







# **Mecanismos de transporte y toxicidad intestinal de especies de mercurio presentes en los alimentos**

**Tesis Doctoral presentada por:**

Marta Vázquez San Antonio

**Dirigida por:**

Dra. Vicenta Devesa i Pérez

Dra. Dinoraz Vélez Pacios

Valencia, 2014

Programa de Doctorado en Ciencias de la Alimentación  
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la  
Alimentación, Toxicología y Medicina Legal  
Universidad de Valencia





Vicenta Devesa i Pérez y Dinoraz Vélez Pacios, ambas Científico Titular del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

HACEN CONSTAR QUE: El trabajo de investigación titulado **“Mecanismos de transporte y toxicidad intestinal de especies de mercurio presentes en los alimentos”** que presenta Dña. Marta Vázquez San Antonio para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia, ha sido realizado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC) bajo su dirección y que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Valencia, Septiembre de 2014

Fdo: Dra. Vicenta Devesa i Pérez

Fdo: Dra. Dinoraz Vélez Pacios



*A mi familia y a Ricardo,  
por vuestro amor*



## Agradecimientos

Como todo en esta vida, con esfuerzo y constancia se consiguen todos los retos que uno se marca. Siempre digo que cuando entre en el IATA era como una niña, pero ahora me siento toda una mujer, preparada para los futuros retos. En esta tesis, he crecido profesionalmente, pero aún más personalmente. Todo esto se lo debo a las personas que me han acompañado en este camino y espero sigan presentes a lo largo de mi vida.

Marta, que que t'he de dir que no t'haja dit ja, gràcies per ensenyar-m'ho tot i per fer per mi fins a tot el que no estava a les teues mans. M'has cuidat des del primer dia i no ho has deixat de fer des de la distància. Has sigut més que una amiga, una súper amiga. T'estic molt agraïda. Antonio, quan t'he necessitat sempre m'has recolzat, gràcies per comportar-te com un pare per a mi.

Chusa, gracias por tu apoyo incondicional y por tu ayuda y disposición para ayudarme en todo momento; espero que sigamos compartiendo muchos momentos juntas. Lola, gracias por llenar de alegría los almuerzos y por compartir tantas risas conmigo. Siempre has tenido buenas palabras hacia mí y sabios consejos, te estoy muy agradecida. Marieta, tus saludos de cada día hacían que mi día empezase mejor, gracias por esa simpatía que tienes. Maite, gracias por tener siempre buenas palabras hacia mí. René, aunque ya no estés aquí, tú huella sigue presente, siempre nos acordamos entre risas de tú expresión “ya”, que hasta que averiguas que significa cuando uno quiera pasa un tiempo. Gracias por transmitirme en muchos momentos esa tranquilidad que te caracteriza. Carlos siempre tienes una buena sonrisa para mí y eso se agradece. Silvia, aunque trabajando hemos coincidido más bien

poco, he tenido la oportunidad de conocerte fuera y siempre has tenido buenos consejos que ofrecerme.

Alida, sei una persona molto cara, tu e la vostra famiglia mi avete sempre dimostrato tanto affetto. Grazie per aver reso che il mio tempo in Italia era meglio di quanto mi aspettassi. Sempre siete stati a guardare me. Abbiamo avuto così tanto divertimento in viaggio, non dimenticherò mai. Susana, la última en llegar y con la que también he compartido grandes momentos, recuerdo con gran alegría esa noche de risas en el sincrotrón, gracias por darme la oportunidad de aprender lo que tú haces, eres fabulosa.

Y para acabar con mi laboratorio, agradecer a mis jefas, Vicen y Deni, esta gran oportunidad que me ofrecieron, por enseñarme todo lo que saben y por confiar en mí en todo momento.

Otro gran laboratorio en el que he conocido fantásticas personas es el de envases, “mis vecinitas”. Gracia, eres una gran persona, siempre has estado pendiente de mí y he agradecido en todo momento tus consejos; gracias por haberme aportado tanto cariño. Vir, gracias por tu complicidad y por transmitir esa alegría que te caracteriza; compartir tantas comidas juntas ha sido todo un lujo. Gràcies Lau, per ser tan bona xiqueta, per estar sempre pendent i voler el millor per a mí, eres un solet. M<sup>a</sup> Pau, Carol, Poliana y Joaquín, fuisteis una gran compañía durante las comidas, sois grandes personas y agradezco haberme cruzado en vuestros caminos. Irene, gracias por tu alegría y transmitir ese buen rollo que tienes.

De la misma manera siempre llevaré en mi corazón el laboratorio de mi bella Italia. Umberto, sei una persona molto importante per me, grazie per avermi dato l'opportunità di imparare da voi, mi piacerebbe lavorare di nuovo con te. Tu e Paola erano come genitori per me, grazie per il vostro

amore. Cinzia e Gabriella, grazie per aver reso i miei giorni dentro e fuori del laboratorio sono stati meravigliosi. Tutti sarai sempre nel mio cuore.

No puede estar ausente de mis agradecimientos el laboratorio del grupo de “Biología de sistemas en levaduras de interés biotecnológico”. Sergi, gràcies per permetre'm aprendre de tu, he estat molt agust en el teu laboratori. Anto, Adri i Lupita, gracias por vuestra simpatía y amabilidad, hacéis que una se sienta bien en un laboratorio que no es el suyo.

Respecto al resto del IATA, recuerdo con mucha alegría los momentos vividos con Ana en cultivos y fuera de esa sala; eres una gran persona. A Clara, per ser tan bona amiga i per entendre'm tan bé. A Moisés, pels teus savis consells, suport i moments compartits fora de l'IATA. A Inma, por estar tan pendiente de mi y ayudarme en todo momento. A José, gracias por ayudarme cuando te he necesitado; siempre has estado dispuesto a hacerlo. Y muchas gracias a las limpiadoras/res, Mar, Alba y Miguel, por sacarme una sonrisa siempre que entráis en el laboratorio. Gracias a los conserjes, Pablo, Juan, Celestino, Miguel y algunos más que he tenido la oportunidad de conocer y siempre tienen buenas palabras y una sonrisa que te hacen empezar y terminar el día con más ilusión.

Por último, mi familia. Gràcies mama per ajudar-me i confiar en mi fins en els moments que ni jo mateixa ho feia, em comprens com la que mes i em dónes la força necessària en tot moment, sense la teua ajuda este camí haguera sigut més difícil, tú ja saps tot el que et vull, però cada dia t'ho recorde, ET VULL MOLT.

Gràcies Papa, sempre has confiat en que jo podía realitzar tot el que em proposara i això m'ha donat confiança en mi mateixa, gràcies per lluitar tant per nosaltres, crec que part de la teua força per a treballar l'he heretat jo, com tú també saps, ET VULL MOLT.

Gràcies als meus germans, Iván i Paula, per donar-me suport sempre que ho he necessitat i per tots els moments viscuts junts i pels que ens queden per viure, VOS VUIC.

A la meua abuela Patro per estar pendent de com m'anava el treball sempre, eres una lluitadora. I en el meu cor, sempre estaràs tu, abuela Adelina, no et pots arribar a imaginar el que et trobe a faltar, encara que sé que sempre m'acompanyes, eres el meu àngel de la guarda.

A les meues ties i cosines gràcies pel vostre suport i afecte.

A les meues amigues per preocuparse de com m'anava sempre la investigació i especialment a Rocio, per creure en mi i donar-me forces sempre per a seguir endavant.

A M<sup>a</sup> Cruz y Ricardo por darme ánimos en esta última etapa.

Finalmente, Ricardo, gracias por llenar mis días de amor. Eres la ilusión que necesitó cada día.

## Resumen

El mercurio es un metal tóxico ampliamente distribuido en el medioambiente. Las formas químicas mayoritarias en los alimentos son el mercurio mercúrico [Hg(II)] y el metilmercurio (CH<sub>3</sub>Hg). La principal vía de exposición para el ser humano la constituye la dieta, siendo los productos pesqueros los que mayor aporte de mercurio realizan. Teniendo en cuenta que la principal vía de exposición al mercurio es la oral, el tracto gastrointestinal se considera la puerta de entrada de este tóxico al organismo. Estudios *in vivo* han demostrado que el Hg(II) presenta una moderada absorción (2-38%) mientras que el CH<sub>3</sub>Hg es absorbido prácticamente en su totalidad. Aunque se conocen los ratios de absorción de ambas especies mercuriales, se desconocen los mecanismos implicados y las características de este proceso, así como el posible efecto tóxico del mercurio sobre el epitelio intestinal. Esta tesis doctoral tiene como objetivo caracterizar los mecanismos de transporte y toxicidad a nivel intestinal de las especies de mercurio presentes en los alimentos. Para tal fin se han empleado modelos celulares procedentes de adenocarcinomas de colon (Caco-2 y HT29-MTX), cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y ratas Wistar.

Los ensayos de transporte han demostrado que el transporte de ambas especies es transcelular, no existiendo evidencias de la participación de la vía paracelular. El Hg(II) en forma de sales o unido a cisteína muestra principalmente un transporte mediado por portador. El transporte de CH<sub>3</sub>Hg en forma de sal de cloruro se realiza principalmente por difusión pasiva a través de la bicapa lipídica, mientras que unido a cisteína está mediado por portador. Para ambas especies parte del transporte mediado por portador es activo y se observa una dependencia de H<sup>+</sup> y de Na<sup>+</sup>. Los ensayos empleando inhibidores y sustratos de ciertas familias de transportadores han evidenciado

que en presencia de aminoácidos aniónicos y catiónicos hay una reducción importante de la entrada y transporte transepitelial de ambas formas mercuriales. Por otro lado, la presencia de Mn(II) reduce significativamente el transporte de Hg(II). Todos estos datos han permitido apuntar a algunos transportadores como posibles partícipes en el transporte de estas formas mercuriales.

Los estudios realizados con el fin de confirmar la participación de algunos de los transportadores señalados se han basado en técnicas de silenciamiento génico en células Caco-2 mediante RNA interferente de pequeño tamaño, en tratamientos químicos y en el empleo de cepas de *S. cerevisiae* transformadas. Estos ensayos han permitido identificar al transportador DMT1, H<sup>+</sup> dependiente, como partícipe en la entrada del Hg(II) en forma salina al interior de la monocapa epitelial. Asimismo, se ha evidenciado la participación de transportadores de aminoácidos (sistema b<sup>0,+</sup> y B<sup>0,+</sup>) en el transporte de las formas mercuriales unidas a cisteína.

Adicionalmente se han identificado factores que pueden influir en el transporte intestinal. Los ensayos han puesto de manifiesto que la capa de mucus secretada por las células caliciformes del intestino, que recubre en condiciones habituales el epitelio, constituye una barrera para la entrada de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Además se ha evidenciado que los componentes solubilizados durante la digestión gastrointestinal de un alimento, en concreto el pez espada, y la presencia de sales biliares disminuyen el paso de mercurio a través de los modelos celulares de epitelio intestinal empleados.

Los estudios realizados en animales y células epiteliales han mostrado una elevada acumulación en el epitelio intestinal para ambas formas mercuriales, que tal y como se ha evidenciado en la presente tesis doctoral tiene un efecto tóxico. Uno de los mecanismos de toxicidad identificados ha

sido la generación de especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno, con disminución del glutatión intracelular, peroxidación lipídica y una inducción de la expresión de metalotioneínas y proteínas de choque térmico. Adicionalmente se han observado incrementos de los niveles de la citoquina proinflamatoria TNF $\alpha$ . Estos efectos citotóxicos se acompañan de una redistribución de la actina filamentososa del citoesqueleto y de la proteína de unión ZO1, una disminución de la expresión de los genes que codifican las proteínas constituyentes de las uniones intercelulares y una disminución de la resistencia eléctrica transepitelial con el consiguiente aumento de la permeabilidad epitelial. Esto produce una alteración de la función barrera del epitelio. Todos estos efectos se han puesto de manifiesto a concentraciones inferiores a 2 mg/L, similares a las encontradas en alimentos.

Los estudios *in vivo* han mostrado un efecto importante sobre la expresión de transportadores de membrana. Se observa una reducción de los niveles de acuaporinas, especialmente la 3 y la 7, que podría explicar la pérdida de líquido y los procesos diarreicos derivados de la exposición a ambas formas mercuriales. Por otro lado hay una modulación de la expresión de transportadores de nutrientes y sustancias necesarias para un adecuado funcionamiento local y sistémico ( $\gamma^+$ LAT1, LAT1, LAT2, OATP y DMT1), como respuesta celular al tóxico.

Todos estos datos evidencian que el mercurio en sus formas habituales en alimentos puede tener un efecto tóxico que afecta a las principales funciones del epitelio intestinal.



## Índice general

<i>Índice</i> .....	i
<i>Índice de tablas</i> .....	x
<i>Índice de figuras</i> .....	xiv
<i>Abreviaturas</i> .....	xix

<b>Introducción</b> .....	1
1. Formas químicas de mercurio .....	3
2. Usos del mercurio .....	4
3. Fuentes de emisión de mercurio .....	5
4. Ciclo del mercurio .....	9
5. Exposición humana a mercurio .....	10
6. Toxicocinética .....	15
6.1. Absorción .....	15
6.2. Distribución .....	16
6.3. Metabolismo .....	17
6.4. Excreción .....	18
6.5. Factores dietéticos que pueden afectar la toxicocinética del mercurio .....	19
7. Efectos de la exposición a las distintas formas de mercurio .....	21
7.1. Efectos en exposiciones agudas o de corta duración .....	21
7.2. Efectos en exposiciones de media y larga duración .....	22
7.2.1. Efectos carcinogénicos .....	22
7.2.2. Efectos sobre el sistema nervioso y el desarrollo .....	23
7.2.3. Efectos sobre el sistema renal .....	25
7.2.4. Inmunotoxicidad .....	27
7.2.5. Efectos sobre el sistema digestivo .....	28
8. Mecanismos moleculares y celulares de toxicidad de las formas mercuriales .....	29
9. Estructura y función de la pared intestinal .....	32
9.1. Estructura de la mucosa intestinal .....	33

9.2. Tipos celulares en el epitelio intestinal .....	34
9.3. Tejido linfoide asociado al intestino (GALT) .....	37
9.4. Absorción y vías de transporte .....	39
9.5. Función barrera intestinal .....	41
10. Modelos <i>in vitro</i> de epitelio intestinal .....	42
11. Antecedentes sobre los mecanismos de transporte del mercurio a nivel intestinal .....	46

<b>Objetivos</b> .....	49
------------------------	----

<b>Metodología</b> .....	53
--------------------------	----

1. Especies mercuriales .....	55
2. Modelos celulares y animales empleados en el estudio del transporte y toxicidad de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	55
2.1. Líneas celulares humanas procedentes de adenocarcinomas de colon, Caco-2 y HT29-MTX .....	55
2.2. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	57
2.3. Modelos animales .....	57
3. Evaluación de las características del transporte intestinal de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg empleando la línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal .....	58
3.1. Evaluación de la actividad mitocondrial de células Caco-2 tratadas con Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	60
3.2. Control de la integridad de la monocapa durante los ensayos de transporte, acumulación celular y permeabilidad .....	61
3.3. Ensayos de transporte, acumulación celular y determinación de la permeabilidad de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg en condiciones estándar .....	62
3.4. Estudio de eliminación celular de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	65
3.5. Estudio de los parámetros cinéticos del transporte de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	66
3.6. Efecto de la albúmina en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	67
3.7. Estudio de la participación de la vía paracelular en el transporte de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	67

---

3.8. Participación de un mecanismo dependiente de energía en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	68
3.9. Efecto de la concentración de H <sup>+</sup> en la permeabilidad y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	69
3.10. Influencia de la concentración de Na <sup>+</sup> en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	69
3.11. Efecto de la presencia de distintas formas de cisteína en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	70
3.12. Efecto de inhibidores o sustratos de determinados transportadores en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	71
3.13. Evaluación de la participación de un transporte pasivo en el paso transcelular de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	72
4. Evaluación de los transportadores implicados en el transporte intestinal de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	74
4.1. Evaluación de los transportadores implicados en el transporte intestinal de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg empleando la línea celular Caco-2 .....	75
4.1.1. Expresión génica de los transportadores seleccionados en células control y en células expuestas a Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	75
4.1.2. Silenciamiento génico transitorio de transportadores específicos mediante la técnica de siARN (ARN pequeño de interferencia) .....	78
4.1.3. Inhibición de la expresión del transportador <i>DMT1</i> mediante el empleo de hepcidina y su efecto sobre la acumulación y el transporte de Hg(II) .....	81
4.1.4. Extracción del ARN total de los cultivos celulares .....	81
4.1.5. Cuantificación del ARN .....	82
4.1.6. Transcripción reversa (RT) .....	82
4.1.7. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) .....	83
4.2. Estudios de identificación de transportadores empleando <i>S. cerevisiae</i> .....	85
4.2.1. Construcción de los plásmidos .....	85
4.2.2. Transformación de levaduras .....	86
4.2.3. Ensayos de acumulación de Hg(II) y manganeso [Mn(II)] en <i>S. cerevisiae</i> .....	87
5. Evaluación de la influencia del modelo <i>in vitro</i> de epitelio intestinal y los factores existentes en el lumen sobre la permeabilidad y acumulación del Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	88

5.1. Influencia del modelo celular sobre el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	89
5.1.1. Ensayo de transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg empleando co-cultivos Caco-2/HT29-MTX .....	89
5.1.2. Evaluación de la retención celular de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg en el mucus secretado por las células HT29-MTX .....	90
5.2. Evaluación de la influencia de factores presentes en el tracto gastrointestinal sobre la permeabilidad y acumulación del Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	91
5.2.1. Influencia de L-Cys en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	91
5.2.2. Influencia del ácido taurocólico en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	91
5.2.3. Influencia de la matriz alimentaria en el transporte de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	92
6. Estudios de toxicidad de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg en monocapas epiteliales del intestino con distintos estadios de diferenciación .....	96
6.1. Identificación del estadio de diferenciación .....	96
6.2. Evaluación de viabilidad y tipo de muerte celular (apoptosis vs necrosis) .....	97
6.3. Evaluación de la actividad mitocondrial .....	97
6.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o nitrógeno (RNS) .....	98
6.5. Cuantificación de los niveles de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH) .....	99
6.6. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	100
6.7. Expresión génica de proteínas de estrés, factor de necrosis tumoral y proteínas de las uniones intercelulares .....	101
6.8. Evaluación del efecto de las formas mercuriales sobre la permeabilidad de las monocapas intestinales .....	103
6.9. Evaluación de la distribución del citoesqueleto y la morfología de las uniones estrechas .....	103
7. Estudios <i>in vivo</i> de acumulación y efectos sobre los transportadores del epitelio gastrointestinal de la exposición a Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	105
7.1. Tratamientos y recolección de muestras .....	105

7.2. Estudio de expresión proteica de transportadores en los distintos tramos gastrointestinales .....	105
8. Determinación de mercurio .....	108
9. Determinación de manganeso .....	109
10. Determinación de proteínas .....	110
11. Análisis estadístico .....	110

## **Resultados y discusión** ..... 111

### **Capítulo 1** *Caracterización in vitro del transporte y acumulación intestinal de especies mercuriales* ..... 113

<b>Resultados</b> .....	116
1. Evaluación previa de la viabilidad celular mediante la determinación de la actividad mitocondrial .....	116
2. Evaluación de la integridad de la monocapa celular Caco-2 en los ensayos de transporte .....	116
3. Transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg en células Caco-2 .....	117
3.1. Transporte y acumulación celular en dirección apical-basolateral (A-B) .....	117
3.2. Transporte y acumulación celular en dirección basolateral-apical (B-A) .....	120
3.3. Cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) y del ratio de eliminación ( $E_r$ ) .....	122
3.4. Efecto de la albúmina (BSA) en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	123
3.5. Estudio de la eliminación celular de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	124
4. Estudio de la naturaleza del transporte de las formas mercuriales .....	126
4.1. Estudio de los parámetros cinéticos .....	126
4.2. Estudio de la participación de la vía paracelular en el transporte de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	130
4.3. Participación de mecanismos dependientes de energía en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	131
4.3.1. Efecto de la temperatura sobre la permeabilidad .....	131

4.3.2. Efecto de la inhibición del metabolismo celular sobre la permeabilidad .....	132
4.4. Efecto de la concentración de H <sup>+</sup> en la permeabilidad y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	133
4.5. Influencia de los iones Na <sup>+</sup> en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	136
4.6. Efecto de la presencia de distintas formas de cisteína en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	138
4.7. Efecto de inhibidores o sustratos de determinados transportadores en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	140
4.8. Evaluación de la participación de un transporte pasivo en el paso transcelular de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	143
<b><i>Discusión</i></b> .....	145
Mecanismos de transporte intestinal de Hg(II) .....	146
Mecanismos de transporte intestinal de CH <sub>3</sub> Hg .....	152
<b><i>Conclusiones</i></b> .....	157
<b><i>Capítulo 2 Identificación de los transportadores implicados en el transporte intestinal de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg</i></b> .....	161
<b><i>Resultados</i></b> .....	164
1. Estudios de identificación de transportadores empleando la línea celular Caco-2 .....	164
1.1. Inhibición de transportadores mediante silenciamiento transitorio y su efecto sobre la acumulación celular de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	164
1.2. Inhibición de la expresión del transportador <i>DMT1</i> mediante el empleo de hepcidina y su efecto sobre la acumulación y el transporte de Hg(II) .....	167
2. Estudio de la participación del transportador <i>DMT1</i> en el transporte de Hg(II) empleando <i>S. cerevisiae</i> .....	169
3. Expresión relativa de los transportadores seleccionados en células expuestas a las formas mercuriales .....	172
3.1. Evaluación de la expresión diferencial en células tratadas con Hg(II) ...	172
3.2. Evaluación de la expresión diferencial en células tratadas con CH <sub>3</sub> Hg .....	173

3.3. Evaluación de la expresión diferencial en células tratadas con Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg en presencia de L-Cys .....	174
<b><i>Discusión</i></b> .....	176
<b><i>Conclusiones</i></b> .....	183
<b><i>Capítulo 3 Evaluación de la influencia del modelo in vitro de epitelio intestinal y los factores existentes en el lumen sobre la permeabilidad y acumulación del Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg</i></b> ...	185
<b><i>Resultados</i></b> .....	188
1. Integridad de la membrana y caracterización del co-cultivo Caco-2/HT29-MTX .....	188
2. Influencia del modelo celular sobre el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	189
2.1. Coeficiente de permeabilidad aparente de las especies mercuriales .....	189
2.2. Acumulación celular de las especies mercuriales .....	190
2.3. Evaluación de la retención celular de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg en el mucus secretado por las células HT29-MTX .....	191
3. Evaluación de la influencia de factores presentes en el tracto gastrointestinal sobre la permeabilidad y acumulación del Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	192
3.1. Influencia de la L-cisteína en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	192
3.2. Influencia del ácido taurocólico en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	193
3.3. Influencia de la matriz alimentaria en el transporte de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	195
<b><i>Discusión</i></b> .....	196
<b><i>Conclusiones</i></b> .....	201

**Capítulo 4** *Estudios de toxicidad de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en monocapas epiteliales del intestino con distintos estadios de diferenciación* ..... 203

**Resultados** ..... 206

1. Identificación de los estadios de diferenciación ..... 206

2. Evaluación de viabilidad y tipo de muerte celular (apoptosis vs necrosis) ..... 206

3. Evaluación de la actividad mitocondrial ..... 209

4. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o nitrógeno (NOS). ..... 211

5. Contenidos intracelulares de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH) ..... 214

6. Evaluación de la peroxidación lipídica ..... 216

7. Expresión diferencial de los genes que codifican para las proteínas de estrés térmico (*HSP*), metalotioneínas (*MT*) y factor de necrosis tumoral (*TNF $\alpha$* ) ..... 218

8. Evaluación de la permeabilidad de las monocapas celulares ..... 222

9. Expresión diferencial de los genes que codifican para las proteínas constituyentes de las uniones intercelulares (claudina 1, ocludina, zonula occludens 1 y molécula de adhesión intercelular 1) ..... 224

10. Evaluación de la distribución de la actina filamentosa (F-actina) y ZO1 mediante microscopia de fluorescencia ..... 226

**Discusión** ..... 228

**Conclusiones** ..... 234

**Capítulo 5** *Estudios in vivo de la acumulación y los efectos sobre los transportadores del epitelio gastrointestinal de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg* ..... 237

**Resultados** ..... 240

1. Evaluación de la acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en los distintos tramos del tracto gastrointestinal ..... 240

2. Estudio de expresión proteica de transportadores en los distintos tramos gastrointestinales ..... 241

2.1. Evaluación de los contenidos proteicos de los transportadores en el estómago ..... 241

2.2. Evaluación de los contenidos proteicos de los transportadores en el yeyuno ..... 245

2.3. Evaluación de los contenidos proteicos de los transportadores en el colon .....	249
<b><i>Discusión</i></b> .....	253
<b><i>Conclusiones</i></b> .....	261
<b><i>Conclusiones</i></b> .....	263
<b><i>Bibliografía</i></b> .....	269

## Índice de tablas

### Introducción

<b>Tabla 1.</b> Especies de mercurio mayoritarias en muestras biológicas y medioambientales .....	4
<b>Tabla 2.</b> Episodios de intoxicación por mercurio por consumo de cereales contaminados .....	14

### Metodología

<b>Tabla 1.</b> Condiciones empleadas en los ensayos de inhibición del transporte de Hg(II) .....	71
<b>Tabla 2.</b> Condiciones empleadas en los ensayos de inhibición del transporte de CH <sub>3</sub> Hg .....	71
<b>Tabla 3.</b> Secuencias y eficacias de los oligonucleótidos de los transportadores empleados en qPCR .....	76
<b>Tabla 4.</b> Secuencia de los ARN de interferencia empleados en los ensayos de silenciamiento .....	80
<b>Tabla 5.</b> Reactivos empleados en la retrotranscripción .....	82
<b>Tabla 6.</b> Reactivos empleados en qPCR .....	83
<b>Tabla 7.</b> Programa empleado para la reacción de qPCR .....	84
<b>Tabla 8.</b> Secuencias y eficacias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de proteínas de estrés, marcadores de diferenciación, factor de necrosis tumoral y proteínas de las uniones intercelulares .....	102
<b>Tabla 9.</b> Anticuerpos policlonales empleados en los estudios <i>in vivo</i> .....	107
<b>Tabla 10.</b> Condiciones experimentales empleadas en la cuantificación de mercurio mediante CV-AFS .....	108

### Capítulo 1

<b>Tabla 1.</b> Porcentaje de mercurio en el medio apical, basolateral y en el interior celular tras 2 horas de exposición de las células Caco-2 a Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg en dirección A-B .....	119
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de mercurio en el medio apical, basolateral y en el interior celular tras 2 horas de exposición de las células Caco-2 a 0.5 y 1 mg/L de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg en dirección B-A .....	122

<b>Tabla 3.</b> Coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app} \times 10^{-6}$ cm/s) y ratio de eliminación ( $E_r$ ) en células Caco-2 expuestas a Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg en dirección A-B y en dirección B-A (120 minutos, pH 7.2, 37 °C) .....	123
<b>Tabla 4.</b> Coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app} \times 10^{-6}$ cm/s) y porcentajes de acumulación celular en células Caco-2 expuestas a 1 mg/L de Hg(II) y 0.8 mg/L de CH <sub>3</sub> Hg con o sin tratamiento previo con azida sódica (5 mM) y 2-desoxiglucosa (50 mM) .....	133
<b>Tabla 5.</b> Coeficientes de permeabilidad aparente en dirección A-B ( $P_{app} \times 10^{-6}$ cm/s) tras 120 minutos de exposición a 1 mg/L de Hg(II) y 0.6 mg/L de CH <sub>3</sub> Hg en diferentes condiciones de pH apical/basal (7.2/7.2; 5.5/7.2) .....	134
<b>Tabla 6.</b> Efecto de inhibidores específicos o sustratos en el transporte de Hg(II) en células Caco-2 expuestas durante 60 minutos a 0.4 o 0.6 mg/L .....	141
<b>Tabla 7.</b> Efecto de inhibidores específicos o sustratos en el transporte de CH <sub>3</sub> Hg en células Caco-2 expuestas durante 60 minutos a 0.4 mg/L .....	142
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de flujo y coeficiente de permeabilidad a través de la membrana artificial ( $P_{am}$ ) del verapamilo, Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg tras 16 horas de exposición .....	144
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de transporte de CH <sub>3</sub> Hg al lado aceptor en membranas artificiales lipídicas (PAMPA) tras 16 horas de exposición a: 1) CH <sub>3</sub> Hg, 2) CH <sub>3</sub> Hg en presencia de concentraciones crecientes de L-Cys y 3) CH <sub>3</sub> Hg en presencia de cationes divalentes (Mn <sup>+2</sup> , Zn <sup>+2</sup> y Cu <sup>+2</sup> ) y distintas concentraciones de L-Cys .....	145

## *Capítulo 2*

<b>Tabla 1.</b> Contenido intracelular de mercurio en células Caco-2 transfectadas con siRNA y en células control expuestas durante 60 minutos a Hg(II) (1 mg/L), Hg(II)+L-Cys (1 mg/L+2.5 µM) y CH <sub>3</sub> Hg+L-Cys (1 mg/L+2.5 µM)...	166
<b>Tabla 2.</b> Expresión relativa del transportador <i>DMT1</i> en células Caco-2 diferenciadas tras el tratamiento con 200, 700 y 1200 nM de hepcidina durante 2 y 4 horas, en relación a células no tratadas .....	167

## *Capítulo 3*

<b>Tabla 1.</b> Coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app} \times 10^{-6}$ cm/s) de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg (0.8 mg/L) en monocapas Caco-2 y Caco-2/HT29-MTX (70/30, 50/50) .....	189
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de acumulación celular tras 120 minutos de exposición de monocultivos HT29-MTX a 0.8 mg/L de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg en condiciones normales y previa eliminación del mucus .....	191

**Tabla 3.** Porcentaje de mercurio en los distintos compartimentos (apical, celular y basolateral) de co-cultivos Caco-2/HT29-MTX (70/30) expuestos durante 120 minutos a 0.7 mg/L de Hg(II) o CH<sub>3</sub>Hg en presencia o ausencia de L-Cys (5 μM) . . . . . 192

**Tabla 4.** Contenido de mercurio en los distintos compartimentos (apical, celular y basolateral) de co-cultivos Caco-2/HT29-MTX (70/30) expuestos durante 60 minutos a la fracción bioaccesible de pez espada (n=3) y al patrón de CH<sub>3</sub>Hg preparado en blanco de digestión gastrointestinal (n=2) . . . . . 196

### Capítulo 4

**Tabla 1.** Porcentaje de viabilidad, necrosis y apoptosis de células Caco-2 diferenciadas y no diferenciadas expuestas a estaurosporina, Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 24 horas . . . . . 208

**Tabla 2.** Porcentaje de actividad mitocondrial de células Caco-2 diferenciadas (D) y no diferenciadas (ND) tratadas a distintos tiempos con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg, respecto a células control no tratadas . . . . . 210

**Tabla 3.** Concentraciones de GSH total (T-GSH, GSH + GSSG, μM/mg proteína), GSH (μM/mg proteína) y ratios GSSG/GSH en células Caco-2 diferenciadas y no diferenciadas tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 30 minutos . . . . . 215

**Tabla 4.** Expresión relativa de proteínas de choque térmico 27 (*HSP27*) y 90 (*HSP90*), metalotioneína 2A (*MT2A*), factor de necrosis tumoral α (*TNFα*) [ratio de expresión en escala logarítmica en base 2] en células Caco-2 diferenciadas tratadas con 0.5 y 1 mg/L de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 4, 6 y 24 horas . . . . . 220

**Tabla 5.** Expresión relativa de proteínas de choque térmico 27 (*HSP27*) y 90 (*HSP90*), metalotioneína 2A (*MT2A*), factor de necrosis tumoral α (*TNFα*) [ratio de expresión en escala logarítmica en base 2] en células Caco-2 indiferenciadas tratadas con 0.5 y 1 mg/L de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 4, 6 y 24 horas . . . . . 221

**Tabla 6.** Expresión relativa de proteínas constituyentes de las uniones intercelulares [claudina 1 (*CLDN1*), ocludina (*OCLN*), zonula occludens 1 (*ZO1*) y molécula de adhesión de intercelular 1 (*JAMI*)] (ratio de expresión en escala logarítmica en base 2) en células Caco-2 diferenciadas tratadas con 0.5 y 1 mg/L de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 4, 6 y 24 horas . . . . . 225

**Capítulo 5**

**Tabla 1.** Concentraciones de mercurio (mg/kg peso fresco) en tramos gastrointestinales de ratas control y ratas expuestas a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 4 días ..... 240

## Índice de figuras

### Introducción

<b>Figura 1.</b> Proporción de las emisiones antropogénicas mundiales de mercurio a la atmósfera procedentes de diversos sectores en 2005 .....	7
<b>Figura 2.</b> Emisiones de mercurio a la atmósfera en distintas regiones del mundo entre 1990 y 2005 .....	8
<b>Figura 3.</b> Ciclo biogeoquímico del mercurio .....	10
<b>Figura 4.</b> Estructura de la pared intestinal .....	32
<b>Figura 5.</b> Proceso de renovación del epitelio intestinal .....	34
<b>Figura 6.</b> Dominios de una célula epitelial polarizada .....	35
<b>Figura 7.</b> Uniones intercelulares en células del epitelio intestinal .....	37
<b>Figura 8.</b> Organización del sistema inmune intestinal .....	38
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de los distintos mecanismos de transporte celular .....	41

