentaje del GMPc basal. Los que son significativamente diferentes de las neuronas control se indican mediante asteriscos (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. ANOVA de un criterio)

1.2.2 Estudio de los efectos de la exposición perinatal a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas de cerebelo ex vivo.

Se estudió si la exposición perinatal a estos compuestos altera el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas cultivadas *ex vivo* durante 12-14 días. Como se muestra en la Tabla 5, la exposición a MeHg reduce significativamente el contenido de calmodulina y de la subunidad beta de la guanilato ciclasa soluble en las neuronas en cultivo. La exposición perinatal a PCB126 + MeHg reduce el contenido de nNOS y aumenta el de la guanilato ciclasa alfa en las neuronas de cerebelo *ex vivo*.

La exposición perinatal a PCB153, PCB126 ó PCB153 + MeHg no afecta significativamente el contenido de ninguna de las proteínas analizadas en cultivo de neuronas *ex vivo*.

Tabla 5. Efecto de la exposición perinatal a los neurotóxicos sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas de cerebelo ex vivo.

| Proteína | Exposición perinatal | | | | |
|----------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | MeHg | PCB153 | PCB153 +MeHg | PCB126 | PCB126 +MeHg |
| CM | 80 ± 22* n = 14 | 120 ± 21 n = 4 | 96 ± 20 n = 5 | 90 ± 10 n = 4 | 100 ± 26 n = 6 |
| nNOS | 98 ± 19 n = 13 | 103 ± 36 n = 2 | 105 ± 77 n = 2 | 104 ± 16 n = 5 | 58 ± 20** n = 6 |
| GCS-alfa | 100 ± 47 n = 8 | 86 ± 21 n = 3 | 88 ± 17 n = 3 | 94 ± 17 n = 5 | 144 ± 28* n = 6 |
| GCS-beta | 74 ± 11** n = 16 | 78 ± 27 n = 4 | 82 ± 15 n = 4 | 95 ± 10 n = 4 | 117 ± 32 n = 6 |

Los valores son la media ± SEM del número de cultivos indicado. Se expresan como porcentaje del contenido de cada proteína en las neuronas control. Los valores significativamente diferentes de las neuronas control se indican mediante asteriscos (*p<0,05, ** p<0,001)

1.3. EFECTOS DE LA ADICIÓN *IN VITRO* DE LOS PCBs Y/O MeHg A CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS CONTROL SOBRE LA FUNCIÓN DE LA VÍA GLU-NO-GMPc.

1.3.1 Estudio de los efectos del PCB126, PCB153 y/o MeHg añadidos in vitro a cultivos de neuronas de cerebelo control sobre la viabilidad neuronal.

Uno de los objetivos de esta tesis era evaluar la utilidad de los cultivos de neuronas de cerebelo de ratas control como modelo para estudiar los efectos que la exposición a PCB153, PCB126 o MeHg solos o combinados ejercen sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebro de ratas *in vivo*. Para realizar estos estudios fue necesario primero evaluar los efectos del MeHg y los PCBs añadidos *in vitro* sobre la viabilidad neuronal. Este estudio es indispensable para establecer el rango de concentraciones que se pueden utilizar sin llegar a desencadenar mecanismos de muerte celular. Las neuronas se cultivaron a partir de cerebelos de crías de 7 días de edad de ratas Wistar control. Los PCBs y/o el MeHg se añadieron *in vitro* a las 24 horas de la siembra. Los ensayos de viabilidad celular se realizaron a los 12-14 días de cultivo.

En la figura 26 se muestran algunas imágenes representativas de estos ensayos. La viabilidad neuronal se determinó como se describe en el apartado 3.2.2.3.

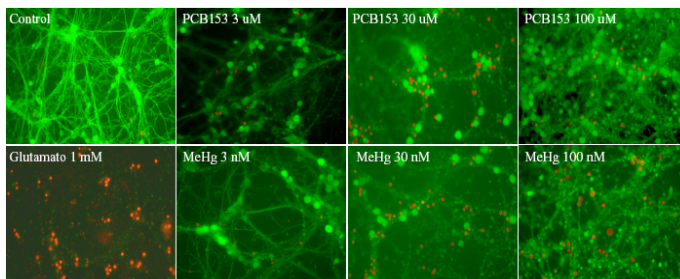


Fig. 26. Imágenes representativas tomadas en el microscopio de fluorescencia de neuronas de cerebelo tratadas *in vitro* con los diferentes compuestos y teñidas con diacetato de fluoresceína (verde) y con Yoduro de propidio (rojo). Las células vivas están teñidas de verde y las muertas de rojo.

El tratamiento *in vitro* con PCB153 reduce la viabilidad de las neuronas granulares en cultivo a partir de una concentración de 50 μM (71 ± 7 % de células viables). La EC₅₀ de este compuesto es 120 μM. (Figura 27).

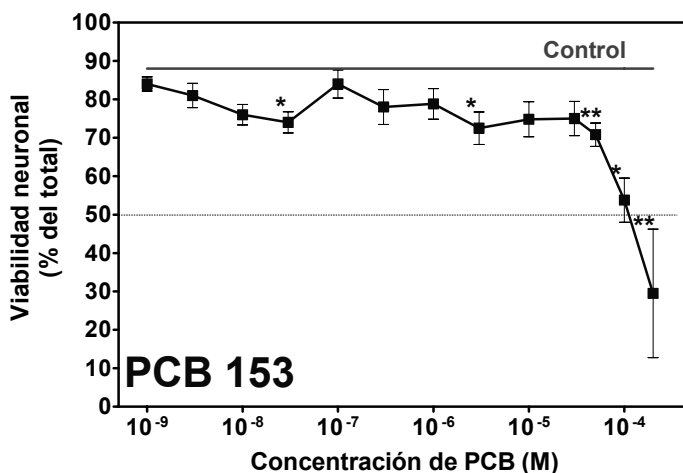


Fig. 27. El PCB153, añadido *in vitro* al medio de cultivo, reduce significativamente la viabilidad neuronal a partir de una concentración 50 μM. Cada valor es la media ± SEM de 5 cultivos. En cada cultivo se contaron aproximadamente 2000 neuronas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la viabilidad de las neuronas control (* p<0,05, ** p<0,01, ANOVA de un criterio)

El tratamiento *in vitro* con PCB126 reduce la viabilidad de las neuronas granulares en cultivo a partir de una concentración de 1 nM (74 ± 2 % de células viables), pero este porcentaje de viabilidad es relativamente estable hasta su descenso a 10 μ M. La EC_{50} de este compuesto es 9 μ M. (Figura 28)

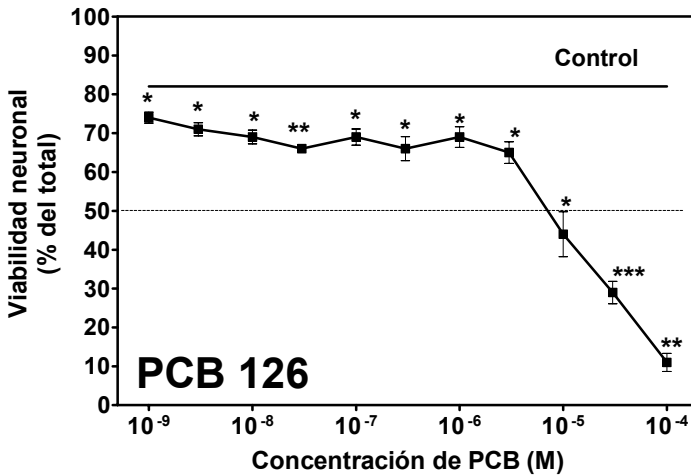


Fig. 28. El PCB126, añadido *in vitro* al medio de cultivo, reduce significativamente la viabilidad neuronal a partir de una concentración 1 nM. Cada valor es la media \pm SEM de 5 cultivos. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la viabilidad de las neuronas control (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. ANOVA de un criterio).

El tratamiento *in vitro* con MeHg reduce la viabilidad de las neuronas granulares en cultivo a partir de una concentración de 10 μ M (76 ± 4 % de células viables), pero no hay grandes variaciones en este porcentaje de variabilidad hasta 50 nM de MeHg. La EC_{50} de este compuesto es 0,07 μ M. (Figura 29)

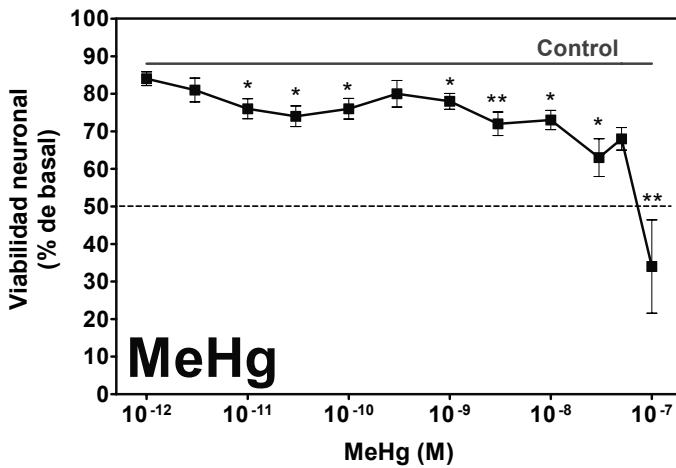


Fig. 29. El MeHg, añadido *in vitro* al medio de cultivo, reduce significativamente la viabilidad neuronal a partir de una concentración 10 pM. Cada valor es la media \pm SEM de 5 cultivos. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la viabilidad de las neuronas control (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. ANOVA de un criterio).

1.3.2 Estudio del efecto de los PCBs y/o MeHg añadidos *in vitro* sobre la función de la vía Glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en neuronas de cerebelo.

Una vez determinado el rango de concentraciones útil de estos compuestos en cultivos de neuronas de cerebelo, procedimos a evaluar sus efectos sobre la vía Glu-NO-GMPc.

Se prepararon cultivos de neuronas a partir de cerebelo de crías de 7 días de edad de ratas Wistar control. Se añadieron los PCBs y/o MeHg *in vitro* a las 24 horas de la siembra y se mantuvieron durante 12-14 días. El día del ensayo, las neuronas se trataron con NMDA (0.3mM) para activar la vía Glu-NO-GMPc o con SNAP (0,1mM) para activar la guanilato ciclasa soluble.

1.3.2.1. Estudio de los efectos del tratamiento *in vitro* con Metilmercurio sobre la función de la vía Glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en neuronas de cerebelo

La exposición *in vitro* a Metilmercurio no altera los niveles basales de GMP intracelular en las neuronas de cerebelo expuestas durante 12-13 días (Figura 30A). Sin embargo, la concentración de GMPc alcanzada tras la incubación con NMDA se reduce significativamente con respecto a las neuronas control a partir de 3 nM MeHg. El NMDA aumenta el GMPc un 400 ± 30 % en neuronas control. En neuronas tratadas con MeHg 3, 5 ó 10 nM el funcionamiento de la vía Glu-NO-GMPc está disminuido, alcanzando el GMPc un 226 ± 20 , 300 ± 40 y 200 ± 76 % el basal respectivamente tras el tratamiento con NMDA (Figura 30B).

La activación de la guanilato ciclasa con SNAP aumentó los niveles de GMPc intracelular un 570 ± 53 % en neuronas control, pero sólo un 300 ± 43 , 330 ± 24 y 290 ± 62 % en las tratadas con MeHg 3,5 y 10 nM respectivamente (Figura 30C). Esto indica que la activación de la guanilato ciclasa por NO está disminuida en neuronas tratadas *in vitro* con MeHg.

1.3.2.1. Estudio de los efectos del tratamiento *in vitro* con PCB153 sobre la función de la vía Glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en neuronas de cerebelo

La exposición *in vitro* a PCB153 de 1 a 30 μ M aumenta los niveles basales de GMP intracelular en las neuronas de cerebelo. El PCB153 1 μ M aumenta el contenido basal de GMPc al 136 ± 72 % ($p < 0,05$) del de neuronas control; a 3 μ M 151 ± 77 % ($p < 0,01$); a 10 μ M, 153 ± 67 % ($p < 0,01$) y a 30 μ M 181 ± 88 % ($p < 0,05$) (Figura 31A).

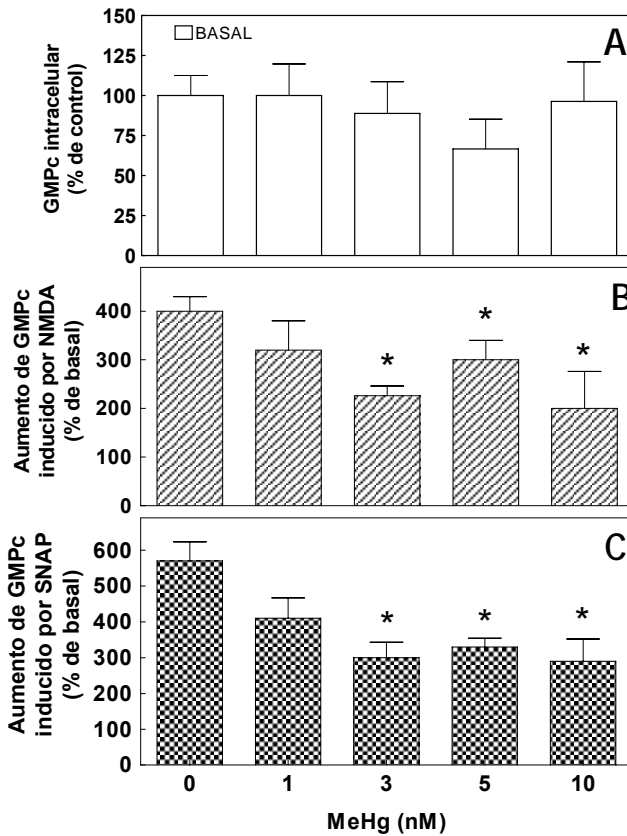


Fig. 30. La exposición a MeHg *in vitro* reduce la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc por NMDA y la activación de la guanilato ciclasa soluble por NO en neuronas de cerebelo en cultivo. Las neuronas se cultivaron a partir de cerebelo de crías de rata Wistar de 7 días de edad. Se añadió MeHg *in vitro* a las 24 horas tras la siembra y se mantuvo durante 12-14 días. El día del ensayo, las neuronas se trataron con NMDA (0.3mM) o SNAP (0,1mM) durante 5 minutos. Los valores son la media \pm SEM de muestras triplicadas de 6 cultivos. Aquellos que son significativamente diferentes de las neuronas control se indican mediante asteriscos. (* $p < 0.05$)

- A. Contenido basal de GMPc intracelular. Los valores se expresan en porcentaje del GMPc basal de las neuronas control.
- B. Activación de la vía Glu-NO-GMPc por NMDA. Los valores representan el aumento de GMPc inducido por NMDA expresado en porcentaje del contenido basal de GMPc en las muestras de cada tratamiento.

- C. *Activación de la guanilato ciclasa soluble por óxido nítrico. Se representa el aumento de GMPc inducido por el SNAP expresado en porcentaje del contenido basal de GMPc en cada tratamiento.*

El aumento de GMPc inducido por la activación de la vía Glu-NO-GMPc con NMDA es significativamente menor que en neuronas control a partir de PCB153 10 μM . El NMDA aumenta el GMPc al 460 ± 32 % del basal en las neuronas control. En las neuronas tratadas con PCB153 10, 30, 50 y 100 μM la función de la vía Glu-NO-GMPc está disminuida. En las neuronas expuestas a estas concentraciones de PCB153, el GMPc alcanzó 331 ± 57 , 283 ± 51 , 235 ± 49 y 211 ± 32 % el basal, respectivamente, tras el tratamiento con NMDA (Figura 31B).

La activación de la guanilato ciclasa con SNAP aumentó el GMPc intracelular al 498 ± 102 % del basal en neuronas control, pero sólo al 312 ± 55 %, 382 ± 48 , 358 ± 52 y 321 ± 65 % en las tratadas con PCB153 1, 3, 5 ó 10 μM respectivamente (Figura 31C), indicando que a estas concentraciones el PCB153 reduce ligeramente la activación de la guanilato ciclasa por óxido nítrico.

1.3.2.1. Estudio de los efectos del tratamiento *in vitro* con PCB126 sobre la función de la vía Glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en neuronas de cerebelo

El tratamiento *in vitro* con PCB126 0,3 μM ó 1 μM aumenta los niveles basales de GMP intracelular en las neuronas (177 ± 20 %, $p < 0,01$ y 183 ± 100 % $p < 0,05$ respectivamente; Figura 32A).

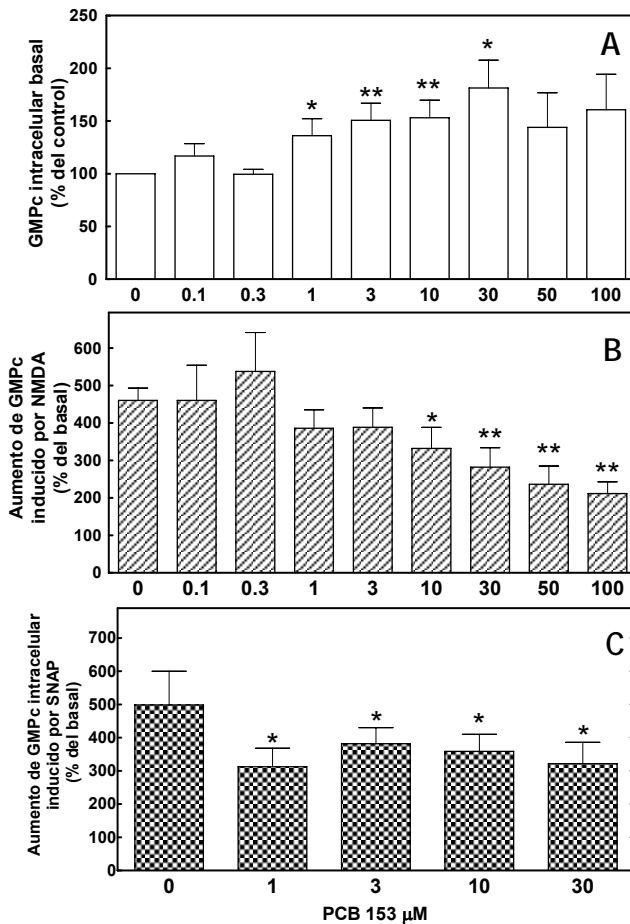


Fig. 31. La exposición crónica a PCB153 *in vitro* aumenta los niveles basales de GMPc y reduce la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc por NMDA y la activación de la guanilato ciclasa por NO. Las neuronas se cultivaron a partir de cerebelo de crías de rata Wistar de 7 días de edad. Se añadió PCB153 *in vitro* a las 24 horas tras la siembra y se mantuvo durante 12-14 días. El día del ensayo, las neuronas se trataron con NMDA (0.3mM) o SNAP (0,1mM) durante 5 minutos. Los valores son la media \pm SEM de muestras triplicadas de 6 cultivos. Los valores significativamente diferentes de las neuronas control se indican mediante asteriscos. (* $p < 0.05$)

- A. Contenido basal de GMPc intracelular. Los valores se expresan en porcentaje del GMPc basal de las neuronas control.
- B. Activación de la vía Glu-NO-GMPc por NMDA. Los valores representan el aumento de GMPc inducido por NMDA expresado en

porcentaje del contenido basal de GMPc en las muestras de cada tratamiento.

- C. Activación de la guanilato ciclasa soluble por óxido nítrico. Se representa el aumento de GMPc inducido por el SNAP expresado en porcentaje del contenido basal de GMPc en cada tratamiento.

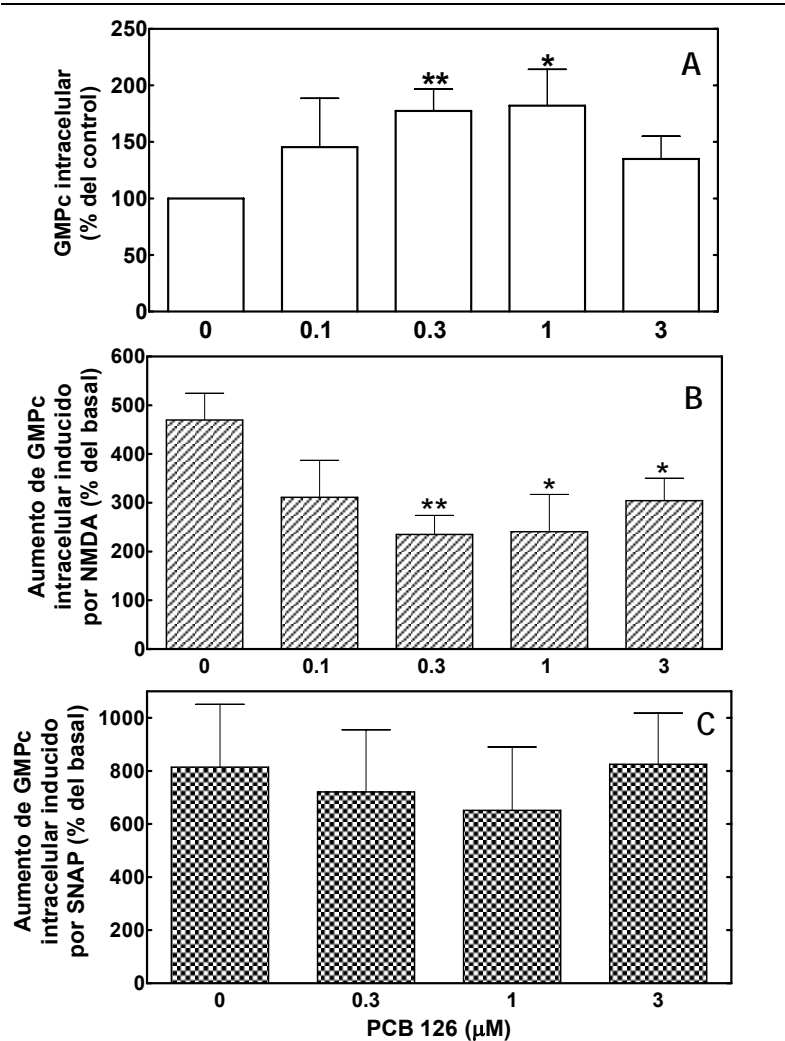


Fig. 32. La exposición crónica a PCB126 *in vitro* aumenta los niveles basales de GMPc y reduce la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc por NMDA. Las neuronas se cultivaron a partir de

cerebelo de crías de rata Wistar de 7 días de edad. Se añadió PCB126 in vitro a las 24 horas tras la siembra y se mantuvo durante 12-14 días. El día del ensayo, las neuronas se trataron con NMDA (0.3mM) o SNAP (0,1mM) durante 5 minutos. Los valores son la media \pm SEM de muestras triplicadas de 6 cultivos. Los valores significativamente diferentes de las neuronas control se indican mediante asteriscos. ($p < 0.05$)*

A. Contenido basal de GMPc intracelular. Los valores se expresan en porcentaje del GMPc basal de las neuronas control.

B. Activación de la vía Glu-NO-GMPc por NMDA. Los valores representan el aumento de GMPc inducido por NMDA expresado en porcentaje del contenido basal de GMPc en las muestras de cada tratamiento.

C. Activación de la guanilato ciclasa soluble por óxido nítrico. Se representa el aumento de GMPc inducido por el SNAP expresado en porcentaje del contenido basal de GMPc en cada tratamiento.

La adición de NMDA activa la vía Glu-NO-GMPc y aumenta el GMPc un 470 ± 54 % en las neuronas control. En las neuronas tratadas con PCB126 0.3, 1 ó 3 μ M está disminuida la función de la vía Glu-NO-GMPc. En las neuronas expuestas a estas concentraciones de PCB126, tras añadir NMDA, el GMPc alcanzó un 235 ± 39 % ($p < 0,01$), 241 ± 76 % ($p < 0,05$) y 304 ± 46 % ($p < 0,05$) del basal respectivamente (Figura 32B).

El PCB126, a las concentraciones estudiadas, no altera la activación de la guanilato ciclasa soluble por NO (Figura 32C)

1.3.3 Efecto de los tratamientos con combinaciones de PCBs con MeHg sobre la vía Glu-NO-GMPc.

También realizamos tratamientos *in vitro* con combinaciones de PCB153 ó PCB126 con MeHg para determinar si se reproducían los efectos encontrados *in vivo*.

1.3.3.1. Efecto del tratamiento *in vitro* con la combinación de PCB153 y metilmercurio

Como se muestra en la figura 33A, la exposición *in vitro* a la combinación de PCB153 con MeHg 10 nM previno el aumento de GMPc basal provocado por el PCB153 solo. Una concentración menor de MeHg (1nM) no previene el efecto del PCB153. En presencia de MeHg 1 nM, el PCB153 produjo un aumento en el GMPc basal de $174 \pm 32 \%$, $126 \pm 14 \%$ y $213 \pm 56 \%$ a 1 μM , 3 μM y 10 μM respectivamente ($p < 0,05$). Combinado con MeHg 10 nM, estas mismas concentraciones de PCB153 no aumentaron el GMPc basal ($123 \pm 15 \%$, $122 \pm 19 \%$ y $111 \pm 6 \%$ respectivamente)

La combinación de PCB153 con MeHg potencia el efecto inhibitor de cada sustancia sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc. (Figura 33B). Por ejemplo, el PCB153 a 1 ó 3 μM o el MeHg a 1 nM no afectan la función de la vía. En cambio, su combinación la inhibe.

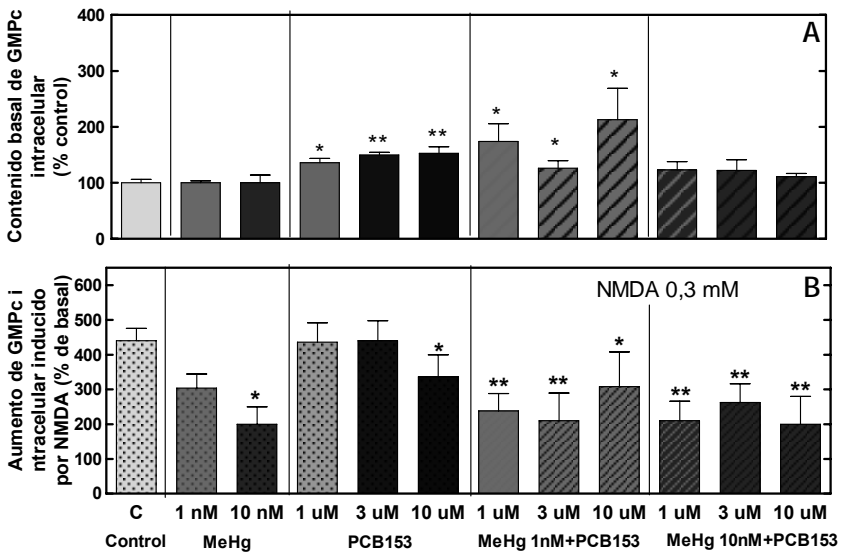


Fig. 33. La exposición crónica *in vitro* a la mezcla de MeHg con PCB153 potencia el descenso en la función de la vía Glu-NO-GMPc. El MeHg previene el aumento de GMPc basal inducido por PCB153 en neuronas de cerebelo en cultivo. Las neuronas se trataron con NMDA (0.3mM) durante 5 minutos. Los valores son la media \pm SEM de muestras triplicadas de 6 cultivos. Los valores significativamente diferentes de las neuronas control se indican por asteriscos. (* $p < 0.05$, ** < 0.01)

- A. Contenido basal de GMPc intracelular. Los valores se expresan en porcentaje del GMPc basal de las neuronas control.
- B. Activación de la vía Glu-NO-GMPc por NMDA. Los valores representan el aumento de GMPc inducido por NMDA expresado en porcentaje del contenido basal de GMPc en las muestras de cada tratamiento.

1.3.3.2. Efecto del tratamiento *in vitro* con la combinación de PCB126 y metilmercurio

A diferencia de lo que ocurre con el PCB153, la combinación con 10 nM MeHg no previene el aumento de GMPc basal inducido por

el PCB126 solo. En presencia de MeHg 1 nM, el PCB126 0,3 μ M induce una disminución del GMPc basal al 75 ± 32 % de las neuronas control ($p < 0,05$). (Figura 34)

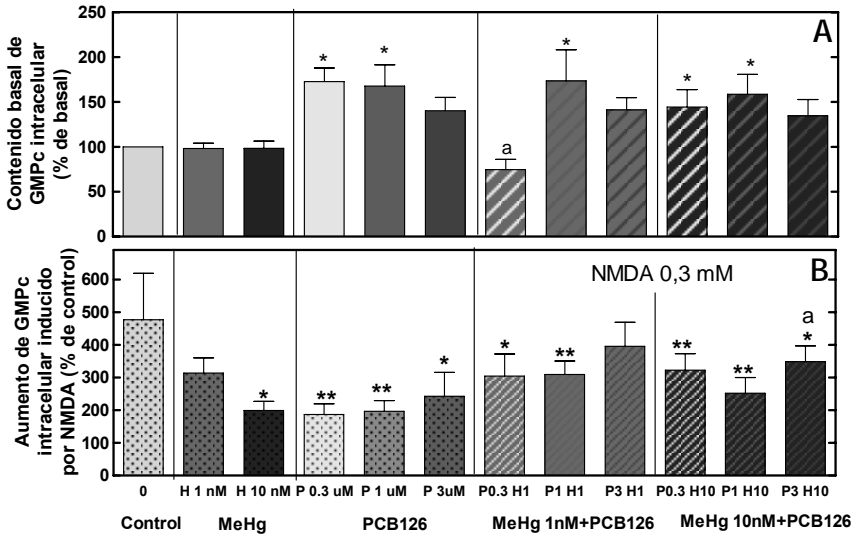


Fig. 34. El tratamiento *in vitro* con MeHg no impide el aumento de GMPc basal inducido por PCB126 en neuronas de cerebelo en cultivo. La exposición crónica a algunas concentraciones de la mezcla de MeHg con PCB126 *in vitro* previene el descenso en la activación de la vía Glu-NO-GMPc por NMDA. Las neuronas se trataron con NMDA (0.3mM) durante 5 minutos. Los valores son la media \pm SEM de muestras triplicadas de 6 cultivos. Los valores significativamente diferentes de las neuronas control se indican por asteriscos. (* $p < 0,05$, ** $< 0,01$)

A. Contenido basal de GMPc intracelular. Los valores se expresan en porcentaje del GMPc basal de las neuronas control.

B. Activación de la vía Glu-NO-GMPc por NMDA. Los valores representan el aumento de GMPc inducido por NMDA expresado en porcentaje del contenido basal de GMPc en las muestras de cada tratamiento.