### Metodología

<b>Figura 1.</b> Representación gráfica del sistema Transwell® .....	59
<b>Figura 2.</b> Voltímetro Millicell®-ERS utilizado para la medición de la RET en el sistema Transwell® .....	59
<b>Figura 3.</b> Diseño de los ensayos de transporte, acumulación celular y permeabilidad en el sistema Transwell® .....	63
<b>Figura 4.</b> Representación gráfica del sistema PAMPA .....	72
<b>Figura 5.</b> Esquema del protocolo de digestión gastrointestinal .....	95

### Capítulo 1

<b>Figura 1.</b> Transporte en dirección A-B en función del tiempo en células Caco-2 expuestas a diferentes concentraciones de Hg(II) (0.1, 0.5 y 1 mg/L) (A) y CH <sub>3</sub> Hg (0.1, 0.5, 1 y 5 mg/L) (B) .....	118
<b>Figura 2.</b> Transporte en dirección B-A en función del tiempo en células Caco-2 expuestas a 0.5 y 1 mg/L de Hg(II) (A) y CH <sub>3</sub> Hg (B) . .....	121

<b>Figura 3.</b> Eliminación del mercurio durante 240 minutos hacia el compartimento apical (círculos negros) y hacia el compartimento basolateral (círculos blancos) desde células Caco-2 expuestas a 1 mg/L de Hg(II) (A) y 0.8 mg/L de CH <sub>3</sub> Hg (B) durante 60 minutos (pH 7.2, 37 °C) .....	125
<b>Figura 4.</b> Flujo de Hg(II) frente a la concentración en células Caco-2 (120 minutos, pH 7.2, 37 °C) en dirección A-B (A) y B-A (B) .....	128
<b>Figura 5.</b> Flujo de CH <sub>3</sub> Hg frente a la concentración en células Caco-2 (120 minutos, pH 7.2, 37 °C) en dirección A-B (A) y B-A (B) .....	129
<b>Figura 6.</b> Coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg (1 mg/L) en función de la temperatura en células Caco-2 expuestas durante 120 minutos .....	132
<b>Figura 7.</b> Porcentajes de mercurio en el lado apical, basolateral y el interior celular de células Caco-2 expuestas durante 120 minutos a 1 mg/L de Hg(II) y 0.6 mg/L de CH <sub>3</sub> Hg en diferentes condiciones de pH apical/basal (7.2/7.2; 5.5/7.2) .....	135
<b>Figura 8.</b> Porcentajes de mercurio en el compartimento apical, basolateral y el interior celular de células Caco-2 expuestas durante 120 minutos a 0.8 mg/L de Hg(II) (A) y 0.6 mg/L de CH <sub>3</sub> Hg (B) en presencia y ausencia de Na <sup>+</sup> en el medio apical .....	137
<b>Figura 9.</b> Porcentajes de mercurio en el compartimento apical, basolateral y en el interior celular de células Caco-2 expuestas durante 120 minutos a 2.5 μM de Hg(II) (A) y CH <sub>3</sub> Hg (B) con 5 μM de L-cisteína (L-Cys), DL-homocisteína (Hcys) o N-acetil-L-cisteína (NAC) .....	139
<b>Figura 10.</b> Posibles mecanismos de transporte intestinal de Hg(II) .....	159
<b>Figura 11.</b> Posibles mecanismos de transporte intestinal de CH <sub>3</sub> Hg .....	160

## Capítulo 2

<b>Figura 1.</b> Expresión relativa de transportadores en células Caco-2 silenciadas en relación a células no silenciadas [ratio de expresión en base logarítmica 2 (log <sub>2</sub> )] .....	165
<b>Figura 2.</b> Porcentajes de mercurio en el lado apical, basolateral y en el interior celular de células Caco-2 diferenciadas, con y sin tratamiento previo con 1200 nM de hepcidina (2 horas) y posterior exposición a 1 mg/L de Hg(II) (60 minutos) .....	168
<b>Figura 3.</b> Acumulación de manganeso y mercurio en la cepa mutante de levadura <i>smf1Δsmf2Δ</i> transformada con el vector p415GPD o expresando el transportador DMT1 (p415GPD-DMT1) .....	170

<b>Figura 4.</b> Acumulación de manganeso y mercurio en la cepa silvestre de levadura BY4741 transformada con el vector p415GPD o expresando el transportador DMT1 (p415GPD-DMT1) .....	171
<b>Figura 5.</b> Expresión relativa de transportadores [ratio de expresión en base logarítmica 2 ( $\log_2$ )] de células Caco-2 tratadas con Hg(II) (1 mg/L) . .....	173
<b>Figura 6.</b> Expresión relativa de transportadores [ratio de expresión en base logarítmica 2 ( $\log_2$ )] de células Caco-2 tratadas con CH <sub>3</sub> Hg (1 mg/L) .....	174
<b>Figura 7.</b> Expresión relativa de transportadores [ratio de expresión en base logarítmica 2 ( $\log_2$ )] de células Caco-2 expuestas durante 24 horas a Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg (1 mg/L) con 5 $\mu$ M de L-Cys .....	175
<b>Figura 8.</b> Transportadores implicados en el transporte intestinal de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg en el dominio apical de los enterocitos .....	184

### *Capítulo 3*

<b>Figura 1.</b> Contenido celular de mercurio en la monocapa Caco-2 y los cocultivos Caco-2/HT29-MTX (70/30 y 50/50) expuestos a 0.8 mg/L de CH <sub>3</sub> Hg o Hg(II) durante 120 minutos .....	190
<b>Figura 2.</b> Porcentaje de mercurio en los distintos compartimentos (apical, basolateral y celular) de las monocapas Caco-2 y Caco-2/HT29-MTX (70/30) expuestas a 0.7 mg/L de Hg(II) (A) o CH <sub>3</sub> Hg (B), en presencia o ausencia de ácido taurocólico (TC, 20 mM) .....	194
<b>Figura 3.</b> Efecto del mucus, el ácido taurocólico, la L-Cys y la matriz alimentaria sobre la absorción intestinal del Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	202

### *Capítulo 4*

<b>Figura 1.</b> Distribución de la población celular empleando la doble tinción (Anexina y 7-AAD) .....	207
<b>Figura 2.</b> Conversión de resazurina a resorufina .....	209
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de fluorescencia debido a la formación de diclorofluoresceína (DCF) en células Caco-2 diferenciadas (A) y no diferenciadas (B) expuestas a 2 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y a distintas concentraciones de Hg(II) (0.1, 0.5, 1 y 2 mg/L) .....	212

<b>Figura 4.</b> Porcentaje de fluorescencia debido a la formación de diclorofluoresceína (DCF) en células Caco-2 diferenciadas (A) y no diferenciadas (B) expuestas a 2 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y a distintas concentraciones de CH <sub>3</sub> Hg (0.1, 0.5, 1 y 2 mg/L) .....	213
<b>Figura 5.</b> Reacción del malondialdehído y el ácido tiobarbitúrico .....	216
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de equivalentes de malonaldehído (MDA) respecto al control en células Caco-2 diferenciadas (A) y no diferenciadas (B) expuestas durante 30 minutos a FeSO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.5 mM/2 mM) y distintas concentraciones (mg/L) de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	217
<b>Figura 7.</b> Valores de RET (Ohms × cm <sup>2</sup> ) en células Caco-2 diferenciadas tras distintos tiempos de exposición a lipopolisacárido (LPS 0.05 mg/L), Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg (0.5, 1 y 2 mg/L) .....	222
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de Lucifer yellow (LY) transportado al lado basolateral en células Caco-2 diferenciadas tras distintos tiempos de exposición a lipopolisacárido (LPS 0.05 mg/L), Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg (0.5, 1 y 2 mg/L) .....	223
<b>Figura 9.</b> Imágenes de la distribución en células Caco-2 de la F-actina tras tinción con TRITC-faloidina (A-C) y de la ZO1 tras inmunofluorescencia (D-F) .....	227
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de acción de Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg en células epiteliales del intestino .....	235

## *Capítulo 5*

<b>Figura 1.</b> Niveles proteicos de AQP3, 4, 6 y 8 en el estómago de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	242
<b>Figura 2.</b> Niveles proteicos de y <sup>+</sup> LAT1, LAT1 y LAT2 en el estómago de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	243
<b>Figura 3.</b> Niveles proteicos de OATP1/3 y DMT1 en el estómago de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	244
<b>Figura 4.</b> Niveles proteicos de AQP3, 4, 6, 7 y 8 en el yeyuno de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	246
<b>Figura 5.</b> Niveles proteicos de y <sup>+</sup> LAT1, LAT1 y LAT2 en el yeyuno de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	247
<b>Figura 6.</b> Niveles proteicos de OATP1/3 y DMT1 en el yeyuno de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	248
<b>Figura 7.</b> Niveles proteicos de AQP3, 4, 6, 7 y 8 en el colon de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH <sub>3</sub> Hg .....	250

**Figura 8.** Niveles proteicos de  $\gamma^+$ LAT1, LAT1 y LAT2 en el colon de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg ..... 251

**Figura 9.** Niveles proteicos de OATP1/3 y DMT1 en el colon de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg ..... 252

**Figura 10.** Efecto de la exposición a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en los niveles proteicos de transportadores del tracto gastrointestinal de ratas ..... 262

## *Abreviaturas*

**AA<sup>0</sup>**: aminoácidos neutros

**AA<sup>+</sup>**: aminoácidos catiónicos

**A-B**: apical-basolateral

**B-A**: basolateral-apical

**AJ**: uniones adherentes

**AQP**: acuaporinas

**ALPI**: fosfatasa alcalina intestinal

**b<sup>0,+</sup>**: sistema transportador de aminoácidos b<sup>0,+</sup>

**B<sup>0,+</sup>**: sistema transportador de aminoácidos B<sup>0,+</sup>

**BCH**: ácido aminobiciclo-(2,2,1)-heptano-2-carboxílico

**BSA**: albúmina de suero bovino

**CH<sub>3</sub>Hg**: metilmercurio

**CLDN1**: claudina 1

**CV-AFS**: espectrometría de fluorescencia atómica por vapor frío

**DAPI**: 4', 6-diamino-2-fenilindol

**DCF**: 2', 7'-diclorofluoresceína

**DCFH-DA**: 2', 7'-diacetato de diclorofluoresceína

**DCT1/DMT1**: transportador de cationes divalentes 1

**DMEM**: medio de Eagle modificado por Dulbecco

**DMEMc**: medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado para el mantenimiento de la línea celular Caco-2

**DMSO**: dimetilsulfóxido

**EDTA**: ácido etilendiamino tetraacético

**E<sub>r</sub>**: ratio de eliminación celular

**F-actina**: actina filamentosa

**FPN1**: ferroportina 1

**GPx**: glutatión peroxidasa

**GSH**: glutatión reducido

**GSSG**: glutatión oxidado

**HBSS**: solución salina balanceada de Hanks

**HBSS-HEPES:** solución salina balanceada de Hanks suplementada con 10 mM de HEPES

**HBSS-MES:** solución salina balanceada de Hanks suplementada con 20 mM de MES

**Hcys:** DL-homocisteína

**HEPES:** ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico

**Hg(II):** mercurio inorgánico divalente

**HSP:** proteínas de choque térmico

**HT-DMEMc:** medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado para el mantenimiento de la línea celular HT29-MTX

**JAM1:** molécula de adhesión intercelular 1

**K<sub>m</sub>:** constante de Michaelis-Menten

**LAT:** sistema transportador de aminoácidos L

**LBA:** medio Luria Bertani

**L-Cys:** L-cisteína

**LY:** Lucifer yellow

**LPS:** lipopolisacárido

**MDA:** malonaldehído

**MEM:** medio esencial mínimo con sales de Earle

**MES:** N-morfolino etanosulfónico

**Mn(II):** manganeso divalente

**MT:** metalotioneínas

**NAC:** N-acetil-L-cisteína

**Nramp:** proteína de resistencia natural asociada a macrófagos

**OATP/OAT:** polipéptido transportador de aniones orgánicos

**OCN:** ocludina

**PAMPA:** ensayo de permeabilidad en membranas artificiales en paralelo

**P<sub>am</sub>:** coeficiente de permeabilidad a través de la membrana artificial

**P<sub>app</sub>:** coeficiente de permeabilidad aparente

**PBS:** tampón fosfato salino

**PBS-CMF:** tampón fosfato salino libre de Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup>

- PMSF**: fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
**qPCR**: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa  
**RET**: resistencia eléctrica transepitelial  
**RN18S**: gen ribosomal 18S  
**RT**: retrotranscripción  
**ROS**: especies reactivas de oxígeno  
**RNS**: especies reactivas de nitrógeno  
**SC-leu**: medio selectivo sin leucina  
**SFB**: suero fetal bovino  
**siARN**: ácido ribonucleico de interferencia de pequeño tamaño  
**SMF**: familia de transportadores homólogos al transportador Nramp2 en humanos  
**SSA**: ácido 5-sulfosalicílico dihidratado  
**TBA**: ácido 2-tiobarbitúrico  
**TBARS**: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico  
**TC**: ácido taurocólico  
**T-GSH**: GSH total  
**TJ**: uniones estrechas  
**TNF $\alpha$** : factor de necrosis tumoral  
**TRITC**: isotiocianato de tetrametilrodamina  
**WB**: western blot  
**y<sup>+</sup>LAT**: sistema transportador de aminoácidos y<sup>+</sup>L  
**YPD**: extracto de levadura peptona dextrosa  
**ZO1**: proteína de la zonula occludens 1



## *Introducción*

---



## 1. Formas químicas de mercurio

El mercurio es un metal presente en el medioambiente por causas de origen natural o antropogénico. Experimenta complejas transformaciones en la atmósfera, el sistema terrestre y el acuático, donde puede encontrarse en tres formas químicas: mercurio elemental, mercurio inorgánico y mercurio orgánico.

El **mercurio elemental** o mercurio metálico [ $\text{Hg}^0$ ] es la única especie metálica líquida a temperatura y presión ambiental. Esta característica es la base del nombre y símbolo del mercurio (Hg) que deriva de la palabra griega hydrargyros (hydros: agua; argyros: plata). Los romanos llamaron al mercurio *Argentum Vivum*, que significa “plata líquida”. El mercurio elemental es muy volátil y es la forma de mercurio predominante en la atmósfera. Su solubilidad en agua es baja.

Los **compuestos inorgánicos** de mercurio presentan dos posibles estados de oxidación,  $\text{Hg}_2^{+2}$  [mercurio mercurioso, Hg(I)] y  $\text{Hg}^{+2}$  [mercurio mercúrico, Hg(II)]. Son más solubles en agua que el mercurio elemental. Presentan una alta afinidad por grupos inorgánicos y orgánicos, especialmente por los que contienen azufre. Las sales de mercurio inorgánico más habituales son  $\text{HgS}$ ,  $\text{HgO}$  y  $\text{HgCl}_2$  (JEFCA, 2011; EFSA, 2012).

En los **compuestos orgánicos** el átomo de mercurio está unido a uno o dos grupos alquil o aril, generando especies del tipo  $\text{RHgX}$  o  $\text{RHgR}'$  donde R y R' representan los grupos alquil o aril ( $\text{CH}_3-$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5-$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5-$ ) y X es un anión (haluro, nitrato, sulfato). Las principales especies son metilmercurio, dimetilmercurio, etilmercurio y fenilmercurio, siendo el metilmercurio la especie orgánica más abundante en el medioambiente (EFSA, 2012).

La tabla 1 muestra las especies de mercurio mayoritarias en muestras biológicas y medioambientales.

**Tabla 1.** Especies de mercurio mayoritarias en muestras biológicas y medioambientales (EFSA, 2012).

Mercurio elemental	Hg(0)	Hg <sup>0</sup>
Iones inorgánicos de mercurio	Ión mercurioso Hg(I)	Hg <sub>2</sub> <sup>+2</sup>
	Ión mercúrico Hg(II)	Hg <sup>+2</sup>
Especies orgánicas de mercurio	Metilmercurio	CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup>
	Dimetilmercurio	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Hg
	Etilmercurio	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> Hg <sup>+</sup>
	Fenilmercurio	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Hg <sup>+</sup>

## 2. Usos del mercurio

El ser humano obtiene mercurio a partir del cinabrio (HgS), principal mena de este elemento. Existen importantes depósitos de cinabrio en Rusia, Estados Unidos, Italia y España. Por calentamiento del mineral se genera vapor de mercurio y posteriormente mercurio metálico líquido, con múltiples aplicaciones en procesos industriales y en la fabricación de diversos productos. Su extenso empleo es debido a sus características especiales: metal en forma líquida a temperatura ambiente, buen conductor eléctrico, densidad y una tensión superficial elevadas, capacidad para expandirse o contraerse en respuesta a cambios de presión y temperatura (Del Cerro-Martín, 2012).

Entre los procesos industriales que utilizan mercurio destaca la producción de cloro y de sosa cáustica, la producción de cloruro de vinilo

monómero y la extracción de oro de minerales. El mercurio como componente se encuentra en espejos, termómetros, barómetros, baterías, interruptores eléctricos, lámparas, aparatos eléctricos y explosivos (EFSA, 2012).

El mercurio también ha sido empleado con fines medicinales. Entre sus aplicaciones destaca el uso como purgante, antihelmíntico y en el tratamiento de la sífilis, la fiebre amarilla y el tifus. Hasta la década de los setenta del siglo XX se utilizaron como diuréticos, compuestos orgánicos sintéticos con un 30-40% de mercurio en su formulación. Otros fármacos que presentan mercurio en su composición son las formulaciones oftalmológicas, óticas, descongestivos nasales, antihemorroidales, corticoides, antivirales, antimicóticos, antibióticos y ciertas vacunas distribuidas en viales multidosis. Las amalgamas dentales también pueden contener mercurio (45-55%) junto a plata (30%) y otros metales (cobre, zinc).

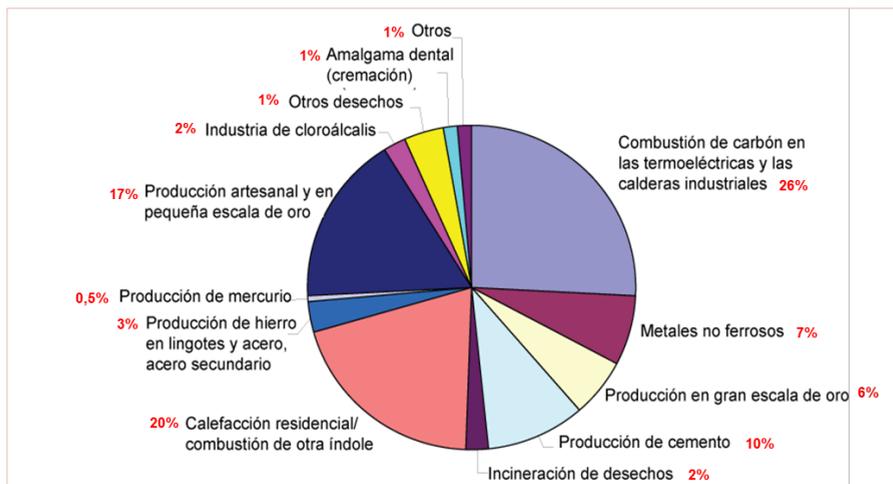
### **3. Fuentes de emisión de mercurio**

El mercurio no es un metal abundante en la corteza terrestre, donde su concentración media se estima en 80 µg/kg (OMS, 2003). El contenido en la atmósfera es muy superior; se cifra entre 5500 y 8900 toneladas consecuencia de emisiones naturales y antropogénicas (UNEP, 2013).

Las fuentes naturales más importantes de emisión de mercurio a la atmósfera son la desgasificación de la corteza terrestre, las emisiones volcánicas, la actividad geotermal, la evaporación desde el medio acuático y la disolución de los minerales de las rocas. Algunos modelos recientes sobre el flujo de mercurio en el medioambiente sugieren que las fuentes naturales

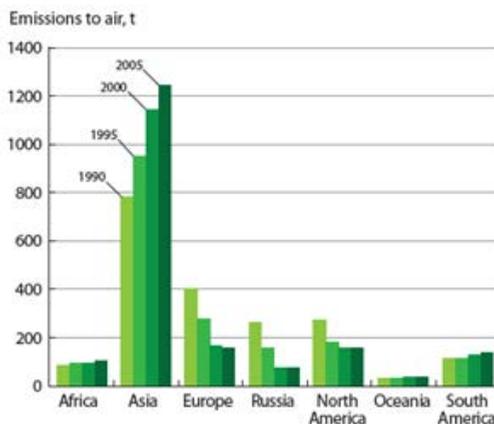
de origen geológico representan un 10% del mercurio que llega a la atmósfera desde reemisiones y nuevas emisiones (UNEP, 2013).

El porcentaje de las emisiones antropogénicas de mercurio es superior (30%) y se estima que en el año 2005 alcanzó las 1921 toneladas (UNEP 2013). Estas emisiones han sido diferenciadas en “no intencionales” e “intencionales”. En las emisiones “no intencionales” el mercurio es un subproducto del proceso productivo dada la presencia de este elemento en combustibles fósiles como el carbón y petróleo, y en otras materias primas. Los sectores productivos en los que se generan este tipo de emisiones son: refinado de petróleo crudo, combustión estacionaria de combustibles fósiles en las centrales eléctricas y en la calefacción residencial, producción de hierro en lingotes y acero, producción de metales no ferrosos, producción de cemento y producción de oro a gran escala (UNEP, 2010). Las emisiones “intencionales” están relacionados con los usos que el hombre ha dado a este elemento: la minería de oro artesanal y en pequeña escala, las liberaciones difusas que tienen lugar desde productos que contienen mercurio, los procesos de incineración de residuos, especialmente de origen médico como las amalgamas, manufactura y reparación de equipos eléctricos y científicos (UNEP, 2010). La figura 1 muestra la contribución de diversos sectores a las emisiones antropogénicas de mercurio a la atmósfera en el año 2005.



**Figura 1.** Proporción de las emisiones antropogénicas mundiales de mercurio a la atmósfera procedentes de diversos sectores en 2005 (UNEP, 2010).

Las fuentes antropogénicas de mercurio a la atmósfera se incrementaron drásticamente como consecuencia de la industrialización. A partir de 1990 estas emisiones han permanecido relativamente estables, si bien se ha producido un cambio en el origen geográfico de las mismas (figura 2, UNEP 2008). Entre 1990 y 2005 las emisiones aumentaron sustancialmente en Asia, y en mucha menor cuantía en África y América del Sur. Por el contrario en Europa y América del Norte disminuyeron.



**Figura 2.** Emisiones de mercurio a la atmósfera en distintas regiones del mundo entre 1990 y 2005 (UNEP, 2010).

Desde hace años, existe una preocupación creciente de los organismos reguladores por los niveles de mercurio en el medio ambiente y sus consecuencias para la salud humana. Como ejemplo, la Unión Europea elaboró en el año 2005 una estrategia destinada a reducir las cantidades de mercurio en la UE y en el mundo, su circulación y la exposición de las poblaciones a dicha sustancia (Comisión de las Comunidades Europeas, 2005). Entre los objetivos de esta medida se encontraban: reducir las emisiones de mercurio, restringir la oferta y la demanda de esta sustancia y gestionar las cantidades de mercurio ya almacenadas así como las presentes en los productos. La UE ha elaborado directivas limitando o reduciendo el uso de mercurio en productos (Directiva 2005/32/CE; Directiva 2006/66/CE) o procesos industriales (Directiva 2010/75/UE). Desde el 10 de abril de 2014 está prohibida la comercialización de tensiómetros, barómetros, higrómetros, manómetros, esfigmomanómetros y termómetros que contengan mercurio y estén destinados a usos profesionales e industriales (Reglamento 847/2012).

#### **4. Ciclo del mercurio**

El ciclo biogeoquímico del mercurio en el medioambiente se muestra en la figura 3. El mercurio elemental, muy volátil, pasa a la atmósfera donde presenta un tiempo de residencia de uno a dos años. Su oxidación a Hg(II) por reacción con oxidantes de la atmósfera como el oxígeno, el ozono y el cloro, permite su deposición en la corteza terrestre donde su tiempo de residencia varía entre horas y meses.

En los sedimentos el Hg(II) está sujeto a un amplio abanico de reacciones químicas y biológicas. Las condiciones de pH, temperatura y la composición del suelo favorecen la formación de compuestos inorgánicos de Hg(II). Aunque algunos de ellos son bastantes solubles, y en consecuencia móviles, suelen formar complejos con la materia orgánica (ácidos fúlvicos y húmicos) y con las arcillas de los suelos, lo que limita en gran medida la movilidad del mercurio en los suelos, haciendo que éstos actúen como grandes reservas de mercurio. La acción de la microbiota del suelo sobre el Hg(II) da lugar a una pequeña cantidad de metilmercurio cuya proporción media respecto al total de mercurio presente en suelos y sedimentos suele ser inferior al 1%.

Una parte del Hg(II) presente en el suelo llega a las cuencas hidrográficas. En el agua experimenta procesos de metilación por la acción de microorganismos, principalmente, bacterias anaerobias reductoras de sulfuro. Se generan compuestos orgánicos, entre ellos el dimetilmercurio volátil, que se recicla a la atmósfera, y el metilmercurio, que se bioacumula en el plancton y por tanto, puede ingresar en la cadena alimentaria. El metilmercurio se biomagnifica sobre todo en la cadena trófica marina. Por otra parte, el metal disuelto en el agua puede evaporarse y retornar a la atmósfera.

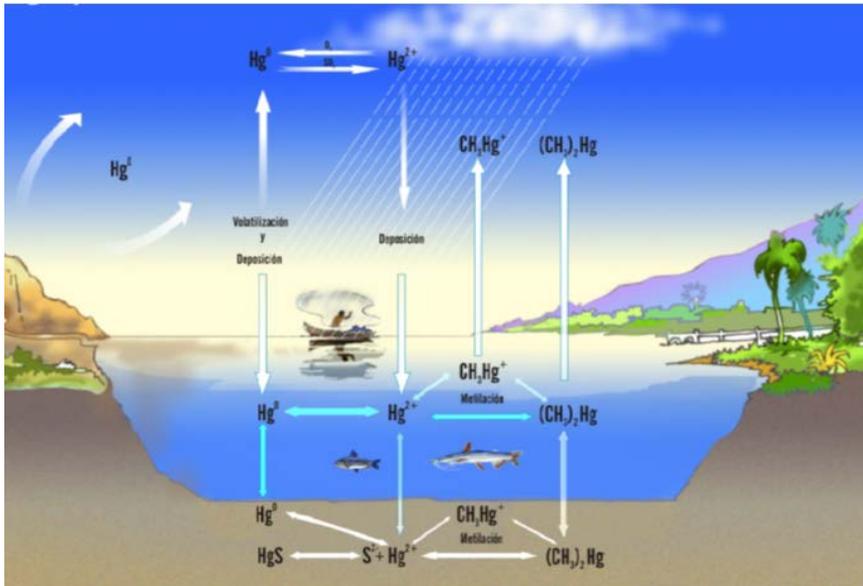


Figura 3. Ciclo biogeoquímico del mercurio.

## 5. Exposición humana a mercurio

El mercurio contamina aire, agua y alimentos, que constituyen las fuentes del tóxico para la población.

La mayor exposición al mercurio elemental se produce por vía aérea. El límite recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para mercurio en aire es de  $1 \mu g/m^3$  (OMS, 2000). La concentración en el aire varía mucho según sean zonas rurales ( $2-4 \text{ ng}/m^3$ ) o urbanas ( $10 \text{ ng}/m^3$ ) (OMS, 2000). Salvo en casos excepcionales no supera los  $50 \text{ ng}/m^3$ . Debe considerarse que una parte de la población puede estar expuesta a mercurio elemental a través de las amalgamas dentales.

Por lo que respecta al mercurio inorgánico, la exposición se produce principalmente a través del agua y de los alimentos. Se estima que la cantidad media de mercurio consumida a través del agua es de  $50 \text{ ng}/\text{día}$

(ATSDR, 1999). En aguas que están situadas en áreas no influenciadas por la industrialización, la concentración media es de 50 ng/L. En regiones próximas a minas de mercurio e industrializadas, se han reportado valores entre 400 y 700 ng/L. Un caso extremo es el de la bahía de Minamata (Japón), donde se detectaron entre 1600 y 3600 ng/L. La OMS recomienda un límite de 1 µg/L de mercurio total en agua destinada al consumo humano (OMS, 2004).

Los alimentos también pueden aportar mercurio inorgánico. Para la población europea, los grupos de alimentos “Pescados y otros productos de la pesca”, “Bebidas no alcohólicas” y “Misceláneos” son los que mayor contribución tienen a la ingesta de esta especie (EFSA, 2012). El reciente informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) indica que la ingesta media semanal de mercurio inorgánico a través de los alimentos puede llegar a alcanzar los 2.16 µg/kg peso corporal en la población adulta. El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) establece como valor de referencia para el mercurio inorgánico una ingesta semanal tolerable provisional (ISTP) que no debe superar los 4 µg/kg peso corporal (JECFA, 2011).

Las exposiciones a formas orgánicas de mercurio se deben básicamente a etilmercurio y metilmercurio. Las vacunas que contienen tiomersal como agente antiséptico constituyen la principal fuente de etilmercurio. Por lo que respecta a metilmercurio, la única fuente de exposición relevante es el consumo de productos de la pesca. La EFSA (2012) indica que la ingesta media de metilmercurio alcanza un máximo de 1.57 µg/kg peso corporal/semana en la población adulta. Este valor está próximo a la ISTP propuesta para metilmercurio por JECFA, 1.6 µg/kg peso corporal (JECFA, 2011). EFSA rebaja esta recomendación a 1.3 µg/kg peso corporal a la semana (EFSA, 2012), mientras que la Agencia de Protección

Medioambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA) establece una dosis de referencia para una exposición crónica oral a metilmercurio muy inferior (0.1 µg/kg peso corporal al día; U.S. EPA, 2001).

Tal y como se ha comentado, los alimentos constituyen la principal fuente de exposición a mercurio para la mayor parte de la población mundial. El contenido de mercurio es variable en función del grupo de alimentos considerados. En pescados y productos de la pesca las concentraciones oscilan entre 0.001 y 11.4 mg/kg. Los contenidos más elevados aparecen siempre en los grandes depredadores marinos como atún, bonito, pez espada y tiburón. Según indica el informe de la EFSA (2012), un 5% de los productos de la pesca superan 1 mg/kg, límite máximo de mercurio admitido por la legislación europea en estos alimentos. En el resto de alimentos los contenidos son bajos, oscilan entre 0.0001 y 0.050 mg/kg, siendo en la mayoría de las muestras analizadas los valores inferiores al límite de cuantificación de la metodología de análisis. Los valores más elevados se han descrito en setas (JEFCA, 2011).

La gran mayoría de los estudios aportan datos sobre mercurio total en los alimentos por lo que a día de hoy se carece de suficiente información sobre contenidos de especies de mercurio. Un claro ejemplo se cita en el informe de la EFSA; de los 59650 datos de mercurio recibidos de los países europeos, sólo un 1.8% aportaban concentraciones de metilmercurio y sólo en tres muestras se indicó la concentración de mercurio inorgánico (EFSA, 2012). La especiación es una labor que realizan muy pocos laboratorios de control alimentario. De hecho, las dos únicas recomendaciones del último informe de JEFCA sobre mercurio hacen referencia a este aspecto e indican que 1) debe incrementarse la información sobre mercurio inorgánico y metilmercurio en alimentos tal y como son consumidos y 2) deben validarse

métodos analíticos para la determinación de ambas especies de mercurio en distintas matrices alimentarias (JEFCA, 2011).

La especiación de mercurio varía según el alimento. Los estudios sobre metilmercurio en productos de la pesca son suficientes para evidenciar que es la especie mayoritaria (más del 80% del mercurio total). Los datos sobre su contenido en mercurio inorgánico son escasos e indican que representan menos del 10%. En el resto de alimentos se asume que el mercurio inorgánico es la especie más abundante (EFSA, 2012).

El riesgo que para la salud de la población supone la presencia de metilmercurio ha llevado a los organismos pertinentes a establecer distintas medidas. Entre ellas cabe destacar la limitación de la concentración de mercurio en alimentos, casi exclusivamente en productos de la pesca, y las recomendaciones de consumo de determinadas especies de pescado a grupos de población vulnerables. En España, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, Nutrición y Consumo (AECOSAN) recomienda evitar el consumo de pez espada, tiburón, atún rojo y lucio a mujeres en edad fértil, embarazadas o en periodo de lactancia y a niños menores de 3 años. Asimismo, recomienda limitar a 50 g/semana el consumo de estos productos pesqueros en niños de 3 a 12 años (AECOSAN, 2011).

En el siglo pasado se produjeron episodios de intoxicación por presencia de altas concentraciones de mercurio en alimentos. La intoxicación evidenciada en Minamata (Japón) en el año 1956, consecuencia de una elevada exposición a metilmercurio a través del consumo de productos de la pesca, ha sido la que ha afectado a mayor número de personas y es uno de los episodios que más conocimientos ha aportado sobre la toxicidad del metilmercurio (Grandjean *et al.*, 2010). El origen de la contaminación fue el mercurio vertido a la bahía de Minamata por una planta de acetaldehído. La

empresa vertió entre 1932 y 1968 cerca de 27 toneladas de residuos de mercurio a los que pudieron estar expuestas cerca de 200000 personas. Hasta el 2001 se habían diagnosticado 2265 afectados.

El consumo de cereales contaminados con especies de mercurio utilizadas como fungicidas, ha sido también causa de numerosas intoxicaciones (tabla 2; Grandjean *et al.*, 2010). La intoxicación ocurrida en Irak en 1971 es, tras el episodio de Minamata, la que afectó a un mayor número de personas. La población consumió cereales importados de EEUU y México que habían sido tratados con metilmercurio y que no deberían haber sido destinados a consumo humano.

**Tabla 2.** Episodios de intoxicación por mercurio por consumo de cereales contaminados.

<b>Contaminante</b>	<b>Alimento</b>	<b>País</b>	<b>Enfermos</b>	<b>Muertos</b>	<b>Año</b>
Etilmercurio	Trigo	Irak	200	70	1955
Etilmercurio	Trigo	Irak	1000	200	1959
Etilfenilmercurio	Trigo	Pakistán	100	9	1961
Metilmercurio	Trigo	Guatemala	45	20	1966
Etilmercurio	Maíz	Ghana	144	20	1967
Metilmercurio	Trigo	Irak	6530	459	1971

## 6. Toxicocinética

Tal y como se ha comentado previamente, las formas químicas de mercurio que ingresan vía oral son principalmente mercurio inorgánico y metilmercurio, aunque puede existir una exposición oral accidental a la forma elemental de este metal. Los procesos que experimenta el mercurio desde su ingreso en el organismo hasta su eliminación dependen de la forma química en la que se encuentre, de la dosis, de factores propios del individuo (edad, sexo, masa corporal, estado nutricional y enfermedades preexistentes, entre otros) y de los componentes de la dieta.

### 6.1. Absorción

La absorción del mercurio elemental en forma de vapor a través del pulmón es muy rápida, sin embargo se absorbe en cantidades muy reducidas en el tracto gastrointestinal (0.01%, U.S. EPA, 1997a). Respecto al mercurio inorgánico, ensayos en animales y humanos indican que su absorción es variable, con ratios que oscilan entre un 1 y un 38% (Rahola *et al.*, 1973; Kostial *et al.*, 1979, 1983; Piotrowski *et al.*, 1992; Endo *et al.*, 2003) y que dependen del grado de solubilidad en el agua de la sal de mercurio utilizada (JEFCA, 2011). Así, los haluros, sulfatos y nitratos de mercurio, con solubilidades altas, presentan absorciones moderadas mientras que el sulfuro de mercurio (HgS) es poco soluble y, por tanto, su absorción es mínima (JEFCA, 2011). A diferencia de lo observado para las formas inorgánicas, para el metilmercurio se describen tasas de absorción superiores al 80% (EFSA, 2012). Su absorción es rápida, observándose picos en plasma dentro de las primeras 6 horas (Aberg *et al.*, 1969).

## 6.2. Distribución

El mercurio elemental, una vez absorbido, se distribuye con facilidad por el organismo y es capaz de atravesar las barreras hematoencefálica y placentaria (Clarkson *et al.*, 2007). Su distribución se encuentra limitada principalmente por la oxidación a Hg(II), puesto que esta forma tiene una movilidad mucho más reducida (Clarkson, 1989; Rooney, 2007).

El Hg(II) absorbido se distribuye en sangre a partes iguales entre el plasma y los eritrocitos (Clarkson *et al.*, 2007). En los eritrocitos se une probablemente a los residuos cisteinil de la hemoglobina y en el plasma se acumula en las distintas fracciones proteicas (EFSA, 2012). Debido a su baja lipofilia, su paso a través de la barrera placentaria y hematoencefálica es limitado (Clarkson *et al.*, 2007). El riñón y en concreto el túbulo contorneado proximal, es el órgano que presenta una mayor acumulación de la forma inorgánica de mercurio (Zalups, 2000). También se han descrito concentraciones elevadas de mercurio en la zona periportal del hígado, la mucosa del tracto intestinal, el epitelio de la piel, las células intersticiales de los testículos y el plexo coroideo de animales expuestos a mercurio mercurio (EFSA, 2012).

En cuanto al metilmercurio, tras su absorción pasa a sangre donde se acumula preferentemente en los eritrocitos. La fracción de metilmercurio unida a las células rojas de la sangre depende de la especie. Así, en humanos la relación eritrocitos/plasma es de aproximadamente 20 (Clarkson *et al.*, 2007), en ratones y monos es de 10, mientras que en ratas es de alrededor de 300 (EFSA, 2012). En el plasma, la mayoría del metilmercurio está unido a la albúmina, que tiene un grupo sulfhidrilo libre en un residuo cisteinil terminal (Yasutake *et al.*, 1990). Por complejos mecanismos de intercambio de ligando, el metilmercurio se transfiere de las proteínas del plasma a

grupos tiol de bajo peso molecular como el glutatión y la cisteína (Quig, 1998). El metilmercurio es capaz de atravesar el folículo piloso, la placenta y la barrera hematoencefálica, permitiendo su acumulación en el cabello, el feto y el cerebro (Clarkson y Magos, 2006). Al igual que ocurre con las otras formas de mercurio, las concentraciones más elevadas tras la exposición a metilmercurio se encuentran en riñón e hígado (NRC, 2000).

### 6.3. Metabolismo

El metabolismo de las especies de mercurio es similar en humanos y en animales de laboratorio. La biotransformación que experimenta el mercurio inorgánico se limita prácticamente a las reacciones de conjugación con grupos sulfhidrilo (JEFCA, 2011). En estudios con ratones se ha evidenciado que una pequeña cantidad del mercurio inorgánico puede ser reducido a mercurio elemental y eliminado como vapor de mercurio (EFSA, 2012). En contraste, el mercurio elemental puede ser rápidamente oxidado por la hidrógeno peroxidasa y catalasa a Hg(II) (JEFCA, 2011). No hay evidencias de la formación de especies metiladas a partir de formas inorgánicas o elementales de mercurio en tejidos animales o humanos.

Por el contrario, el metilmercurio experimenta cambios en su forma química. Se ha puesto de manifiesto que es desmetilado en mamíferos a Hg(II) en presencia de especies reactivas de oxígeno. Suda y Hirayama (1992) proponen que esta reacción puede estar catalizada por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)-citocromo P450 reductasa. Este proceso metabólico se ha descrito en el hígado, tracto intestinal, bazo, y en menor medida en células fagocíticas y en el cerebro (EFSA, 2012). De hecho, el mercurio inorgánico presente en el cerebro es generalmente el resultado de la desalquilación *in situ* de las especies orgánicas de mercurio

(Rodrigues *et al.*, 2010) y de la oxidación del mercurio elemental (Clarkson, 1989; Rooney, 2007).

#### 6.4. Excreción

La mayoría del mercurio se excreta vía fecal y urinaria. La magnitud de estas vías de excreción depende principalmente de la dosis ingerida y de la especie química. La eliminación también ocurre a través de las glándulas sudoríparas, mamarias y lagrimales, aunque en menor proporción.

La eliminación del mercurio elemental depende de su oxidación a Hg(II). La vida media de esta forma mercurial es de 58-64 días (U.S. EPA, 1997a). Aproximadamente el 80% del mercurio acumulado tras exposición a la forma elemental se elimina como mercurio inorgánico, por tanto su patrón de eliminación es similar al de la forma inorgánica.

La vida media biológica del mercurio inorgánico en humanos es de aproximadamente 40 días (Kolev y Bates, 2005). Debido a su baja absorción intestinal se elimina principalmente a través de las heces (JEFCA, 2011). Estudios en voluntarios han puesto de manifiesto que tras la ingesta de mercurio inorgánico, aproximadamente el 85% se excreta a través de las heces en los primeros días (Miettinen, 1973). En cuanto al Hg(II) absorbido, se excreta principalmente por orina aunque también existe una cierta eliminación vía biliar en forma de complejos con el glutatión (U.S. EPA, 1997b).

La vida media biológica de metilmercurio en humanos es de 70-80 días (Aberg *et al.*, 1969; Miettinen *et al.*, 1971). Aproximadamente el 80-90% de la dosis absorbida es eliminada a través de las heces en forma de mercurio inorgánico (U.S. EPA, 1997b; NRC, 2000). La eliminación urinaria es

relativamente baja pero aumenta gradualmente con el tiempo, pudiendo llegar a representar un porcentaje importante de la excreción diaria total (20% tras 100 días, U.S. EPA, 2001). La eliminación vía biliar juega un papel muy importante en el proceso de excreción del metilmercurio absorbido. En el hígado, el metilmercurio se conjuga con moléculas de glutatión, al igual que ocurre con la forma inorgánica. Esta reacción está catalizada por la S-glutatión transferasa (Ballatori y Clarkson, 1985) y en esa forma es eliminado por vía biliar. Parte del metilmercurio eliminado por esta vía es excretado a través de las heces y parte puede ser nuevamente reabsorbido. En este punto entra en juego la microbiota intestinal, la cual puede desmetilar el metilmercurio a mercurio inorgánico (Rowland *et al.*, 1980), facilitando de esta forma su eliminación fecal definitiva, debido a la baja tasa de absorción de la forma inorgánica.

Adicionalmente, el metilmercurio atraviesa la glándula mamaria y se excreta en la leche materna (Hong *et al.*, 2012), pudiendo llegar al niño durante la lactancia. En la leche materna el metilmercurio representa del 26 al 63% del mercurio total (Miklavcic *et al.*, 2011). Se ha puesto de manifiesto que la vida media de esta especie orgánica en mujeres en periodo de lactancia es mucho más corta que en el resto de mujeres (Hong *et al.*, 2012).

#### 6.5. Factores dietéticos que pueden afectar la toxicocinética del mercurio

La absorción, distribución y eliminación de las formas de mercurio está fuertemente influenciada por componentes alimentarios como el selenio, moléculas que contienen grupos sulfhidrilo y ligandos orgánicos como la fibra dietética. En ratas se ha demostrado que los grupos tiol son un factor importante en la distribución y eliminación de mercurio inorgánico (Zalups y

Lash, 2006). Los conjugados de mercurio con glutatión son parte del mecanismo de captación de mercurio inorgánico por el sistema renal (Bridges y Zalups, 2005) y los complejos que sufren la eliminación vía biliar. Zalups y Ahmad (2005a) evidenciaron que los conjugados de metilmercurio y mercurio inorgánico con N-acetilcisteína son especies de mercurio potencialmente transportables *in vivo* por las células epiteliales del túbulo proximal.

Otro factor dietético importante en la toxicocinética del mercurio es el selenio. Este elemento forma en el plasma un complejo con el mercurio inorgánico, el cual se une a la selenoproteína-P (Sasakura y Suzuki, 1998; Gailer *et al.*, 2000), previniendo la captación del mercurio por los órganos diana (Yamamoto, 1985). La fibra dietética también afecta la absorción de las formas mercuriales. Se ha demostrado que algunos tipos de fibra reducen el contenido de mercurio en el cerebro, la sangre y el intestino tras exposición de ratones a metilmercurio y además favorecen su excreción (Rowland *et al.*, 1986). Se cree que este incremento de la eliminación de metilmercurio en presencia de fibra insoluble puede deberse a la disminución de la recirculación enterohepática de la forma mercurial (Rooney, 2007).

Otros estudios han evidenciado la influencia de algunos alimentos en la toxicocinética del mercurio. Así se ha descrito que la leche puede afectar la retención del mercurio inorgánico en el intestino (Kostial *et al.*, 1979). Por otra parte, un estudio en ratas que consumían ajo en su dieta junto con 4 mg/L de CH<sub>3</sub>HgCl en el agua de bebida durante 12 semanas, evidenció una reducción de 6.7% en la acumulación del mercurio en el hígado, riñones, huesos y testículos (Cha, 1987).

## **7. Efectos de la exposición a las distintas formas de mercurio**

La toxicidad del mercurio depende de la forma química en la que se encuentre, la dosis, la edad, la duración de la exposición, la vía de exposición y los hábitos dietéticos (OMS, 2008). Aunque se han descrito afecciones en diversos órganos y sobre distintos sistemas, los efectos más reportados para el metilmercurio se producen a nivel neurológico y a nivel renal para el mercurio inorgánico.

### 7.1. Efectos en exposiciones agudas o de corta duración

Las personas que inhalan altas concentraciones de vapores de mercurio metálico presentan un cuadro clínico inicial parecido a una gripe. El paciente puede presentar manifestaciones respiratorias graves que pueden evolucionar a neumonitis y fibrosis intersticial residual, incluso al desarrollo de una insuficiencia respiratoria crónica (Hamilton y Hardy, 1949; Friberg y Nordberg, 1972; Seaton y Bishop, 1978; Berlin, 1979). Además hay afección del sistema nervioso central (Magos y Clarkson, 2006).

En cuanto al mercurio inorgánico, la dosis letal oral media ( $LD_{50}$ ) en ratas dosificadas con  $HgCl$  varía entre 26 y 80 mg/kg de peso corporal (ATSDR, 1999). En humanos se ha estimado una dosis letal de 10–42 mg mercurio/kg para un adulto de 70 kg de peso (IPCS, 2003). La ingestión de  $HgCl$  produce dolores abdominales intensos que pueden acompañarse de vómitos, ardor en la boca, dolor de garganta, náuseas y erosiones esofágicas. Todos estos síntomas están vinculados al carácter corrosivo de esta especie. Frecuentemente los pacientes presentan toxicidad renal, que puede manifestarse como una necrosis tubular aguda que llega a degenerar en una insuficiencia renal aguda (McLauchlan, 1991; Magos y Clarkson, 2006).

Este cuadro de insuficiencia renal puede producir la muerte en un periodo comprendido entre 8 y 12 días.

La exposición oral aguda a metilmercurio afecta al sistema nervioso central y los síntomas consisten en un efecto sobre el nervio sensor y motor, conduciendo a una ataxia generalizada, defectos en la vista, con restricción concéntrica del campo visual y, en los casos más graves, ceguera, sordera, somnolencia y coma (Skerfving y Vostal, 1972). También se ha descrito la afectación del sistema nervioso periférico (Skerfving y Copplestone, 1976). La LD<sub>50</sub> oral en ratas varía dependiendo de la edad, siendo de 25 mg/kg peso corporal para ratas adultas (450 g de peso) y 40 mg/kg peso corporal para ratas jóvenes (200 g de peso) (Lin *et al.*, 1975). En las crías de roedores se han descrito alteraciones sensoriales y motoras, déficit cognitivos y depresión tras exposición prenatal/perinatal (Onishchenko *et al.*, 2012). También existen evidencias de cambios degenerativos en el cerebelo (U.S. EPA, 1997a, 1997b).

## 7.2. Efectos en exposiciones de media y larga duración

### 7.2.1. Efectos carcinogénicos

Se han llevado a cabo distintos estudios para evaluar el carácter cancerígeno del mercurio elemental en humanos expuestos laboralmente (IARC, 1993). Estos estudios se han considerado no concluyentes debido a la falta de datos adecuados de exposición y a la no inclusión en el análisis de factores de confusión. Por esta razón, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado a esta forma de mercurio dentro del grupo 3, no cancerígeno para el hombre (IARC, 1993).

En cuanto al mercurio inorgánico, un estudio de exposición crónica en ratas y ratones dosificados con HgCl (2.5-10 mg/kg) durante 102-103 días con una frecuencia de 5 días por semana, mostró un incremento de tumores de tiroides y preestómago en ratas y de tumores renales en ratones (NTP, 1993). Teniendo en cuenta este estudio, la U.S. EPA ha clasificado al cloruro de mercurio como posible cancerígeno (grupo C; U.S. EPA; 1999a); sin embargo, la IARC lo incluye en la misma categoría que el mercurio elemental (IARC, 1993), ya que considera que el estudio no es representativo debido a la elevada mortalidad y a las características de los tumores.

Finalmente, el metilmercurio está clasificado por la IARC (1993) y la U.S. EPA (1999b) como posible cancerígeno para el hombre. No existen estudios epidemiológicos que asocien la exposición a metilmercurio con la prevalencia de procesos cancerígenos. En animales, se han observado tumores renales en ratones macho expuestos a CH<sub>3</sub>HgCl (30 mg/L) durante 78 semanas (Mitsumori *et al.*, 1981). Estos autores en un estudio posterior realizado durante 2 años, empleando concentraciones inferiores (0.4, 2 y 10 mg/L), evidencian nuevamente una mayor incidencia de adenomas y/o carcinomas renales en ratones macho expuestos a 10 mg/L (Mitsumori *et al.*, 1990).

### *7.2.2. Efectos sobre el sistema nervioso y el desarrollo*

El metilmercurio es un potente neurotóxico y afecta también al desarrollo fetal. Este efecto se puso de manifiesto por primera vez en los casos de intoxicación por consumo de pescado contaminado que tuvieron lugar en Minamata. Los signos clínicos más comunes entre la población adulta fueron parestesia, ataxia, temblores, pérdidas auditivas y dificultad al andar. El

examen del cerebro de los individuos fallecidos evidenció atrofia, lesiones en el córtex cerebral y cerebelar y cambios en las fibras nerviosas (Harada, 1995). Este desastre afectó de forma muy destacable a la población infantil y a los niños nacidos de madres afectadas. Los recién nacidos presentaban malformaciones, retrasos en el desarrollo físico y trastornos a corto y largo plazo del sistema nervioso central. Se reportaron distintas afecciones neurales tales como parálisis, retraso mental, ataxia cerebelosa, disartria y reducción del campo visual entre otros (Harada, 1995). El otro gran desastre que confirmó el efecto neurotóxico del metilmercurio durante el desarrollo fue el que se produjo en Irak a principios de 1970. La población infantil expuesta *in utero* desarrolló un cuadro neurotóxico con defectos sensoriales severos como ceguera o sordera, reflejos hiperactivos, parálisis cerebral y retraso mental (Amin-Zaki *et al.*, 1974).

Además de estas exposiciones a concentraciones elevadas, se realizaron tres grandes estudios epidemiológicos prospectivos en las Islas Seychelles, Nueva Zelanda y las Islas Faroe para evaluar el desarrollo en la infancia y la neurotoxicidad en relación con la exposición fetal a metilmercurio en poblaciones consumidoras de pescado. No se reportaron efectos adversos en el estudio de las Islas Seychelles, pero los niños de las Islas Faroe mostraron déficits sutiles de la memoria, la atención y el lenguaje a los 7 años de edad. En el estudio prospectivo de Nueva Zelanda, los niños de 4 a 6 años también exhibieron deficiencias en una serie de pruebas neuropsicológicas (U.S. EPA, 2001). En un artículo reciente de Grandjean y Heltz (2011) se discuten estos estudios y se indica que hay demasiadas incertidumbres en los mismos como para confirmar la relación directa entre la exposición prenatal a metilmercurio a través de los alimentos y la prevalencia de estas patologías en la población infantil.

Aunque la forma orgánica es un mayor neurotóxico, también se han descrito efectos sobre el sistema nervioso de la forma inorgánica y la elemental en animales de laboratorio (IPCS, 2003). Además para el mercurio elemental se ha evidenciado que la exposición *in utero* por inhalación afecta al sistema nervioso central. La exposición de ratas durante la gestación produce en la descendencia afecciones del comportamiento instintivo y del aprendido, con manifestaciones tales como hiperactividad, déficit del aprendizaje espacial y del comportamiento adaptado (Fredriksson *et al.*, 1992, 1996).

### 7.2.3. Efectos sobre el sistema renal

El efecto nefrotóxico del mercurio elemental y los compuestos inorgánicos se manifiesta por daño en el glomérulo y en los túbulos renales (JEFCA, 2011), con degeneración o necrosis de los túbulos (OMS, 2003; EFSA, 2012). Tanto en clínica humana como en patología experimental, la nefrotoxicidad por exposición a mercurio presenta variaciones individuales de sensibilidad, probablemente secundaria a las variaciones en la eliminación de mercurio, así como el estado anterior de las funciones renales. Parecen también existir variaciones de sensibilidad según el sexo (NTP, 1993).

Para el mercurio elemental se indica un nivel mínimo sin efectos adversos observables (LOAEL) de 0.86 mg/m<sup>3</sup> (ICPS, 2003). En ratas expuestas a vapor de mercurio (33 mg/m<sup>3</sup>) durante 12-42 semanas se han observado cambios degenerativos en el epitelio tubular del riñón con depósitos en las células tubulares (Kishi *et al.*, 1978).

La exposición a mercurio inorgánico conlleva importantes afecciones renales. Exposiciones a HgCl a medio y largo plazo en roedores producen

incrementos del peso de los riñones (Jonker *et al.*, 1993; NTP, 1993) debido a una vacuolización del epitelio tubular (NTP, 1993). Los estudios a largo plazo (2 años, dosificaciones 5 días/semana, concentraciones entre 0.3-5 mg/kg peso corporal/día) en ratas muestran una alta incidencia de nefropatías que cursan con regeneración tubular, engrosamiento de la membrana basal del túbulo y túbulos dilatados con cilindros hialinos (NTP, 1993). Tal y como se ha comentado en el apartado 7.2.1, en roedores expuestos crónicamente a mercurio inorgánico se ha puesto de manifiesto una tendencia al incremento de tumores malignos en el túbulo renal que se incrementa con la dosis.

En humanos, la exposición crónica a mercurio inorgánico da lugar a disfunciones renales que pueden manifestarse de distintas formas, desde proteinurias asintomáticas hasta oligonurias o anurias y síndromes nefríticos. Holmes *et al.* (2009) indican que los cambios en la función renal son detectables a concentraciones urinarias de mercurio mayores a 5 µg/g creatinina.

También se han reportado para el metilmercurio efectos sobre el sistema renal en roedores expuestos durante tiempos prolongados. Así, ratas macho expuestas 26 días a concentraciones de 0.25 mg/kg/día mostraron afecciones renales severas (U.S. EPA, 2001). En ratones expuestos durante 103 días a 10 mg/L de metilmercurio se evidenció un aumento de la incidencia de tumores sólidos renales (Mitsumori *et al.*, 1990). Estos efectos renales observados en animales no se han puesto de manifiesto en humanos (JEFCA, 2000).

#### *7.2.4. Inmunotoxicidad*

En los últimos años se ha prestado una mayor atención a los efectos del mercurio sobre el sistema inmunitario ya que la inducción de glomerulonefritis autoinmune está caracterizada por depósitos de inmunoglobulinas y complementos. El mecanismo de la inducción es aún desconocido, aunque las tendencias actuales sugieren que se debe a un aumento de la función de las células T-ayudantes y/o a la supresión de células T-supresoras. Existe unanimidad en la afirmación de que el sistema inmunitario es la primera diana y posteriormente aparecen los efectos sobre el sistema renal (Español Cano, 2006).

La exposición a vapor de mercurio durante 10 semanas de ratones susceptibles evidenció una estimulación general del sistema inmune con hiperinmunoglobulemia y afección glomerular, acompañada de depósitos de complejos inmunoglobulina G (Warfvinge *et al.*, 1995). La exposición a las formas inorgánicas de mercurio también produce una respuesta autoinmune en ratones susceptibles expuestos a 10 mg/kg peso corporal durante 10 semanas a través del agua de bebida. Sin embargo, esta respuesta no se observa en ratones normales (Nielsen y Hultman, 2002). También la exposición a metilmercurio (350 mg mercurio/kg/día) genera una respuesta autoinmune en ratones genéticamente susceptibles, si bien es de menor magnitud (Hultman y Hansson-Georgiadis, 1999). A diferencia de lo observado en las formas inorgánicas, el metilmercurio no genera depósitos de complejos inmunes a nivel sistémico, posiblemente por una menor activación del sistema inmune.

Además de los efectos de estimulación inmune, también se ha demostrado que las formas mercuriales tiene efectos inmunosupresores (Havarinasab y Hultman, 2005). Exposiciones de animales de

experimentación a mercurio inorgánico y metilmercurio pueden conllevar una reducción de distintos tipos celulares del sistema inmunitario y una reducción en la respuesta inmune.

#### *7.2.5. Efectos sobre el sistema digestivo*

Tal y como se ha comentado anteriormente, la ingestión de cantidades elevadas de las formas mercuriales de forma aguda produce efectos a nivel gastrointestinal debido al carácter corrosivo del mercurio. Sin embargo, no son muy conocidos los efectos sobre este sistema en exposiciones a medio o largo plazo. El hallazgo más significativo es la denominada “estomatitis mercurial” cuyo principal síntoma es la sialorrea, a menudo acompañada de hipertrofia de las glándulas salivares. Posteriormente aparece gingivitis y ulceraciones en la mucosa bucal (Español Cano, 2006).

Se han reportado procesos inflamatorios y necrosis a nivel gástrico en ratones expuestos a mercurio inorgánico (59 mg mercurio/kg peso corporal/día, 5 días/semana) durante 2 semanas (NTP, 1993). En un estudio de exposición crónica llevado a cabo en ratas, el 12–14% de los machos expuestos a 1.9 o 3.7 mg mercurio/peso corporal/día presentaron procesos inflamatorios en el ciego y un incremento significativo de la incidencia de hiperplasia en el estómago (NTP, 1993). Los estudios epidemiológicos realizados en poblaciones expuestas de forma continuada a través de los alimentos, no evalúan efectos a nivel gastrointestinal.

## **8. Mecanismos moleculares y celulares de toxicidad de las formas mercuriales**

Los mecanismos moleculares implicados en la toxicidad del mercurio inorgánico y el metilmercurio están muy relacionados con su alta afinidad por moléculas que presentan grupos tiol (proteínas o péptidos). Por otro lado, algunos estudios apuntan a que el mercurio puede afectar la expresión de numerosos genes relacionados con el control y regulación del ciclo celular, factores de transcripción, componentes de la maquinaria de reparación del ADN y determinadas rutas de señalización entre otros muchos (Ayensu y Tchounwou, 2006). El efecto sobre la expresión génica y su elevada capacidad para interactuar con los grupos tiol de numerosas moléculas pueden ser la base molecular de los procesos celulares implicados en la toxicidad del mercurio, tales como la inducción de estrés oxidativo, afección de la homeostasis del calcio y de la biosíntesis de grupos hemo, modificaciones del citoesqueleto, perturbaciones a nivel de membrana y alteraciones de la respuesta inmune.

Los resultados de varios estudios sugieren que uno de los principales mecanismos celulares involucrados en la toxicidad de las formas inorgánicas y orgánicas de mercurio es la inducción de estrés oxidativo. La alta afinidad de los iones de mercurio por los grupos tiol puede conllevar a la reducción del contenido intracelular de glutatión (Zalups y Lash, 1997; Gatti *et al.*, 2004). Esto puede provocar directamente un desbalance redox o predisponer a las células al mismo. De hecho, los estudios sobre neurotoxicidad del metilmercurio, indican que el mecanismo principal relacionado con este efecto tóxico es la alteración de la homeostasis redox celular por un aumento del nivel de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Mori *et al.*, 2007; Chuu *et al.*, 2008; Pieper *et al.*, 2014). El mecanismo subyacente implicado parece estar relacionado con alteraciones en las funciones mitocondriales

(Garrecht y Austin, 2011), lo que resulta en un aumento del anión superóxido y de los niveles de peróxido de hidrógeno y posteriormente de los radicales hidroxilo.

Por otra parte, el mercurio puede unirse a residuos de cisteína de determinados enzimas responsable del mantenimiento del estado redox intracelular. De hecho, la actividad de varias enzimas antioxidantes parece disminuir notablemente después de la exposición a formas mercuriales. Así, se ha reportado que la administración de HgCl a ratas reduce de forma muy acentuada la actividad de la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión disulfuro reductasa en la corteza renal (Gstraunthaler *et al.*, 1983), un tejido diana de la acción tóxica del mercurio inorgánico. Este mismo efecto se observa a nivel cerebral en ratones expuestos a metilmercurio (Vicente *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 2009). El aumento de los niveles de las especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno podrían dar lugar a la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y el daño oxidativo del ADN observado en exposiciones a formas mercuriales (Farina *et al.*, 2011a). Esto se ha evidenciado en ratas alimentadas oralmente con CH<sub>3</sub>HgCl y HgCl (Huang *et al.*, 2011).

También se ha descrito que el CH<sub>3</sub>HgCl y el HgCl pueden alterar la homeostasis intracelular del Ca<sup>+2</sup>, aumentando los niveles intracelulares de este elemento (Denny y Atchison, 1996; Limke *et al.*, 2004). Según Tan *et al.* (1993), el modo en que el metilmercurio y el mercurio inorgánico incrementan estos niveles es diferente. Así, la forma orgánica favorece la entrada de Ca<sup>+2</sup> extracelular y también moviliza el Ca<sup>+2</sup> intracelular presente en el retículo endoplasmático y la mitocondria, mientras que el mercurio inorgánico sólo aumenta la entrada de Ca<sup>+2</sup> desde el espacio extracelular. Un aumento de los niveles celulares de Ca<sup>+2</sup> puede conducir a la activación de enzimas de degradación, la alteración de la función mitocondrial y un

aumento en el daño inducido por los radicales libres (Aschner *et al.*, 2010; Farina *et al.*, 2011a, 2011b).

Otro mecanismo de toxicidad descrito es el efecto de las especies de mercurio sobre el citoesqueleto. Miura *et al.* (1984) demostraron que el mercurio inorgánico y el metilmercurio inhiben la polimerización de la tubulina *in vitro*. También se ha puesto de manifiesto un efecto sobre la red microtubular en distintos tipos celulares. Vogel *et al.* (1985) sugieren que el metilmercurio inhibe el ensamblaje de microtúbulos por unión a los grupos sulfhidrilo libres en los extremos y la superficie de los microtúbulos. De hecho, la adición de un quelante parece promover el reensamblaje de los microtúbulos en las células expuestas a esta forma mercurial (Sager y Syversen, 1984), presumiblemente por eliminación de los iones de metilmercurio de los grupos sulfhidrilo críticos. Este efecto sobre el citoesqueleto perturba numerosos procesos celulares, incluyendo la supervivencia celular, la proliferación, migración y diferenciación (Johansson *et al.*, 2007).

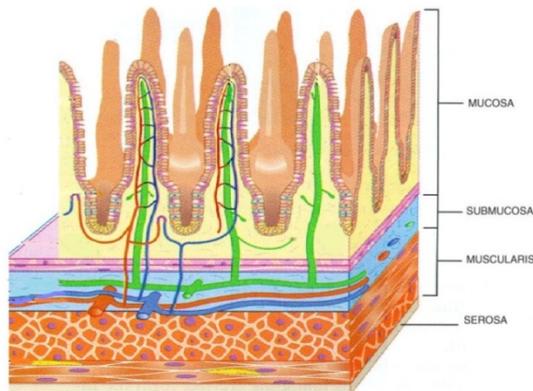
Los mecanismos de toxicidad relacionados con la genotoxicidad producida por las especies de mercurio (Crespo-López *et al.*, 2009) han sido relacionados con el estrés oxidativo, la alteración de los microtúbulos, así como la afección de las vías de reparación y replicación del ADN (Christie *et al.*, 1986; Cebulska-Wasilewska *et al.*, 2005). Además se ha puesto de manifiesto que el mercurio, especialmente como  $\text{CH}_3\text{HgCl}$ , se une covalentemente a los nitrógenos endocíclicos y exocíclicos de las bases de ADN (Li *et al.*, 2006).

Los mecanismos moleculares y celulares de toxicidad del mercurio son un tema en continuo estudio, sin embargo siguen existiendo incógnitas que dilucidar. Debido a que los principales sistemas diana de este elemento son

el sistema nervioso y el renal, un gran número de estudios se han centrado en determinar los mecanismos de toxicidad que desarrollan patologías en estos sistemas. Sin embargo, los estudios a nivel de sistema digestivo, primera barrera fisiológica con la que entra en contacto cualquier contaminante vehiculado con los alimentos, son muy escasos.

## **9. Estructura y función de la pared intestinal**

El intestino es una estructura tubular que se extiende desde el píloro gástrico hasta el ano, localizada en la cavidad abdominal y rodeada de peritoneo. Se subdivide en dos partes bien definidas, el intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y el intestino grueso (ciego, colon y recto). La pared del intestino está compuesta por distintas capas, mucosa, serosa y muscular, esta última formada a su vez por 2 capas de fibras musculares lisas (submucosa y *muscularis mucosae*) (figura 4). La mucosa, capa externa, es la principal responsable de las diferentes funciones del intestino (digestión, absorción y defensa).

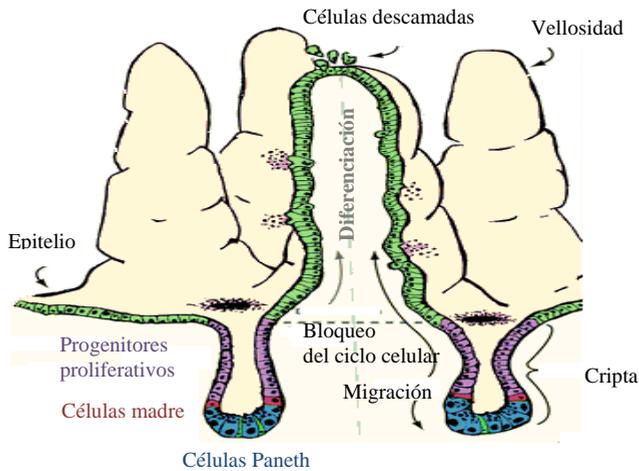


**Figura 4.** Estructura de la pared intestinal.

### 9.1. Estructura de la mucosa intestinal

La mucosa intestinal está formada por un epitelio de una sola capa al cual recubre un tejido conjuntivo denominado lámina propia. La capacidad de absorción de la mucosa está incrementada por diferentes rasgos estructurales que permiten multiplicar la superficie luminal hasta 600 veces (Riverón, 1999). Estos rasgos estructurales son los pliegues de Kerking, de los que parten las villis o vellosidades intestinales, evaginaciones de la capa mucosa hacia el lumen. Cada vellosidad intestinal está recubierta por una capa de células epiteliales columnares o enterocitos en cuyo borde apical se encuentran las microvilli. Cada enterocito contiene alrededor de 1700 microvilli y a su conjunto se le denomina borde en cepillo o superficie microvellosa. Entre las vellosidades se encuentran las criptas de Lieberkühn, invaginaciones tubulares donde se sitúan las células madre que dan lugar a la mayoría de tipos celulares que componen el intestino (Porter *et al.*, 2002).