Como se muestra en la figura 35B, la adición de NMDA para activar la vía produjo un aumento significativamente menor de GMPc que el control (476 ± 141 %) en las neuronas tratadas con PCB126. Sin embargo, el MeHg 1 nM previene el efecto del PCB126 3 μ M

sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc. Las neuronas tratadas con estas concentraciones tienen una función de la vía del Glu-NO-GMPc similar a las neuronas control.

Tabla 6. Resumen de los efectos de los tratamientos in vitro con PCB153, PCB126 o MeHg.

| Compuesto | GMPc intracelular | | |
|---------------|---|-----------------------------------|-------------------------------|
| | Basal | ↑ por NMDA | ↑ por SNAP |
| PCB153 | ↑ (50 %) | ↓ (45 %) | ↓ (30 %) |
| PCB126 | ↑ (45 %) | ↓ (50 %) | ↔ |
| MeHg | ↔ | ↓ (50 %) | ↓ (50 %) |
| PCB153 + MeHg | 10 nM MeHg previene el efecto de PCB153 | | Potencia el efecto individual |
| PCB126 + MeHg | MeHg no previene el efecto de PCB126 | MeHg previene el efecto de PCB126 | |

Esta tabla resume los resultados mostrados en las figuras 31 a 35. Entre paréntesis se indica el porcentaje de aumento o disminución con respecto al valor control de cada caso.

1.3.4 Efecto de la exposición in vitro a PCBs y/o MeHg sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc.

Se cuantificó el contenido de las proteínas de la vía Glu-NO-GMPc para determinar si se alteraba por la exposición a los PCBs y/o MeHg y si estas alteraciones podrían contribuir a las de la función de la vía.

Como se muestra en la tabla 7, la exposición *in vitro* a MeHg produce una disminución del contenido de calmodulina en neuronas de cerebelo a todas las concentraciones estudiadas. También se observó una disminución significativa del contenido de nNOS a concentraciones de 5 y 10 nM de MeHg y de NR1 a 1nM de MeHg.

Tabla 7. Efecto de la exposición crónica a MeHg in vitro sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas granulares de cerebelo.

| MeHg (nM) | NR1 | Calmodulina | nNOS | GCs-alfa | GCs-beta |
|-----------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|
| 1 nM | 72 ± 8 * n = 7 | 82 ± 13 * n = 8 | 100 ± 23 n = 8 | 111 ± 19 n = 8 | 92 ± 13 n = 8 |
| 3 nM | | 63 ± 23 * n = 8 | 87 ± 19 n = 8 | 117 ± 36 n = 8 | 117 ± 18 n = 8 |
| 5 nM | | 61 ± 1 ** n = 6 | 73 ± 29 * n = 6 | 90 ± 30 n = 6 | 87 ± 16 n = 6 |
| 10 nM | 96 ± 45 n = 6 | 83 ± 8 * n = 8 | 86 ± 16 * n = 6 | 127 ± 15 n = 6 | 79 ± 19 n = 6 |

*Los valores son la media + SEM de muestras triplicadas del número de cultivos indicado en cada caso y se expresan como porcentaje del contenido en neuronas control. Se han resaltado en negrita y marcado con asteriscos los valores significativamente diferentes del control. (*p<0,05, **p<0,01. ANOVA de un criterio)*

En la tabla 8 se resume el contenido de proteínas en neuronas de cerebelo expuestas *in vitro* a PCB153. El tratamiento con PCB153 produjo una reducción significativa del contenido de calmodulina a todas las concentraciones estudiadas y de la subunidad beta de la guanilato ciclasa soluble a PCB153 10 μ M.

Tabla 8. Efecto de la exposición crónica a PCB153 in vitro sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas granulares de cerebelo

| PCB 153 | NR1 | CM | nNOS | GCs-alfa | GCs-beta |
|------------|-----------------------|--|-----------------------|-----------------------|--|
| 1 μ M | 102 \pm 27 n = 9 | 83 \pm 16 * n = 8 | 114 \pm 36 n = 8 | 86 \pm 56 n = 8 | 90 \pm 19 n = 8 |
| 3 μ M | 92 \pm 30 n = 8 | 83 \pm 19 * n = 8 | 102 \pm 34 n = 8 | 95 \pm 49 n = 8 | 96 \pm 19 n = 8 |
| 10 μ M | 97 \pm 21 n = 8 | 81 \pm 31 * n = 8 | 116 \pm 43 n = 6 | 117 \pm 27 n = 3 | 81 \pm 12 * n = 6 |

Los valores son la media + SEM de muestras triplicadas del número de cultivos indicado en cada caso y se expresan como porcentaje del contenido en neuronas control. Se han resaltado en negrita y marcado con asteriscos los valores significativamente diferentes del control. ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$. ANOVA de un criterio)*

En la tabla 9 se resume el contenido de proteínas en neuronas de cerebelo expuestas *in vitro* a PCB153 combinado con MeHg. El tratamiento con PCB153 + MeHg previno la disminución en el contenido de calmodulina inducido por el tratamiento con PCB153 o MeHg solos. El tratamiento de PCB153 combinado con MeHg 10 nM produjo un aumento significativo en el contenido de ambas subunidades de guanilato ciclasa a todas las concentraciones del PCB153 estudiadas. Se observa también un aumento de la subunidad NR1 del receptor NMDA en las combinaciones de MeHg con PCB153 10 μ M.

Tabla 9. Efecto de la exposición crónica a PCB153 + MeHg in vitro sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas granulares de cerebelo

| MeHg nM + PCB153 μ M | NR1 | CM | nNOS | GCs-alfa | GCs-beta |
|--------------------------|--|-----------------------|-----------------------|--|---|
| MeHg 1 + PCB153 1 | 96 \pm 8 n = 4 | 96 \pm 11 n = 4 | 99 \pm 17 n = 4 | 161 \pm 67 n = 4 | 110 \pm 23 n = 4 |
| MeHg 1 + PCB153 3 | 102 \pm 18 n = 4 | 95 \pm 4 n = 4 | 120 \pm 20 n = 3 | 137 \pm 68 n = 4 | 115 \pm 21 n = 4 |
| MeHg 1 + PCB153 10 | 78 \pm 7* n = 4 | 101 \pm 11 n = 4 | 108 \pm 15 n = 4 | 136 \pm 27 n = 4 | 143 \pm 34 n = 4 |
| MeHg 10 + PCB153 1 | 89 \pm 18 n = 4 | 91 \pm 17 n = 4 | 94 \pm 15 n = 3 | 147 \pm 25* n = 4 | 149 \pm 38* n = 4 |
| MeHg 10 + PCB153 3 | 92 \pm 14 n = 4 | 97 \pm 22 n = 4 | 91 \pm 22 n = 4 | 131 \pm 10* n = 4 | 145 \pm 18** n = 4 |
| MeHg 10 + PCB153 10 | 75 \pm 6* n = 4 | 86 \pm 27 n = 4 | 112 \pm 40 n = 4 | 126 \pm 4* n = 4 | 129 \pm 10* n = 4 |

Los valores son la media + SEM de muestras triplicadas del número de cultivos indicado en cada caso y se expresan como porcentaje del contenido en neuronas control. Se han resaltado en negrita y marcado con asteriscos los valores significativamente diferentes del control. (*p<0,05, **p<0,01. ANOVA de un criterio)

Tabla 10. Efecto de la exposición crónica a PCB126 in vitro sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas granulares de cerebelo

| PCB 126 | NR1 | CM | nNOS | GCs-alpha | GCs-beta |
|-------------|-----------------------|-----------------------|---|---|------------------------|
| 0.3 μ M | 86 \pm 27 n = 6 | 118 \pm 40 n = 8 | 99 \pm 37 n = 8 | 150 \pm 47 * n = 6 | 106 \pm 33 n = 9 |
| 1 μ M | 90 \pm 43 n = 7 | 115 \pm 40 n = 8 | 105 \pm 25 n = 10 | 153 \pm 56 n = 5 | 105 \pm 41 n = 10 |
| 3 μ M | 104 \pm 33 n = 6 | 97 \pm 19 n = 6 | 126 \pm 14 * n = 4 | 134 \pm 27 n = 4 | 100 \pm 29 n = 7 |

Los valores son la media + SEM de muestras triplicadas del número de cultivos indicado en cada caso y se expresan como porcentaje del contenido en neuronas control. Se han resaltado en negrita y marcado con asteriscos los valores significativamente diferentes del control. (*p<0,05, **p<0,01. ANOVA de un criterio).

En la tabla 10 se resume el contenido de proteínas en neuronas de cerebelo expuestas *in vitro* a PCB126. El tratamiento con PCB126 3 μM indujo un aumento de la cantidad de nNOS. También aumentó el contenido de la subunidad alfa de la guanilato ciclasa alfa, pero el aumento sólo fue significativo a 0.3 μM .

En la tabla 11 se resume el contenido de proteínas en neuronas de cerebelo expuestas *in vitro* a PCB126 combinado con MeHg. El tratamiento con PCB126 + MeHg previno la disminución en el contenido de calmodulina y el aumento de nNOS inducido por el tratamiento con MeHg solo. El tratamiento con PCB126 y MeHg indujo un aumento de la cantidad de guanilato ciclasa alfa, pero sólo fue significativo a 0.3 y 1 μM de PCB126 con 1 nM de MeHg.

Tabla 11. Efecto de la exposición crónica a PCB126 + MeHg in vitro sobre el contenido de proteínas de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas granulares de cerebelo

| MeHg nM + PCB126 μM | NR1 | CM | nNOS | GCs-alpha | GCs-beta |
|-----------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|--|---|
| MeHg 1 + PCB 126 0.3 | 119 \pm 34 n = 4 | 88 \pm 28 n = 4 | 107 \pm 28 n = 4 | 116 \pm 8* n = 4 | 109 \pm 27 n = 4 |
| MeHg 1 + PCB 126 1 | 100 \pm 30 n = 4 | 90 \pm 15 n = 4 | 104 \pm 17 n = 4 | 126 \pm 20* n = 4 | 96 \pm 21 n = 4 |
| MeHg 1 + PCB 126 3 | 97 \pm 60 n = 4 | 96 \pm 18 n = 4 | 105 \pm 24 n = 4 | 123 \pm 53 n = 4 | 101 \pm 30 n = 4 |
| MeHg 10 + PCB 126 0.3 | 111 \pm 73 n = 4 | 97 \pm 19 n = 4 | 120 \pm 33 n = 4 | 104 \pm 30 n = 4 | 78 \pm 28 n = 4 |
| MeHg 1 0+ PCB 126 1 | 97 \pm 20 n = 4 | 95 \pm 23 n = 4 | 108 \pm 27 n = 4 | 118 \pm 41 n = 4 | 88 \pm 23 n = 4 |
| MeHg 10 + PCB 126 3 | 84 \pm 40 n = 4 | 98 \pm 11 n = 4 | 102 \pm 23 n = 4 | 86 \pm 22 n = 4 | 79 \pm 13* n = 4 |

Los valores son la media + SEM de muestras triplicadas del número de cultivos indicado en cada caso y se expresan como porcentaje del contenido en neuronas control. Se han resaltado en negrita y marcado con asteriscos los valores significativamente diferentes del control. ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$. ANOVA de un criterio).*

Para facilitar la visualización de todos los resultados obtenidos sobre el contenido de proteínas de la vía del Glu-NO-GMPc en todos los modelos estudiados, en la tabla 12 a continuación se resumen todos los datos en forma de porcentaje de contenido con respecto al control de cada caso. Las flechas indican aumento o descenso con respecto al control.

Tabla 12. Resumen del contenido de proteína en homogenados de cerebelo, cultivos celulares ex vivo y tratados in vitro.

| NR1 | <i>In vivo</i> ♂ | <i>In vivo</i> ♀ | <i>Ex vivo</i> | <i>In vitro</i> |
|-----------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|
| PCB153 | 94 ± 7 | 114 ± 14 | | 97 ± 21 |
| PCB126 | 73 ± 9 ↓ | 104 ± 12 | | 104 ± 33 |
| MeHg | 83 ± 3 ↓ | 98 ± 15 | | 96 ± 45 |
| PCB153 + MeHg | 100 ± 6 | 113 ± 15 | | 75 ± 6 ↓ |
| PCB126 + MeHg | 82 ± 7 ↓ | 108 ± 13 | | 84 ± 40 |
| nNOS | <i>In vivo</i> ♂ | <i>In vivo</i> ♀ | <i>Ex vivo</i> | <i>In vitro</i> |
| PCB153 | 110 ± 12 | 87 ± 17 | 103 ± 36 | 116 ± 43 |
| PCB126 | 158 ± 29 ↑ | 145 ± 18 ↑ | 104 ± 16 | 126 ± 14 ↑ |
| MeHg | 105 ± 17 | 66 ± 6 ↓ | 98 ± 19 | 86 ± 16 ↓ |
| PCB153 + MeHg | 59 ± 4 ↓ | 134 ± 24 | 105 ± 77 | 112 ± 40 |
| PCB126 + MeHg | 106 ± 21 | 111 ± 13 | 58 ± 20 ↓ | 102 ± 23 |
| CM | <i>In vivo</i> ♂ | <i>In vivo</i> ♀ | <i>Ex vivo</i> | <i>In vitro</i> |
| PCB153 | 108 ± 19 | 96 ± 27 | 120 ± 21 | 81 ± 31 ↓ |
| PCB126 | 93 ± 9 | 189 ± 42 ↑ | 90 ± 10 | 150 ± 47 |
| MeHg | 104 ± 22 | 62 ± 19 ↓ | 80 ± 22 ↓ | 83 ± 8 ↓ |
| PCB153 + MeHg | 89 ± 13 | 118 ± 24 | 96 ± 20 | 86 ± 27 |
| PCB126 + MeHg | 132 ± 11 | 140 ± 17 ↑ | 100 ± 26 | 102 ± 23 |
| GCs alfa | <i>In vivo</i> ♂ | <i>In vivo</i> ♀ | <i>Ex vivo</i> | <i>In vitro</i> |
| PCB153 | 89 ± 12 | 91 ± 6 | 86 ± 21 | 117 ± 27 |
| PCB126 | 92 ± 7 | 92 ± 12 | 94 ± 17 | 134 ± 27 |
| MeHg | 84 ± 13 | 75 ± 12 ↓ | 100 ± 47 | 127 ± 15 |
| PCB153 + MeHg | 78 ± 4 ↓ | 71 ± 12 ↓ | 88 ± 17 | 126 ± 4 ↑ |
| PCB126 + MeHg | 117 ± 6 ↑ | 102 ± 13 | 144 ± 28 ↑ | 86 ± 22 |
| GCs beta | <i>In vivo</i> ♂ | <i>In vivo</i> ♀ | <i>Ex vivo</i> | <i>In vitro</i> |
| PCB153 | 102 ± 6 | 103 ± 5 | 78 ± 27 | 81 ± 12 ↓ |
| PCB126 | 85 ± 7 | 107 ± 6 | 95 ± 10 | 100 ± 29 |
| MeHg | 91 ± 5 | 97 ± 5 | 74 ± 11 ↓ | 79 ± 19 |
| PCB153 + MeHg | 102 ± 5 | 95 ± 2 | 82 ± 15 | 129 ± 10 ↑ |
| PCB126 + MeHg | 60 ± 7 ↓ | 100 ± 5 | 117 ± 32 | 79 ± 13 ↓ |

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

1.4. LA EXPOSICIÓN PERINATAL A PCB126 SOLO O COMBINADO CON MeHg DISMINUYE EL PESO DE LAS CRÍAS EN SUS PRIMERAS SEMANAS DE VIDA.

Las crías expuestas al PCB126 solo o combinado con MeHg tenían un peso menor que las crías control al nacer. Esta diferencia no se observó en las crías expuestas a PCB153, al MeHg solo o a su combinación. Como ya se ha comentado en la introducción, el PCB153 y el PCB126 pertenecen a dos grupos con características diferentes: el PCB126 es “dioxin-like” y el PCB153 es “non-dioxin-like”. Sus efectos sobre algunos sistemas son diferentes. El hecho de que el PCB126 afecta al peso de las crías y el PCB153 no lo hace podría ser debido a la estructura “dioxin-like” del 126 y “non-dioxin-like” del 153.

Algunos estudios realizados en humanos han mostrado una correlación entre bajo peso en el momento del nacimiento y los niveles de PCBs en sangre materna. Taylor *et al.* (1989) observaron una relación entre el bajo peso de los bebés al nacer y la exposición materna a Aroclor 1254 (una mezcla comercial de PCBs) en madres expuestas por su trabajo en una fábrica. Por otro lado, Rylander *et al.* (1998) observaron una tendencia similar en una región sueca con alto consumo de pescado. Rylander *et al.* tomaron como referencia de exposición a PCBs los niveles de PCB153 en sangre materna, considerando que, al ser el más abundante en muestras humanas (Fangstrom *et al.*, 2005b), es un buen indicador de contaminación por PCBs en general. Encontraron que existe una correlación negativa entre los niveles de PCB153 y el peso de los niños recién nacidos. Sin embargo, es altamente improbable que la población se

vea expuesta a un solo PCB a través de los alimentos y no se podría atribuir este efecto al PCB153 en particular, sino a la exposición a un conjunto de PCBs. También se ha descrito que, en ratas, el PCB126 administrado a las madres provoca bajo peso en la prole sin afectar a la viabilidad de las crías (Shirota *et al.*, 2006). En nuestros estudios hemos encontrado que la exposición de las madres a 100 ng/kg día de PCB126 produce estos mismos efectos: bajo peso sin afectar la viabilidad. Sin embargo, en un estudio preliminar encontramos que la exposición a 1 µg/kg y día de PCB126 sí que produce un notable descenso de la viabilidad de las crías.

1.5. LA EXPOSICIÓN PERINATAL A MeHg, PCB153 O PCB126 PERO NO A SUS COMBINACIONES DISMINUYE LA CAPACIDAD DE APRENDIZAJE DE LAS RATAS A LOS 3 MESES DE EDAD.

Los resultados obtenidos muestran que la exposición perinatal a PCB153, PCB126 o MeHg disminuye la capacidad de aprendizaje del test del laberinto en Y tanto en ratas machos como en hembras a los 3 meses de edad. Sin embargo, los animales expuestos a la combinación de metilmercurio con cualquiera de los PCBs estudiados tienen una capacidad de aprendizaje similar a las ratas control.

Se han descrito alteraciones en la capacidad de aprendizaje tanto en niños como en animales prenatalmente expuestos a PCBs o MeHg. Diversos estudios han revelado una relación entre los niveles de PCB en sangre total de cordón umbilical y baja puntuación en la realización de test de inteligencia en niños de 12 meses (Darvill *et al.*, 2000) y de 11 años (Jacobson y Jacobson, 1996): a mayor nivel de PCBs, menores puntuaciones en los test. Jacobson *et al.* (1996)

realizaron estudios en niños en edad escolar expuestos a niveles de PCBs ligeramente superiores a los de la población media y observaron que la exposición prenatal a PCBs estaba asociada a una disminución del coeficiente intelectual total y de las habilidades verbales. Comprobaron que las alteraciones más notables se producían en los procesos de memoria y atención. Monos expuestos prenatalmente a una mezcla de PCBs similar a la hallada en leche materna humana también mostraron déficits en la realización de tests de alternancia espacial y retraso en el aprendizaje (Rice, 1999).

Jacobson y Jacobson (2003) mostraron que algunos déficits cognitivos estaban asociados a la exposición a través de la placenta y no durante la lactancia, lo que sugería que el cerebro fetal es especialmente sensible a estos compuestos. Otros autores proponen que la exposición durante la lactancia, dada su enorme importancia en el desarrollo del sistema nervioso central, también produce efectos perjudiciales (Costa *et al.*, 2004; Crofton *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta que nuestro modelo incluye exposición a PCBs y/o MeHg tanto durante la gestación como durante la lactancia, los mecanismos responsables de alteraciones en cualquiera de estos periodos podrían estar involucrados en los efectos observados.

Es difícil atribuir las alteraciones descritas en la población humana a un compuesto en particular, dado que los PCBs normalmente se presentan en mezclas. Algunas investigaciones en modelos animales han estudiado los efectos de exposición a compuestos individuales. Schantz *et al.* (1995) describieron una disminución en la capacidad de aprendizaje espacial de ratas expuestas prenatalmente a PCB153. Utilizaron un test de memoria de trabajo en un laberinto radial de 8 brazos. Curiosamente,

observaron que la exposición prenatal a PCB126 mejoraba la realización de este mismo test. Por otra parte, Hojo *et al.* (2004) observaron déficits en el aprendizaje de una tarea de discriminación en ratas prenatalmente expuestas a PCB126.

La exposición prenatal a MeHg induce alteraciones en el comportamiento tanto en humanos como en modelos animales (Goulet *et al.*, 2003; Myers y Davidson, 1998). La exposición *in utero* a ciertos niveles de MeHg se ha asociado a problemas neurológicos irreversibles y problemas neuropsicológicos en niños en los campos de la atención, capacidad visoespacial, función motora, lenguaje y memoria (Gilbert y Grant-Webster, 1995; Grandjean y Landrigan, 2006; Grandjean *et al.*, 1997).

Ratas perinatalmente expuestas a MeHg durante el mismo periodo de gestación y lactancia que en nuestros experimentos mostraron alteraciones significativas del comportamiento caracterizadas por hipoactividad, reducción del apetito, reducción de su natural tendencia a escapar de lugares no deseados, y alteraciones en el aprendizaje de test de evitación pasiva en la edad adulta (Schalock *et al.*, 1981).

Nuestros resultados muestran que la exposición perinatal a MeHg o a los PCBs individualmente provoca una disminución de la capacidad de aprendizaje de la tarea de discriminación condicional en el laberinto en Y cuando las ratas tienen tres meses de edad. Sin embargo, la exposición a la combinación de PCB153 ó 126 con MeHg no deteriora la capacidad de aprendizaje de esta tarea. Este resultado no apoya algunas opiniones actuales sobre los posibles efectos sinérgicos de la exposición prenatal a PCBs y MeHg en la población humana. Estos posibles efectos sinérgicos se han propuesto como posible explicación de las diferencias entre los

resultados de estudios realizados en diferentes regiones, como son las Islas Feroe, el lago Michigan y las islas Seychelles (Nakai y Satoh, 2002). Los niños nacidos de madres expuestas en las islas Feroe (con altos niveles de MeHg y PCBs) mostraron déficits en tareas de aprendizaje y en la evaluación clínica de diferentes estadios de neurodesarrollo que no fueron observados en los niños de las Seychelles, por ejemplo, que presentan menores niveles de PCBs. Las diferencias en estudios de diferentes cohortes pueden ser debidas a un gran número de variables entre las que cabe incluir el estilo de vida y el ambiente familiar (Davidson *et al.*, 2004; Seegal, 1996). Uno de los factores que puede contribuir a las diferencias es el diferente origen alimentario de la contaminación. En las islas Feroe consumen principalmente mamíferos marinos (altas cantidades de grasa de ballena) y en las Seychelles esencialmente pescado oceánico. Se ha sugerido que los aceites de pescado, beneficiosos en el neurodesarrollo, estén de algún modo enmascarando o previniendo los efectos de los PCBs y/o MeHg (Seegal, 1996). En todo caso, no hay información clara en estudios humanos sobre si la exposición a combinaciones de PCBs y MeHg producen efectos mayores, menores o similares que la exposición a las sustancias individuales.

Algunos autores proponen que los diferentes efectos encontrados en humanos en las islas Feroe y, por ejemplo, en las Seychelles podrían ser consecuencia de la presencia de MeHg junto con los PCBs en unos casos, pero no en otros. La combinación de los dos tipos de agentes produciría efectos más tóxicos que la exposición a los compuestos por separado. Esta hipótesis no se ha comprobado experimentalmente y en esta tesis hemos estudiado esta posibilidad. Nuestros resultados son los primeros disponibles

sobre los efectos de la exposición perinatal a la combinación de PCB153 ó PCB126 con MeHg, y muestran que la exposición perinatal a la combinación de MeHg y PCB no sólo no potencia el deterioro cognitivo, sino que lo previene cuando las ratas tienen 3 meses de edad.

Otros grupos han estudiado los efectos de la exposición prenatal de ratas a la combinación de MeHg con Aroclor 1254, una mezcla comercial de PCBs. Este tratamiento combinado no empeoró las alteraciones inducidas por la exposición a MeHg o PCBs solos en el aprendizaje de una tarea de alternancia espacial (Widholm *et al.*, 2004), pero según Roegge *et al.* (2004) la combinación de algunos PCBs (también administrados como Aroclor) y MeHg empeoró la realización de tareas motoras. Nuestros estudios muestran los primeros resultados en los que la exposición a PCBs y MeHg combinados resulta en una mejor realización de una tarea de aprendizaje que en el caso de exposiciones a cada compuesto de forma individual. En estos momentos no tenemos ninguna posible explicación para la “prevención” del deterioro cognitivo en ratas expuestas a la combinación. Los experimentos con las mezclas y los compuestos individuales se realizaron al mismo tiempo y utilizando las mismas soluciones de PCBs y metilmercurio, por lo que podemos estar seguros de que la exposición a la combinación de metilmercurio y PCBs “previene” los efectos inducidos por los compuestos individuales. Como se comenta más adelante, la prevención del deterioro cognitivo sería consecuencia de la prevención de la alteración en la función de la vía Glu-NO-GMPc. Sin embargo, no sabemos por qué la exposición a la combinación previene los efectos de los compuestos solos sobre la función de la vía.

1.6. LA EXPOSICIÓN PERINATAL A PCB153, PCB126 O MeHg, PERO NO A COMBINACIONES DE PCB CON MeHg, REDUCE LA FUNCIÓN DE LA VÍA GLU-NO-GMPc EN EL CEREBELO DE LAS RATAS A LOS 3 MESES DE EDAD.

Los efectos de la exposición a los PCBs, MeHg o sus combinaciones sobre la función de la vía Glu-NO-cGMP *in vivo* en el cerebelo de los mismos animales utilizados en los estudios de aprendizaje fueron totalmente paralelos a los resultados obtenidos en los test de aprendizaje en el laberinto en Y. La exposición perinatal a PCB153, PCB126 o MeHg de forma individual deteriora la función de la vía cuando las ratas tienen 3 meses, mientras que la exposición a PCB153 ó 126 combinados con MeHg no produce alteraciones en la función de la vía, que es similar a la de las ratas control.

Los resultados obtenidos en esta tesis y otros anteriores del grupo (Hernandez-Viadel *et al.*, 2003; Llansola *et al.*, 1999) muestran que existe una correlación entre los efectos de las sustancias neurotóxicas sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc y sobre la capacidad de aprendizaje de la tarea en el laberinto en Y. Esto apoya la idea de que la alteración en la función de esta vía es responsable del deterioro en el aprendizaje y proporciona los primeros datos sobre los posibles mecanismos por los que el PCB153, PCB126 o el MeHg podrían inducir el deterioro en la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y de las ratas expuestas. La alteración en la función de la vía Glu-NO-GMPc podría también contribuir al deterioro cognitivo en humanos expuestos durante el desarrollo a PCBs o MeHg.

Nuestros resultados sugieren que la alteración en el aprendizaje es una consecuencia directa del deterioro de la función de la vía Glu-NO-GMPc, que modula el aprendizaje de esta tarea del laberinto en Y. Se han descrito algunas alteraciones moleculares causadas por la exposición perinatal a PCBs y a MeHg que podrían estar relacionadas con su efecto en el aprendizaje asociado a esta vía del Glu-NO-GMPc.