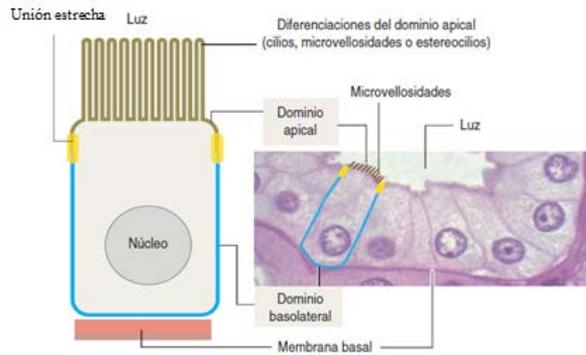
En las criptas de Lieberkühn se lleva a cabo un proceso dinámico que posibilita la renovación del epitelio intestinal (figura 5). La cripta origina una población de células progenitoras que se dividen y diferencian conforme migran hacia el lumen intestinal. Tras alcanzar la región apical de la vellosidad, las células se descaman y son eliminadas al lumen (Sancho *et al.*, 2003). Las células progenitoras en su migración se diferencian a enterocitos, células caliciformes o enteroendocrinas, mientras que las células de Paneth se diferencian en la base de la cripta (Sancho *et al.*, 2003).



**Figura 5.** Proceso de renovación del epitelio intestinal.

## 9.2. Tipos celulares en el epitelio intestinal

Los enterocitos son células cilíndricas y constituyen el primer tipo celular en orden de abundancia en el epitelio intestinal (70-90%, Mahler *et al.*, 2009). Son células polarizadas, presentan un dominio apical en contacto con el lumen intestinal y un dominio basal conectado con la lámina propia y la circulación sanguínea (figura 6). La membrana apical del enterocito que forma el borde en cepillo contiene enzimas (glicosidasas, peptidasas y lipasa) y transportadores esenciales para la digestión y absorción de nutrientes.



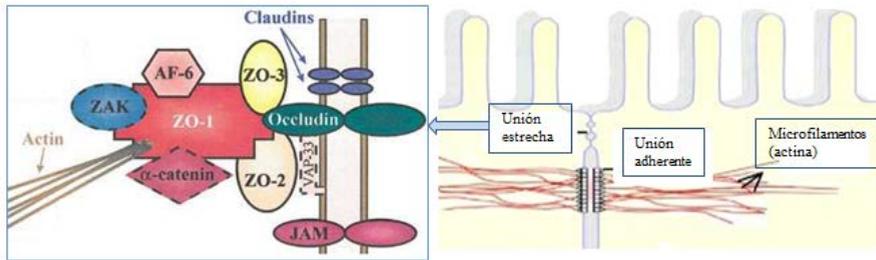
**Figura 6.** Dominios de una célula epitelial polarizada.

El segundo tipo celular son las células caliciformes, cuyo ratio varía de un 10% en el intestino delgado hasta un 24% en el colon distal (Forstner y Forstner, 1994). La morfología de estas células está determinada por la distensión de la teca que contiene los gránulos de mucina situados por debajo de la membrana apical. Las capas intestinales de mucus secretadas por las células caliciformes son un gel viscoso compacto constituido principalmente por la mucina MUC2, que proporciona la primera línea de defensa contra los agentes endógenos y exógenos (Kim y Ho, 2010). Esta capa mucosa tiene un grosor de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  (Mahler *et al.*, 2009) y también se considera un componente activo en los procesos de absorción y digestión.

Además de los tipos celulares mayoritarios, se han descritos otros tipos celulares con una función secretora. Las células de Paneth, son células granuladas que secretan péptidos y enzimas antimicrobianas, por lo que se consideran células especializadas en la defensa de la mucosa intestinal. También existen células enteroendocrinas que producen y secretan diferentes hormonas de manera endocrina o paracrina.

La polaridad de los enterocitos y las células caliciformes se mantiene gracias a las uniones estrechas. Estas impiden la libre difusión de proteínas y lípidos entre los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática. Las uniones estrechas forman parte de las uniones intercelulares, una compleja red proteica que permite el contacto entre células adyacentes y entre una célula y la matriz extracelular. Las uniones intercelulares se clasifican en tres grupos funcionales: oclusivas, de anclaje y comunicantes (Alberts, 2010). Las uniones oclusivas implican un sellado entre células epiteliales al formar una capa continua que restringe la permeabilidad. Las uniones de anclaje fijan las células entre sí y con la matriz extracelular, contribuyendo a la formación y mantenimiento tisular. Finalmente, las uniones comunicantes forman poros entre células permitiendo el acoplamiento y facilitando la comunicación intercelular. Las uniones estrechas están compuestas principalmente por uniones oclusivas y de anclaje.

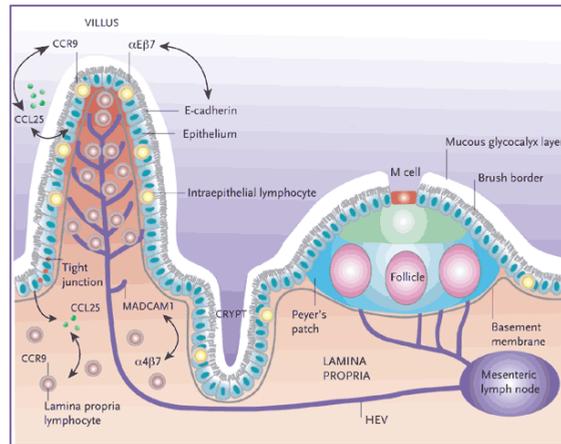
Se han descrito numerosas proteínas integrantes de las uniones estrechas (figura 7) (González-Mariscal *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2006; Anderson y Van Itallie, 2009), que además de tener un papel en la polaridad intervienen en numerosos procesos de señalización, regulación transcripcional, ciclo celular, tráfico vesicular y regulación paracelular (Anderson y Van Itallie, 2009). Entre las proteínas de las uniones estrechas hay proteínas transmembrana [claudinas, ocludinas y moléculas de adhesión intercelular (JAM)] que conectan las membranas de las células adyacentes formando un estrecho sellado (*kissing points*). Estas proteínas transmembrana se unen a proteínas periféricas que son las que permiten su organización, su unión al citoesqueleto y la iniciación de la señalización celular. Entre las proteínas periféricas de membrana hay que destacar las proteínas de la zona ocludens (ZO1, ZO2 y ZO3) y la cingulina (Shin *et al.*, 2006).



**Figura 7.** Uniones intercelulares en células del epitelio intestinal.

### 9.3. Tejido linfoide asociado al intestino (GALT)

El GALT está constituido por folículos linfoides (acumulación de linfocitos) que se localizan a lo largo del tubo intestinal. Es el órgano linfoide más grande del cuerpo humano, con un 70% de los inmunocitos corporales (Corr *et al.*, 2008). Está formado por una red de folículos linfoides dispersos o agregados (parches de Peyer en el intestino delgado) que se disponen por debajo del epitelio intestinal, en la lámina propia y la submucosa. Los folículos son áreas ricas en células B, además poseen células dendríticas, macrófagos y linfocitos T (Cesta, 2006; Corr *et al.*, 2008). Estos folículos están recubiertos por el epitelio asociado a los folículos, constituido por enterocitos y células M (Corr *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2010). Además de los folículos, también forman parte del GALT, los linfocitos interepiteliales (IEL), linfocitos T CD8<sup>+</sup> que se encuentran en el epitelio intestinal intercalados entre las células epiteliales y que son muy abundantes (1 IEL por cada 4-6 células epiteliales, Cesta *et al.*, 2006). Una propiedad única de los IEL es que pueden reconocer a los antígenos de forma directa, sin procesamiento previo, y son capaces de responder con la secreción de citoquinas como el IFN- $\gamma$  (Guy-Grand *et al.*, 1998).



**Figura 8.** Organización del sistema inmune intestinal (Cheroutre y Madakamutil, 2004).

Además del sistema GALT, se ha puesto de manifiesto que las células epiteliales también juegan un papel importante en la modulación inmune del intestino (Shen y Turner, 2006). Se ha evidenciado que existe una red interactiva entre los enterocitos y las células del sistema GALT que mantiene el balance y modula la respuesta inmune (Van de Walle *et al.*, 2010). Las células epiteliales regulan la permeabilidad y además son capaces de sintetizar y secretar mediadores de inflamación, los cuales pueden alcanzar las células del sistema GALT y favorecer el inicio de la respuesta inmune. Por otro lado, las células epiteliales pueden responder a mediadores secretados por las células inmunes, y modular la permeabilidad de la monocapa epitelial y su secreción, atenuando o amplificando de esta forma la respuesta inmune.

#### 9.4. Absorción y vías de transporte

La pared del intestino delgado representa la primera barrera fisiológica para la absorción de las sustancias ingeridas. Cualquier compuesto, antes de llegar al torrente sanguíneo debe difundir a través de la capa de mucus, las células epiteliales que recubren el intestino, la lámina propia y las células endoteliales. Se ha evidenciado que la capa de células epiteliales es la limitante en la velocidad y el paso de los compuestos a la circulación sistémica (Mahler *et al.*, 2009). La unidad funcional absorbente del intestino es la vellosidad intestinal recubierta por la capa epitelial de enterocitos.

Existen diferentes mecanismos de transporte a través del epitelio intestinal, que pueden clasificarse en tres grandes grupos, transporte pasivo (difusión simple o facilitada), transporte activo (primario o secundario) y endocitosis (pinocitosis o fagocitosis) (figura 9). El transporte pasivo se produce por difusión y se caracteriza por realizarse a favor de gradiente de concentración y sin consumo de energía. Este puede transcurrir a través de la membrana de las células epiteliales (transporte transcelular) o a través de los espacios intercelulares (transporte paracelular) (Cano-Cebrian *et al.*, 2005). La vía paracelular es importante para sustancias de pequeño tamaño e hidrofílicas, sin embargo, representa un porcentaje muy bajo de la absorción pasiva ya que la superficie ocupada por los espacios intercelulares es muy pequeña comparado con la extensa superficie ocupada por las células (Artursson *et al.*, 2001).

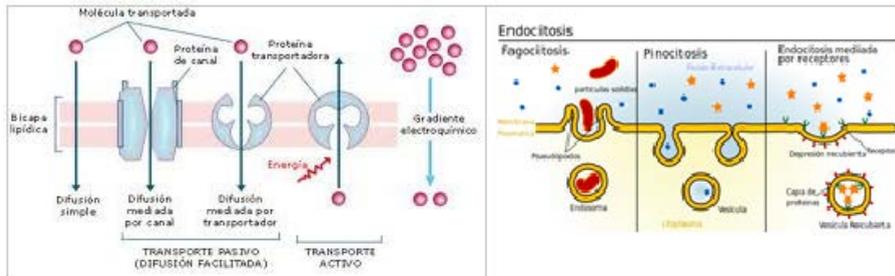
La difusión a través de la bicapa lipídica consiste en un reparto de las moléculas entre el fluido luminal en el que se encuentran disueltas (fase acuosa) y la bicapa lipídica de la membrana (fase orgánica), de tal modo que las moléculas se desplazan desde la zona donde se encuentran más concentradas hacia el espacio donde la concentración es menor. Este

mecanismo de absorción depende de las propiedades físico-químicas de la sustancia, en especial de su constante de disociación ( $pK_a$ ), que define el grado de ionización de una sustancia para cada pH, y de su coeficiente de partición de Nernst que se correlaciona con su grado de liposolubilidad. La difusión facilitada se diferencia de la simple en que en la primera participan proteínas transmembrana o portadores (canales iónicos o permeasas). Estos portadores presentan una gran especificidad en su unión a los sustratos ya que reconocen grupos funcionales de los mismos.

El transporte activo se caracteriza por realizarse en contra de gradiente electroquímico, por lo que requiere aporte de energía. Cuando la energía es aportada por una reacción exergónica, como la hidrólisis de ATP, se denomina transporte activo primario. Por el contrario, en el transporte activo secundario la energía procede del co-transporte de otra sustancia a favor de gradiente electroquímico. Al igual que en el transporte por difusión facilitada, en los sistemas de transporte activo las proteínas transportadoras con un número finito de sitios de unión a ligando poseerán cinética saturable (Meunier *et al.*, 1995) y serán susceptibles de inhibición competitiva.

Cuando se transportan macromoléculas o partículas de un determinado tamaño el mecanismo principal de transporte es la endocitosis. En este proceso la sustancia a transportar se rodea progresivamente por una pequeña porción de la membrana plasmática, que primero se invagina y luego se estrangula formando una vesícula intracelular que contiene el material ingerido. Según el tamaño de las vesículas formadas se distinguen dos tipos de endocitosis: la pinocitosis que supone la ingestión de líquidos y/o solutos mediante pequeñas vesículas, y la fagocitosis que implica la ingestión de grandes partículas, tales como los microorganismos o residuos celulares, mediante grandes vesículas o vacuolas.

Los procesos de difusión pasiva a nivel intestinal se consideran mayoritarios en los procesos de absorción, sin embargo, la coexistencia de otros mecanismos y la complejidad del proceso de absorción de los compuestos tiene cada vez más relevancia (Sugano *et al.*, 2010).



**Figura 9.** Representación esquemática de los distintos mecanismos de transporte celular.

### 9.5. Función barrera intestinal

Además de su función absorbiva, el epitelio intestinal constituye la mayor y más importante barrera corporal. La capa de la mucosa actúa como una barrera de permeabilidad selectiva, que permite el paso de nutrientes, electrolitos y agua, y a su vez mantiene una defensa efectiva contra las toxinas, antígenos lumenales y la flora entérica (Groschwitz y Hogan, 2009). Esta función barrera, tal y como se ha comentado anteriormente, se mantiene principalmente por las uniones estrechas que sellan los espacios intercelulares de forma selectiva. También es una pieza importante en el mantenimiento de la integridad y la función barrera del tejido linfoide asociado al intestino. El paso paracelular de antígenos en condiciones fisiológicas está controlado por el sistema GALT, el cual previene el paso de antígenos dañinos a la circulación sistémica e induce la tolerancia a los

antígenos luminales mediante un proceso en el que interviene la secreción de inmunoglobulina A y la actividad de las células T-reguladoras. El balance entre la respuesta inmune y la tolerancia es necesario, ya que una respuesta inmune inapropiada puede causar procesos inflamatorios.

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han puesto de manifiesto que la permeabilidad intestinal está regulada por múltiples factores, tales como factores exógenos, apoptosis epitelial, citoquinas, células inmunes y componentes dietarios (Groschwitz y Hogan, 2009; Suzuki, 2013). La pérdida o déficit de la función barrera se considera un determinante crítico en la predisposición a presentar procesos inflamatorios a nivel intestinal, tales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y las alergias alimentarias, incluso en desórdenes funcionales del intestino como el síndrome del intestino irritable (Camilleri *et al.*, 2012).

### **10. Modelos *in vitro* de epitelio intestinal**

Para evaluar los procesos de absorción y los mecanismos de toxicidad intestinal de una sustancia se pueden emplear aproximaciones *in vivo* e *in vitro*. Dentro de las aproximaciones *in vitro*, las líneas celulares derivadas de cánceres colorrectales han proporcionado una herramienta muy útil para el estudio de la absorción de fármacos y nutrientes y de los efectos tóxicos de numerosos compuestos. El empleo de cultivos celulares conlleva una serie de ventajas; son métodos menos costosos y laboriosos, minimizan el tiempo de experimentación y son fáciles de manipular. Las tres líneas celulares mejor caracterizadas son Caco-2, HT29 y T84.

Las células Caco-2 fueron establecidas por Fogh *et al.* (1977) a partir de un adenocarcinoma de colon humano. En cultivo se diferencian espontáneamente una vez han alcanzado la confluencia, formando un

monoestrato celular polarizado con muchas de las características morfológicas y funcionales de los enterocitos humanos maduros. Las monocapas formadas presentan uniones estrechas intercelulares, domas, microvilli en el lado apical y además expresan transportadores propios de la membrana del borde en cepillo (Pinto *et al.*, 1983; Hidalgo *et al.*, 1989; Meunier *et al.*, 1995; Yamashita *et al.*, 2000; Hilgendorf *et al.*, 2007; Maubon *et al.*, 2007). Durante su diferenciación expresan progresivamente distintas actividades hidrolasas, como la sucrosa isomaltasa, lactasa, aminopeptidasa, dipeptidilpeptidasa IV y fosfatasa alcalina intestinal, también típicas de los enterocitos del intestino delgado (Pinto *et al.*, 1983; Sambruy *et al.*, 2001). Contrariamente, las propiedades eléctricas, la conductividad iónica y la permeabilidad de estas monocapas diferenciadas son más características de las células de la cripta del colon (Grasset *et al.*, 1984). Se ha llegado a la conclusión tras el estudio fenotípico y genotípico de esta línea celular que debido a su origen tumoral no representan un único citotipo. Por ese motivo exhibe características típicas del intestino delgado adulto, del colon adulto y del colon fetal (Harris *et al.*, 1992).

En 1990, la línea celular Caco-2 se introdujo como herramienta experimental para estudios sobre los mecanismos de transporte intestinal, y un año más tarde se sugirió que el modelo era adecuado para la evaluación de la permeabilidad intestinal de fármacos y para la predicción de la absorción oral de los mismos (Tavelin, 2003). Distintas investigaciones han puesto de manifiesto que los valores de permeabilidad aparente obtenidos para una determinada sustancia empleando células Caco-2 pueden correlacionarse con la magnitud de la absorción en humanos (Artursson y Karlsson, 1991; Stewart *et al.*, 1995; Yee, 1997), aunque esto depende en parte de la naturaleza del compuesto a estudiar. La principal desventaja de esta línea celular radica en el tamaño de poro de las uniones intercelulares

(4-5 Å), similar al presente en el tramo colónico, pero inferior al presente en el intestino delgado humano (8-13 Å) (Tavelin, 2003), lugar donde se produce la mayor parte de la absorción. Por ese motivo la permeabilidad obtenida con células Caco-2 en cultivo es baja para sustancias que presenten un importante transporte paracelular. Esto conlleva a que la predicción de su absorción *in vivo* no sea la adecuada y se subestime la magnitud de la misma.

Otra gran limitación del monocultivo Caco-2 es la elevada expresión de la glicoproteína P (Shah *et al.*, 2006), proteína secretora localizada en la membrana apical (Thiebaut *et al.*, 1987), respecto a la observada en enterocitos humanos. Este hecho supone que los sustratos de esta proteína se eliminen de forma muy acentuada y por tanto que la permeabilidad de estos compuestos sea menor. En estos casos también se subestimaría la cantidad de compuesto que se absorbe *in vivo*. Aun teniendo en cuenta estas limitaciones y el hecho de tratarse de células de origen tumorigénico, hasta ahora la línea celular Caco-2 se ha evidenciado como el mejor modelo celular para estudios de absorción intestinal y toxicidad de xenobióticos (Sambury *et al.*, 2001).

La línea celular HT29 fue establecida en 1975 (Fogh y Trempe, 1975). A nivel morfológico, los cultivos de esta línea celular son heterogéneos y contienen subpoblaciones de células con diversa capacidad de diferenciación. En condiciones estándar de cultivo la mayoría de la población es indiferenciada y sólo el 5-10% desarrolla un fenotipo mucosecretor (Lesuffleur *et al.*, 1990). Bajo condiciones de estrés celular, como, por ejemplo, la eliminación de glucosa o de suero fetal, o el tratamiento con metotrexato (MTX) o 5-fluorouracilo, se pueden aislar poblaciones que desarrollan fenotipos diferenciados más homogéneos. Así, el tratamiento prolongado de HT29 con  $10^{-7}$  M de MTX permitió la

selección de una población con capacidad de diferenciación hacia un fenotipo mucosecretor, a la cual se le llamó HT29-M6 o HT29-MTX (Lesuffleur *et al.*, 1990). Estas células forman una monocapa homogénea de células caliciformes polarizadas con un núcleo basal, numerosas vacuolas de mucus acumuladas en el citoplasma de la región apical y algunas microvellosidades apicales que no llegan a formar un borde en cepillo maduro (Lesuffleur *et al.*, 1993). El clon HT29-MTX a diferencia de las HT29 parentales sintetiza principalmente mucinas de tipo gástrico (Lesuffleur *et al.*, 1990, 1991, 1993). La principal mucina secretada es la MUC5AC, aunque también es posible detectar MUC1, MUC5B y MUC2 (Lesuffleur *et al.*, 1993, 1995). A nivel de las microvellosidades, las HT29-M6 presentan hidrolasas típicas del borde en cepillo de epitelio adulto (dipeptidilpeptidasa, aminopeptidasa N) (Lesuffleur *et al.*, 1990).

La línea celular HT29 se ha empleado principalmente para evaluar aspectos relacionados con la adhesión e invasión microbiana, la diferenciación celular y los procesos cancerígenos y sus terapias. Adicionalmente, y en menor medida, se ha utilizado en ensayos de absorción, en la mayoría de los casos formando co-cultivos con células Caco-2 (Walter *et al.*, 1996; Hilgendorf *et al.*, 2000; Pontier *et al.*, 2001; Calatayud *et al.*, 2012a; Rocha *et al.*, 2012). El co-cultivo de ambas líneas epiteliales permite reproducir de forma más precisa la población celular del intestino (Mahler *et al.*, 2009). Estos co-cultivos forman monocapas con uniones intercelulares más laxas, cuyo poro intercelular es más semejante al existente en el intestino delgado humano (Hilgendorf *et al.*, 2000). Por otro lado, la presencia de las células caliciformes permite la producción de una capa de mucus, habitual en el tracto gastrointestinal. Finalmente, debido a que las HT29 no expresan la P-glicoproteína (Hilgendorf *et al.*, 2000), estas

monocapas mixtas presenta una expresión de este transportador más similar a la del epitelio intestinal humano.

El empleo del cultivo combinado de las células mayoritarias del intestino permite en cierta forma solventar algunas de las limitaciones que presenta el monocultivo de Caco-2. Los estudios comparativos entre células Caco-2 y co-cultivos han evidenciado que el modelo que integra ambas células es mejor a la hora de evaluar el transporte de sustancias que se mueven por vía paracelular o que son sustratos de la P-glicoproteína. Ambos modelos celulares presentan un comportamiento semejante para compuestos que se mueven por difusión pasiva transcelular (Walter *et al.*, 1996; Hilgendorf *et al.*, 2000; Pontier *et al.*, 2001). Por otro lado, el co-cultivo proporciona una herramienta potencial para el estudio de la influencia de la mucina en la absorción oral de sustancias.

## **11. Antecedentes sobre los mecanismos de transporte del mercurio a nivel intestinal**

Existen pocos estudios que investiguen el transporte de mercurio inorgánico y metilmercurio a través del intestino, siendo este paso de gran interés si se tiene en cuenta que la mucosa intestinal es la primera barrera que limitará la distribución sistémica de este elemento, y condicionará su posterior toxicidad. Por el contrario, órganos como el riñón y cerebro han sido extensamente estudiados debido a que son considerados diana de ambas formas mercuriales. Los escasos estudios sobre transporte intestinal de mercurio inorgánico y metilmercurio se han realizado empleando distintos modelos. Algunas investigaciones se han realizado *in vivo*, empleando roedores, mientras que otras se han realizado *in vitro* con el empleo de

modelos como el intestino evertido de rata o la línea celular humana Caco-2. Estos estudios aportan distinta información, en algunos casos contradictoria.

Según Foulkes (2000), el transporte de mercurio inorgánico depende de los ligandos presentes. Las moléculas que contienen grupos sulfhidrilo permiten la formación de conjugados con el mercurio que pueden actuar como homólogos estructurales y/o funcionales de moléculas esenciales, tales como aminoácidos y/o polipéptidos. Este hecho ha sido descrito en otros órganos (Bridges *et al.*, 2004; Bridges y Zalups, 2004; Zalups y Ahmad, 2005a, 2005b) pero sólo ha sido postulado a nivel intestinal. Este transporte por mimetismo molecular también es aplicable al metilmercurio. El transporte de metilmercurio unido a distintos tipos de grupos tiol, tales como glutatión o formas de cisteína (cisteína, homocisteína y N-acetilcisteína) ha sido estudiado en otros órganos, tipos celulares o en sistemas modelo (Aschner *et al.*, 1990; Kerper *et al.*, 1992; Mokrzan *et al.*, 1995; Wu, 1995; Simmons-Willis *et al.*, 2002; Zalups y Ahmad, 2004; Bridges y Zalups, 2006a, 2006b; Heggland *et al.*, 2009). Dada la prevalencia de transportadores de aminoácidos y péptidos en los enterocitos, especialmente a lo largo del duodeno (Ganapathy *et al.*, 2001; Dave *et al.*, 2004), es posible que estos conjugados se transporten por uno o más de estos transportadores mediante el denominado mimetismo molecular.

Se ha sugerido que la absorción intestinal de mercurio inorgánico en ratas transcurre en dos etapas. Inicialmente el mercurio inorgánico se acumula en la mucosa intestinal y, posteriormente, se internaliza para llegar a la circulación sistémica (Piotruwsky *et al.*, 1992; Foulkes y Bergman, 1993). La mayoría de estudios sobre absorción intestinal de mercurio inorgánico se han realizado *in situ* evidenciando que el transporte se modifica al variar el pH (Endo *et al.*, 1988a), las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  (Endo *et al.*, 1988a, 1988b, 1990) y en presencia de sustancias quelantes y cisteína (Endo

*et al.*, 1990, 1991). Los estudios *in vitro* empleando células intestinales, en concreto la línea celular Caco-2, se limitan al trabajo de Aduayom *et al.* (2003), el cual sugiere que el mercurio inorgánico se transporta por un mecanismo de difusión pasiva. Esta conclusión es sorprendente, teniendo en cuenta la baja liposolubilidad de las formas inorgánicas de mercurio. Además, estudios en otros sistemas celulares muestran que el transporte de mercurio inorgánico es inhibido al reducir el metabolismo celular (Endo *et al.*, 1995).

Respecto al metilmercurio, los estudios *in vivo* sugieren la participación de la enzima  $\gamma$ -glutamyltransferasa y miembros de la familia de transportadores de aniones orgánicos (OAT) en la captación de metilmercurio (Urano *et al.*, 1990). El único estudio empleando células intestinales Caco-2 aporta información sobre la captación del  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}$ -cisteína, concluyendo que los transportadores de aminoácidos neutros (sistema L) participan en el transporte de  $\text{CH}_3\text{Hg}$ -cisteína y no en el de  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  (Mori *et al.*, 2012). Estos transportadores se localizan en la membrana basolateral de los enterocitos, por tanto hasta el momento se desconoce que ocurre a nivel de membrana apical.

A la vista de los antecedentes, aunque se conocen algunas características del transporte intestinal de estas formas mercuriales, no existen datos suficientes que permitan identificar mecanismos de transporte o incluso evidenciar la participación de determinados transportadores en la absorción intestinal de mercurio inorgánico y metilmercurio. Todo esto a su vez impide que se puedan identificar posibles estrategias para disminuir la absorción de este elemento traza tóxico y, por otro lado, se desconoce si este paso a través del epitelio puede afectar la absorción de otros compuestos esenciales para el adecuado funcionamiento del organismo.

## *Objetivos*

---



La presente tesis tiene como objetivo general la evaluación de los mecanismos de transporte implicados en la absorción intestinal de las formas de mercurio presentes en los alimentos y de sus efectos tóxicos sobre el epitelio intestinal.

Para llevar a cabo este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio del transporte intestinal de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg y de los factores que influyen en el mismo.

1.1. Evaluación del transporte y la retención celular de las formas de mercurio en la línea celular Caco-2 y caracterización de la naturaleza de los mecanismos implicados.

1.2. Identificación de transportadores que participan en el transporte intestinal de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg.

1.3. Evaluación de la influencia del modelo celular, de componentes habituales en el lumen gastrointestinal y de componentes procedentes de la dieta en el transporte de ambas especies mercuriales.

2. Estudios sobre la toxicidad intestinal de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg.

2.1. Estudios de la viabilidad, muerte celular y los mecanismos de toxicidad en células Caco-2 en distintos estadios de diferenciación.

2.2. Evaluación de la expresión génica de proteínas de choque térmico, metalotioneínas y factor de necrosis tumoral en células Caco-2 en distintos estadios de diferenciación.

2.3. Estudios de los efectos sobre el citoesqueleto, las uniones intercelulares y la permeabilidad celular de células Caco-2 diferenciadas.

2.4. Estudios *in vivo* de la acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en el epitelio gastrointestinal y de su efecto sobre la expresión de transportadores presentes en el epitelio.

## *Metodología*

---



## **1. Especies mercuriales**

Las disoluciones de mercurio inorgánico divalente [Hg(II)] fueron preparadas por dilución de los patrones comerciales de Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (1000 mg/L, Merck, España) y HgCl<sub>2</sub> (1000 mg/L, Sigma, Italia). Las disoluciones de metilmercurio (CH<sub>3</sub>Hg) fueron preparadas a partir de CH<sub>3</sub>HgCl (1000 mg/L, AlfaAesar, España). A lo largo de la tesis, las concentraciones se expresan como mg/L y/o μM de mercurio, para facilitar la comparación entre tratamientos.

## **2. Modelos celulares y animales empleados en el estudio del transporte y toxicidad de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg**

### **2.1. Líneas celulares humanas procedentes de adenocarcinomas de colon, Caco-2 y HT29-MTX**

Las células Caco-2 se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC; número 86010202, Reino Unido). El mantenimiento de estas células se llevó a cabo en frascos de 75 cm<sup>2</sup> a los que se adicionaron 10 mL de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) a pH 7.2, con L-glutamina (0.87 g/L) y un alto contenido de glucosa (4.5 g/L). El DMEM se suplementó con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomycin, 0.0025 mg/mL de anfotericina B, 1 mM de piruvato de sodio y 10 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico). A lo largo de la tesis este medio suplementado se denominará DMEMc. Los ensayos se realizaron con células entre los pases 5 y 40. Los ensayos para el estudio de un mismo parámetro se llevaron a cabo en células que no difirieron en más de tres pases.

Las células HT29-MTX fueron donadas por la Dra. Thécla Lesuffleur (Institute National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM UMR S938, Francia) en el pase 15 y se emplearon en los ensayos entre los pases 16 y 24. El mantenimiento rutinario de las células se llevó a cabo en frascos de 25 cm<sup>2</sup>, a los que se adicionaron 5 mL de medio DMEM a pH 7.2, con L-glutamina (0.87 g/L) y un alto contenido de glucosa (4.5 g/L), suplementado con un 10% (v/v) de SFB, 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomycin, 0.0025 mg/mL de anfotericina B, 10 mM de HEPES y 1 mM de piruvato de sodio para obtener el medio suplementado que en esta tesis se denomina HT-DMEMc.

Ambas líneas celulares se incubaron a 37 °C en atmósfera controlada, con una humedad relativa del 95% y un flujo de CO<sub>2</sub> del 5%. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. Cuando la monocapa celular alcanzó el 80% de confluencia, las células se tripsinizaron y posteriormente se resembraron en los frascos a una densidad de  $0.5-1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

Para la tripsinización de las células se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular dos veces con tampón fosfato salino (PBS). A continuación se adicionó una disolución de tripsina (0.5 mg/L) y ácido etilendiamino tetracético (EDTA, 0.22 g/L) que se mantuvo en contacto con las células durante 10 minutos a 37 °C. Posteriormente, se inactivó la tripsina con medio completo (DMEMc o HT-DMEMc) y tras centrifugación (1200 rpm, 5 minutos) se recuperaron las células. Este procedimiento es común a todos los tratamientos de tripsinización aplicados en la presente tesis doctoral.

Los reactivos utilizados para el mantenimiento de los cultivos celulares fueron adquiridos a Sigma (España), PAA Laboratories GMBH (Labclinic, España) y HyClone Laboratories (Thermo Scientific, España).

## 2.2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas empleadas en este estudio fueron BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) y *smf1Δsmf2Δ* (cepa XL131; *MATα smf1:URA3 smf2: HIS3 ade2 lys2Δ201 leu2-3 112*), esta última donada por la Dra. Valleria Culotta (Departamento de Ciencias de Salud Ambiental de la Escuela de Higiene y Salud Pública, Universidad Johns Hopkins, Baltimore, MD, EEUU).

Los stocks de levaduras fueron mantenidos en medio YPD (extracto de levadura peptona dextrosa) constituido por 0.5% (m/v) de extracto de levadura, 1% (m/v) de peptona bacteriológica y 2% (m/v) de glucosa (Sigma).

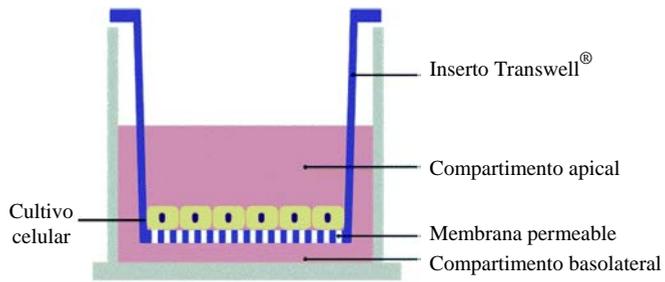
## 2.3. Modelos animales

En los estudios *in vivo* se emplearon ratas albinas adultas Wistar (350-400 g peso corporal), procedentes del estabulario de la Facultad de Fisiología de la Universidad de Pavia (Italia). Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales controladas (ciclos de 12 horas de luz y oscuridad y temperatura ambiente de 22 °C), con agua y comida *ad libidum*. Los animales fueron cuidados y sacrificados de acuerdo con los requisitos de la Directiva Europea (Directiva 86/609/EEC). Todos los protocolos experimentales empleados fueron aprobados por el Comité de Bioética para el uso de animales de laboratorio de la Universidad de Pavia.