Se ha postulado que las alteraciones cognitivas inducidas por PCBs reflejan un patrón de conectividad neuronal alterado, debido a las alteraciones en el perfil ontogénico de la dendritogénesis (Lein *et al.* 2007). Las alteraciones en el metabolismo NO-cGMP inducidas por los PCBs pueden contribuir a la alteración de la conectividad neuronal, ya que el óxido nítrico actúa como modulador del desarrollo de las neuritas, retrasando el crecimiento de las mismas (Trimm y Rehder 2004) y modulando la formación de las proyecciones axonales (Vercelli *et al.* 2000). El NO también está implicado en la remodelación de conexiones sinápticas (Mize y Lo 2000). Durante la remodelación sináptica, el NO actúa como señal para la separación de las sinapsis e inhibe la formación de estas por mecanismos tanto dependientes como independientes de cGMP (Sunico *et al.* 2005). Otro aspecto que puede estar relacionado con las alteraciones en el aprendizaje causadas por los PCBs es el estrés oxidativo. Varios autores han demostrado que la exposición a PCBs induce la formación de especies reactivas de oxígeno y altera la neurotransmisión dopaminérgica. El estrés oxidativo también puede alterar la neurotransmisión glutamatérgica y la función cognitiva. Respecto a las vías de señalización molecular afectadas por estos tóxicos, se ha demostrado con anterioridad que algunos PCBs alteran la homeostasis del calcio, aumentan la traslocación de PKC e inhiben

la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana, que los autores relacionan con su neurotoxicidad y alteraciones en la potenciación a largo plazo, fenómeno íntimamente ligado al aprendizaje. (revisado en Costa *et al.* 2001)

El metilmercurio causa diversas alteraciones a nivel molecular que se relacionan directamente con problemas en la función neuronal y, según se ha comentado en la introducción, algunas relacionadas con el receptor NMDA y la señalización por calcio. Una de estas alteraciones es la disrupción de los microtúbulos del citoesqueleto, que provocaría fenómenos de apoptosis relacionados con la evidente muerte neuronal descrita en los tejidos de humanos y animales expuestos y la falta de conectividad de las neuronas expuestas durante el desarrollo. La exposición a MeHg causa aumento de calcio intracelular (Ca²⁺), que lleva a la muerte celular por citotoxicidad (Revisado en Castoldi *et al.* 2001). Con frecuencia se asocian las alteraciones causadas por MeHg al estrés oxidativo y depleción de glutatión en los astrocitos circundantes. Este estrés causa alteraciones, por ejemplo, en la captación de glutamato por parte de los astrocitos, causando citotoxicidad neuronal por exceso de activación del receptor NMDA por este neurotransmisor (Allen *et al.* 2002). La preferencia del MeHg por los astrocitos, donde se acumula en mayor medida, se ha visto asociada igualmente a una menor diferenciación de estas células en el embrión que conduce, entre otras cosas, a un desarrollo deficiente de la barrera hematoencefálica, con la consecuente falta de aislamiento del sistema nervioso a otras posibles moléculas nocivas (Bertossi *et al.* 2004).

1.7. LA CAPACIDAD DE APRENDIZAJE Y LA FUNCIÓN DE LA VÍA GLU-NO-GMPc SE DETERIORAN CON LA EDAD EN RATAS CONTROL Y MACHOS EXPUESTOS PERINATALMENTE A PCB153 + MeHg PERO NO EN RATAS EXPUESTAS A MeHg, PCB153, PCB126 Ó PCB126 + MeHg

También hemos estudiado los efectos de la exposición perinatal a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre la capacidad de aprendizaje y sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc cuando las ratas alcanzan los 8 meses de edad. Las ratas de estos experimentos eran de las mismas camadas utilizadas para los estudios realizados en ratas de tres meses. Parte de la camada se utilizó a los tres meses y la otra parte a los ocho meses.

La capacidad de aprendizaje de las ratas control fue significativamente menor en ratas maduras (ocho meses) que en ratas jóvenes. Sin embargo, en ratas perinatalmente expuestas a los neurotóxicos, la capacidad de aprendizaje fue similar a los 3 y a los 8 meses de edad.

A los 8 meses, todos los grupos muestran una capacidad similar para aprender la tarea en el laberinto en Y, y también una función similar de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo.

Las ratas de 3 meses expuestas a PCB153, PCB126 y/o MeHg muestran una capacidad de aprendizaje similar a las ratas control de 8 meses. Esto sugiere que la exposición perinatal a PCB153, PCB126 o MeHg parece acelerar el deterioro fisiológico que se produce con la edad en la función de la vía Glu-NO-GMPc y, en consecuencia, de la capacidad de aprendizaje.

El envejecimiento está asociado de forma fisiológica a un deterioro cognitivo. Los mecanismos responsables de este deterioro no se conocen bien (Casanova Sotolongo *et al.*, 2004). Tampoco se conocen en detalle los mecanismos moleculares de los procesos de aprendizaje. Se sabe que los receptores NMDA juegan un papel crucial en algunos tipos de aprendizaje (Magnusson, 1998).

Como se describe en la introducción, una de las vías de transducción de señales asociada a estos receptores que modula procesos de aprendizaje es la vía Glu-NO-GMPc. Consideramos que, en ratas control, la disminución en la función de la vía con la edad sería responsable de la disminución en la capacidad de aprendizaje de la tarea de discriminación condicional del laberinto en Y. Los mecanismos por los que la función de la vía se reduce en ratas de ocho meses en comparación con las de tres meses no los conocemos en detalle, pero parece que un factor que podría contribuir es una disminución en el contenido y en la función de los receptores NMDA. Se ha descrito de forma consistente en diferentes estudios una reducción de la cantidad de receptores NMDA con la edad en la mayor parte de áreas cerebrales (hipocampo, estriado, corteza frontal, hipotálamo, etc). Los resultados descritos han sido similares cuando se ha analizado la cantidad de receptores mediante la unión de ligandos o por “immunoblotting” (Castorina *et al.*, 1994; Magnusson y Cotman, 1993; Mothet *et al.*, 2006; Scheuer *et al.*, 1995; Vernet *et al.*, 1998). La reducción en la cantidad de receptores NMDA podría conducir a una disminución de la función de las vías de transducción de señales asociadas a ellos, incluyendo la vía Glu-NO-GMPc.

En esta tesis mostramos que la función de la vía del Glu-NO-cGMP disminuye con la edad en ratas normales. Esta disminución va

asociada a un descenso en el contenido de la subunidad NR1 receptor NMDA en el caso de ratas macho pero no en las hembras (Piedrafita *et al.*, 2007).

Hemos observado una reducción en el contenido de NR1 en el cerebelo de los machos expuestos a PCB126 y/o MeHg que no se producen en el cerebelo de las hembras. La cantidad de receptores NMDA también está reducida en machos pero no en hembras control de 8 meses comparadas con las de 3. Sin embargo, la función de la vía está deteriorada tanto en hembras como en machos de 8 meses. No observamos cambios en el contenido de receptor NMDA en animales perinatalmente expuestos a PCB153 solo o combinado con MeHg ni en ningún grupo de hembras expuestas, por lo que en estos casos, la reducción en la cantidad de receptores NMDA no explicaría el deterioro en la función de la vía Glu-NO-GMPc y del aprendizaje. Por tanto alteraciones en la funcionalidad del receptor y/o algún otro paso de la vía deben contribuir a la disminución de su función.

1.8. POSIBLE UTILIDAD DE LOS CULTIVOS DE NEURONAS DE CEREBELO *EX VIVO* EN EL ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES CAUSADAS POR PCB153, PCB126, Y/O METILMERCURIO EN LA VÍA GLU-NO-GMPC

En este trabajo nos propusimos ensayar la posible utilidad de los cultivos primarios de neuronas de cerebelo como modelo para estudiar en detalle los mecanismos moleculares por los que los PCBs y/o el metilmercurio afectan la función de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico y, subsiguientemente, la capacidad de aprendizaje.

Estudiamos en primer lugar si en neuronas cultivadas a partir de cerebelos de ratas expuestas perinatalmente a estos neurotóxicos se altera la función de la vía Glu-NO-GMPc. Las neuronas de estos experimentos no se expusieron a las sustancias tóxicas durante su periodo de cultivo *in vitro*, por lo que cualquier alteración observada se debería a efectos moleculares permanentes o persistentes durante largo tiempo.

1.8.1 La exposición a PCB153 solo o en combinación con MeHg o a PCB126 reduce la función de la vía Glu-NO-GMPc en neuronas de cerebelo cultivadas ex vivo a partir de ratas expuestas perinatalmente.

Las neuronas cultivadas a partir de cerebelo de ratas expuestas a PCB126 o PCB153 muestran un descenso en la función de la vía Glu-NO-GMPc reproduciendo los resultados obtenidos *in vivo*. Sin embargo, no observamos alteraciones en la función de esta vía en los cultivos de neuronas cultivadas a partir de cerebelos de ratas expuestas perinatalmente a MeHg.

Una posible explicación podría ser el diferente entorno celular, ya que las neuronas granulares *in vivo* están rodeadas de todo el tejido neural, que incluye un gran número de células gliales que controlan e influyen en el entorno molecular de las neuronas, factores neuroprotectores, hormonas... Las neuronas en cultivo, sin embargo, han sido aisladas de ese entorno. Se ha propuesto que las interacciones entre diferentes tipos celulares del sistema nervioso juegan un papel importante en los mecanismos de toxicidad del MeHg. Por ejemplo, la exposición a MeHg provoca liberación de glutamato al medio extracelular en cultivos de astrocitos y alteraciones en la recuperación del mismo por parte de estas células

(Allen *et al.*, 2002; Aschner *et al.*, 2000). Juárez *et al.* (2002) observaron que el MeHg produce un aumento de glutamato extracelular en corteza frontal de ratas *in vivo*. Por otra parte, antagonistas de los receptores de glutamato atenúan los efectos tóxicos del mercurio (Park *et al.*, 1996). Además, la ausencia de glutamato previene efectos del cloruro de metilmercurio sobre las neuronas de cerebelo en cultivo (Albrecht y Matyja, 1996). Esto sugiere que algunos de los efectos del MeHg en cerebro *in vivo*, o sobre vías de transducción de señales asociadas a receptores de glutamato como la vía Glu-NO-GMPc, serían consecuencia de las alteraciones inducidas por el MeHg sobre modulación de la neurotransmisión glutamatérgica por los astrocitos. Estos efectos no se observarían en cultivos de neuronas en ausencia de astrocitos

Otra posibilidad, es que las alteraciones causadas por el MeHg no se mantengan una vez que este se elimina. Algunos autores proponen que las alteraciones causadas por el MeHg son debidas al estrés oxidativo (Rossi *et al.*, 1997; Sarafian *et al.*, 1989). Es posible que, en ausencia del MeHg, el estrés oxidativo disminuya y las células se “recuperen”.

En contraste con lo que ocurre *in vivo*, la exposición a PCB153+MeHg combinados no revierte, en las neuronas *ex vivo*, los efectos del PCB153 solo, sino que los acentúa. En cambio, la exposición perinatal a PCB126+MeHg sí que previene la inhibición inducida por el PCB126 solo de la función de la vía Glu-NO-GMPc en las neuronas en cultivos *ex vivo* de forma similar a la prevención de la inhibición observada *in vivo*.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en cultivos de neuronas de cerebelo *ex vivo* reproducen los efectos sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo *in vivo* inducidos por los

tratamientos con PCB153, PCB126 y PCB126 + MeHg, pero no los inducidos por MeHg solo o por PCB153 + MeHg.

1.9. UTILIDAD DEL TRATAMIENTO *IN VITRO* DE CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS CONTROL CON PCB153, PCB126, Y/O METILMERCURIO COMO MODELO PARA ESTUDIAR LOS MECANISMOS DE LAS ALTERACIONES EN LA VÍA GLU-NO-GMPc.

El último objetivo de este trabajo era comprobar si cultivos primarios de neuronas de cerebelo podrían ser útiles como modelo para el estudio de las alteraciones causadas por la exposición a PCB153, PCB126 y/o MeHg sobre la vía Glu-NO-GMPc. Los cultivos *ex vivo* requieren una exposición perinatal de los individuos, la cual es una tarea laboriosa, que hay que programar con antelación y no permite controlar finamente la dosis. Además, este tipo de cultivos con crías de diferentes grupos (control y expuestas a diferentes compuestos) deben ser realizados en paralelo para garantizar un tiempo de cultivo y una manipulación similar que los hagan comparables durante los ensayos. Por tanto el modelo de cultivo de neuronas *ex vivo* resulta muy laborioso y poco práctico para el estudio de los mecanismos por los que los PCBs y/MeHg afectan la función de la vía Glu-NO-GMPc.

Los cultivos utilizados en el modelo de exposición *in vitro* se realizan a partir de crías control, de las que se puede obtener sin dificultad el número que sea necesario, todas las placas de cultivo proceden de una misma manipulación y podemos ajustar exactamente las concentraciones de neurotóxico que deseamos ensayar. Los modelos *in vitro* nos permiten estudiar los efectos de la exposición de las neuronas a diferentes concentraciones de los neurotóxicos y así determinar umbrales de neurotoxicidad. También

nos permiten estudiar las cinéticas de los efectos y analizar los mecanismos moleculares de los mismos, ya que permiten inhibir o activar enzimas y receptores antes de la adición de los PCBs y/o MeHg y analizar su participación en los efectos inducidos por estos agentes neurotóxicos. Por tanto, el tratamiento *in vitro* de neuronas procedentes de ratas control con los PCBs y/o MeHg sería un modelo más útil y práctico que el modelo de cultivo *ex vivo*.

Para comprobar la utilidad del modelo *in vitro* estudiamos en primer lugar si en los cultivos de neuronas de cerebelo tratados *in vitro* con PCBs y/o MeHg se reproducen las alteraciones observadas *in vivo* en la vía Glu-NO-GMPc.

1.9.1 La exposición a MeHg in vitro reduce la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc por NMDA y la activación de la guanilato ciclasa soluble por NO en neuronas de cerebelo en cultivo.

El tratamiento *in vitro* con MeHg produjo una reducción en la activación de la vía Glu-NO-GMPc por NMDA. Además comprobamos que este tratamiento disminuye la activación de la guanilato ciclasa por NO. Por tanto este modelo reproduce la inhibición de la función de la vía Glu-NO-GMPc observada en cerebelo *in vivo* y nos ha permitido identificar un paso de la vía (la activación de la guanilato ciclasa por NO) que está alterado y podría ser responsable de la disminución de la función de la vía en su conjunto.

Estos resultados también indican que no es necesaria la presencia de astrocitos para que el MeHg altere la función de la vía, por lo que la ausencia de astrocitos en el cultivo no sería la causa por la que la función de la vía no se altera en cultivos de neuronas

ex vivo de ratas perinatalmente expuestas a MeHg. La ausencia de efecto en cultivos *ex vivo* podría ser debida a la ausencia de niveles suficientes de MeHg.

1.9.2 La exposición crónica a PCB153 in vitro aumenta los niveles basales de GMPc y reduce la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc por NMDA y la activación de la guanilato ciclasa por NO.

Como ocurre en los experimentos *ex vivo*, los niveles basales de GMPc están aumentados en las neuronas tratadas *in vitro* con PCB153. Experimentos preliminares realizados en el laboratorio indican que el PCB153 aumenta el Ca^{2+} intracelular. Esto conduciría a un aumento de la activación de la nNOS por la calcio-calmodulina y de la formación de NO. Los mayores niveles de NO aumentarían la activación de la guanilato ciclasa, que podría ser responsable del aumento de GMPc basal.

En los cultivos de neuronas tratados *in vitro* con PCB153 se reproduce la disminución en la activación de la función de la vía Glu-NO-GMPc en respuesta a NMDA que ocurre en el cerebelo *in vivo* en las ratas perinatalmente expuestas a PCB153, indicando que son un buen modelo para estudiar los mecanismos moleculares implicados. En este modelo la activación de la guanilato ciclasa por NO está disminuida, sugiriendo que éste es el paso de la vía afectado por el PCB153 también en cerebelo *in vivo*.

La exposición crónica *in vitro* a la mezcla de MeHg con PCB153 también disminuye en la función de la vía Glu-NO-GMPc. Esto no reproduce la prevención de la disminución de la función de la vía observada en cerebelo *in vivo* en ratas expuestas a MeHg +

PCB153. Dado que no conocemos el mecanismo por el que la exposición a la combinación previene los efectos *in vivo*, es difícil discutir porque esta prevención no se reproduce en los cultivos de neuronas tratados *in vitro* con PCB153 + MeHg.

1.9.3 La exposición crónica a PCB126 in vitro aumenta los niveles basales de GMPc y reduce la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc por NMDA.

Los niveles basales de GMPc están aumentados en las neuronas tratadas *in vitro* con PCB126. Como en el caso de las neuronas tratadas con PCB153, el aumento de la concentración basal de GMPc podría ser consecuencia de un aumento de los niveles basales de calcio y de la activación de la óxido nítrico sintasa y de la guanilato ciclasa.

En los cultivos de neuronas tratados *in vitro* con PCB126 también se reproduce la disminución en la activación de la función de la vía Glu-NO-GMPc en respuesta a NMDA que ocurre en el cerebelo *in vivo* en las ratas perinatalmente expuestas a PCB126, por lo que son un buen modelo para estudiar los mecanismos moleculares implicados. A diferencia de las neuronas tratadas con PCB153, en este modelo la activación de la guanilato ciclasa por NO no está disminuida, por lo que el paso concreto implicado en la disminución de la función de la vía Glu-NO-GMPc en este caso sería diferente. De momento no hemos identificado el paso que está alterado

Estos resultados indican que el PCB153 y el PCB126 pueden afectar más de un paso de la vía Glu-NO-GMPc y que algunos pasos (por ejemplo los que modulan el GMPc basal) se afectan del mismo modo por PCB153 ó 126 mientras que otros pasos (e.g. activación de

guanilato ciclasa por NO) se afectan de modo diferente por los dos PCBs.

La exposición crónica *in vitro* a la mezcla de algunas concentraciones de MeHg y PCB126 revierte el descenso en la función de la vía Glu-NO-GMPc inducido por los compuestos individualmente de forma similar a lo que ocurre en cerebelo *in vivo*. Este efecto no se produce con otras combinaciones de concentraciones, indicando que las interacciones entre los efectos de diferentes sustancias neurotóxicas dependen de la concentración relativa de cada una de ellas.

En resumen, los resultados obtenidos muestran que el tratamiento *in vitro* de cultivos de neuronas control con PCB126, PCB153 ó MeHg individualmente reproducen los efectos encontrados en cerebelo *in vivo*. El tratamiento *in vitro* de las neuronas con combinaciones de PCBs y MeHg sólo reproduce los efectos encontrados *in vivo* cuando se combinan en determinadas concentraciones pero no en otras.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La exposición perinatal a MeHg, PCB153 o PCB126 disminuye la capacidad de las ratas para aprender la tarea del laberinto en Y a los 3 meses de edad, reproduciendo del deterioro cognitivo que la exposición a estos compuestos produce en humanos.
2. La exposición perinatal a las combinaciones de MeHg con PCB153 o PCB126 no afecta a la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y de ratas de tres meses de edad.
3. La exposición perinatal a PCB153, PCB126 o MeHg reduce la función de la vía Glu-NO-GMPc en el cerebelo de las ratas a los 3 meses de edad.
4. La exposición perinatal a las combinaciones de metilmercurio con PCB153 ó PCB126 no afecta a la función de la vía Glu-NO-GMPc en el cerebelo de las ratas a los tres meses de edad.
5. Los efectos de los PCBs, el MeHg o sus combinaciones sobre la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y o sobre la función de la vía Glu-NO-GMPc son iguales en las crías macho y en las crías hembra.
6. En las ratas control, tanto la función de la vía Glu-NO-GMPc como la capacidad de aprendizaje en el laberinto en Y se deterioran con la edad, siendo menores a los ocho meses que los tres meses.
7. En las ratas expuestas prenatalmente a PCB153, PCB126, MeHg o PCB126 + MeHg la función de la vía Glu-NO-GMPc y la capacidad de aprendizaje no disminuyen a los ocho meses en comparación con los tres meses de edad. A los tres meses la función de la vía y la capacidad de aprendizaje en estas ratas son similares a las de las ratas control de ocho meses. Sin embargo, no se

- deterioran más, permaneciendo igual a los ocho meses. Esto sugiere que estos compuestos aceleran el deterioro que la función de la vía y la capacidad de aprendizaje sufren con la edad.
8. Los cultivos primarios de neuronas de cerebelo preparados *ex vivo* a partir de ratas expuestas perinatalmente a PCB153 solo o combinado con MeHg y de animales expuestos a PCB126 tienen reducida la función de la vía Glu-NO-GMPc. La función de la vía no está alterada en las neuronas cultivadas a partir de crías expuestas a MeHg o PCB126 + MeHg. Por tanto los cultivos *ex vivo* procedentes de ratas expuestas a PCB153, PCB126 ó MeHg + PCB126 reproducen los efectos encontrados *in vivo* pero los procedentes de las expuestas a MeHg ó PCB153 + MeHg no.
 9. La exposición a MeHg, PCB126 o PCB153 *in vitro* reduce la activación de la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc por NMDA en neuronas de cerebelo en cultivo reproduciendo los resultados obtenidos en cerebelo *in vivo*. Sin embargo, las combinaciones de PCB153 con MeHg ensayadas no reproducen los resultados obtenidos *in vivo* y sólo algunas de las combinaciones de concentraciones PCB126 + MeHg los reproducen. Por tanto parece que los cultivos de neuronas de cerebelo tratados *in vitro* con PCBs o MeHg son un buen modelo para estudiar los mecanismos moleculares de las alteraciones causadas por los neurotóxicos individuales en cerebelo *in vivo*.
 10. En el estudio de los mecanismos por los que estos compuestos alteran la función de la vía Glu-NO-GMPc hemos comprobado que:
 - a. La exposición crónica a PCB153 o PCB126 *in vitro* aumenta los niveles basales de GMPc.

b. La exposición crónica *in vitro* a PCB153 o a MeHg reduce la activación de la guanilato ciclasa soluble por NO. Esta podría ser la causa de la disminución de la función de la vía Glu-NO-GMPc .

c. El PCB126 disminuye la función de la vía Glu-NO-GMPc sin afectar la activación de la guanilato ciclasa por el NO, indicando que los mecanismos por los que el PCB126 y el PCB153 afectan la función de esta vía son diferentes.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M. A., Minarro, J., y Felipo, V. (2000). Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Exp.Neurol.*, 161: 704-713.
- Albrecht, J., y Matyja, E. (1996). Glutamate: a potential mediator of inorganic mercury neurotoxicity. *Metab Brain Dis*, 11: 175-184.
- Allen, J. W., Shanker, G., Tan, K. H., y Aschner, M. (2002). The Consequences of Methylmercury Exposure on Interactive Functions between Astrocytes and Neurons. *Neurotoxicology*, 23: 755-759.
- Aoki, Y. (2001). Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters--what we have learned from Yusho disease. *Environ.Res.*, 86: 2-11.
- Arriada-Mendicoa, N., Otero-Siliceo, E., y Corona-Vazquez, T. (1999). Current concepts regarding the cerebellum and cognition. *Rev.Neurol.*, 29: 1075-1082.
- Aschner, M., Sonnewald, U., y Tan, K. H. (2002). Astrocyte modulation of neurotoxic injury. *Brain Pathol*, 12: 475-481.
- Aschner, M., Yao, C. P., Allen, J. W., y Tan, K. H. (2000). Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. *Neurochem.Int.* 2000. Aug.-Sep.;37.(2-3):199.-206., 37: 199-206.

- Bakir, F., Rustam, H., Tikriti, S., Al Damluji, S. F., y Shihristani, H. (1980). Clinical and epidemiological aspects of methylmercury poisoning. *Postgrad.Med.J.*, 56: 1-10.
- Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J., y Zhang, X. (1993). Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*, 14: 83-144.
- Bemis J. C. and Seegal R. F. (2000) Polychlorinated biphenyls and methylmercury alter intracellular calcium concentrations in rat cerebellar granule cells. *Neurotoxicology* 21, 1123-1134.
- Bernabeu, R., Schmitz, P., Faillace, M. P., Izquierdo, I., y Medina, J. H. (1996). Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport*, 7: 585-588.
- Bernabeu, R., Schroder, N., Quevedo, J., Cammarota, M., Izquierdo, I., y Medina, J. H. (1997). Further evidence for the involvement of a hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. *Neuroreport*, 8: 2221-2224.
- Bertossi M., Girolamo F., Errede M., Virgintino D., Elia G., Ambrosi L. and Roncali L. (2004) Effects of methylmercury on the microvasculature of the developing brain. *Neurotoxicology* 25, 849-857.
- Beyrouy, P., Stamler, C. J., Liu, J. N., Loua, K. M., Kubow, S., y Chan, H. M. (2006). Effects of prenatal methylmercury exposure on brain monoamine oxidase activity and neurobehaviour of rats. *Neurotoxicol.Teratol.*, 28: 251-259.

-
- Bockaert, J., Pin, J., y Fagni, L. (1993). Metabotropic glutamate receptors: an original family of G protein-coupled receptors. *Fundam.Clin.Pharmacol.*, 7: 473-485.
- Borga, K., Fisk, A. T., Hoekstra, P. E., y Muir, D. C. (2004). Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Arctic marine food webs. *Environ.Toxicol.Chem.*, 23: 2367-2385.
- Boulton, C. L., Southam, E., y Garthwaite, J. (1995). Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience*, 69: 699-703.
- Bourne, J. A. (2003). Intracerebral microdialysis: 30 years as a tool for the neuroscientist. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*, 30: 16-24.
- Braune, B. M., Outridge, P. M., Fisk, A. T., Muir, D. C., Helm, P. A., Hobbs, K., Hoekstra, P. F., Kuzyk, Z. A., Kwan, M., Letcher, R. J., Lockhart, W. L., Norstrom, R. J., Stern, G. A., y Stirling, I. (2005). Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: an overview of spatial and temporal trends. *Sci.Total Environ.*, 351-352: 4-56.
- Canales, J. J., Corbalan, R., Montoliu, C., Llansola, M., Monfort, P., Erceg, S., Hernandez-Viadel, M., y Felipo, V. (2001). Aluminium impairs the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in cultured neurons and in rat brain *in vivo*: molecular mechanisms and implications for neuropathology. *J.Inorg.Biochem.*, 87: 63-69.

- Carpenter D. O., Hussain R. J., Berger D. F., Lombardo J. P. and Park H. Y. (2002) Electrophysiologic and behavioral effects of perinatal and acute exposure of rats to lead and polychlorinated biphenyls. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3, 377-386.
- Casanova Sotolongo, P., Casanova Carrillo, P., y Casanova Carrillo, C. (2004). Memory. An introduction to the study of the cognitive disorders in normal and pathological aging. *Rev Neurol*, 38: 469-472.
- Castoldi, A. F., Blandini, F., Randine, G., Samuele, A., Manzo, L., y Coccini, T. (2006). Brain monoaminergic neurotransmission parameters in weanling rats after perinatal exposure to methylmercury and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB153). *Brain Res.*, 1112: 91-98.
- Castoldi, A. F., Coccini, T., Ceccatelli, S., y Manzo, L. (2001). Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res.Bull.*, 55: 197-203.
- Castorina, M., Ambrosini, A. M., Pacific, L., Ramacci, M. T., y Angelucci, L. (1994). Age-dependent loss of NMDA receptors in hippocampus, striatum, and frontal cortex of the rat: prevention by acetyl-L-carnitine. *Neurochem.Res.*, 19: 795-798.
- Cestari, V., y Castellano, C. (1997). MK-801 potentiates morphine-induced impairment of memory consolidation in mice: involvement of dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)*, 133: 1-6.
- Colborn, T., Dumanoski, D., y Meyers, J. P. (1997). *Our Stole Future*(1 ed.). New York: Penguin Books USA Inc.

- Costa L. G., Guizzetti M., Lu H., Bordi F., Vitalone A., Tita B., Palmery M., Valeri P. and Silvestrini B. (2001) Intracellular signal transduction pathways as targets for neurotoxicants. *Toxicology* 160, 19-26.
- Costa, L. G., Aschner, M., Vitalone, A., Syversen, T., y Soldin, O. P. (2004). Developmental neuropathology of environmental agents. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 44: 87-110.
- Crofton K. M. and Rice D. C. (1999) Low-frequency hearing loss following perinatal exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) in rats. *Neurotoxicol Teratol* 21, 299-301.
- Crofton, K. M., Kodavanti, P. R., Derr-Yellin, E. C., Casey, A. C., y Kehn, L. S. (2000). PCBs, thyroid hormones, and ototoxicity in rats: cross-fostering experiments demonstrate the impact of postnatal lactation exposure. *Toxicol.Sci.*, 57: 131-140.
- Cucarella, C., Montoliu, C., Hermenegildo, C., Saez, R., Manzo, L., Minana, M. D., y Felipo, V. (1998). Chronic exposure to aluminum impairs neuronal glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway. *J.Neurochem.*, 70: 1609-1614.
- Chapman, P. F., Atkins, C. M., Allen, M. T., Haley, J. E., y Steinmetz, J. E. (1992). Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport*, 3: 567-570.
- Chen, J., Zhang, S., Zuo, P., y Tang, L. (1997). Memory-related changes of nitric oxide synthase activity and nitrite level in rat brain. *Neuroreport*, 8: 1771-1774.
- Choi, B. H. (1989). The effects of methylmercury on the developing brain. *Prog.Neurobiol.*, 32: 447-470.