### **3. Evaluación de las características del transporte intestinal de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg empleando la línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal**

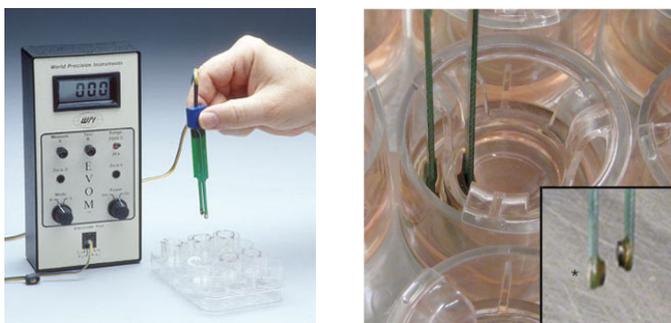
Para caracterizar el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg a través de la monocapa formada por las células Caco-2 diferenciadas (10-14 días post-siembr) se emplearon dos aproximaciones. En la mayoría de ensayos se determinó el coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ), parámetro que evalúa la velocidad de paso de una sustancia a través de la monocapa celular corregido por la concentración inicial del compuesto en el compartimento dador, la superficie y el tiempo de exposición. En algunos ensayos, sin embargo, en lugar de la determinación del  $P_{app}$ , que requiere la toma de muestra a distintos tiempos, se evaluó el transporte y la retención celular de las formas mercuriales a tiempo final.

Para los ensayos de transporte, acumulación y permeabilidad, las células se sembraron a una densidad de  $5.3-6.4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> sobre una membrana semipermeable de poliéster (Transwell<sup>®</sup>, Costar Corporation, Cultek, España) que permite la separación del cultivo en dos compartimentos, el compartimento superior o apical, que *in vivo* correspondería al lumen intestinal y el inferior o basolateral, que correspondería al espacio intersticial en contacto con los capilares sanguíneos (figura 1). En los estudios de transporte se han empleado insertos Transwell<sup>®</sup> de 24 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0.4 µm.



**Figura 1.** Representación gráfica del sistema Transwell®.

Durante el tiempo de crecimiento y diferenciación celular en el sistema Transwell®, se monitoreó el desarrollo de la monocapa celular mediante la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) cada 2 días a partir sexto día post-siembr. Esta medida se realizó con un voltímetro Millicell®-ERS (Millipore Corporation, España; figura 2). Las células entre los 10-14 días post-siembr mostraron valores de RET estables y superiores a  $250 \text{ Ohms} \times \text{cm}^2$ , criterio empleado en nuestro laboratorio para considerar la monocapa formada.



**Figura 2.** Voltímetro Millicell®-ERS utilizado para la medición de la RET en el sistema Transwell®.

A continuación se describen los protocolos de trabajo para la realización de los estudios de transporte tanto en las condiciones estándar de trabajo (pH 7.2, 37 °C), como en las condiciones específicas aplicadas para evaluar los posibles mecanismos implicados en el transporte intestinal de las formas mercuriales (apertura de las uniones intercelulares, pH, temperatura, inhibición del metabolismo celular, gradiente de sodio, presencia de formas de cisteína e inhibición competitiva o no competitiva de determinados transportadores).

### 3.1. Evaluación de la actividad mitocondrial de células Caco-2 tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Se evaluó el efecto de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg sobre la actividad mitocondrial de las células diferenciadas como medida indirecta de la viabilidad celular. Este estudio se llevó a cabo con el fin de seleccionar las concentraciones subletales de trabajo a aplicar en los estudios de transporte y acumulación. El ensayo se basa en la capacidad de las células viables de llevar a cabo la reducción de la resazurina (sal sódica de 10-óxido de 7-hidroxi-3-hidrofenoquinazolin-2(1H)-ona, Sigma) a resorufina y dihidroresorufina, ambas detectables colorimétricamente. La conversión es intracelular y está catalizada por las oxidoreductasas mitocondriales, microsomales y citosólicas (O'Brien *et al.*, 2000). Las células se sembraron a una densidad de  $2.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos en medio DMEMc, cambiando el medio cada 2-3 días. Tras alcanzar la diferenciación (10-12 días), las células se expusieron a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 y 5 mg/L) durante 4 y 24 horas. Estos tratamientos se prepararon en medio esencial mínimo con sales de Earle (MEM, HyClone) suplementado con 1 mM de piruvato de sodio, 10 mM HEPES, 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomina y 0.0025

mg/L de anfotericina B. A lo largo de la tesis, este medio se denominará MEM suplementado. En todos los ensayos se emplearon células control no tratadas.

Tras la exposición, se retiró el medio y las monocapas celulares se lavaron con PBS. Posteriormente se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de resazurina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en MEM suplementado) y se incubó durante 2 horas a 37 °C, 95% humedad relativa y flujo de  $\text{CO}_2$  del 5%. Tras la incubación, se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  a una placa de 96 pocillos y la reducción de la resazurina se determinó por espectrometría visible a longitudes de onda de 570 y 600 nm (PowerWave HT Microplate Scanning Spectrophotometer, Bio-Tek instruments, Alemania). Los resultados se expresaron como porcentajes respecto a la absorbancia de las células no tratadas con mercurio.

### 3.2. Control de la integridad de la monocapa durante los ensayos de transporte, acumulación celular y permeabilidad

La integridad de la monocapa celular se determinó a través de la medición de tres parámetros: a) la RET; b) el coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{\text{app}}$ ) o el porcentaje de transporte del marcador fluorescente paracelular yellow (LY, Sigma); c) la viabilidad celular al final del ensayo.

La RET se midió al inicio de la experiencia y en todos los tiempos de toma de muestra (5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos), tal y como se describe al inicio del apartado 3. Para evaluar el transporte de LY, este marcador se adicionó a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  al compartimento dador de los pocillos control y de los pocillos tratados con mercurio. La fluorescencia del LY en las alícuotas recogidas a cada tiempo del lado receptor se midió empleando un lector de microplacas (PolarSTAR OPTIMA reader, BMG-Labtech, Alemania) a una longitud de onda de excitación/emisión de

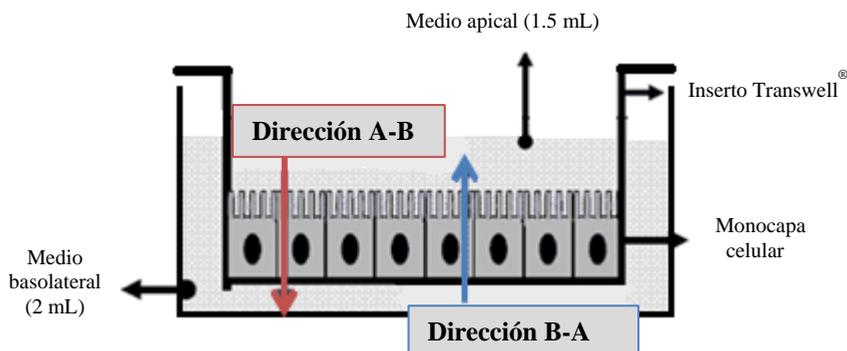
485/520 nm. El cálculo del  $P_{app}$  se realizó aplicando la ecuación 1 que se describe en el apartado 3.3. Para los ensayos de transporte a tiempo final, en lugar de la permeabilidad de LY se calculó el porcentaje de transporte de LY al final del ensayo. Para evaluar posibles interacciones del LY sobre la captación y transporte de las especies mercuriales se realizaron experiencias paralelas con y sin marcador paracelular que demostraron la ausencia de interferencias entre el LY y las formas mercuriales estudiadas.

La viabilidad celular se determinó en las células recogidas mediante tripsinización al final del ensayo. Se utilizó la técnica de tinción con azul tripano 0.4% (v/v) (Sigma) empleando una cámara de Neubauer y visualización en microscopio óptico invertido (OPTIKA XDS-1R, Italia).

Se consideraron válidos los ensayos de transporte cuando se cumplieron las siguientes condiciones: a) cambios inferiores al 25% en la RET respecto a los valores iniciales; b) valores de  $P_{app}$  del LY  $< 2 \times 10^{-7}$  cm/s o porcentaje de transporte de LY a tiempo final  $< 2\%$  y c) viabilidad celular  $\geq 80\%$ .

### 3.3. Ensayos de transporte, acumulación celular y determinación de la permeabilidad de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en condiciones estándar

Los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C, 95% de humedad relativa, 5% de CO<sub>2</sub> y empleando como medio de cultivo la solución salina de Hanks con NaCO<sub>3</sub> (Sigma), suplementada con 10 mM HEPES (pH 7.2). A lo largo de esta tesis, este medio se denominará HBSS-HEPES. Se evaluó el transporte en dirección apical-basolateral (A-B, sentido absorptivo) y en dirección basolateral-apical (B-A, sentido secretorio) (figura 3).



**Figura 3.** Diseño de los ensayos de transporte, acumulación celular y permeabilidad en el sistema Transwell®.

Antes de iniciar las experiencias, las células diferenciadas en Transwell® se acondicionaron durante 15 minutos con el medio HBSS-HEPES adicionado a ambos compartimentos. Posteriormente, se retiró el medio y se adicionaron los patrones de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg preparados en HBSS-HEPES al compartimento dador (apical, para el transporte A-B o basolateral para el transporte B-A) y medio HBSS-HEPES al compartimento aceptor. Independientemente de la dirección de ensayo, se añadieron 1.5 mL de medio al lado apical y 2 mL al compartimento basolateral. Las concentraciones ensayadas en dirección A-B fueron:

- Hg(II): 0.1, 0.5 y 1 mg/L (equivalentes a 5, 2.5 y 5  $\mu$ M respectivamente).
- CH<sub>3</sub>Hg: 0.1, 0.5, 1 y 5 mg/L (equivalentes a 0.46, 2.3, 4.6 y 23  $\mu$ M respectivamente).

En la dirección B-A solamente se ensayaron dos concentraciones (0.5 y 1 mg/L) para ambas especies mercuriales. A los tiempos estipulados (5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos), se retiraron alícuotas (600  $\mu$ L) del compartimento aceptor que se sustituyeron por el mismo volumen de medio fresco (HBSS-HEPES) sin adición de mercurio. Transcurrido el tiempo de ensayo (120 minutos), el contenido del compartimento dador fue recogido en su totalidad, y las células se recuperaron por tripsinización siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.1.

En las alícuotas recogidas del medio aceptor, así como en el medio dador y en las células se procedió a la cuantificación de mercurio tras digestión de las muestras en horno de microondas y determinación por espectrofotometría de fluorescencia atómica por vapor frío (CV-AFS), tal y como se describe en el apartado 8.

Los coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ; cm/s) se calcularon utilizando la ecuación 1.

$$P_{app} = (dC/dt) (V_r / AC_o) \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde,

$dC/dt$  es el flujo ( $\mu$ g/s) determinado por la pendiente lineal de la ecuación que rige la variación de las concentraciones de mercurio, corregidas por la dilución, frente al tiempo.

$V_r$  es el volumen del compartimento aceptor (2 mL en la dirección A-B y 1.5 mL en la dirección B-A).

$A$  es la superficie ocupada por la monocapa celular (4.67  $\text{cm}^2$ ).

$C_o$  es la concentración inicial de mercurio en el compartimento dador ( $\mu$ g/mL).

Adicionalmente se calculó el ratio de eliminación ( $E_r$ ) mediante la ecuación:

$$E_r = P_{app} (B-A)/P_{app} (A-B) \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde  $P_{app} (B-A)$  es el coeficiente de permeabilidad aparente en dirección basolateral-apical y  $P_{app} (A-B)$  es el coeficiente de permeabilidad aparente en dirección apical-basolateral.

En los ensayos a tiempo final, los datos de transporte se expresaron como cantidad de mercurio total (ng) normalizado por el número total de células obtenidas mediante tinción con azul de tripano (apartado 3.2) o por el contenido total de proteína determinado por el método Bradford (apartado 10).

#### 3.4. Estudio de eliminación celular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Los ensayos de eliminación del mercurio intracelular se llevaron a cabo en condiciones estándar (37 °C, pH 7.2). Se adicionaron al compartimento apical 1.5 mL de una disolución de Hg(II) o CH<sub>3</sub>Hg (ambas a 1 mg/L) en HBSS-HEPES y 2 mL de HBSS-HEPES al compartimento basolateral. Tras 60 minutos de contacto con las células, una parte de los pocillos se destinó a evaluar el contenido de mercurio acumulado. En el resto de pocillos se eliminaron los medios apical y basolateral, se sustituyeron por medio HBSS-HEPES sin adición de mercurio y se procedió al estudio de la eliminación del mercurio acumulado.

A los tiempos estipulados (5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos) se retiraron los medios apical y basolateral en su totalidad, y se sustituyeron por el mismo volumen de medio HBSS-HEPES sin adición. Al final del ensayo, se recuperaron las células por tripsinización siguiendo el

protocolo descrito en el apartado 2.1. En todas estas muestras se procedió a la determinación de mercurio tras digestión de las muestras en horno de microondas y cuantificación por CV-AFS (apartado 8).

### 3.5. Estudio de los parámetros cinéticos del transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones estándar (pH 7.2, 37 °C) en dirección A-B y B-A. Las concentraciones de Hg(II) utilizadas fueron las siguientes:

- dirección A-B: 0.06, 0.14, 0.19, 0.20 y 0.25 mg/L, equivalentes a 0.3, 0.65, 0.89, 0.95 y 1.15 μM respectivamente.

- dirección B-A: 0.07, 0.11, 0.19, 0.28 y 0.36 mg/L, equivalentes a 0.35, 0.49, 0.89, 1.29 y 1.69 μM respectivamente.

Las concentraciones de CH<sub>3</sub>Hg empleadas fueron:

- dirección A-B: 0.07, 0.16, 0.23, 0.27 y 0.33 mg/L (equivalentes a 0.32, 0.74, 1.06, 1.24 y 1.52 μM respectivamente).

- dirección B-A: 0.10, 0.13, 0.23, 0.25, 0.30, 0.53 y 1 mg/L (equivalentes a 0.46, 0.59, 1.06, 1.15, 1.38, 2.43 y 4.63 μM respectivamente).

Tras la exposición (60 minutos), el medio apical, basolateral y las células fueron recogidos en su totalidad para llevar a cabo la cuantificación de mercurio. Los contenidos de mercurio normalizados por número de células se emplearon para el cálculo de los parámetros cinéticos aplicando la ecuación 3 (Proctor *et al.*, 2008).

$$J = (J_{\max} \times C)/(K_m + C) + (K_d \times C) \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde,

J es el flujo normalizado por el área de superficie (pmol/min  $\times$  cm<sup>2</sup>).

K<sub>m</sub> es una constante equivalente a la constante de Michaelis-Menten (μM).

J<sub>max</sub> es el flujo máximo (pmol/min  $\times$  cm<sup>2</sup>).

K<sub>d</sub> es la constante para el término no saturable (μL/min  $\times$  cm<sup>2</sup>).

C es la concentración en el compartimento dador (μM).

### 3.6. Efecto de la albúmina en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Este estudio se llevó a cabo en condiciones estándar (pH 7.2, 37 °C) en dirección A-B. Se adicionaron 1.5 mL de las disoluciones patrón de Hg(II) (0.4 mg/L, 2 μM) o CH<sub>3</sub>Hg (0.3 mg/L, 1.4 μM) preparadas en HBSS-HEPES al compartimento apical y 2 mL de HBSS-HEPES con 4% (m/v) de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) al compartimento basolateral. Tras la exposición (120 minutos) se determinó el P<sub>app</sub> (apartado 3.3) y el contenido de mercurio (apartado 8) en el lisado celular y el compartimento apical.

### 3.7. Estudio de la participación de la vía paracelular en el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Este estudio se llevó a cabo en condiciones estándar (pH 7.2, 37 °C) en dirección A-B durante 120 minutos. Las células se incubaron durante 5

minutos con una disolución 5 mM de EDTA en PBS libre de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  (PBS-CMF) (PAA), la cual se adicionó a ambos compartimentos. Posteriormente se retiró el tratamiento con EDTA y la monocapa se lavó con PBS-CMF. Se adicionaron 1.5 mL de Hg(II) o  $\text{CH}_3\text{Hg}$  (ambos a 1 mg/L) preparados en medio HBSS libre de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  al compartimento apical, y 2 mL de HBSS-HEPES al compartimento basolateral. El  $P_{\text{app}}$  se evaluó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.

### 3.8. Participación de un mecanismo dependiente de energía en el transporte y acumulación de Hg(II) y $\text{CH}_3\text{Hg}$

Para evaluar la dependencia de la energía del transporte se realizaron dos aproximaciones a pH 7.2. En primer lugar se analizó el efecto de la temperatura sobre el transporte, evaluando la permeabilidad en dirección A-B de Hg(II) (1 mg/L, 5  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{CH}_3\text{Hg}$  (1 mg/L, 4.6  $\mu\text{M}$ ) a 18 °C y 2 °C durante 120 minutos. Los resultados se compararon con los obtenidos a 37 °C. Los valores de  $P_{\text{app}}$  a las distintas temperaturas permitieron calcular la energía de permeación ( $E_p$ ) mediante la ecuación de Arrhenius (Ecuación 4).

$$P_{\text{app}} = P_0 e^{-E_p/RT} \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde,

$P_{\text{app}}$  representa el coeficiente de permeabilidad aparente (cm/s).

$P_0$  es el factor pre-exponencial.

R es la constante de los gases (8.31434 J/mol °K).

T es la temperatura absoluta (°K).

La segunda aproximación consistió en un tratamiento de inhibición del metabolismo celular. Las células se incubaron durante 10 minutos con una

disolución de azida sódica (5 mM, Sigma) y 2-desoxiglucosa (50 mM, Sigma) preparada con HBSS-HEPES. Posteriormente, se expusieron durante 120 minutos a Hg(II) (1 mg/L, 5  $\mu$ M) o CH<sub>3</sub>Hg (0.8 mg/L, 4  $\mu$ M) en condiciones estándar (pH 7.2, 37 °C). El valor de P<sub>app</sub> se evaluó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.

### 3.9. Efecto de la concentración de H<sup>+</sup> en la permeabilidad y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

El estudio se realizó en dirección A-B, disminuyendo el pH del medio apical a 5.5 y manteniendo el pH 7.2 en el medio basolateral. El pH 5.5 se consiguió mediante la adición de 20 mM de ácido o-2-(N-morfolino etanosulfónico) (MES, Sigma) al medio HBSS (HBSS-MES). Para el ensayo de transporte se adicionaron 1.5 mL de una disolución de Hg(II) (1 mg/mL, 5  $\mu$ M) o CH<sub>3</sub>Hg (0.6 mg/mL, 2.8  $\mu$ M) preparada en HBSS-MES al compartimento apical y 2 mL de HBSS-HEPES al compartimento basolateral. Tras 120 minutos de exposición, los valores de P<sub>app</sub> y la retención celular se calcularon siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3. Los resultados obtenidos se compararon con los valores hallados en condiciones de igualdad de pH en ambos compartimentos (7.2/7.2).

### 3.10. Influencia de la concentración de Na<sup>+</sup> en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Se preparó un medio control [10 mM HEPES, 130 mM NaCl (Panreac, España), 10 mM KCl (Panreac), 1 mM MgSO<sub>4</sub> (Sigma), 5 mM glucosa (Panreac) y 1 mM CaCl<sub>2</sub> (Panreac)] y un medio libre de NaCl, en el que dicha sal fue sustituida por una concentración equimolar de cloruro de colina [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N(Cl)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, Sigma]. La osmolaridad de los medios se midió

empleando un osmómetro con punto de congelación (Automatic Micro-Osmometer Type 15 Löser, Löser Messtechnik, Alemania). Todos los medios preparados presentaron una osmolaridad de  $310 \pm 10$  mOsm/kg.

Las disoluciones de Hg(II) (0.8 mg/L, 4  $\mu$ M) y CH<sub>3</sub>Hg (0.6 mg/L, 2.8  $\mu$ M) fueron preparadas en medio control o en medio sin NaCl y se adicionaron al compartimento apical (1.5 mL). En el compartimento basolateral se adicionaron 2 mL del medio control. Transcurrido 120 minutos de exposición en condiciones estándar (pH 7.2, 37 °C), se recuperaron los medios apicales, basolaterales y las células, y se llevó a cabo la cuantificación de mercurio (apartado 8).

### 3.11. Efecto de la presencia de distintas formas de cisteína en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Para evaluar el efecto de distintas formas de cisteína sobre el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg se siguió el protocolo descrito por Zalups y Ahmad (2004), con ligeras modificaciones. Se mantuvieron en contacto durante 10 minutos a temperatura ambiente, 5  $\mu$ M de L-cisteína (L-Cys, Merck), DL-homocisteína (Hcys, Sigma) o N-acetil-L-cisteína (NAC, Sigma) con 2.5  $\mu$ M de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg preparados en medio HBSS-HEPES. Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de transporte en dirección A-B (pH 7.2, 37 °C), adicionando 1.5 mL de las mezclas Hg(II)-formas de cisteína o CH<sub>3</sub>Hg-formas de cisteína al compartimento apical y 2 mL de HBSS-HEPES al compartimento basolateral. Después de la exposición (120 minutos) se recuperaron los medios apicales, basolaterales y las células, y se llevó a cabo la cuantificación del mercurio (apartado 8).

### 3.12. Efecto de inhibidores o sustratos de determinados transportadores en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Los ensayos se llevaron a cabo en dirección A-B en condiciones estándar (pH 7.2, 37 °C), exceptuando el ensayo con Mn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Merck) que se llevó a cabo a pH 5.5 en el lado apical. Los tratamientos aplicados se describen en la tabla 1 para el Hg(II) y en la tabla 2 para el CH<sub>3</sub>Hg.

**Tabla 1.** Condiciones empleadas en los ensayos de inhibición del transporte de Hg(II).

Sustrato o inhibidor	Concentración (μM)	Preincubación (min)	Transportador afectado
Rifamicina	100	60	OATPs
BCH	100	60	sistema L
AA <sup>0</sup> (L-Phe + L-Met)	2000	60	sistemas B <sup>0+</sup> , L, y <sup>+L</sup>
AA <sup>+</sup> (L-Arg + L-Lys)	2000	60	sistemas B <sup>0+</sup> , b <sup>0+</sup> , L, y <sup>+L</sup>
Mn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	500/1000	30	DMT1

BCH: ácido aminobiciclo-(2,2,1)-heptano-2-carboxílico

AA<sup>0</sup>: aminoácidos neutros

AA<sup>+</sup>: aminoácidos catiónicos

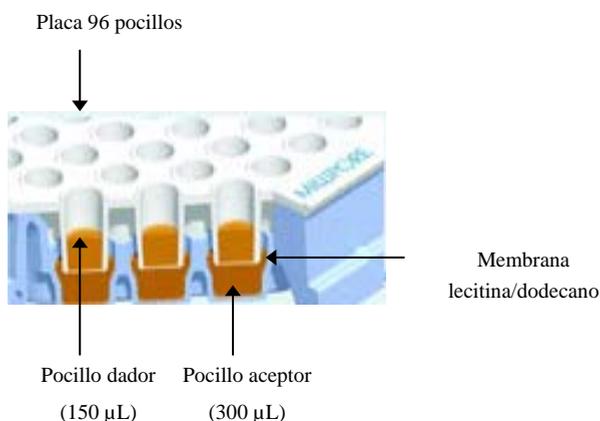
**Tabla 2.** Condiciones empleadas en los ensayos de inhibición del transporte de CH<sub>3</sub>Hg.

Sustrato o inhibidor	Concentración (μM)	Preincubación (min)	Transportador afectado
Rifamicina	100	60	OATPs
BCH	100	60	sistema L
L-Phe	2000	60	sistemas B <sup>0+</sup> , L, y <sup>+L</sup>
L-Arg	2000	60	sistemas B <sup>0+</sup> , b <sup>0+</sup> , L, y <sup>+L</sup>

BCH: ácido aminobiciclo-(2,2,1)-heptano-2-carboxílico

### 3.13. Evaluación de la participación de un transporte pasivo en el paso transcelular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Estos ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos (Multiscreen<sup>®</sup> filter, Millipore, España). El ensayo PAMPA (ensayo de permeabilidad en membranas artificiales en paralelo) se basa en la creación de una membrana lipídica artificial que emula la bicapa lipídica, sobre los pocillos de un soporte que se puede considerar el compartimento dador. Posteriormente, este soporte se acopla a una placa multipocillo que actúa como compartimento receptor (figura 4).



**Figura 4.** Representación gráfica del sistema PAMPA.

Para la creación de la membrana se empleó una disolución de lecitina (1% m/v, Sigma) en dodecano (Sigma), sonicada durante 5 minutos antes de su adición. Posteriormente, se incorporaron cuidadosamente 5 µL de esta disolución a los pocillos dadores (parte apical) e inmediatamente se adicionaron 150 µL de Hg(II) o CH<sub>3</sub>Hg (ambos a 50 y 100 µM) preparados en dimetilsulfóxido 5% (v/v) (DMSO, Sigma) en PBS a pH 7.2. Como control se empleó clorhidrato de verapamilo (Sigma) (100 y 500 µM)

preparado en DMSO 5% (v/v). Los pocillos dadores fueron acoplados a los pocillos aceptores que contenían 300 µL de DMSO 5% (v/v) y este montaje se incubó a temperatura ambiente durante 16 horas envuelto en un paño mojado para prevenir la evaporación. Transcurrido el período de incubación, los medios apical y basal se recuperaron para llevar a cabo la cuantificación de mercurio (apartado 8) y de verapamilo. La concentración del verapamilo se determinó utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Agilent 8453, Agilent, España) a una longitud de onda de 279 nm.

El coeficiente de permeabilidad a través de la membrana artificial se determinó utilizando la ecuación descrita por Sugano *et al.* (2001) que se indica a continuación:

$$P_{am} = - 2.303 \times (V_{dn} \times V_{ac} / V_{dn} + V_{ac}) \times (1/ S \times t) \times \log (1 - \%flujo/100)$$

(Ecuación 5)

Calculándose el porcentaje de flujo a partir de la ecuación

$$\%flujo = (C_{ac}/C_{ref}) \times 100 \text{ (Ecuación 6)}$$

donde,

$V_{dn}$  es el volumen el compartimento dador (0.15 mL).

$V_{ac}$  es el volumen del compartimento aceptor (0.3 mL).

$S$  es el área de la membrana (0.3 cm<sup>2</sup>).

$t$  es el tiempo de incubación (57600 s).

$C_{ac}$  es la cantidad de mercurio en el pocillo aceptor al final del ensayo (ng).

$C_{ref}$  es la cantidad de mercurio adicionada en el pocillo dador (ng).

Adicionalmente, se realizaron ensayos empleando el sistema PAMPA para determinar la influencia de L-Cys y determinados cationes en la difusión pasiva de CH<sub>3</sub>Hg. Estos estudios consistieron en:

- a) Evaluar el efecto de concentraciones crecientes de L-Cys (25, 200 y 500 μM) sobre el transporte de CH<sub>3</sub>Hg (10.8 mg/L; 50 μM)
- b) Evaluar el efecto conjunto de la presencia de Mn<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> y Cu<sup>+2</sup> (50 μM, Merck, España) y L-Cys (200 y 500 μM) sobre el transporte de CH<sub>3</sub>Hg (10.8 mg/L; 50 μM).

Transcurrido el período de incubación (16 horas), los medios dadores y aceptores se recuperaron para llevar a cabo la cuantificación de mercurio (apartado 8).

#### **4. Evaluación de los transportadores implicados en el transporte intestinal de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg**

Se investigó la participación de transportadores en el paso transcelular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg, seleccionándose éstos en base a los resultados obtenidos en los estudios de caracterización del transporte descritos en el apartado 3. En concreto, se evaluaron los transportadores de aminoácidos b<sup>0,+</sup> y B<sup>0,+</sup> en el transporte de ambas formas mercuriales unidas a L-Cys, y el papel del transportador de cationes divalente (DMT1) en el transporte de Hg(II). En células Caco-2 se evaluaron también los cambios en la expresión génica de estos transportadores y de los pertenecientes al sistema L (LAT1, LAT2) y al sistema y<sup>+L</sup> (y<sup>+LAT1</sup>, y<sup>+LAT2</sup>) tras la exposición a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en presencia o ausencia de L-Cys.

#### 4.1. Evaluación de los transportadores implicados en el transporte intestinal de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg empleando la línea celular Caco-2

##### 4.1.1. Expresión génica de los transportadores seleccionados en células control y en células expuestas a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Inicialmente se evaluó si los transportadores de interés se expresaban en el clon de Caco-2 empleado. Una vez confirmada la expresión de estos transportadores, se llevó a cabo una segunda experiencia para determinar si la exposición a las formas mercuriales modificaba su patrón de expresión.

Las células se sembraron a una densidad de  $6.4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 6 pocillos en medio DMEMc y los ensayos se llevaron a cabo tras alcanzar la diferenciación (10-12 días post-siembra). Para evaluar la expresión diferencial de los transportadores en presencia de mercurio, las células Caco-2 diferenciadas se expusieron durante 24 y 48 horas a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (1 mg/L), ambos preparados en MEM suplementado. También se evaluó la expresión diferencial de los transportadores tras el tratamiento de las células Caco-2 con 0.5 mg/L de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en presencia de 5 μM de L-Cys. Como referencia se emplearon células en el mismo estadio de diferenciación no tratadas con mercurio. Transcurrido el tiempo de exposición, las células se lavaron con PBS y se recuperaron para la extracción de ARN y posterior obtención de ADN complementario (ADNc) según el protocolo descrito en los apartados 4.1.4 a 4.1.6.

La evaluación de la expresión se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), tal y como se describe en el apartado 4.1.7. Las secuencias de los oligonucleótidos (Biologio, Teknockroma, España) se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Secuencias y eficacias de los oligonucleótidos de los transportadores empleados en qPCR.

Gen	GenBank N°	Secuencia de primers 5'-3'	Amplicón (bp)	Eficacia	Referencia
Sistema $b^{0,+}$ <i>SLC7A9</i>	NM_001126335	F: GGCCTGACGATTCTAGGACTCA R: GGAGCCAGAACCAAAAACACA	125	2.03 ± 0.01	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/</a>
Sistema $B^{0,+}$ <i>SLC6A14</i>	NM_007231	F: CCAAGCCACTGAAAGGGAGT R: AACTCTGGAGGGTGCTTCAA	130	1.98 ± 0.14	
<i>LAT1</i> <i>SLC7A5</i>	NM_003486.5	F: CACAGAGGAAATGATCAACCCCT R: TGATAGTTCCCGAAGTCCACGG	168	2.09 ± 0.08	
<i>LAT2</i> <i>SLC7A8</i>	NM_182728.1	F: TGAGGAGCTTGTTGATCCCTACA R: GCGACATTGGCAAAGACATACA	93	2.00 ± 0.09	Terada <i>et al.</i> , 2005
$y^+$ <i>LAT1</i> <i>SLC7A7</i>	NM_001126105	F: GATCCATGTTGAGCGGTTTAC R: CCACGCACAAGTAGATCAATGC	77	2.10 ± 0.05	Terada <i>et al.</i> , 2005

**Tabla 3.** Continuación

<b>Gen</b>	<b>GenBank N°</b>	<b>Secuencia de primers 5'-3'</b>	<b>Amplicón (bp)</b>	<b>Eficacia</b>	<b>Referencia</b>
<i>y<sup>+</sup>LAT2</i> <i>SLC7A6</i>	NM_001076785.1	F: CCCACACCCACCTACCATCT R: CTGAGCCGATCATGTTGCC	160	2.06 ± 0.07	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>
<i>DMT1</i> <i>SLC11A2</i>	NM_000617	F: GTGGTCAGCGTGGCTTATCTG R: GATGCTTACCGTATGCCACAGT	102	1.84 ± 0.05	Balusikova <i>et al.</i> , 2009

#### 4.1.2. Silenciamiento génico transitorio de transportadores específicos mediante la técnica de siARN (ARN pequeño de interferencia)

Calatayud *et al.* (2012b) evidenciaron que las células Caco-2 diferenciadas eran poco sensibles a la transfección, motivo por el cual en esta tesis se han empleado células Caco-2 no diferenciadas (24 horas post-siembra).

Fue necesario confirmar la expresión de los transportadores de interés en células no diferenciadas. Para ello, las células Caco-2 se sembraron a una densidad  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos utilizando DMEMc como medio de cultivo. Transcurridas 24 horas desde la siembra, se llevó a cabo un estudio de expresión génica en el que se evaluó la posibilidad de detectar *DMT1*, sistema *b<sup>0+</sup>* y sistema *B<sup>0+</sup>*. Tras este primer ensayo se realizó la transfección con los siARN descritos en la tabla 4 (QIAGEN y Life Technologies, España).

Para la transfección, las células se tripsinizaron, contaron y diluyeron en DMEMc sin antibióticos ni antifúngicos. Se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se incubaron 24 horas en las condiciones estándar de cultivo. Posteriormente se procedió al silenciamiento. Para ello, se diluyó el siARN a una concentración final de 60 nM en medio DMEM sin suplementos y se preparó el reactivo de transfección (Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX, Life Technologies) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El siRNA y el reactivo de transfección se mezclaron en proporción 1:1 y se incubaron durante 5 minutos para permitir la formación de complejos de transfección. Transcurrido este tiempo, la mezcla se adicionó cuidadosamente al cultivo celular (100  $\mu$ L) y se incubó a temperatura ambiente. El silenciamiento se evaluó a las 24 horas mediante el análisis de la expresión génica tras extracción de ARN,

retrotranscripción y cuantificación por qPCR tal y como se describe en los apartados 4.1.4 a 4.1.7.

El silenciamiento se monitoreó adicionalmente mediante la observación en el microscopio óptico del cultivo celular transfectado con un control de muerte celular (All Start HS Cell Death Control siARN, QIAGEN). En todos los ensayos se sembraron en paralelo controles de células cultivadas en medio DMEMc sin reactivo de transfección ni siARN.