- Danysz, W., Zajaczkowski, W., y Parsons, C. G. (1995). Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. *Behav.Pharmacol.*, 6: 455-474.
- Dare, E., Fetissov, S., Hokfelt, T., Hall, H., Ogren, S. O., y Ceccatelli, S. (2003). Effects of prenatal exposure to methylmercury on dopamine-mediated locomotor activity and dopamine D2 receptor binding. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, 367: 500-508.
- Darvill, T., Lonky, E., Reihman, J., Stewart, P., y Pagano, J. (2000). Prenatal exposure to PCBs and infant performance on the fagan test of infant intelligence. *Neurotoxicology*, 21: 1029-1038.
- Davidson, P. W., Myers, G. J., Shamlaye, C., Cox, C., y Wilding, G. E. (2004). Prenatal exposure to methylmercury and child development: influence of social factors. *Neurotoxicol Teratol*, 26: 553-559.
- DeKoning, E. P., y Karmaus, W. (2000). PCB exposure in utero and via breast milk. A review. *J.Expo.Anal.EnvIRON.Epidemiol.*, 10: 285-293.
- Delgado, J. M., Ferrús, A., Mora, F., Rubia, F. J., y Editores. (1998). *Manual de Neurociencia*(1st ed.). Madrid: Editorial Sintesis, S.A.
- Desmond, J. E., Gabrieli, J. D., Wagner, A. D., Ginier, B. L., y Glover, G. H. (1997). Lobular patterns of cerebellar activation in verbal working-memory and finger-tapping tasks as revealed by functional MRI. *J Neurosci.*, 17: 9675-9685.

- Di Chiara, G. (1990). Brain dialysis of neurotransmitters: a commentary. *J.Neurosci.Methods*, 34: 29-34.
- Dobbing, J. (1968). The development of the blood-brain barrier. *Prog.Brain Res.*, 29: 417-427.
- Dobbing, J. (1974). The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics*, 53: 2-6.
- Dunah, A. W., Yasuda, R. P., Luo, J., Wang, Y., Prybylowski, K. L., y Wolfe, B. B. (1999). Biochemical studies of the structure and function of the N-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptors. *Mol.Neurobiol.*, 19: 151-179.
- Emerit, M. B., Riad, M., y Hamon, M. (1992). Trophic effects of neurotransmitters during brain maturation. *Biol.Neonate*, 62: 193-201.
- Environmental Protection Agency, U. S. (2004). Risk assessment principles and practices. *Risk Assessment.Task.Force.US.EPA*. 1-193.
- Erceg, S., Monfort, P., Cauli, O., Montoliu, C., Llansola, M., Piedrafita, B., y Felipo, V. (2006). Role of extracellular cGMP and of hyperammonemia in the impairment of learning in rats with chronic hepatic failure Therapeutic implications. *Neurochem.Int.*, 48: 441-446.
- Erceg, S., Monfort, P., Hernandez-Viadel, M., Llansola, M., Montoliu, C., y Felipo, V. (2005a). Restoration of learning ability in hyperammonemic rats by increasing extracellular cGMP in brain. *Brain Res.*, 1036: 115-121.
- Erceg, S., Monfort, P., Hernandez-Viadel, M., Rodrigo, R., Montoliu, C., y Felipo, V. (2005b). Oral administration of sildenafil restores learning ability in rats with

- hyperammonemia and with portacaval shunts. *Hepatology*, 41: 299-306.
- Eto, K., Oyanagi, S., Itai, Y., Tokunaga, H., Takizawa, Y., y Suda, I. (1992). A fetal type of Minamata disease. An autopsy case report with special reference to the nervous system. *Mol.Chem.Neuropathol.*, 16: 171-186.
- Fangstrom, B., Hovander, L., Bignert, A., Athanassiadis, I., Linderholm, L., Grandjean, P., Weihe, P., y Bergman, A. (2005a). Concentrations of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, and polychlorobiphenyls in serum from pregnant Faroese women and their children 7 years later. *Environ.Sci.Technol.*, 39: 9457-9463.
- Fangstrom, B., Strid, A., Grandjean, P., Weihe, P., y Bergman, A. (2005b). A retrospective study of PBDEs and PCBs in human milk from the Faroe Islands. *Environ.Health*, 4: 12.
- Faroon, O. M., Samuel, L. K., Smith-Simon, C., y De Rosa, C. T. (2003). Polychlorinated Biphenyls: Human Health Aspects. Concise International Chemical Assessment Document 55. Geneva.
- Felipo, V., Miñana, M. D., y Grisolia, S. (1993). Inhibitors of protein kinase C prevent the toxicity of glutamate in primary neuronal cultures. *Brain Res.*, 604: 192-196.
- Garthwaite, J., Charles, S. L., y Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336: 385-388.
- Giesy, J. P., y Kannan, K. (1998). Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs):

- implications for risk assessment. *Crit Rev.Toxicol.*, 28: 511-569.
- Gilbert, S. G., y Grant-Webster, K. S. (1995). Neurobehavioral effects of developmental methylmercury exposure. *Environ.Health Perspect.*, 103 Suppl 6: 135-142.
- Gimenez-Llort, L., Ahlbom, E., Dare, E., Vahter, M., Ogren, S., y Ceccatelli, S. (2001). Prenatal exposure to methylmercury changes dopamine-modulated motor activity during early ontogeny: age and gender-dependent effects. *Environ.Toxicol.Pharmacol.*, 9: 61-70.
- Goldey E. S., Kehn L. S., Lau C., Rehnberg G. L. and Crofton K. M. (1995) Developmental exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) reduces circulating thyroid hormone concentrations and causes hearing deficits in rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 135, 77-88.
- Goulet, S., Dore, F. Y., y Mirault, M. E. (2003). Neurobehavioral changes in mice chronically exposed to methylmercury during fetal and early postnatal development. *Neurotoxicol.Teratol.*, 25: 335-347.
- Grandjean, P., y Landrigan, P. J. (2006). Developmental neurotoxicity of industrial chemicals *The Lancet*, 368: 2167-2178.
- Grandjean, P., Weihe, P., White, R. F., Debes, F., Araki, S., Yokoyama, K., Murata, K., Sorensen, N., Dahl, R., y Jorgensen, P. J. (1997). Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol.Teratol.*, 19: 417-428.

- Gudermann, T., Nurnberg, B., y Schultz, G. (1995). Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol.Med.*, 73: 51-63.
- Harteneck, C., Koesling, D., Soling, A., Schultz, G., y Bohme, E. (1990). Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett.*, 272: 221-223.
- Hawkins, R. D. (1996). NO honey, I don't remember. *Neuron*, 16: 465-467.
- Henderson, C. E. (1996). Programmed cell death in the developing nervous system. *Neuron*, 17: 579-585.
- Hermenegildo, C., Montoliu, C., Llansola, M., Munoz, M. D., Gaztelu, J. M., Minana, M. D., y Felipo, V. (1998). Chronic hyperammonemia impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in the rat *in vivo*. *Eur.J.Neurosci.*, 10: 3201-3209.
- Hernandez-Viadel, M., Montoliu, C., Monfort, P., Canales, J. J., Erceg, S., Rowan, M., Ceccatelli, S., y Felipo, V. (2003). Chronic exposure to 2,5-hexanedione impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in cerebellar neurons in culture and in rat brain *in vivo*. *Neurochem.Int.*, 42: 525-533.
- Hojo, R., Kakeyama, M., Yonemoto, J., y Tohyama, C. (2004). Perinatal exposure to dioxins perturbs learning performance of the rat in a dose-specific fashion, *Organohalogen Compounds* (Vol. 66, pp. 3143-3147).

-
- Huerta, P. T., Sun, L. D., Wilson, M. A., y Tonegawa, S. (2000). Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron*, 25: 473-480.
- Humbert, P., Niroomand, F., Fischer, G., Mayer, B., Koesling, D., Hinsch, K. D., Schultz, G., y Bohme, E. (1991). Preparation of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by immunoaffinity chromatography. *Methods Enzymol.*, 195: 384-391.
- Hussain R. J., Gyori J., DeCaprio A. P. and Carpenter D. O. (2000) *In vivo* and *in vitro* exposure to PCB 153 reduces long-term potentiation. *Environ.Health Perspect.* 108, 827-831.
- Ingram, D. K., Spangler, E. L., Kametani, H., Meyer, R. C., y London, E. D. (1998a). Intracerebroventricular injection of N omega-nitro-L-arginine in rats impairs learning in a 14-unit T-maze. *Eur.J.Pharmacol.*, 341: 11-16.
- Ingram, D. K., Spangler, E. L., Meyer, R. C., y London, E. D. (1998b). Learning in a 14-unit T-maze is impaired in rats following systemic treatment with N omega-nitro-L-arginine. *Eur.J.Pharmacol.*, 341: 1-9.
- Jacobson, J. L., Fein, G. G., Jacobson, S. W., Schwartz, P. M., y Dowler, J. K. (1984). The transfer of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs) across the human placenta and into maternal milk. *Am.J.Public Health*, 74: 378-379.
- Jacobson, J. L., y Jacobson, S. W. (1996). Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N.Engl.J.Med.*, 335: 783-789.

- Jacobson, J. L., y Jacobson, S. W. (2003). Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and attention at school age. *J.Pediatr.*, 143: 780-788.
- Joukhadar, C., y Muller, M. (2005). Microdialysis: current applications in clinical pharmacokinetic studies and its potential role in the future. *Clin Pharmacokinet*, 44: 895-913.
- Juarez, B. I., Martinez, M. L., Montante, M., Dufour, L., Garcia, E., y Jimenez-Capdeville, M. E. (2002). Methylmercury increases glutamate extracellular levels in frontal cortex of awake rats. *Neurotoxicol.Teratol.*, 24: 767-771.
- Kalat, J. W. (2001). *Biological Psychology*. (7th ed.). Belmont: Wadsworth, Inc.
- Kamisaki, Y., Saheki, S., Nakane, M., Palmieri, J. A., Kuno, T., Chang, B. Y., Waldman, S. A., y Murad, F. (1986). Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol.Chem.*, 261: 7236-7241.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., y Jessell, T. M. (2000). *Principles of Neural Science*. New York: McGraw Hill.
- Kiedrowski, L., Costa, E., y Wroblewski, J. T. (1992). Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem.*, 58: 335-341.
- Kim, S. G., Ugurbil, K., y Strick, P. L. (1994). Activation of a cerebellar output nucleus during cognitive processing. *Science*, 265: 949-951.
- Kunisue, T., Muraoka, M., Ohtake, M., Sudaryanto, A., Minh, N. H., Ueno, D., Higaki, Y., Ochi, M., Tsydenova, O.,

- Kamikawa, S., Tonegi, T., Nakamura, Y., Shimomura, H., Nagayama, J., y Tanabe, S. (2006). Contamination status of persistent organochlorines in human breast milk from Japan: recent levels and temporal trend. *Chemosphere*, 64: 1601-1608.
- Landrigan, P. J. (2001). Pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs): an analysis of the evidence that they impair children's neurobehavioral development. *Mol.Genet.Metab*, 73: 11-17.
- Lapham L. W., Cernichiari E., Cox C., Myers G. J., Baggs R. B., Brewer R., Shamlaye C. F., Davidson P. W. and Clarkson T. W. (1995) An analysis of autopsy brain tissue from infants prenatally exposed to methymercury. *Neurotoxicology* 16, 689-704.
- Lein P. J., Yang D., Bachstetter A. D., Tilson H. A., Harry G. J., Mervis R. F. and Kodavanti P. R. (2007) Ontogenetic alterations in molecular and structural correlates of dendritic growth after developmental exposure to polychlorinated biphenyls. *Environ Health Perspect* 115, 556-563.
- Levitt, P., Harvey, J. A., Friedman, E., Simansky, K., y Murphy, E. H. (1997). New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci.*, 20: 269-274.
- Limke, T. L., Heidemann, S. R., y Atchison, W. D. (2004). Disruption of intraneuronal divalent cation regulation by methylmercury: are specific targets involved in altered neuronal development and cytotoxicity in methylmercury poisoning? *Neurotoxicology*, 25: 741-760.

- Llansola, M., Minana, M. D., Montoliu, C., Saez, R., Corbalan, R., Manzo, L., y Felipo, V. (1999). Prenatal exposure to aluminum reduces expression of neuronal nitric oxide synthase and of soluble guanylate cyclase and impairs glutamatergic neurotransmission in rat cerebellum. *J.Neurochem.*, 73: 712-718.
- Longnecker M. P., Wolff M. S., Gladen B. C., Brock J. W., Grandjean P., Jacobson J. L., Korrick S. A., Rogan W. J., Weisglas-Kuperus N., Hertz-Picciotto I., Ayotte P., Stewart P., Winneke G., Charles M. J., Jacobson S. W., Dewailly E., Boersma E. R., Altshul L. M., Heinzow B., Pagano J. J. and Jensen A. A. (2003) Comparison of polychlorinated biphenyl levels across studies of human neurodevelopment. *Environ.Health Perspect.* 111, 65-70.
- Lulek J. (2002) The study of human exposure to PCBs and OCPs in the region III - Europe., p 20. Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, Poznań, Poland.
- Magni, S., Krekule, I., y Bures, J. (1979). Radial maze type as a determinant of the choice behavior of rats. *J Neurosci.Methods*, 1: 343-352.
- Magnusson, K. R. (1998). The aging of the NMDA receptor complex. *Front Biosci*, 3: e70-80.
- Magnusson, K. R., y Cotman, C. W. (1993). Effects of aging on NMDA and MK801 binding sites in mice. *Brain Res.*, 604: 334-337.
- Marty M. S. and Atchison W. D. (1998) Elevations of intracellular Ca²⁺ as a probable contributor to decreased viability in cerebellar granule cells following acute exposure to methylmercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 150, 98-105.