En las células transfectadas y en los controles se llevaron a cabo estudios de acumulación celular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg a las 24 horas postransfección. Para ello, tras retirar el medio y lavar las células con HBSS-HEPES, las células se expusieron durante 1 hora a las formas mercuriales preparadas en HBSS-HEPES. Para el estudio del transportador DMT1, la exposición a Hg(II) (1 mg/L) se llevó a cabo a pH 5.5. Para los transportadores de aminoácidos b<sup>0,+</sup> y B<sup>0,+</sup> la exposición a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (1 mg/L) se llevó a cabo a pH 7.2 en presencia de 2.5 μM de L-Cys. Las células y los medios apicales y basolaterales se recuperaron para llevar a cabo la cuantificación del mercurio (apartado 8).

**Tabla 4.** Secuencia de los ARN de interferencia empleados en los ensayos de silenciamiento.

<b>siRNA</b>	<b>Gen</b>	<b>GenBank</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
Hs_SLC11A2_14 QIAGEN	<i>DMT1</i> <i>SLC11A2</i>	NM_000617	F: CCACCAUGACAGGAACCUATT R: UAGGUUCCUGUCAUGGUGGAG
Hs_SLC11A2_7 QIAGEN	<i>DMT1</i> <i>SLC11A2</i>	NM_000617	F: AGGAGUACUUCGCCACUUATT R: UAAGUGGGCGAAGUACUCCUCT
Hs_SLC7A9_3 QIAGEN	<i>System b<sup>0,+</sup></i> <i>SLC7A9</i>	NM_001126335	F: UGUUCAUCUCGACAGUGAATT R: UUCACUGUCGAGAUGAACAAG
Hs_SLC7A9_7 QIAGEN	<i>System b<sup>0,+</sup></i> <i>SLC7A9</i>	NM_001126335	F: CGUGAUGACUGCCACCGAATT R: UUCGGUGGCAGUCAUCACGGT
Hs_SLC6A14_3 QIAGEN	<i>System B<sup>0,+</sup></i> <i>SLC6A14</i>	NM_007231	F: CAAUAGU AACUCACUGUAATT R: UUACAGUGAGUUACUAUUGGT
s22220 Life technologies	<i>System B<sup>0,+</sup></i> <i>SLC6A14</i>	NM_007231	F: GGGACAAUUGCUAGCUUATT R: UAAGCUAGCAAAUUGUCCAG

#### *4.1.3. Inhibición de la expresión del transportador DMT1 mediante el empleo de hepcidina y su efecto sobre la acumulación y el transporte de Hg(II)*

Las células se sembraron a una densidad de  $7.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 6 pocillos con insertos Transwell® de membranas de poliéster. Después de la diferenciación (10-12 días post-siembra), las células fueron tratadas durante 2 y 4 horas con 200, 700 y 1200 nM de hepcidina (Peptides International, EEUU) preparada en HBSS-HEPES (pH 7.2). Transcurrido este tiempo las monocapas fueron recogidas para llevar a cabo la evaluación de la expresión génica del *DMT1* mediante RT-qPCR, siguiendo el protocolo descrito en los apartados 4.1.4 a 4.1.7. Las células no tratadas con hepcidina se emplearon como control.

Para evaluar el efecto del tratamiento con hepcidina sobre el transporte de Hg(II) se utilizaron las monocapas tratadas con 1200 nM de hepcidina durante 2 horas. Tras retirar la hepcidina, se adicionaron 1.5 mL de Hg(II) (1 mg/L) preparado en HBSS-HEPES al compartimento apical y 2 mL de HBSS-HEPES al compartimento basolateral. Transcurrido el tiempo de exposición (60 minutos), se recogieron el medio apical, basolateral y la monocapa celular y se analizaron los contenidos de mercurio (apartado 8). La integridad de la monocapa celular durante el ensayo se determinó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.

#### *4.1.4. Extracción del ARN total de los cultivos celulares*

Para la extracción del ARN de las células se utilizó un kit comercial (NucleoSpin ARN II kit; Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 4.1.5. Cuantificación del ARN

El ARN se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se comprobó la calidad del mismo por la relación de absorbancias 260/280 nm (Nanodrop ND-1000). La calidad del ARN se verificó visualmente tras una electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v), comprobándose la presencia de las bandas de ARN ribosómico (18S y 28S). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 80 voltios durante 30 minutos.

#### 4.1.6. Transcripción reversa (RT)

Para obtener el ADNc a partir del ARN total extraído, se realizó una RT empleando el kit comercial (Reverse Transcriptase Core Kit, Eurogentec Headquarters, Cultek, España), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para un volumen final de reacción de 10  $\mu$ L se llevó a cabo la mezcla de reactivos que se muestra en la tabla 5. Se aplicó una etapa inicial de calentamiento a 25 °C durante 10 minutos. La RT se llevó a cabo a 48 °C durante 30 minutos. La inactivación del enzima se realizó por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos.

**Tabla 5.** Reactivos empleados en la retrotranscripción.

Componente	Volumen ( $\mu$ L)	Concentración final
10X tampón de reacción	1	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2	5 mM
2.5 mM dNTP	2	500 $\mu$ M
Oligo dT	0.5	2.5 $\mu$ M
Inhibidor RNAsas	0.2	0.4 U/ $\mu$ L
Retrotranscriptasa (EuroScript RT)	0.25	1.25 U/ $\mu$ L
Agua libre de RNAsas	3.05	—
Muestra (100 ng/ $\mu$ L)	1	100 ng ARN total

#### 4.1.7. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

A partir del ADNc obtenido en el apartado anterior, se amplificaron los genes de interés mediante qPCR, empleando para ello el equipo LightCycler® 480 Real-Time q-PCR System (Roche Diagnostics, EEUU). Los reactivos y volúmenes empleados para un volumen final de reacción de 10 µL se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6.** Reactivos empleados en qPCR.

Componente	Volumen
LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (2X)	5 µL
Oligonucleótidos (10 µM)	1 µL
Agua libre de RNAsas y DNAsas	0.5 µL
ADNc	2.5 µL

Las condiciones utilizadas para la reacción qPCR se describen en la tabla 7. En cada ensayo se evaluaron controles sin ADNc para verificar la ausencia de ADN genómico. Las curvas de fusión fueron analizadas tras cada ensayo para confirmar la especificidad del producto obtenido.

El gen de referencia empleado fue el ARN ribosómico 18S (*RN18S*) (F: CATGTGCAAGGCCGGCTTCG; R: GAAGGTGTGGTGCCAGATTT). La curva de eficiencia se calculó empleando 4 diluciones seriadas de ½ sobre una mezcla de células control. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software relative expression software tool, versión 2006 (REST 2006).

**Tabla 7.** Programa empleado para la reacción de qPCR.

<b>Programa</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Calentamiento (hh:mm:ss)</b>	<b>Rampa (°C/s)</b>
Preincubación	1	95	00:05:00	4.4
Amplificación	40	95	00:00:10	4.4
		55	00:00:10	2.2
		72	00:00:20	4.4
Fusión	1	95	00:00:05	4.4
		65	00:01:00	2.2
		97	00:00:20	0.11
Enfriamiento	1	40	00:00:10	0.15

## 4.2. Estudios de identificación de transportadores empleando *S. cerevisiae*

### 4.2.1. Construcción de los plásmidos

Para amplificar la secuencia codificante murina del *DMT1* por PCR se empleó como molde el plásmido pMT2-mDMT1 (donado por el Dr. Jaekwon Lee, Departamento de Bioquímica, Universidad de Nebraska-Lincoln, EEUU) empleando el sistema de PCR *Expand High Fidelity* (Roche Applied Science). Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: DMT1-HindIII-F (5'-TGGAAGCTTACCATGGTGTGGATCCTAAA-3') y DMT1-XhoI-R (3'-TTCCTCGAGTTAGTCATCTGGACACCACT-5'). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler (Eppendorf, España) utilizando tubos PCR-02-C (PCR<sup>®</sup> Tubes) de 0.2 mL. El producto resultante de 1700 pb se purificó a partir de la banda cortada en el gel de agarosa mediante el sistema de purificación Illustra<sup>™</sup> GFX<sup>™</sup> PCR DNA Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este producto y el vector fueron digeridos por las enzimas de restricción HindIII y XhoI y posteriormente ligados dentro del vector de expresión de levadura p415GPD (Mumberg *et al.*, 1995) mediante el sistema Rapid DNA Ligation Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta construcción que expresa el *DMT1* (p415GPD-DMT1), fue utilizada para transformar la levadura silvestre (BY4741) y la levadura XL131 (*smf1 Δsmf2Δ*). Ambas levaduras fueron también transformadas sólo con el vector p415GPD.

La transfección se llevó a cabo utilizando células competentes de la cepa *Escherichia coli* [F- *mrcA Δ(mrr-hsdRMSmcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*] (*One*

*Shot*<sup>®</sup> *TOP10 Competent Cells*, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron a las células competentes *E. coli* las ligaciones obtenidas según el protocolo descrito anteriormente y se dejaron 30 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo se realizó un choque térmico (30 segundos, 42 °C) y se dejaron 2 minutos en hielo. Posteriormente se añadieron 250 µL de medio de crecimiento S.O.C. y se dejaron a 37 °C durante 1 hora. Finalmente se realizó la siembra en medio sólido LBA [Luria Bertani: extracto de levadura 0.5% (m/v), triptona 1% (m/v), NaCl 1% (m/v) y 50 µg/mL de ampicilina] y se mantuvo a 37 °C durante una noche hasta la observación de las colonias.

Se aislaron plásmidos de varios transformantes mediante el kit de extracción de plásmidos GenElute<sup>™</sup>HP Plasmid-Miniprep (Sigma). El fragmento de ADN clonado se secuenció en los servicios centrales de apoyo de la Universidad de Valencia (SCSIE).

#### *4.2.2. Transformación de levaduras*

Las transformaciones de *S. cerevisiae* con plásmidos se llevaron a cabo siguiendo el método de transformación con acetato de litio descrito por Gietz y Woods (2002). Se inoculó una colonia de la cepa a transformar en 3 mL de YPD y se mantuvo toda la noche en un agitador orbital a 30 °C y 190 rpm. Se inoculó nuevamente a una densidad óptica de 600 en un matraz de 10 mL y se incubó durante 5 horas a 30 °C en un agitador orbital a 190 rpm. Posteriormente, se recogieron las células a una densidad óptica de 10 mediante centrifugación (4000 rpm, 1 minuto), se lavaron con 5 mL de agua destilada estéril y se resuspendieron en 1 mL de 1xTE (tampón Tris-EDTA). A continuación, se transfirieron a eppendorfs y se centrifugaron nuevamente (10000 rpm, 30 segundos) eliminando el sobrenadante.

El pellet se resuspendió en una solución de acetato de litio (0.1 M) preparada en 1xTE, se añadieron 25  $\mu$ L de ADN carrier de cadena simple (2 mg/mL) y 1  $\mu$ L del ADN para transformar (10 ng). Posteriormente se adicionaron 1.2 mL de una solución 40% de glicol de polietileno y 0.1 M de acetato de litio preparado en 1xTE y la mezcla se incubó a 30 °C durante 30 minutos con agitación suave. A continuación, se aplicó un choque térmico (10 minutos, 42 °C), seguido de enfriamiento en hielo durante 1 minuto. Se recogieron las células por centrifugación (10000 rpm, 1 minuto) y se resuspendieron en 200  $\mu$ L de agua estéril. Finalmente, se sembraron en placas con medio selectivo en ausencia de leucina (SC-leu) [base nitrogenada para levadura sin aminoácidos y sulfato amónico 0.17% (m/v) (Difco), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5% (m/v), glucosa 2% (m/v) y los correspondientes suplementos Kaiser (ForMedium<sup>TM</sup>)] y se dejaron a 30 °C hasta la observación de colonias (2-3 días). Los transformantes obtenidos se purificaron dos veces por triple estría con el fin de partir de una colonia procedente de una única célula transformada.

#### 4.2.3. Ensayos de acumulación de Hg(II) y manganeso [Mn(II)] en *S. cerevisiae*

El patrón de Hg(II) se preparó a partir de la disolución comercial de Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. El patrón de Mn(II) fue preparado a partir de la disolución comercial de Mn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Merck). Ambos fueron diluidos en medio SC-leu. Las levaduras se crecieron toda la noche a 30 °C en agitación (190 rpm). Posteriormente, fueron diluidas a una A<sub>600</sub> de 0.2 en el caso de los transformantes con BY4741 y de 0.4 en el caso de los transformantes con *smf1Δsmf2Δ* y se expusieron durante 7 y 24 horas a 30  $\mu$ M de Mn(II) o 20  $\mu$ M de Hg(II). Transcurrido el tiempo de exposición, las levaduras se

recogieron a una densidad óptica de 50. El pellet se centrifugó a 10000 rpm durante 3 minutos con 1 mL de NaCl 0.9% (m/v) con el fin de eliminar restos de metal. Los distintos pellets se conservaron a -20 °C hasta la cuantificación de mercurio y manganeso (apartado 8 y 9).

## **5. Evaluación de la influencia del modelo *in vitro* de epitelio intestinal y los factores existentes en el lumen sobre la permeabilidad y acumulación del Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg**

En la presente tesis doctoral, además de caracterizar los mecanismos de transporte se han iniciado estudios encaminados a determinar qué factores pueden afectar el transporte y la acumulación intestinal de las formas mercuriales. En primer lugar, se ha evaluado la influencia de la incorporación de otro tipo celular presente en el epitelio intestinal (células HT29-MTX secretoras de mucus) sobre el coeficiente de permeabilidad aparente y la acumulación celular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Asimismo, se ha analizado la influencia de factores presentes en el tracto intestinal de forma habitual o tras la ingesta de alimentos (componentes mayoritarios de las sales biliares, L-Cys y componentes alimentarios) sobre el proceso absorbivo de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg.

## 5.1. Influencia del modelo celular sobre el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

### 5.1.1. Ensayo de transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg empleando co-cultivos Caco-2/HT29-MTX

La siembra se realizó a una densidad de  $5.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en sistemas Transwell<sup>®</sup>, ensayándose distintas proporciones de los co-cultivos Caco-2/HT29-MTX (70/30 y 50/50). Se utilizó medio HT-DMEMc, adicionando 1.5 mL al compartimento apical y 2 mL al compartimento basolateral. Las células se mantuvieron hasta alcanzar la diferenciación celular (10-12 días post-siembra). Previo al ensayo, las células se acondicionaron durante 15 minutos con HBSS-HEPES. Posteriormente, se retiró este medio y se adicionaron 1.5 mL de Hg(II) o CH<sub>3</sub>Hg (0.8 mg/L) preparados en HBSS-HEPES al compartimento apical y 2 mL de HBSS-HEPES al compartimento basolateral. Los ensayos se realizaron en condiciones estándar (37 °C, pH 7.2) en dirección A-B. Durante el tiempo de exposición se recogieron alícuotas de 600 µL a los tiempos estipulados (5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos). Tras finalizar el ensayo (120 minutos) se recogieron los medios apicales y las células para llevar a cabo la cuantificación de mercurio (apartado 8) y el cálculo del P<sub>app</sub> (apartado 3.3) y de la retención celular.

En todos los ensayos se evaluó la integridad de la monocapa celular mediante la medida de la RET y la determinación de la viabilidad celular, tal y como se describe en el apartado 3.2. Las monocapas formadas por los co-cultivos se consideraron íntegras, y por tanto, los ensayos de transporte válidos, cuando: a) los cambios de los valores de RET no fueron superiores al 25% respecto a los valores iniciales y b) cuando la viabilidad celular al final del ensayo fue  $\geq 80\%$ .

*5.1.2. Evaluación de la retención celular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en el mucus secretado por las células HT29-MTX*

Para confirmar la posible influencia de la capa de mucus en el transporte de las especies mercuriales, se estudió el contenido de mercurio en el mucus de células HT29-MTX sembradas en placas de 6 pocillos y mantenidas hasta su diferenciación (10-12 días). Transcurrido este tiempo, las monocapas celulares se expusieron a 0.7 mg/L de Hg(II) o CH<sub>3</sub>Hg durante 120 minutos. Tras la exposición, se recuperó el medio, se lavó la monocapa con PBS y el mucus fue separado de la monocapa celular siguiendo el método descrito por Mahler *et al.* (2009) con algunas modificaciones. Brevemente, la monocapa se lavó con 1.5 mL de 10 mM de NAC en HBSS a 37 °C con agitación (135 rpm) durante 30 minutos. Posteriormente, el medio de lavado (HBSS + NAC) se recuperó para cuantificar el contenido de mercurio en el mucus secretado por las células HT29-MTX.

Paralelamente se realizaron ensayos de acumulación con monocultivos HT29-MTX a los que previamente al ensayo se les eliminó el mucus mediante lavado con NAC. Tras eliminar el mucus se llevó a cabo el estudio de transporte, exponiendo las células a 0.8 mg/L de Hg(II) o CH<sub>3</sub>Hg durante 120 minutos.

## 5.2. Evaluación de la influencia de factores presentes en el tracto gastrointestinal sobre la permeabilidad y acumulación del Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

### 5.2.1. *Influencia de L-Cys en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg*

Se ensayó el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (0.4 mg/L) en presencia de 5 μM de L-Cys (Merck) en co-cultivos Caco-2/HT29-MTX (70/30) diferenciados, tal y como se había hecho previamente con los monocultivos Caco-2 (apartado 3.11). Durante la exposición se recogieron alícuotas de 600 μL del lado basolateral a distintos tiempos (5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos). En las alícuotas retiradas, en la monocapa celular y en el medio apical recogido al final de la experiencia (120 minutos), se determinó el contenido total de mercurio (apartado 8).

### 5.2.2. *Influencia del ácido taurocólico en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg*

El estudio se llevó a cabo en monocultivos Caco-2 y en co-cultivos Caco-2/HT29-MTX (70/30) diferenciados. Las células se expusieron a una solución estándar de 0.7 mg/L de Hg(II) o CH<sub>3</sub>Hg y 20 mM de ácido taurocólico (Sigma) preparada en HBSS-HEPES durante 120 minutos. Tras la exposición se recogieron los medios apicales y basolaterales para la determinación del contenido de mercurio (apartado 8). También se determinó el elemento en la monocapa celular recuperada por tripsinización.

### 5.2.3. Influencia de la matriz alimentaria en el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Se aplicó un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* a muestras de pez espada (*Xiphias gladius*), siguiendo el protocolo descrito por Laparra *et al.* (2004) (figura 5).

*Etapa gástrica.* Se pesaron en un erlenmeyer 10 g de pez espada y se adicionaron 80 g de agua desionizada. La mezcla se homogeneizó mediante agitación mecánica. Se ajustó el pH a 2 con HCl 6 mol/L (Merck, España) y se adicionó pepsina porcina (Sigma, actividad enzimática 944 U/mg de proteína). Para ello se preparó una disolución de pepsina al 10% (m/v) en HCl 0.1 mol/L y se añadió el volumen necesario para proporcionar  $2 \times 10^{-3}$  g de pepsina/g de muestra, equivalente en las condiciones del método a 0.02 g pepsina/100 g de disolución. Posteriormente se completó el peso hasta 100 g con agua desionizada y el erlenmeyer se selló con Parafilm<sup>®</sup> y se llevó a un baño de agua con agitación (120 movimientos/min) a 37 °C durante 2 horas. Trascurrido este tiempo, el erlenmeyer se enfrió en un baño de hielo durante 10 minutos.

*Etapa intestinal.* Se ajustó el pH del digerido gástrico a 6.5 utilizando NaHCO<sub>3</sub> 1 mol/L (Panreac) y se adicionó pancreatina porcina (Sigma, actividad por mg pancreatina equivalente a 4 x especificaciones de Farmacopea de EEUU: actividad lipasa 944 unidades USP; actividad proteasa 11800 unidades USP; actividad amilasa 11800 unidades USP) y extracto biliar porcino (Sigma, glicina y taurina conjugadas con ácido desoxicólico y otras sales biliares).

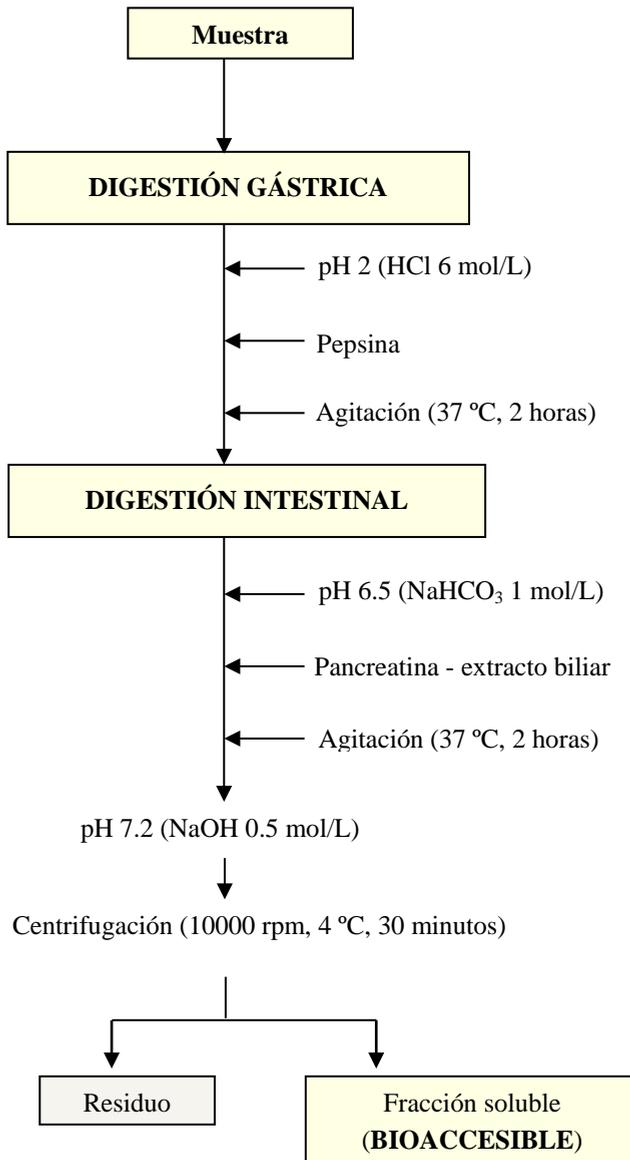
Se preparó una disolución de pancreatina porcina al 0.4% (m/v) y de extracto biliar porcino al 2.5% (m/v) en NaHCO<sub>3</sub> 0.1 mol/L (Sigma). Se adicionó el volumen necesario para proporcionar  $5 \times 10^{-4}$  g de pancreatina/g

de muestra y  $3 \times 10^{-3}$  g de extracto biliar/g de muestra. Estas cantidades equivalen en las condiciones del método a 0.005 g pancreatina/100 g de disolución y 0.03 g de extracto biliar/100 g de disolución. La mezcla se selló con Parafilm® y se incubó nuevamente en agitación (120 movimientos/minuto) durante 2 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, el erlenmeyer se sumergió en un baño de hielo durante 10 minutos. Una vez finalizada la etapa intestinal, se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 0.5 mol/L (Panreac). El digerido obtenido se centrifugó (10000 rpm, 30 minutos, 4 °C) para separar la fracción soluble (bioaccesible) y el residuo.

La fracción soluble procedente de la digestión gastrointestinal no puede adicionarse directamente al cultivo celular. Previamente es necesario inactivar los enzimas proteolíticos utilizados en el proceso y ajustar el pH y la osmolaridad de las fracciones solubles a valores fisiológicos que permitan conservar la integridad de la monocapa celular. Para inactivar las proteasas, la fracción soluble se sometió a un tratamiento térmico a 100 °C durante 4 minutos y posteriormente se sumergió en un baño de hielo durante 10 minutos. A la fracción soluble inactivada, se le adicionó glucosa (5 mM concentración final, Sigma) y HEPES (50 mM concentración final), componentes necesarios para mantener la viabilidad y actividad celular durante los ensayos. Finalmente la osmolaridad se ajustó a valores entre 270-320 mOsmol/kg, mediante la adición de NaCl (Panreac).

Posteriormente, se adicionaron 1.5 mL de las fracciones bioaccesibles con 100 µM de LY al compartimento apical de los co-cultivos Caco-2/HT29-MTX (70/30) y 2 mL de HBSS-HEPES al compartimento basolateral. Las células fueron incubadas durante 60 minutos a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, y 95% de humedad relativa. Tras el tiempo de exposición, las células y los medios apicales y basolaterales fueron recogidos para llevar a cabo la cuantificación del mercurio (apartado 8).

Los porcentajes de retención y de transporte se calcularon con respecto a la cantidad inicial de mercurio adicionada a los cultivos celulares, tras corregir por el número total de células determinado por la tinción de azul de tripano (apartado 3.2). Los resultados de transporte y acumulación del mercurio presente en la fracción bioaccesible se compararon con los hallados para disoluciones patrón de CH<sub>3</sub>Hg preparados en blancos de digestión gastrointestinal a la misma concentración.



**Figura 5.** Esquema del protocolo de digestión gastrointestinal.

## **6. Estudios de toxicidad de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en monocapas epiteliales del intestino en distintos estadios de diferenciación**

Debido a la importante acumulación observada en los cultivos celulares de epitelio intestinal, se planteó llevar a cabo un estudio sobre la toxicidad de las formas mercuriales en estas monocapas celulares. Los ensayos se realizaron con células en dos estadios de diferenciación. Se emplearon células tras 4-5 días de siembra, las cuales habían alcanzado la confluencia y estaban en los estadios iniciales de diferenciación, células que se denominarán indiferenciadas a lo largo de la tesis. Asimismo, se emplearon células tras 10-12 días de siembra, las cuales atendiendo a los criterios empleados se encontraban en estadios avanzados de diferenciación celular. Estas células se denominarán diferenciadas a lo largo de la tesis.

### **6.1. Identificación del estadio de diferenciación**

Las células Caco-2 sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de  $3.9 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> se mantuvieron hasta alcanzar la confluencia o la diferenciación. En ese momento, las células se lavaron con PBS y se recuperaron para la extracción de ARN y posterior obtención de ADNc siguiendo el protocolo descrito en los apartados 4.1.4 a 4.1.6.

Se evaluó la expresión génica del gen *ALPI* (fosfatasa alcalina intestinal) mediante qPCR, tal y como se describe en el apartado 4.1.7. La secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de este gen se muestra en la tabla 8.

## 6.2. Evaluación de viabilidad y tipo de muerte celular (apoptosis vs necrosis)

Las proporciones de células apoptóticas, necróticas y viables se midieron empleando el kit Muse<sup>®</sup> annexin V & dead cell assay (Millipore). Las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de  $3.9 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en DMEMc y transcurrido el tiempo de confluencia o diferenciación se trataron con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (0.1, 0.5, 1 y 2 mg/L). Los patrones de especies mercuriales se prepararon en MEM suplementado. Como control positivo se emplearon células tratadas con estaurosporina 2 μM (Sigma).

Transcurridos los tiempos de exposición estipulados (6 y 24 horas), el medio se eliminó, se lavaron las monocapas celulares con PBS y finalmente las células se recuperaron empleando tripsina-EDTA. La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se eliminó el medio y el precipitado celular obtenido se resuspendió en 1 mL de PBS. Posteriormente se adicionaron 100 μL del reactivo Muse<sup>®</sup> annexin V & dead cell a 100 μL de la suspensión celular y se incubó en oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron empleando el analizador de células Muse<sup>TM</sup> (Millipore).

## 6.3. Evaluación de la actividad mitocondrial

Las células diferenciadas o indiferenciadas, sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de  $2.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, se expusieron a disoluciones de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (0.1, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg/L) preparadas en MEM suplementado. Después de la exposición (4, 6 y 24 horas), el medio fue eliminado y el cultivo se lavó con PBS. Posteriormente, se incubó con 1 mL de la disolución de resazurina y la actividad mitocondrial se determinó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1. Los resultados se

expresaron como porcentajes respecto a la absorbancia de células no tratadas con mercurio.

#### 6.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o nitrógeno (RNS)

Las células Caco-2 se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de  $2.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en DMEMc y se mantuvieron hasta su confluencia o diferenciación, tras lo cual se expusieron a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (0.1, 0.5, 1 y 2 mg/L) preparados en MEM suplementado. Como control positivo se emplearon células tratadas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Prolabo, España).

Después de los tratamientos (4, 6 y 24 horas), el medio fue eliminado y las células fueron lavadas con PBS y posteriormente incubadas a 37 °C durante 30 minutos con una disolución de 2', 7'- diacetato de diclorofluoresceína 100 µM (DCFH-DA, Sigma) preparada en PBS. Transcurrido este tiempo, el medio se eliminó, las células se lavaron con PBS y se lisaron utilizando 140 µL de una disolución de tripsina-EDTA y 20 µL de Tritón X-100 (1% v/v en PBS; Merck). El lisado celular, tras sonicación (10 minutos, 4 °C) y centrifugación (11000 rpm, 3 minutos), fue transferido a una placa de 96 pocillos y la fluorescencia fue determinada mediante un lector de microplacas PolarSTAR OPTIMA a longitudes de onda de excitación/emisión de 488/530 nm. Los valores de fluorescencia obtenidos se normalizaron por contenido total de proteínas cuantificado por el método Bradford (apartado 10) y se expresaron como porcentajes frente a células control no tratadas con mercurio.

### 6.5. Cuantificación de los niveles de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH)

Las células Caco-2 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de  $2.6 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en DMEMc. Se mantuvieron hasta la confluencia o diferenciación y posteriormente se trataron con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (0.1, 0.5, 1 y 2 mg/L) preparados en MEM suplementado. Como control positivo se emplearon células tratadas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los tratamientos se aplicaron durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se retiraron los medios, se recuperaron las células empleando tripsina-EDTA, obteniendo los precipitados celulares tras centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos. La células se trataron con 500 µL de una disolución de ácido 5-sulfosalicílico dihidratado (SSA, Sigma) al 5% (m/v) para conseguir el precipitado de las proteínas y un ciclo de ultrasonidos para favorecer el lisado celular. Posteriormente, el lisado celular se centrifugó a 11000 rpm durante 10 minutos y el precipitado obtenido se diluyó 1/10 con la solución tampón del kit.

La determinación de GSH total (GSH+GSSG) y GSSG se llevó a cabo empleando el kit comercial glutathione colorimetric detection (Arbor Assays, Bionova, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de GSH total y GSSG se calcularon por interpolación frente a curvas de calibrado (GSH: 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 0.781 µM; GSSG: 12.5, 3.125, 1.56, 0.781 y 0.391 µM). Los valores obtenidos se normalizaron respecto al contenido total de proteínas.

#### 6.6. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

El método colorimétrico empleado para la determinación de TBARS se basó en el protocolo descrito por Aviello *et al.* (2011), con ligeras modificaciones. Las células Caco-2 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de  $2.6 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en DMEMc y transcurrido el tiempo de confluencia o diferenciación se trataron con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (0.1, 0.5, 1 y 2 mg/L) preparadas en MEM suplementado. Como control positivo se emplearon células tratadas con 0.5 mM de FeSO<sub>4</sub> (Panreac) y 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tras 30 minutos de exposición, las células se recuperaron empleando tripsina-EDTA, obteniendo un precipitado celular tras centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en 500 µL de SSA 5% (m/v), se sometieron a un ciclo de ultrasonidos a 4 °C durante 10 minutos y se centrifugaron a 11000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente se añadieron 100 µL de ácido tiobarbitúrico (Merck) 0.67% (m/v) a 100 µL del lisado celular y la mezcla se calentó a 80 °C durante 30 minutos. Tras enfriamiento en hielo, los equivalentes de malonaldehído (MDA) se midieron a una longitud de onda de 532 nm utilizando un lector de microplacas PolarSTAR OPTIMA. La cuantificación se llevó a cabo frente a una curva de MDA (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 µM) tratada a 80 °C durante 30 minutos con ácido tiobarbitúrico 0.67%. Los resultados se expresaron como pmoles de equivalentes de MDA/mg proteína y se muestran como porcentajes frente al control no tratado.

### 6.7. Expresión génica de proteínas de estrés, factor de necrosis tumoral y proteínas de las uniones intercelulares

Las células Caco-2 sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de  $3.9 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, tras alcanzar la confluencia o la diferenciación, se expusieron a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (0.5 y 1 mg/L) durante 4, 6 y 24 horas. Tras la exposición, las células se lavaron tres veces con PBS y se recuperaron para la extracción de ARN y posterior obtención de ADNc siguiendo el protocolo descrito en los apartados 4.1.4 a 4.1.6.

La evaluación de la expresión génica se realizó mediante qPCR, tal y como se describe en el apartado 4.1.7. La secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de estos genes se muestra en la tabla 8. El gen de referencia empleado fue 18S ribosomal (*RN18S*).

Los genes evaluados fueron los siguientes:

- Metalotioneína (MT): *MT2A*.
- Proteínas de choque térmico (HSP): *HSP27* y *HSP90*.
- Citoquina proinflamatoria: factor de necrosis tumoral (*TNF- $\alpha$* ).
- Proteínas de las uniones intercelulares: ocludina (*OCLN*), claudina 1 (*CLDNI*), molécula de adhesión celular 1 (*JAMI*) y zonula occludens 1 (*ZOI*).

La expresión de las proteínas constituyentes de las uniones intercelulares sólo se analizó en las células diferenciadas.

**Tabla 8.** Secuencias y eficacias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de proteínas de estrés, marcadores de diferenciación, factor de necrosis tumoral y proteínas de las uniones intercelulares.

Gen	NºGenBank	Secuencia de oligonucleótidos	Amplicón (bp)	Eficacia	Referencia
<i>MT2A</i>	NM_005953	F: AAAGGGGCGTCGGACAAGT R: TAGCAAACGGTCACGGTCAG	126	1.88 ± 0.22	Song y Freedman, 2005
<i>HSPB1</i> ( <i>HSP27</i> )	NM_001540.3	F: ATGGCTACATCTCCCGGTGC R: ACAGGGAGGAGGAAACTTGGG	81	1.81 ± 0.15	Hu <i>et al.</i> , 2008
<i>HSP90AB1</i> ( <i>HSP90</i> )	NM_007355.2	F:GGCAGTCAAGCACTTTTCTGTAG R: GTCAACCACACCACGGATAA	199	1.97 ± 0.37	Yao <i>et al.</i> , 2010
<i>TNFα</i>	NM_000594.3	F: CCCAGGGACCTCTCTCTAATCA R: GCTACAGGCTTGTCACCTCGG	80	1.98 ± 0.2	Uray <i>et al.</i> , 2002
<i>ALPI</i>	NM_001631.3	F: GTGCGACCAGACGTGAATGA R: CCATGACATGCGCTACGAA	175	1.88 ± 0.21	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>
<i>ZO1</i> ( <i>TPJ1</i> )	NM_003257.3	F: CGAGTTGCAATGGTTAACGGA R: TCAGGATCAGGACGACTTACTGG	146	1.73 ± 0.04	Orbán <i>et al.</i> , 2008
<i>CLDN1</i>	NM_021101.4	F: CCGGCGACAACATCGTGAC R: CGGGTTGCTTGCAATGTGC	136	1.66 ± 0.03	Kaarteenaho <i>et al.</i> , 2010
<i>OCLN</i>	NM_002538.2	F: AAGAGTTGACAGTCCCATGGCATA R: ATCCACAGGCCGAAGTTAATGGAAG	133	1.73 ± 0.04	Cui <i>et al.</i> , 2010
<i>JAM1</i> ( <i>F11R</i> )	NM_016946.4	F: GGCATTGGGCAGTGTTACAG R: GTCTCCTTGGTCAAACCTCCAC	134	1.91 ± 0.01	<a href="http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank">http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank</a>

#### 6.8. Evaluación del efecto de las formas mercuriales sobre la permeabilidad de las monocapas intestinales

Las células Caco-2 se sembraron en placas de 12 pocillos con insertos de membrana de poliéster (12 mm diámetro, tamaño de poro de 0.4  $\mu\text{m}$ , Transwell®) a una densidad de  $5.3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, añadiendo 0.5 mL de DMEMc al lado apical y 1.5 mL al compartimento basolateral. Tras 10 días de siembra, las células se expusieron a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (0.5, 1 y 2 mg/L) preparados en MEM suplementado. Como control positivo se utilizó el lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella enterica*, serotipo *typhimurium* (Sigma) a una concentración de 50 ng/mL. Todos los tratamientos se administraron junto al marcador LY, adicionado a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  en el compartimento apical al inicio de la experiencia tanto en los pocillos control (sin mercurio o LPS) como en los pocillos tratados con mercurio o LPS. Durante el tratamiento se recogieron alícuotas (50  $\mu\text{L}$ ) del medio basolateral a los tiempos estipulados (2, 4, 6 y 8 horas) y se sustituyeron por un volumen igual de MEM suplementado.

La integridad de la monocapa celular se determinó evaluando la RET, el transporte de LY y la viabilidad celular tal y como se describe en el apartado 3.2.

#### 6.9. Evaluación de la distribución del citoesqueleto y la morfología de las uniones estrechas

Las células Caco-2 se sembraron en DMEMc sobre cubreobjetos redondos (20 mm de diámetro) colocados sobre placas de plástico de 12 pocillos. La densidad de siembra fue de  $5.3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Tras 10 días, las células se expusieron durante 24 horas a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (0.5, 1 y 2 mg/L) preparados en MEM suplementado. Posteriormente, las monocapas se

lavaron con PBS-CMF, se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v en PBS-CMF) y se permeabilizaron con 0.1% de Tritón X-100 (v/v en PBS-CMF).

Para la observación de la actina filamentosa (F-actina), la tinción se llevó a cabo con 400  $\mu$ L de faloidina conjugada con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC, Sigma) (100  $\mu$ g/mL) durante 20 minutos en oscuridad. Tras este tiempo se lavó la monocapa con PBS-CMF y se trató con una disolución 5  $\mu$ g/mL de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) durante 10 minutos.

Para la inmunolocalización de ZO1, las células fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C con un anticuerpo policlonal anti-ZO1 (Santa Cruz Biotechnology, Épica, España) diluido 1:100 en 2% (v/v) de suero de cabra (Santa Cruz Biotechnology). Para la detección, las células fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo anti-conejo tipo IgG generado en cabra y conjugado con Alexa 488 (Millipore), diluido 1:200 en 2% (v/v) de suero de cabra, seguido de una incubación con DAPI (1:500 diluido en PBS-CMF) durante 5 minutos.

Finalmente las muestras se montaron en ProLong<sup>®</sup> Antifade (Molecular Probe, Invitrogen) y se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon eclipse 90i (DAPI:  $\lambda$  excitación = 340 nm;  $\lambda$  emisión = 485 nm; TRITC:  $\lambda$  excitación = 540 nm;  $\lambda$  emisión = 605 nm; Alexa 488:  $\lambda$  excitación = 488 nm;  $\lambda$  emisión = 519 nm).

## 7. Estudios *in vivo* de acumulación y efectos sobre los transportadores del epitelio gastrointestinal de la exposición a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

### 7.1. Tratamientos y recolección de muestras

Las ratas Wistar se dividieron en tres grupos de cuatro animales. El primer grupo se utilizó como control y a los otros dos se les administró por sonda gástrica durante 4 días una dosis de 5 mg/kg peso corporal/día de HgCl<sub>2</sub> o CH<sub>3</sub>HgCl.

Los animales fueron sacrificados 3-4 horas después del último tratamiento. Inmediatamente se extrajo el tracto gastrointestinal y se lavó abundantemente con solución fisiológica (0.9% m/v NaCl en agua destilada). Tras separar los distintos tramos (estómago, yeyuno y colon), una porción de cada uno de ellos fue procesada para la extracción de las proteínas. El resto fue liofilizado para la determinación de mercurio (apartado 8).

### 7.2. Estudio de expresión proteica de transportadores en los distintos tramos gastrointestinales

Para la detección de proteínas mediante *western blot* se homogenizaron los fragmentos de la mucosa de las diferentes partes del tracto gastrointestinal en una disolución con 250 mM sacarosa (Sigma), 1 mM EDTA (Sigma), 10 mM Tris-HCl pH 7.6 (Sigma), 0.1 mg/mL de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) (Sigma), 100 mM de β-mercaptoetanol (Sigma) y un inhibidor de proteasa (Sigma). Las concentraciones de proteína de las distintas muestras se determinaron mediante el método de Bradford (apartado 10).

Los homogeneizados se solubilizaron en tampón de Laemmli (Laemmli, 1970) para obtener una concentración de 1% y posteriormente 30 µg de

proteínas se sometieron a electroforesis en gel de 12.5% SDS-poliacrilamida y se transfirieron a una membrana Hybond-P PVDF (GE Healthcare, Italia) por electroelución toda la noche. Tras la transferencia, las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau (Sigma) al 0.15% como control de carga. A continuación, las membranas se bloquearon con 5% (m/v) de leche en polvo desnatada en tampón salino con 0.1% de Tween 20 durante una hora. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo primario (tabla 9). Posteriormente, se lavaron y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG, Chemicon, Italia) diluido 1:100000 en solución de bloqueo. Las bandas obtenidas se detectaron con el sistema ECLTM Avance Western Blot (GE Healthcare). El análisis densiométrico de las bandas se llevó a cabo con el programa Total Lab V 1.11 (Amersham Biosciences). Se empleó el anticuerpo de conejo anti  $\beta$ -actina como referencia (1:2000, Rockland Immunochemicals for Research, EEUU).

**Tabla 9.** Anticuerpos policlonales empleados en los estudios *in vivo*.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
Goat polyclonal IgG anti-DMT1	1/500	Santa Cruz Biotechnology
Goat polyclonal IgG anti- $\gamma^+$ LAT1	1/500	Santa Cruz Biotechnology
Goat polyclonal IgG anti-LAT2	1/500	Santa Cruz Biotechnology
Goat polyclonal IgG anti-OATP 1/3	1/500	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit polyclonal IgG anti-AQP3	1/500	Millipore
Rabbit polyclonal IgG anti-AQP4	1/200	Alpha Diagnostic International, EEUU
Rabbit polyclonal IgG anti-AQP7	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit polyclonal IgG anti-AQP8	1/300	Alpha Diagnostic International
Rabbit polyclonal IgG anti-AQP6	1/100	Alpha Diagnostic International

## 8. Determinación de mercurio

Las muestras se sometieron a un proceso de digestión en horno de microondas. Se colocaron en reactores de Teflón® PFA y se adicionó 1 mL de HNO<sub>3</sub> 14 mol/L (Merck) y 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v, Panreac). Los reactores se irradiaron en un horno de microondas (MARS) de CEM (Vertex, Spain) a 800 W de potencia durante 15 minutos. Tras la digestión, los digeridos se colocaron en tubos de 15 mL y se dejaron reposar durante toda la noche con el fin de eliminar los vapores nitrosos que pudieran interferir en la lectura. Posteriormente se llevaron a un volumen final de 10 mL con 0.6 mol/L de HCl.

La cuantificación de mercurio se llevó a cabo mediante CV-AFS (PSA 10.025 Millenium Merlin, PS Analytical, Reino Unido). Las condiciones analíticas utilizadas para la cuantificación se detallan en la tabla adjunta:

**Tabla 10.** Condiciones experimentales empleadas en la cuantificación de mercurio mediante CV-AFS.

Disolución reductora	SnCl <sub>2</sub> 2% (m/v) en HCl 15% (v/v). Flujo 4.5 mL/min
Blanco de reactivos	HCl al 5% (v/v). Flujo 9 mL/min
Gas transportador	Argón. Flujo 100 mL/min
Gas de secado	Aire. Flujo 0.3 L/min
Tiempo de demora	15 s
Tiempo de medida	40 s
Tiempo de retorno	60 s
Rango de amplificación	100
Filtro	32

La cuantificación se llevó a cabo frente a una curva de calibrado externa (0.025-2 ng/mL). El control de calidad de la cuantificación se evaluó mediante el análisis de un agua de referencia (RTC, QCI-049-1, LGC Standards, España) con un contenido certificado de mercurio de  $40.8 \pm 0.396$  µg/L.

## **9. Determinación de manganeso**

La digestión de las muestras para la determinación de manganeso se llevó a cabo por horno microondas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 8. La cuantificación se realizó por espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito Zeeman (modelo AAnalyst 600, Perkin-Elmer Hispania, S.A., España).

Se utilizaron tubos de grafito con plataforma de L'vov insertada. El programa del horno de grafito [temperatura (°C)/tiempo de rampa (s)/tiempo de calentamiento (s)] empleado fue el siguiente: secado (110 °C/ 1 s/ 30 s; 130 °C/ 15 s/ 30 s); pirólisis (1300 °C/ 10 s/ 20 s); atomización (1900 °C/ 0 s/ 5 s); limpieza (2450 °C/ 1 s/ 3 s). El modificador de matriz utilizado consistió en una mezcla de 0.005 mg de Pd (Merck) y 0.003 mg Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Fluka Chemie) en 10 µL de HNO<sub>3</sub> (Merck) 1% (v/v).

La cuantificación se llevó a cabo en área de pico y las señales obtenidas se interpolaron en una curva de calibrado externa de manganeso (0-100 µg/L). El control de calidad de la cuantificación se evaluó mediante el análisis de un agua de referencia (RTC, QCI-049-2, LGC Standards, España) con un contenido certificado de manganeso de  $30.4 \pm 0.161$  µg/L.

## **10. Determinación de proteínas**

La determinación de la concentración proteica se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) aplicando el protocolo especificado por el fabricante (Bio-Rad laboratorios, España). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 595 nm mediante un lector de microplacas PolarSTAR OPTIMA. Los resultados se interpolaron frente a una curva de calibrado de albúmina de suero bovino (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.4 y 0.5 mg/mL).

## **11. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores con comparaciones múltiples post hoc empleando el test HSD de Tukey o mediante el test t-student (SigmaPlot versión 12). Las diferencias se consideraron significativas para  $p < 0.05$ .

## *Resultados y discusión*



## *Capítulo 1*

---

**Caracterización *in vitro* del transporte y  
acumulación intestinal de especies mercuriales**



La principal vía de exposición a mercurio para el hombre es la dieta, donde este elemento se encuentra principalmente como mercurio inorgánico [Hg(II)] o metilmercurio (CH<sub>3</sub>Hg). El proceso de absorción intestinal es, por lo tanto, una etapa clave en su entrada a la circulación sistémica y debe ser considerado en la evaluación del riesgo. A pesar de que el epitelio intestinal constituye la primera barrera para la entrada de este elemento traza tóxico en el organismo, existen pocos estudios que caractericen el transporte del mercurio en células intestinales (Aduayom *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2012).

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en el estudio *in vitro* llevado a cabo con el fin de caracterizar el transporte intestinal de las formas mercuriales. Se ha evaluado la permeabilidad aparente, el transporte y la acumulación celular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg utilizando la línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal. Esta caracterización se ha llevado a cabo modificando las condiciones de ensayo (apertura de uniones intercelulares, pH, temperatura, inhibición del metabolismo celular, creación de un gradiente de sodio, presencia de grupos cisteína). Adicionalmente, se han sustituido los cultivos celulares por membranas artificiales (ensayos PAMPA) para evaluar la participación de un mecanismo de difusión pasiva transcelular. Finalmente, se han realizado ensayos de inhibición empleando sustratos o inhibidores específicos con el fin de evaluar si determinadas familias de transportadores participan en el transporte transcelular de las formas mercuriales.

## **RESULTADOS**

### **1. Evaluación previa de la viabilidad celular mediante la determinación de la actividad mitocondrial**

Tal y como se ha comentado en metodología, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad previos al diseño de los estudios de transporte con el fin de trabajar en condiciones subletales. Los resultados de viabilidad de las células Caco-2 expuestas a 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 y 5 mg/L de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 4 y 24 horas, muestran que a tiempos cortos sólo se producen descensos de viabilidad para las concentraciones más altas de Hg(II) ( $\geq 2$  mg/L), sin que estos descensos puedan considerarse importantes ( $<20\%$ ). A las 24 horas se producen reducciones importantes de viabilidad tras exposiciones a concentraciones  $\geq 2$  mg/L para ambas especies mercuriales. Teniendo en cuenta que en los ensayos de transporte se trabaja a tiempos inferiores a 4 horas, se puede considerar que trabajar a concentraciones iguales o inferiores a 5 mg/L no afecta de forma relevante la viabilidad celular.

### **2. Evaluación de la integridad de la monocapa celular Caco-2 en los ensayos de transporte**

En todos los ensayos realizados los valores de RET y la permeabilidad de LY se han mantenido dentro de los límites establecidos para considerar la monocapa íntegra (apartado 3.2 de metodología), exceptuando el ensayo de apertura de las uniones intercelulares donde se persigue aumentar el transporte entre los espacios intercelulares (apartado 4.2). Asimismo, la viabilidad celular al final de cada ensayo ha sido superior al 80%, tal y como era de esperar por los datos previos de viabilidad (apartado 1). Atendiendo a estos resultados, se puede decir que se ha trabajado con monocapas íntegras

y que los cambios observados al variar las condiciones de ensayo no son debidos a una desestructuración de la monocapa celular.

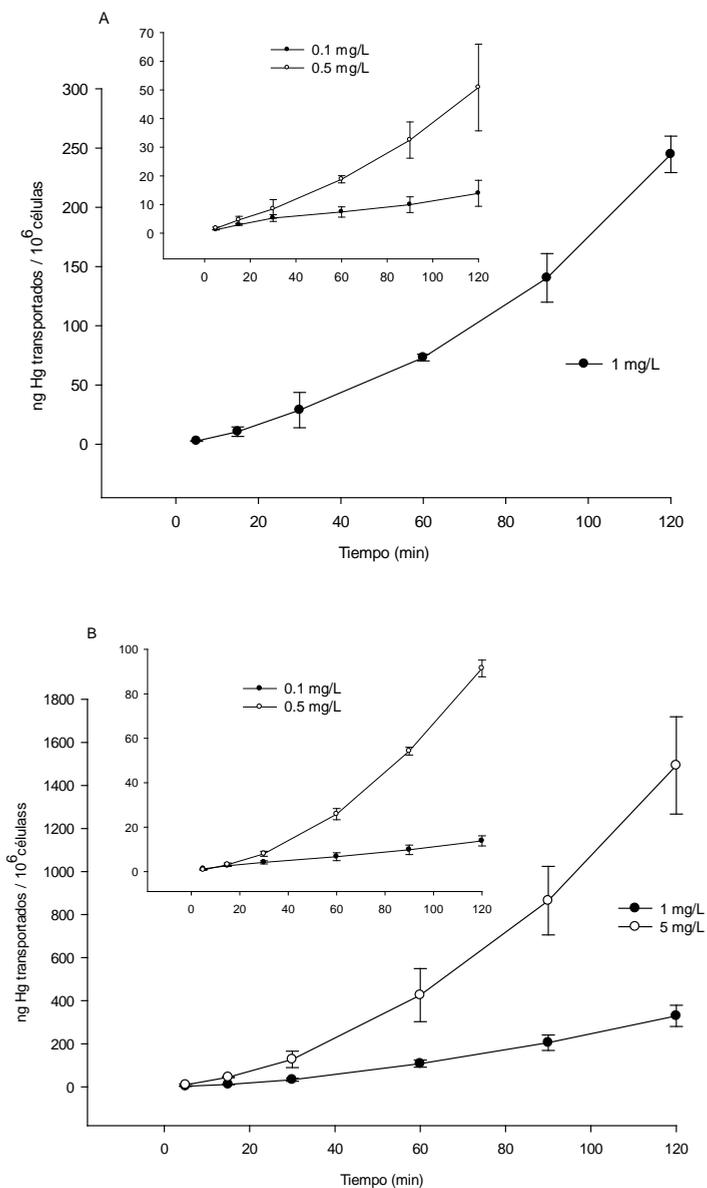
### **3. Transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en células Caco-2**

En todos los ensayos se ha llevado a cabo un balance de masas, comparando la suma de la cantidad de mercurio obtenida en el medio apical, basolateral y en el lisado celular con la adición inicial. La recuperación ha sido satisfactoria, con porcentajes que oscilan entre un 90 y 99% de la concentración de mercurio adicionada.

#### **3.1. Transporte y acumulación celular en dirección apical-basolateral (A-B)**

El estudio en dirección A-B emula el proceso de entrada del elemento desde el lumen intestinal (compartimento apical) hasta la cavidad serosa (compartimento basolateral), indicativo de la cantidad del elemento que puede absorberse y llegar a la circulación sistémica.

La figura 1 muestra el transporte en dirección A-B en función del tiempo tras la exposición de las células Caco-2 a Hg(II) (gráfico A) y CH<sub>3</sub>Hg. (gráfico B). El transporte de ambas especies aumenta con el tiempo, observándose dos pendientes bien diferenciadas, siendo la velocidad del transporte inferior en el primer tramo.



**Figura 1.** Transporte en dirección A-B en función del tiempo en células Caco-2 expuestas a diferentes concentraciones de Hg(II) (0.1, 0.5 y 1 mg/L) (A) y CH<sub>3</sub>Hg (0.1, 0.5, 1 y 5 mg/L) (B). Valores expresados como ng de Hg/10<sup>6</sup> células (media ± desviación estándar, n=3).

Para el Hg(II), el cambio en la velocidad de transporte se produce a los 30 minutos a las concentraciones más elevadas (0.5 y 1 mg/L) y a los 90 minutos para la concentración de 0.1 mg/L. Para el CH<sub>3</sub>Hg, el aumento de la velocidad de transporte se produce a los 30 minutos de exposición para todas las concentraciones ensayadas. En general, el aumento de la velocidad con el tiempo es similar para ambas especies y se incrementa con la concentración (1 mg/L: 7-9 veces; 0.5 mg/L: 5 veces; 0.1 mg/L: 2 veces). Este aumento en el transporte, tal y como se ha comentado anteriormente, no obedece a cambios en la RET de la monocapa.

La tabla 1 muestra los porcentajes de mercurio total en los compartimentos basolateral, apical y en el interior celular de las monocapas tras 2 horas de exposición a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg.

**Tabla 1.** Porcentaje de mercurio en el medio apical, basolateral y en el interior celular tras 2 horas de exposición de las células Caco-2 a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en dirección A-B. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) con respecto a la concentración inmediatamente inferior.

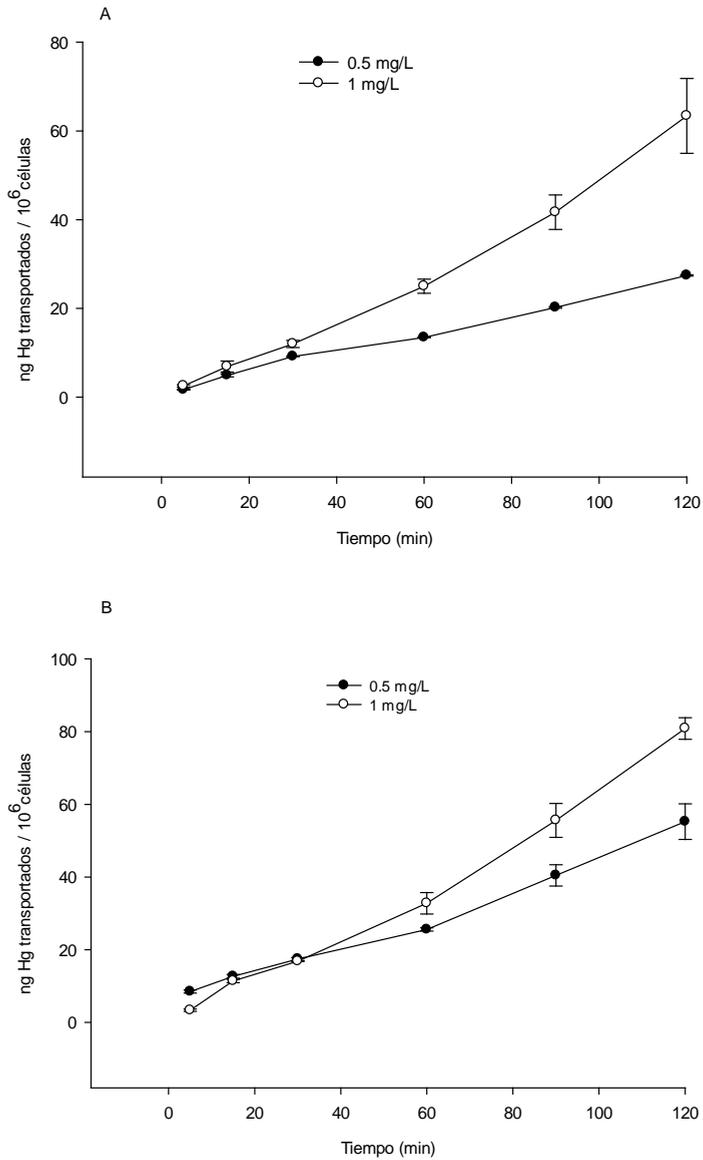
	<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>Apical (%)</b>	<b>Celular (%)</b>	<b>Basolateral (%)</b>
Hg(II)	0.1	79.0 $\pm$ 0.6	21.4 $\pm$ 1.4	11.0 $\pm$ 2.1
	0.5	37.0 $\pm$ 0.4*	45.6 $\pm$ 1.7*	9.0 $\pm$ 2.4
	1	24.2 $\pm$ 4.4*	51.2 $\pm$ 3.0	20.1 $\pm$ 4.6*
CH <sub>3</sub> Hg	0.1	47.2 $\pm$ 6.2	48.1 $\pm$ 2.9	8.9 $\pm$ 0.2
	0.5	25.4 $\pm$ 0.4*	67.2 $\pm$ 0.5*	12.4 $\pm$ 0.4*
	1	20.2 $\pm$ 1.2*	71.3 $\pm$ 8.9	20.9 $\pm$ 0.1*
	5	10.4 $\pm$ 0.9*	78.1 $\pm$ 3.4	19.7 $\pm$ 1.1

A igualdad de concentraciones, el transporte al lado basolateral es similar para ambas especies [Hg(II): 9-20%; CH<sub>3</sub>Hg: 9-21%]. Es destacable la elevada acumulación celular de ambas formas mercuriales, la cual aumenta al aumentar la concentración de mercurio, si bien el incremento únicamente es significativo entre 0.1 y 0.5 mg/L. Los valores de retención celular son superiores para el CH<sub>3</sub>Hg en todas las concentraciones ensayadas. De forma general, no se observa un incremento lineal de la acumulación de mercurio con el aumento de la concentración de exposición.

### 3.2. Transporte y acumulación celular en dirección basolateral-apical (B-A)

El estudio en dirección B-A emula el proceso de eliminación al lumen intestinal de un determinado compuesto (sentido secretorio) y, por tanto, la cantidad del mismo que no llega a la circulación sistémica tras su absorción.

La figura 2 muestra el transporte en dirección B-A en función del tiempo tras la exposición de las células Caco-2 a Hg(II) (gráfico A) y CH<sub>3</sub>Hg (gráfico B). Al igual que sucedía en dirección A-B, se observa un comportamiento bifásico con dos pendientes bien diferenciadas, presentando el primer tramo la menor velocidad de transporte. Para el Hg(II), el aumento en la velocidad de paso tiene lugar entre los 30 minutos (1 mg/L) y los 60 minutos (0.5 mg/L), mientras que para el CH<sub>3</sub>Hg tiene lugar a los 60 minutos, independientemente de la concentración ensayada.



**Figura 2.** Transporte en dirección B-A en función del tiempo en células Caco-2 expuestas a 0.5 y 1 mg/L de Hg(II) (A) y CH<sub>3</sub>Hg (B). Valores expresados como ng de Hg/10<sup>6</sup> células (media ± desviación estándar, n=3).

La tabla 2 muestra los porcentajes de mercurio presentes en el compartimento apical, basolateral y en el interior celular tras la exposición de las células Caco-2 a las formas mercuriales en dirección B-A. La acumulación celular es superior al transporte, siendo los porcentajes inferiores a los observados en dirección A-B. La retención celular y el transporte al lado apical del Hg(II) son inferiores a los del CH<sub>3</sub>Hg.

**Tabla 2.** Porcentaje de mercurio en el medio apical, basolateral y en el interior celular tras 2 horas de exposición de las células Caco-2 a 0.5 y 1 mg/L de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en dirección B-A. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre concentraciones de una misma especie.

	Concentración (mg/L)	Apical (%)	Celular (%)	Basolateral (%)
Hg(II)	0.5	2.30 $\pm$ 0.01	15.6 $\pm$ 1.5	82.5 $\pm$ 3.9
	1	5.3 $\pm$ 0.7*	12.0 $\pm$ 1.4*	81.7 $\pm$ 2.5
CH <sub>3</sub> Hg	0.5	4.6 $\pm$ 0.4	44.7 $\pm$ 1.2	49.4 $\pm$ 0.6
	1	6.7 $\pm$ 0.2*	51.0 $\pm$ 0.6*	46.6 $\pm$ 2.0

### 3.3. Cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) y del ratio de eliminación ( $E_r$ )

Los valores de  $P_{app}$  en condiciones estándar (37 °C, pH 7.2) para el Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en dirección A-B y B-A se muestran en la tabla 3. Los valores de  $P_{app}$  en dirección A-B son mayores para el CH<sub>3</sub>Hg que para el Hg(II) y en ambos casos se incrementan al aumentar la concentración ensayada.

Los valores de  $P_{app}$  en dirección B-A son inferiores a los obtenidos en dirección A-B, dando lugar a  $E_r$  inferiores a 1, indicativo de que el transporte en sentido absorptivo está favorecido frente al secretorio.

**Tabla 3.** Coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app} \times 10^{-6}$ , cm/s) y ratio de eliminación ( $E_r$ ) en células Caco-2 expuestas a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en dirección A-B y en dirección B-A (120 minutos, pH 7.2, 37 °C). Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a la concentración inmediatamente inferior.

	Concentración (mg/L)	$P_{app}$ A-B	$P_{app}$ B-A	$E_r$
Hg(II)	0.1	1.00 $\pm$ 0.13	—	—
	0.5	1.43 $\pm$ 0.51	0.72 $\pm$ 0.01	0.50 $\pm$ 0.05
	1	3.85 $\pm$ 0.32*	1.09 $\pm$ 0.30	0.30 $\pm$ 0.08
CH <sub>3</sub> Hg	0.1	1.62 $\pm$ 0.11	—	—
	0.5	3.13 $\pm$ 0.06*	0.86 $\pm$ 0.20	0.27 $\pm$ 0.05
	1	4.96 $\pm$ 0.02*	0.75 $\pm$ 0.08	0.14 $\pm$ 0.01*
	5	5.37 $\pm$ 0.33*	—	—

### 3.4. Efecto de la albúmina (BSA) en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Teniendo en cuenta el coeficiente de partición octanol/agua se considera que el CH<sub>3</sub>Hg es un compuesto con carácter lipofílico (Halback, 1985), mientras que el Hg(II) es una especie hidrofílica. Se ha puesto de manifiesto que la presencia de BSA en el compartimento basolateral aumenta la permeabilidad de compuestos con carácter lipofílico (Krishna *et al.*, 2001;

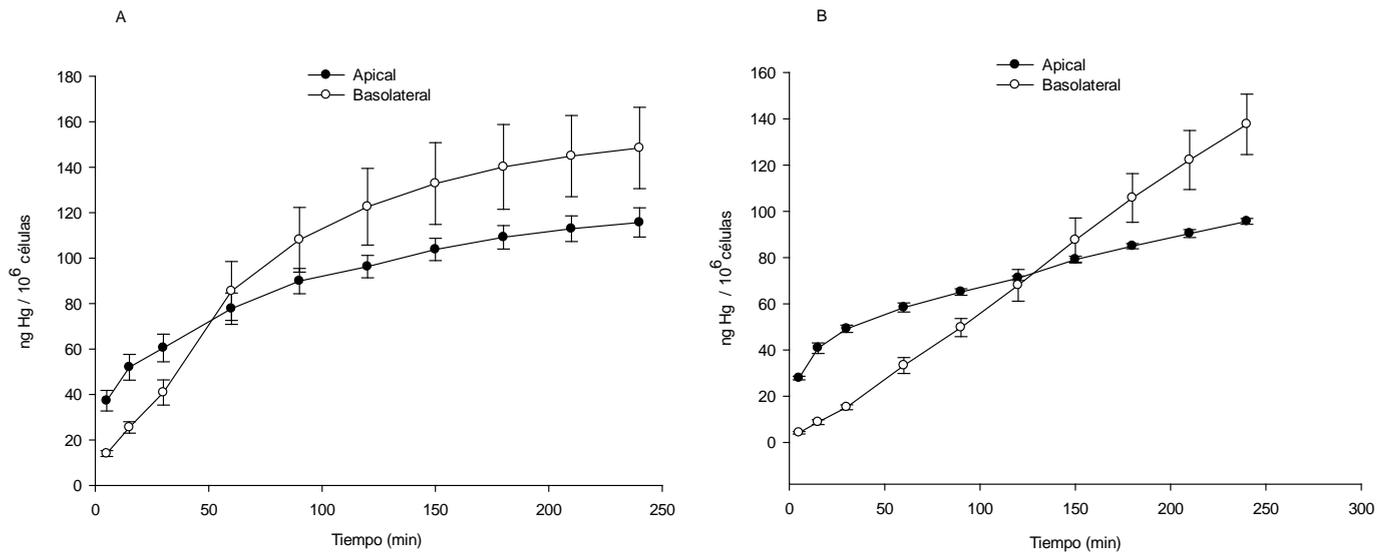
Youdim *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos al incorporar BSA en el medio basolateral ponen de manifiesto que el transporte y la acumulación intracelular de Hg(II) no se modifican. El comportamiento del CH<sub>3</sub>Hg es diferente; se observa un aumento del transporte [sin BSA ( $5.1 \pm 0.2\%$ ), con BSA ( $9.2 \pm 0.2\%$ )] y una disminución de la acumulación celular [sin BSA ( $59 \pm 3.1\%$ ), con BSA ( $52 \pm 2.3\%$ )].

### 3.5. Estudio de la eliminación celular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Las células Caco-2 expuestas durante 60 minutos a 1 mg/L de Hg(II) y 0.8 mg/L de CH<sub>3</sub>Hg, acumulan un alto porcentaje de mercurio [Hg(II):  $45 \pm 3\%$ ; CH<sub>3</sub>Hg:  $50 \pm 2\%$ ]. Por ello se ha considerado de interés estudiar su eliminación hacia el lado basolateral y apical en presencia de un medio de cultivo libre de mercurio. La figura 3 muestra que en estas condiciones existe una eliminación del Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg hacia ambos compartimentos y que ésta aumenta con el tiempo.

Para el Hg(II) (figura 3A), este aumento es lineal hasta los 30 minutos hacia el lado apical y hasta los 60 minutos hacia el lado basolateral. Durante los primeros 30 minutos, la eliminación hacia el lado apical es superior; sin embargo, a tiempos superiores se invierte la tendencia. Tras 4 horas de ensayo, el contenido celular disminuye un  $46 \pm 1\%$ , eliminándose un  $22 \pm 3\%$  hacia el lado basolateral y un  $17 \pm 0.9\%$  hacia el lado apical.

Para el CH<sub>3</sub>Hg (figura 3B), la eliminación hacia el lado basolateral presenta un comportamiento lineal con el tiempo. Tras 4 horas de ensayo, el porcentaje de eliminación hacia el lado basolateral ( $20 \pm 2\%$ ) es mayor que hacia el lado apical ( $14 \pm 0.2\%$ ) y el porcentaje de acumulación celular decrece un  $36 \pm 2\%$ .