- Matsumoto, H., Koya, G., y Takeuchi, T. (1965). Fetal Minamata disease. A neuropathological study of two cases of intrauterine intoxication by a methyl mercury compound. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, 24: 563-574.
- Maurice, T., Hiramatsu, M., Itoh, J., Kameyama, T., Hasegawa, T., y Nabeshima, T. (1994). Behavioral evidence for a modulating role of sigma ligands in memory processes. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. *Brain Res.*, 647: 44-56.
- McHugh, T. J., Blum, K. I., Tsien, J. Z., Tonegawa, S., y Wilson, M. A. (1996). Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell*, 87: 1339-1349.
- Meacham, C. A., Freudenrich, T. M., Anderson, W. L., Sui, L., Lyons-Darden, T., Barone, S., Jr., Gilbert, M. E., Mundy, W. R., y Shafer, T. J. (2005). Accumulation of methylmercury or polychlorinated biphenyls in *in vitro* models of rat neuronal tissue. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 205: 177-187.
- Mendola, P., Selevan, S. G., Gutter, S., y Rice, D. (2002). Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment.Retard.Dev.Disabil.Res.Rev.*, 8: 188-197.
- Meyer, R. C., Knox, J., Purwin, D. A., Spangler, E. L., y Ingram, D. K. (1998). Combined stimulation of the glycine and polyamine sites of the NMDA receptor attenuates NMDA blockade-induced learning deficits of rats in a 14-unit T-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, 135: 290-295.
- Miller, M. W. E. (2006). Brain Development. Normal processes and the Effects of Alcohol and Nicotine. New York: Oxford University Press

- Mize R. R. and Lo F. (2000) Nitric oxide, impulse activity, and neurotrophins in visual system development(1). *Brain Res* 886, 15-32.
- Monfort, P., Corbalan, R., Martinez, L., Lopez-Talavera, J., Cordoba, J., y Felipo, V. (2001). Altered content and modulation of soluble guanylate cyclase in the cerebellum of rats with portacaval anastomosis. *Neuroscience*, 104: 1119-1125.
- Mori, H., y Mishina, M. (1995). Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, 34: 1219-1237.
- Moriarty, F. (1988). Ecotoxicology. *Hum.Toxicol.*, 7: 437-441.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., y Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, 354: 31-37.
- Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S., y Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319: 774-776.
- Mothet, J. P., Rouaud, E., Sinet, P. M., Potier, B., Jouvenceau, A., Dutar, P., Videau, C., Epelbaum, J., y Billard, J. M. (2006). A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging Cell*, 5: 267-274.
- Murray, T. K., y Ridley, R. M. (1997). The effect of dizocilpine (MK-801) on conditional discrimination learning in the rat. *Behav.Pharmacol.*, 8: 383-388.
- Myers, G. J., y Davidson, P. W. (1998). Prenatal methylmercury exposure and children: neurologic, developmental, and

-
- behavioral research. *Environ.Health Perspect.*, 106 Suppl 3: 841-847.
- Myslivecek, J. (1997). Inhibitory learning and memory in newborn rats. *Prog.Neurobiol.*, 53: 399-430.
- Nakai, K., y Satoh, H. (2002). Developmental neurotoxicity following prenatal exposures to methylmercury and PCBs in humans from epidemiological studies. *Tohoku J.Exp.Med.*, 196: 89-98.
- Ness D. K., Schantz S. L., Moshtaghian J. and Hansen L. G. (1993) Effects of perinatal exposure to specific PCB congeners on thyroid hormone concentrations and thyroid histology in the rat. *Toxicol Lett* 68, 311-323.
- Newland, M. C., y Paletz, E. M. (2000). Animal studies of methylmercury and PCBs: what do they tell us about expected effects in humans? *Neurotoxicology*, 21: 1003-1027.
- Nguyen, L., Rigo, J. M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P., y Moonen, G. (2001). Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res.*, 305: 187-202.
- Nurnberg, B., Gudermann, T., y Schultz, G. (1995). Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. *J Mol.Med.*, 73: 123-132.
- Ozawa, S., Kamiya, H., y Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog.Neurobiol.*, 54: 581-618.

- Packard, M. G., y Teather, L. A. (1997). Posttraining injections of MK-801 produce a time-dependent impairment of memory in two water maze tasks. *Neurobiol.Learn.Mem.*, 68: 42-50.
- Parada-Turska, J., y Turski, W. A. (1990). Excitatory amino acid antagonists and memory: effect of drugs acting at N-methyl-D-aspartate receptors in learning and memory tasks. *Neuropharmacology*, 29: 1111-1116.
- Park, S. T., Lim, K. T., Chung, Y. T., y Kim, S. U. (1996). Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology*, 17: 37-45.
- Parsons, L. H., y Justice, J. B., Jr. (1994). Quantitative approaches to *in vivo* brain microdialysis. *Crit Rev.Neurobiol.*, 8: 189-220.
- Patel, N., Spangler, E. L., Greig, N. H., Yu, Q. S., Ingram, D. K., y Meyer, R. C. (1998). Phenserine, a novel acetylcholinesterase inhibitor, attenuates impaired learning of rats in a 14-unit T-maze induced by blockade of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuroreport*, 9: 171-176.
- Pellegrino, L. J., Pellegrino, A. S., y Cushman, A. J. (1979). A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain. New York: Plenum Press.
- Piedrafita, B., Cauli, O., Montoliu, C., y Felipo, V. (2007). The function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in brain *in vivo* and learning ability decrease in parallel in mature compared with young rats. *Learn Mem*, 14: 254-258.
- Pin, J. P., y Bockaert, J. (1995). Get receptive to metabotropic glutamate receptors. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 5: 342-349.

-
- Prickaerts, J., de Vente, J., Honig, W., Steinbusch, H. W., y Blokland, A. (2002). cGMP, but not cAMP, in rat hippocampus is involved in early stages of object memory consolidation. *Eur.J Pharmacol.*, 436: 83-87.
- Rampon, C., Tang, Y. P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., y Tsien, J. Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat.Neurosci.*, 3: 238-244.
- Rice, D. C. (1995). Neurotoxicity of lead, methylmercury, and PCBs in relation to the Great Lakes. *Environ.Health Perspect.*, 103 Suppl 9: 71-87.
- Rice D. C. (1999a) Effect of exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) throughout gestation and lactation on development and spatial delayed alternation performance in rats. *Neurotoxicol Teratol* 21, 59-69.
- Rice, D. C. (1999b). Behavioral impairment produced by low-level postnatal PCB exposure in monkeys. *Environ.Res.*, 80: S113-S121.
- Riekkinen, M., Stefanski, R., Kuitunen, J., y Riekkinen, P., Jr. (1996). Effects of combined block of alpha 1-adrenoceptors and NMDA receptors on spatial and passive avoidance behavior in rats. *Eur.J.Pharmacol.*, 300: 9-16.
- Robertson, L. T. (2002). Memory and the brain. *J Dent Educ*, 66: 30-42.
- Rodier, P. M. (1994). Vulnerable periods and processes during central nervous system development. *Environ.Health Perspect.*, 102 Suppl 2: 121-124.

- Rodier, P. M. (1995). Developing brain as a target of toxicity. *Environ.Health Perspect.*, 103 Suppl 6: 73-76.
- Rodriguez-Alvarez, J., Lafon-Cazal, M., y Bockaert, J. (1996). The CaM-kinase II inhibitor KN-62 blocks NMDA but not kainate stimulation of NO synthesis. *Neuroreport*, 7: 2525-2528.
- Roegge, C. S., Wang, V. C., Powers, B. E., Klintsova, A. Y., Villareal, S., Greenough, W. T., y Schantz, S. L. (2004). Motor impairment in rats exposed to PCBs and methylmercury during early development. *Toxicol.Sci.*, 77: 315-324.
- Rogan, W. J., y Ragan, N. B. (1994). Chemical contaminants, pharmacokinetics, and the lactating mother. *Environ.Health Perspect.*, 102 Suppl 11: 89-95.
- Rossi, A. D., Ahlbom, E., Ogren, S. O., Nicotera, P., y Ceccatelli, S. (1997). Prenatal exposure to methylmercury alters locomotor activity of male but not female rats. *Exp.Brain Res.*, 117: 428-436.
- Rylander, L., Stromberg, U., Dyremark, E., Ostman, C., Nilsson-Ehle, P., y Hagmar, L. (1998). Polychlorinated biphenyls in blood plasma among Swedish female fish consumers in relation to low birth weight. *Am J Epidemiol.*, 147: 493-502.
- Sakaue, M., Okazaki, M., y Hara, S. (2005). Very low levels of methylmercury induce cell death of cultured rat cerebellar neurons via calpain activation. *Toxicology*, 213: 97-106.
- Sarafian, T., Hagler, J., Vartavarian, L., y Verity, M. A. (1989). Rapid cell death induced by methyl mercury in suspension of cerebellar granule neurons. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, 48: 1-10.

-
- Sarafian T. A. (1993) Methyl mercury increases intracellular Ca²⁺ and inositol phosphate levels in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 61, 648-657.
- Schalock, R. L., Brown, W. J., Kark, R. A., y Menon, N. K. (1981). Perinatal methylmercury intoxication: behavioral effects in rats. *Dev.Psychobiol.*, 14: 213-219.
- Schantz, S. L., Moshtaghian, J., y Ness, D. K. (1995). Spatial learning deficits in adult rats exposed to ortho-substituted PCB congeners during gestation and lactation. *Fundam.Appl.Toxicol.*, 26: 117-126.
- Schantz, S. L., Seo, B. W., Moshtaghian, J., Peterson, R. E., y Moore, R. W. (1996). Effects of gestational and lactational exposure to TCDD or coplanar PCBs on spatial learning. *Neurotoxicol.Teratol.*, 18: 305-313.
- Schettler, T. (2001). In Harm's Way: Toxic Threats to Child Development (1 ed.). Boston: Greater Boston Physicians for Social Responsibility.
- Scheuer, K., Stoll, S., Paschke, U., Weigel, R., y Muller, W. E. (1995). N-methyl-D-aspartate receptor density and membrane fluidity as possible determinants of the decline of passive avoidance performance in aging. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 50: 65-70.
- Schmahmann, J. D. (1991). An emerging concept. The cerebellar contribution to higher function. *Arch.Neurol.*, 48: 1178-1187.
- Seegal, R. F. (1996). Can epidemiological studies discern subtle neurological effects due to perinatal exposure to PCBs? *Neurotoxicol Teratol*, 18: 251-254; discussion 271-256.

- Shirota, M., Mukai, M., Sakurada, Y., Doyama, A., Inoue, K., Haishima, A., Akahori, F., y Shirota, K. (2006). Effects of vertically transferred 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB-126) on the reproductive development of female rats. *J Reprod Dev*, 52: 751-761.
- Smith, R. D., Grzelak, M. E., y Coffin, V. L. (1997). Reduction of dizocilpine and scopolamine-induced deficits in avoidance responding by SCH 54388, a metabolite of felbamate. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 58: 657-664.
- Snider, R. S., Maiti, A., y Snider, S. R. (1976). Cerebellar pathways to ventral midbrain and nigra. *Exp.Neurol.*, 53: 714-728.
- Stellman, S. D., Djordjevic, M. V., Muscat, J. E., Gong, L., Bernstein, D., Citron, M. L., White, A., Kemeny, M., Busch, E., y Nafziger, A. N. (1998). Relative abundance of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in adipose tissue and serum of women in Long Island, New York. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 7: 489-496.
- Stone, J. R., y Marletta, M. A. (1996). Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochemistry*, 35: 1093-1099.
- Sucher, N. J., Awobuluyi, M., Choi, Y. B., y Lipton, S. A. (1996). NMDA receptors: from genes to channels. *Trends Pharmacol.Sci.*, 17: 348-355.
- Sunico C. R., Portillo F., Gonzalez-Forero D. and Moreno-Lopez B. (2005) Nitric-oxide-directed synaptic remodeling in the adult mammal CNS. *J Neurosci* 25, 1448-1458.

- Szasz A., Barna B., Szupera Z., De Visscher G., Galbacs Z., Kirsch-Volders M. and Szente M. (1999) Chronic low-dose maternal exposure to methylmercury enhances epileptogenicity in developing rats. *International Journal of Developmental Neuroscience* 17, 733-742.
- Takeuchi, T. (1982). Pathology of Minamata disease. With special reference to its pathogenesis. *Acta Pathol.Jpn.*, 32 Suppl 1: 73-99.
- Taylor, P. R., Stelma, J. M., y Lawrence, C. E. (1989). The relation of polychlorinated biphenyls to birth weight and gestational age in the offspring of occupationally exposed mothers. *Am J Epidemiol.*, 129: 395-406.
- Trimm K. R. and Rehder V. (2004) Nitric oxide acts as a slow-down and search signal in developing neurites. *Eur J Neurosci* 19, 809-818.
- Tsien, J. Z., Huerta, P. T., y Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, 87: 1327-1338.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., y Peterson, R. E. (2006). The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol.Sci.*, 93: 223-241.
- Van Larebeke N., Hens L., Schepens P., Covaci A., Baeyens J., Everaert K., Bernheim J. L., Vlietinck R. and De Poorter G. (2001) The Belgian PCB and dioxin incident of January-June

- 1999: exposure data and potential impact on health. *Environ Health Perspect* 109, 265-273.
- Vercelli A., Garbossa D., Biasiol S., Repici M. and Jhaveri S. (2000) NOS inhibition during postnatal development leads to increased ipsilateral retinocollicular and retinogeniculate projections in rats. *Eur J Neurosci* 12, 473-490.
- Vernet, D., Bonavera, J. J., Swerdloff, R. S., Gonzalez-Cadavid, N. F., y Wang, C. (1998). Spontaneous expression of inducible nitric oxide synthase in the hypothalamus and other brain regions of aging rats. *Endocrinology*, 139: 3254-3261.
- Vilagi I., Doczi J. and Banczerowski-Pelyhe I. (2000) Altered electrophysiological characteristics of developing rat cortical neurones after chronic methylmercury chloride treatment. *International Journal of Developmental Neuroscience* 18, 493-499.
- Wania, F. (2006). Potential of degradable organic chemicals for absolute and relative enrichment in the Arctic. *Environ.Sci.Technol.*, 40: 569-577.
- Washington State Department of Health (1999) Evaluation of Evidence Related to the Development of a Tolerable Daily Intake for Methylmercury. Office of Environmental Health Assessment Services (Mariën K., ed.), p 24. Washington State Department of Health, Olympia, Washington.
- Whishaw, I. Q., Cioe, J. D., Previsich, N., y Kolb, B. (1977). The variability of the interaural line vs the stability of bregma in rat stereotaxic surgery. *Physiol Behav.*, 19: 719-722.

-
- Widholm, J. J., Villareal, S., Seegal, R. F., y Schantz, S. L. (2004). Spatial alternation deficits following developmental exposure to Aroclor 1254 and/or methylmercury in rats. *Toxicol.Sci.*, 82: 577-589.
- Wiggs, C. L., Weisberg, J., y Martin, A. (1999). Neural correlates of semantic and episodic memory retrieval. *Neuropsychologia*, 37: 103-118.
- Xu, X. (1997). NMDA receptor antagonist MK-801 selectively impairs learning of the contiguity of the conditioned stimulus and unconditioned stimulus in goldfish. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 58: 491-496.
- Yamada, K., Noda, Y., Nakayama, S., Komori, Y., Sugihara, H., Hasegawa, T., y Nabeshima, T. (1995). Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br.J Pharmacol.*, 115: 852-858.
- Zhang, S., Ehlers, M. D., Bernhardt, J. P., Su, C. T., y Huganir, R. L. (1998). Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuron*, 21: 443-453.
- Zou, L. B., Yamada, K., Tanaka, T., Kameyama, T., y Nabeshima, T. (1998). Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacology*, 37: 323-330.