**Figura 3.** Eliminación del mercurio durante 240 minutos hacia el compartimento apical (círculos negros) y hacia el compartimento basolateral (círculos blancos) desde células Caco-2 expuestas a 1 mg/L de Hg(II) (A) y 0.8 mg/L de CH<sub>3</sub>Hg (B) durante 60 minutos (pH 7.2, 37 °C). Valores expresados como ng Hg /10<sup>6</sup> células (media ± desviación estándar, n = 3).

#### 4. Estudio de la naturaleza del transporte de las formas mercuriales

##### 4.1. Estudio de los parámetros cinéticos

El análisis de la dependencia de la concentración es uno de los métodos usados para investigar los mecanismos de transporte ya que permite diferenciar el transporte mediado por transportadores del transporte pasivo (Sugano *et al.*, 2010).

La figura 4 muestra el flujo de Hg(II) frente a la concentración tanto en dirección A-B (figura 4A) como B-A (figura 4B). Los parámetros cinéticos calculados para esta especie son los siguientes:

- dirección A-B:  $V_{\max}$ :  $0.033 \text{ pmol/min} \times 10^6 \text{ células}$

$$K_m: 0.467 \text{ } \mu\text{M}$$

$$K_d: 1.45 \times 10^{-18} \text{ } \mu\text{L/min} \times 10^6 \text{ células}$$

- dirección B-A:  $V_{\max}$ :  $0.0305 \text{ pmol/min} \times 10^6 \text{ células}$

$$K_m: 0.599 \text{ } \mu\text{M}$$

$$K_d: 3.45 \times 10^{-18} \text{ } \mu\text{L/min} \times 10^6 \text{ células}$$

Se ha comparado el componente no saturable ( $K_d$ ) y saturable ( $V_{\max}/K_m$ ) del transporte, con el fin de determinar la naturaleza del mismo. Para el Hg(II), los valores de  $V_{\max}/K_m$  (A-B:  $0.0708 \text{ } \mu\text{L/min} \times 10^6 \text{ células}$ ; B-A:  $0.0509 \text{ } \mu\text{L/min} \times 10^6 \text{ células}$ ) son varios órdenes de magnitud superiores a  $K_d$ . Esto sugiere el predominio de un componente saturable en el transporte de Hg(II) en ambas direcciones.

Para el CH<sub>3</sub>Hg (figura 5), los parámetros cinéticos calculados son los siguientes:

- dirección A-B:  $V_{\max}$ : 0.0078 pmol/min  $\times 10^6$  células

$K_m$ : 0.1  $\mu$ M

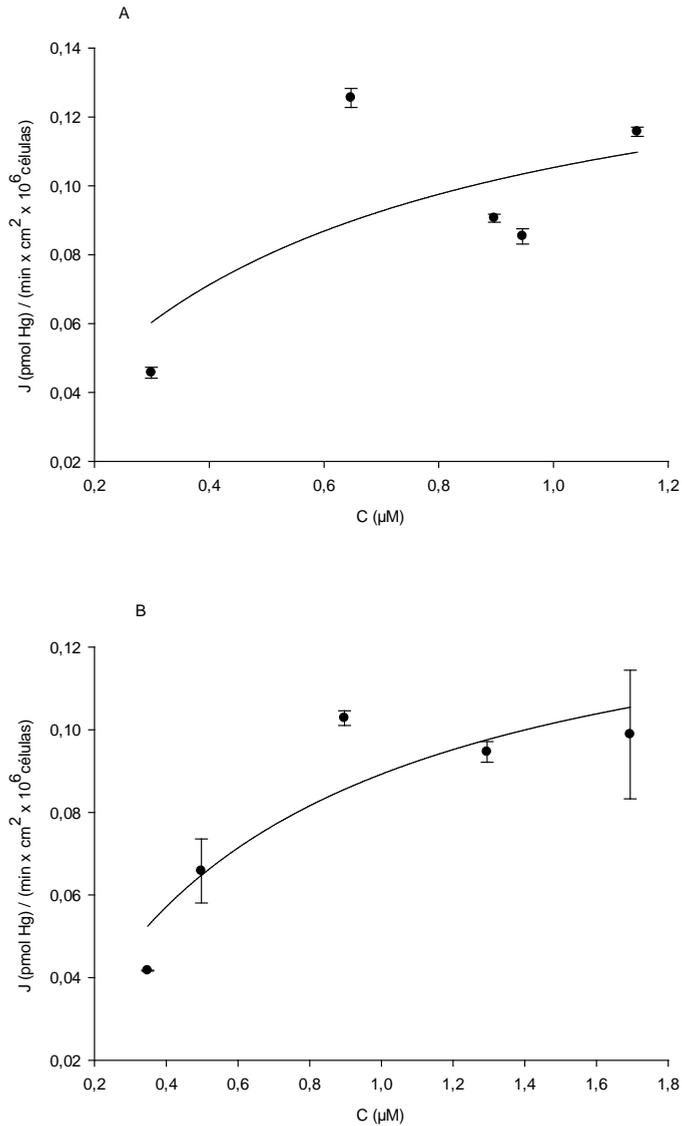
$K_d$ : 0.29  $\mu$ L/min  $\times 10^6$  células

- dirección B-A:  $V_{\max}$ : 0.049 pmol/min  $\times 10^6$  células

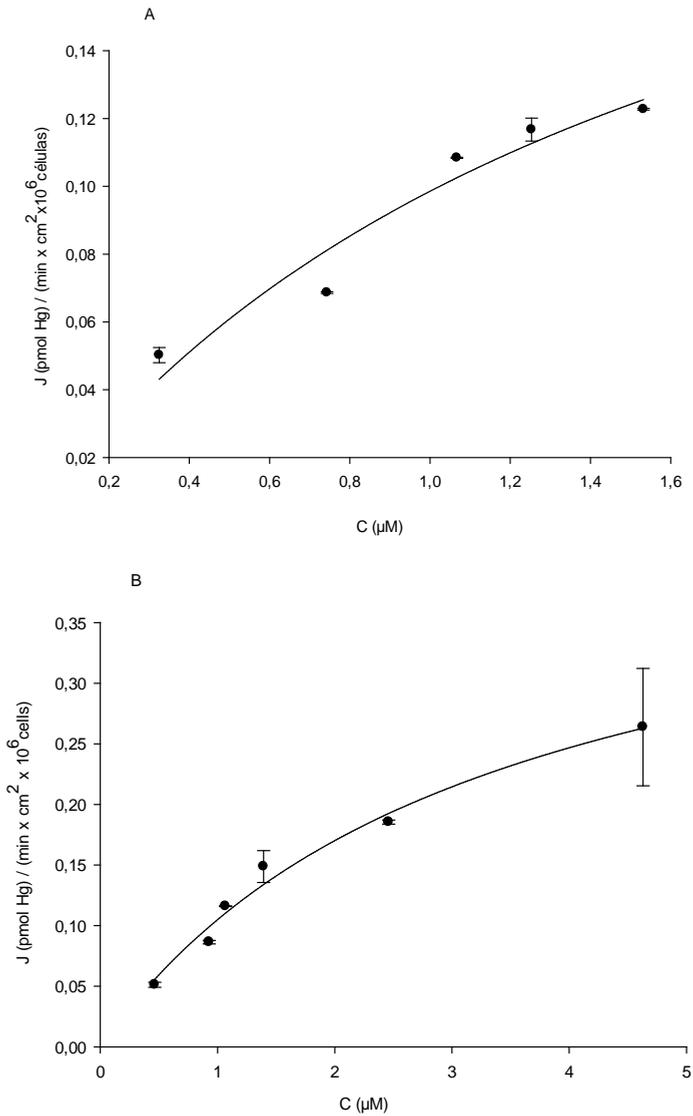
$K_m$ : 1.17  $\mu$ M

$K_d$ :  $1 \times 10^{-17}$   $\mu$ L/min  $\times 10^6$  células

La comparación de  $K_d$  con el componente saturable del transporte en dirección A-B ( $V_{\max}/K_m$ : 0.0855 pmol/min  $\times 10^6$  células) sugiere que cerca del 20% del transporte del CH<sub>3</sub>Hg hacia el lado basolateral se produce a través de un mecanismo de transporte saturable, por lo que en esta dirección predomina un componente no saturable. Para el transporte B-A, el término  $V_{\max}/K_m$  (0.0421 pmol/min  $\times 10^6$  células) es mucho mayor que la constante  $K_d$ , indicando el predominio de un componente saturable.



**Figura 4.** Flujo de Hg(II) frente a la concentración en células Caco-2 (120 minutos, pH 7.2, 37 °C) en dirección A-B (A) y B-A (B). Valores expresados como [(pmol Hg) / (min × cm<sup>2</sup> × 10<sup>6</sup> células)] (media ± desviación estándar, n = 3).



**Figura 5.** Flujo de CH<sub>3</sub>Hg frente a la concentración en células Caco-2 (120 minutos, pH 7.2, 37 °C) en dirección A-B (A) y B-A (B). Valores expresados como [(pmol Hg) / (min × cm<sup>2</sup> × 10<sup>6</sup> células)] (media ± desviación estándar, n = 3).

#### 4.2. Estudio de la participación de la vía paracelular en el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

El efecto de la alteración de las uniones intercelulares sobre la permeabilidad se utiliza como criterio para determinar la preferencia de la ruta paracelular en el transporte (Gan *et al.*, 1993a, 1993b). El estudio del transporte paracelular se ha llevado a cabo mediante la modificación de las uniones intercelulares por adición de 5 mM EDTA, un agente quelante del calcio. La eliminación del Ca<sup>+2</sup> extracelular causa la retracción de las proteínas que forman las uniones estrechas y en consecuencia produce una apertura de los espacios intercelulares (Ma *et al.*, 2000). La monitorización de estas alteraciones se ha llevado a cabo midiendo la permeabilidad de LY, compuesto fluorescente que se transporta principalmente por vía paracelular.

El tratamiento con EDTA produce una apertura importante de las uniones intercelulares, tal y como evidencia el incremento observado en el P<sub>app</sub> del marcador LY,

$$- P_{app} \text{ sin EDTA} = 0.12 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

$$- P_{app} \text{ con EDTA} = 1.44 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

Esta apertura de las uniones intercelulares no se traduce en un aumento del P<sub>app</sub> del Hg(II),

$$- P_{app} \text{ sin EDTA} = 3.8 \pm 0.4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

$$- P_{app} \text{ con EDTA} = 2.8 \pm 0.4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

El P<sub>app</sub> del CH<sub>3</sub>Hg tampoco se ve afectado por esta apertura,

$$- P_{app} \text{ sin EDTA: } 4.9 \pm 0.2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

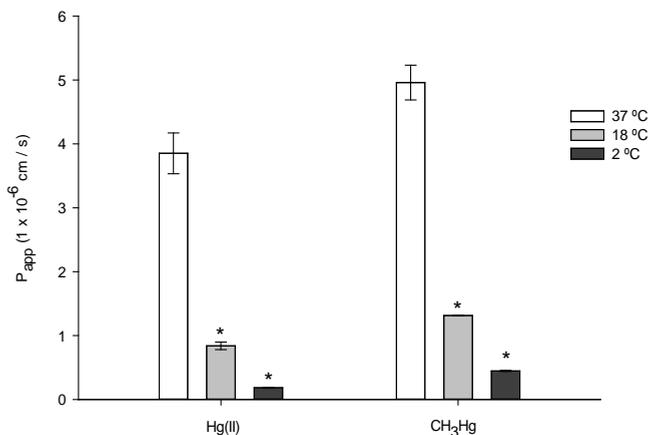
$$- P_{app} \text{ con EDTA} = 3.9 \pm 0.1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

Los resultados obtenidos indican que la vía paracelular no es relevante en el transporte de estas especies de mercurio.

#### 4.3. Participación de mecanismos dependientes de energía en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

##### *4.3.1. Efecto de la temperatura sobre la permeabilidad*

Los procesos celulares dependientes de energía son mínimos entre 0 y 4 °C y, por tanto, una disminución del transporte de un compuesto al disminuir la temperatura puede ser un indicativo de la participación de un transporte activo. La figura 6 muestra los valores de P<sub>app</sub> de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en dirección A-B a distintas temperaturas. Los resultados muestran que una disminución de la temperatura supone un menor transporte. Los porcentajes de reducción son similares para ambas especies [Hg(II): 78 y 95% a 17 y 2 °C respectivamente; CH<sub>3</sub>Hg: 74 y 91% a 17 y 2 °C respectivamente]. La energía de permeación (E<sub>p</sub>), obtenida aplicando la ecuación de Arrhenius a partir de los valores de P<sub>app</sub> calculados a las distintas temperaturas, es de 16 kcal/mol para el Hg(II) y de 12 kcal/mol para el CH<sub>3</sub>Hg.



**Figura 6.** Coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (1 mg/L) en función de la temperatura en células Caco-2 expuestas durante 120 minutos. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a las células incubadas a 37 °C.

#### 4.3.2. Efecto de la inhibición del metabolismo celular sobre la permeabilidad

El tratamiento con azida sódica y 2-desoxiglucosa inhibe el metabolismo y, por tanto, la generación del ATP necesario para el funcionamiento del transporte activo (Artursson *et al.*, 1996). La tabla 4 muestra los valores de  $P_{app}$  obtenidos para el Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en condiciones estándar y tras someter las células a un tratamiento de inhibición metabólica. Los resultados ponen de manifiesto que para ambas especies el tratamiento previo con azida sódica y 2-desoxiglucosa produce una disminución significativa del  $P_{app}$ . La reducción es similar para las dos formas mercuriales, 52% para el Hg(II) y 54% para el CH<sub>3</sub>Hg. La depleción del ATP conlleva además una reducción

de la acumulación celular del Hg(II) (30%), mientras que no afecta los contenidos intracelulares del CH<sub>3</sub>Hg.

**Tabla 4.** Coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app} \times 10^{-6}$  cm/s) y porcentajes de acumulación celular en células Caco-2 expuestas a 1 mg/L de Hg(II) y 0.8 mg/L de CH<sub>3</sub>Hg con o sin tratamiento previo con azida sódica (5 mM) y 2-desoxiglucosa (50 mM). Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) respecto a las células no tratadas con azida sódica y 2-desoxiglucosa.

	<b>Tratamiento</b>	<b><math>P_{app}</math> (<math>1 \times 10^{-6}</math> cm/s)</b>	<b>Acumulación celular (%)</b>
Hg(II)	Sin tratamiento	4.75 $\pm$ 0.46	37.6 $\pm$ 0.4
	Con tratamiento	2.28 $\pm$ 0.14*	26.4 $\pm$ 2.5*
CH <sub>3</sub> Hg	Sin tratamiento	3.33 $\pm$ 0.04	64.1 $\pm$ 5.6
	Con tratamiento	1.52 $\pm$ 0.05*	71.5 $\pm$ 1.6

#### 4.4. Efecto de la concentración de H<sup>+</sup> en la permeabilidad y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

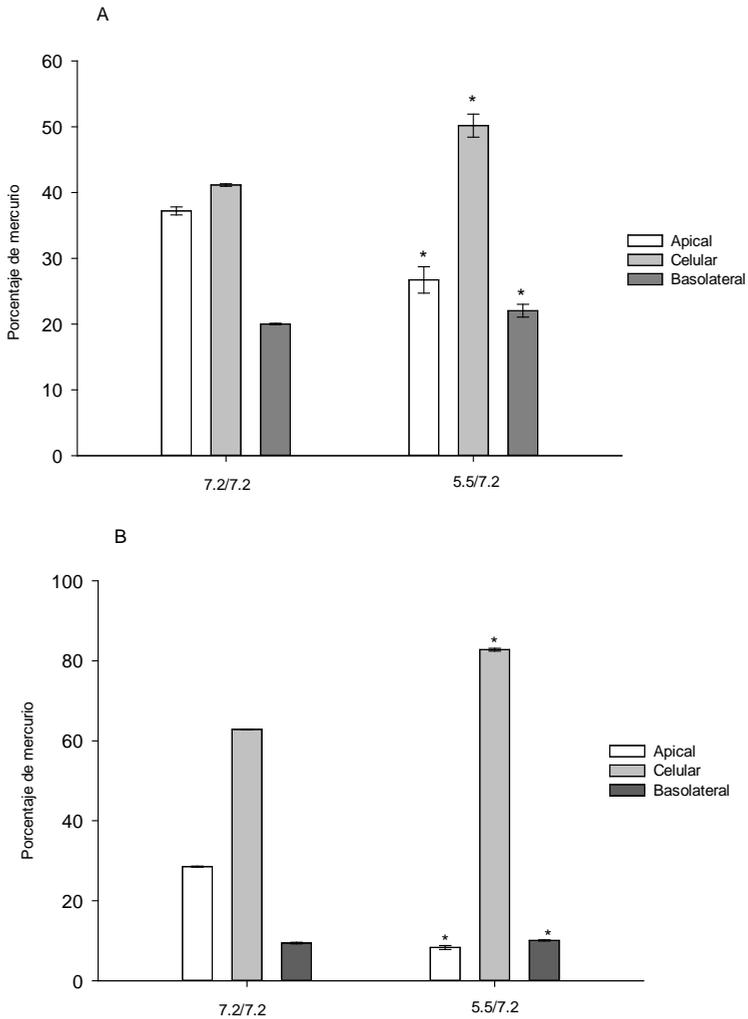
El transporte de solutos contra gradiente de concentración empleando como fuerza motora H<sup>+</sup> es una característica de un número importante de transportadores de mamíferos involucrados en el transporte de pequeñas moléculas (Martín-Venegas *et al.*, 2009). Asimismo, el pH puede variar el estado de ionización de los compuestos y, por tanto, su permeabilidad, especialmente cuando existen mecanismos de difusión pasiva. Con objeto de evaluar el efecto de la concentración de H<sup>+</sup> sobre el transporte y la acumulación del Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg se han llevado a cabo ensayos a diferentes pH en el compartimento apical.

Los resultados obtenidos (tabla 5) muestran que para ambas especies de mercurio una mayor concentración de  $H^+$  en el lado apical, supone un aumento significativo en el  $P_{app}$  en dirección A-B [Hg(II): 23%;  $CH_3Hg$ : 20%].

**Tabla 5.** Coeficientes de permeabilidad aparente en dirección A-B ( $P_{app} \times 10^{-6}$  cm/s) tras 120 minutos de exposición a 1 mg/L de Hg(II) y 0.6 mg/L de  $CH_3Hg$  en diferentes condiciones de pH apical/basal (7.2/7.2; 5.5/7.2). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre ambas condiciones de pH.

	Condición pH	$P_{app}$ ( $1 \times 10^{-6}$ cm/s)
Hg(II)	7.2/7.2	$3.50 \pm 0.03$
	5.5/7.2	$4.6 \pm 0.3^*$
$CH_3Hg$	7.2/7.2	$3.2 \pm 0.3$
	5.5/7.2	$4.0 \pm 0.5^*$

Este aumento de la  $P_{app}$  supone cambios en el transporte y la acumulación celular de Hg(II) (figura 7A) y  $CH_3Hg$  (figura 7B). Un aumento de la concentración de  $H^+$  en el lado apical supone un incremento significativo de la acumulación celular [Hg(II): 18%;  $CH_3Hg$ : 24%] y del transporte al lado basolateral [Hg(II): 10%;  $CH_3Hg$ : 7%].

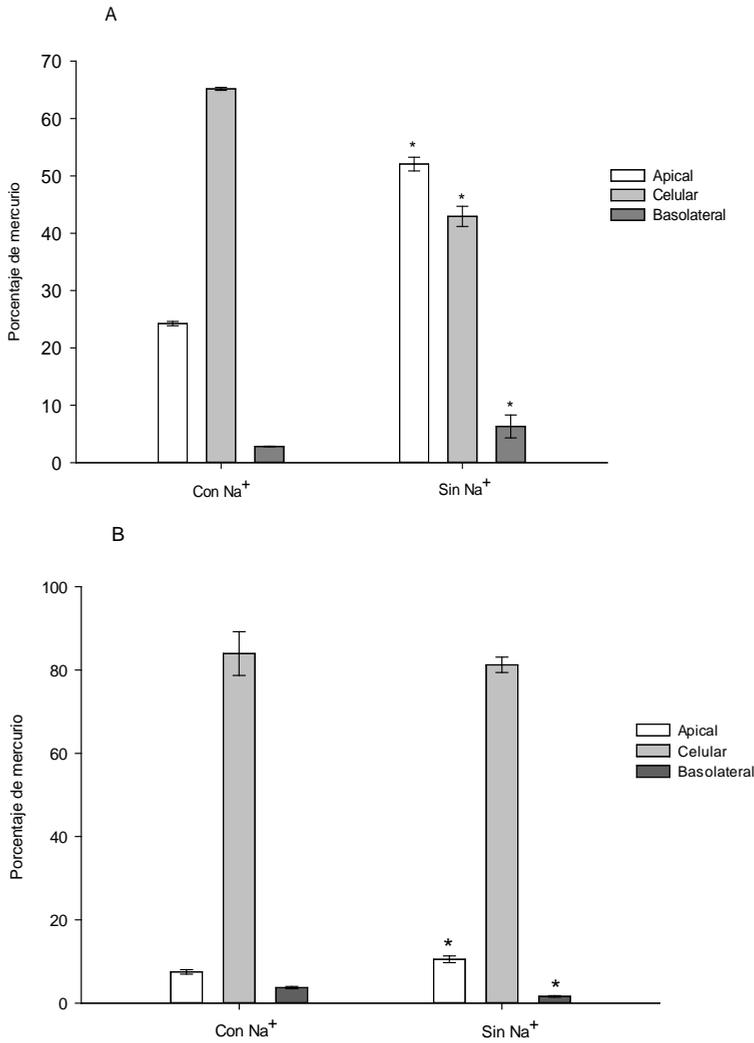


**Figura 7.** Porcentajes de mercurio en el lado apical, basolateral y el interior celular de células Caco-2 expuestas durante 120 minutos a 1 mg/L de Hg(II) y 0.6 mg/L de CH<sub>3</sub>Hg en diferentes condiciones de pH apical/basal (7.2/7.2; 5.5/7.2). Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a la condición de pH 7.2/7.2 para un mismo compartimento.

#### 4.5. Influencia de los iones $\text{Na}^+$ en el transporte y acumulación de $\text{Hg(II)}$ y $\text{CH}_3\text{Hg}$

Estudios en otras líneas celulares apuntan a transportadores dependientes de  $\text{Na}^+$  como partícipes en el transporte de mercurio (Bridges *et al.*, 2007), por ello en la presente tesis se ha evaluado la influencia del  $\text{Na}^+$  en el transporte intestinal de  $\text{Hg(II)}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}$ .

Los resultados obtenidos para el  $\text{Hg(II)}$  (figura 8A) muestran que la ausencia de  $\text{Na}^+$  en el lado apical produce un aumento significativo del transporte basolateral, mientras que la acumulación celular se reduce significativamente. Esto conlleva un aumento del porcentaje de mercurio presente en el lado apical. La eliminación del  $\text{Na}^+$  también afecta el transporte de  $\text{CH}_3\text{Hg}$  (figura 8B), pero de distinta forma. Se produce un incremento del contenido apical y una reducción del transporte basolateral y de la acumulación intracelular.



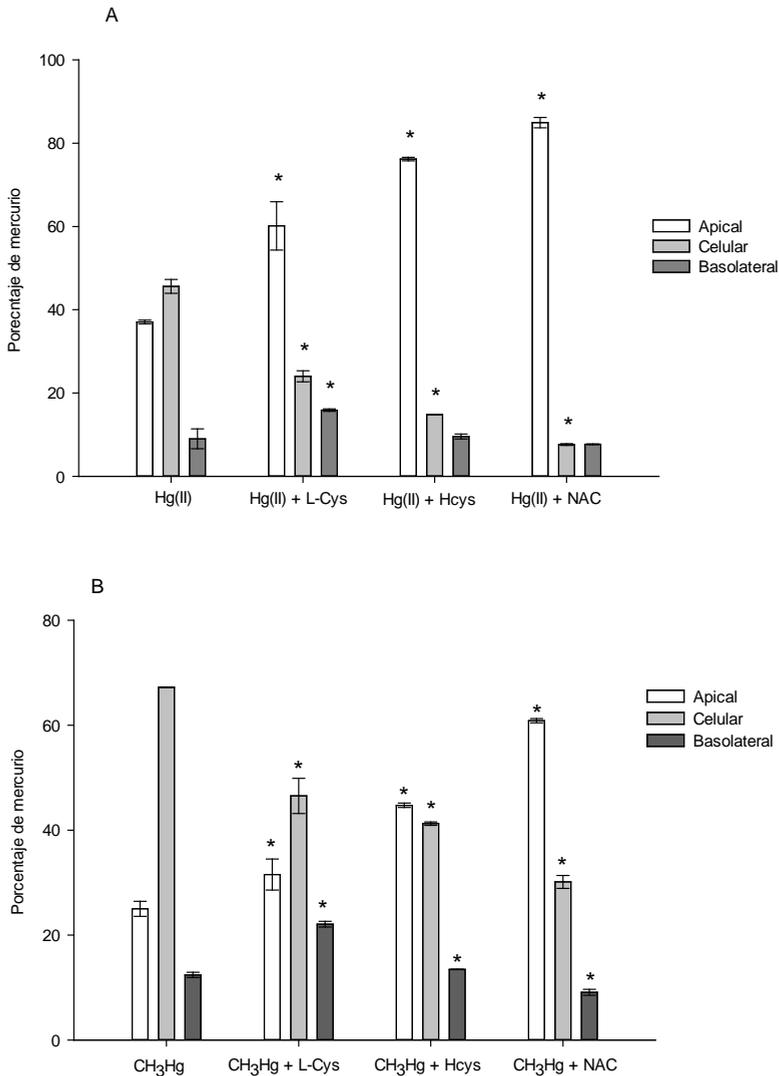
**Figura 8.** Porcentajes de mercurio en el compartimento apical, basolateral y el interior celular de células Caco-2 expuestas durante 120 minutos a 0.8 mg/L de Hg(II) (A) y 0.6 mg/L de CH<sub>3</sub>Hg (B) en presencia y ausencia de Na<sup>+</sup> en el medio apical. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) respecto a la presencia de Na<sup>+</sup> para un mismo compartimento.

#### 4.6. Efecto de la presencia de distintas formas de cisteína en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

El mercurio tiene una alta afinidad por los grupos sulfhidrilo, incluso se ha descrito que formando conjugados con estos grupos presenta una mayor tasa de transporte (Clarkson, 1993; Bridges y Zalups, 2005, 2010; Bridges *et al.*, 2007). En esta tesis se ha evaluado el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en presencia de distintas formas de cisteína: L-cisteína (L-Cys), DL-homocisteína (Hcys) y N-acetil-L-cisteína (NAC).

Los resultados se muestran en la figura 9. En el caso del Hg(II) (figura 9A), se observa un aumento de la cantidad de mercurio que permanece en el lado apical en presencia de las formas de cisteína, siendo destacable el incremento observado en los contenidos apicales de Hg(II)-NAC (57%). Asimismo se observa una importante reducción de la retención celular (L-Cys: 47%; Hcys: 68%; NAC: 83%). Respecto al transporte al lado basolateral sólo se observa un aumento significativo en presencia de L-Cys (44%).

En el caso del CH<sub>3</sub>Hg (figura 9B), la presencia de las formas de cisteína también produce un aumento significativo del contenido apical (L-Cys: 19%; Hcys: 43%; NAC: 59%) y una disminución de la acumulación celular (L-Cys: 31%; Hcys: 39%; NAC: 55%). El transporte al lado basolateral se modifica de forma distinta según la forma de cisteína. Así, existe un aumento del transporte basolateral en presencia de L-Cys y Hcys (44% y 8%, respectivamente), mientras que disminuye un 27% con NAC en el medio apical.



**Figura 9.** Porcentajes de mercurio en el compartimento apical, basolateral y el interior celular de células Caco-2 expuestas durante 120 minutos a 2.5  $\mu$ M de Hg(II) (A) y CH<sub>3</sub>Hg (B) con 5  $\mu$ M de L-cisteína (L-Cys), DL-homocisteína (Hcys) o N-acetil-L-cisteína (NAC). Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) respecto a las células tratadas sólo con Hg(II) o CH<sub>3</sub>Hg.

#### 4.7. Efecto de inhibidores o sustratos de determinados transportadores en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Los transportadores seleccionados para el estudio fueron elegidos en base a datos bibliográficos que confirmaban o sugerían su participación en el transporte de las formas mercuriales en otros tipos celulares o tejidos (Zalups y Ahmad, 2004; Zalups *et al.*, 2004; Bridges *et al.*, 2007; Bridges y Zalups, 2010) y en base a los resultados obtenidos en los apartados anteriores de este capítulo.

La tabla 6 muestra el efecto de distintos inhibidores o sustratos sobre el transporte de Hg(II). Todos ellos producen una disminución significativa del transporte al lado basolateral respecto al control, excepto el BCH. La magnitud de reducción varía dependiendo del tratamiento [Mn(II) 91-97%; L-Phe + L-Met 67%; L-Arg + L-Lys 45%; rifamicina 26%]. Los inhibidores o sustratos también afectan significativamente la acumulación celular del Hg(II). El tratamiento con Mn(II) es el más efectivo en la reducción de los contenidos celulares, siendo esta reducción dependiente de la concentración (40% para 500 μM; 55% para 1000 μM). De forma similar, los tratamientos con una combinación de aminoácidos neutros (L-Phe + L-Met) o catiónicos (L-Arg + L-Lys) reduce la acumulación celular del Hg(II) (27% y 18% respectivamente). El resto de tratamientos, sin embargo, suponen un incremento significativo de los contenidos celulares (rifamicina 15%; BCH 12%).

**Tabla 6.** Efecto de inhibidores específicos o sustratos en el transporte de Hg(II) en células Caco-2 expuestas durante 60 minutos a 0.4 o 0.6 mg/L. Porcentajes de mercurio en el compartimento apical, basolateral y el interior celular respecto a la adición inicial. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n \geq 3$ ). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a las células tratadas sólo con Hg(II) (sin inhibidor).

Hg(II) (mg/L)	pH apical	Tratamiento	Apical	Celular	Basolateral
0.4	7.2	Sin inhibidor	52.4 $\pm$ 1.6	42.6 $\pm$ 0.05	6.8 $\pm$ 1.07
		Rifamicina 100 $\mu$ M	47.9 $\pm$ 1.6*	50.2 $\pm$ 1.12*	5.1 $\pm$ 0.60*
		BCH 100 $\mu$ M	43.5 $\pm$ 0.17*	48.3 $\pm$ 1.4*	8.3 $\pm$ 1.2
		AA <sup>0</sup> 2000 $\mu$ M	66.2 $\pm$ 0.17*	31.0 $\pm$ 1.6*	2.2 $\pm$ 0.30*
		AA <sup>+</sup> 2000 $\mu$ M	62.0 $\pm$ 0.80*	34.8 $\pm$ 4.1*	3.7 $\pm$ 0.40*
0.6	5.5	Sin inhibidor	33.5 $\pm$ 0.96	61.8 $\pm$ 1.9	4.8 $\pm$ 0.26
		Mn(II) 500 $\mu$ M	62.4 $\pm$ 0.45*	37.4 $\pm$ 1.4*	0.41 $\pm$ 0.03*
		Mn(II) 1000 $\mu$ M	72.5 $\pm$ 0.30*	27.7 $\pm$ 0.25*	0.15 $\pm$ 0.01*

BCH: ácido aminobicyclo-(2,2,1)-heptano-2-carboxílico

AA<sup>0</sup>: aminoácidos neutros (L-Phe + L-Met)

AA<sup>+</sup>: aminoácidos catiónicos (L-Arg + L-Lys)

Los resultados del transporte de CH<sub>3</sub>Hg en presencia de los distintos inhibidores y sustratos se muestran en la tabla 7. Todos los tratamientos producen un cambio en la distribución de CH<sub>3</sub>Hg en los compartimentos analizados (apical, celular y basolateral) respecto al tratamiento control. Se

observa una disminución significativa del transporte al lado basolateral, aunque en proporción variable (rifamicina 48%, L-Phe 31%, BCH 27%, L-Arg 10%). Los contenidos celulares decrecen en presencia de BCH (18%), L-Arg (14%) y L-Phe (14%) y se incrementan en presencia de rifamicina (8%). Se observa un aumento de la cantidad de mercurio que no se absorbe y permanece en la parte apical (BCH 25%, L-Arg 21%, L-Phe 17%), excepto para el tratamiento con rifamicina

**Tabla 7.** Efecto de inhibidores específicos o sustratos en el transporte de CH<sub>3</sub>Hg en células Caco-2 expuestas durante 60 minutos a 0.4 mg/L. Porcentajes de mercurio en el compartimento apical, basolateral y el interior celular respecto a la adición inicial. Valores expresados como media ± desviación estándar (n ≥ 3). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) respecto a las células tratadas sólo con CH<sub>3</sub>Hg (sin inhibidor).

Tratamiento	Apical (%)	Celular (%)	Basolateral (%)
Sin inhibidor	32 ± 1.6	65.2 ± 2	4.8 ± 0.1
Rifamicina 100 µM	27 ± 1.3*	70.6 ± 0.9*	2.5 ± 0.2*
BCH 100 µM	42.6 ± 1.2*	53.4 ± 0.3*	3.5 ± 0.02*
L-Arg 1000 µM	40.4 ± 2.4*	56.4 ± 0.5*	3.3 ± 0.08*
L-Phe 1000 µM	38.5 ± 0.6*	56 ± 1.5*	4.3 ± 0.15*

BCH: ácido aminobicyclo-(2,2,1)-heptano-2-carboxílico

#### 4.8. Evaluación de la participación de un transporte pasivo en el paso transcelular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

El estudio de transporte empleando una membrana artificial en la que los mecanismos de transporte mediados por portador y la vía paracelular están ausentes, permite identificar la participación de un transporte transcelular pasivo (Sugano *et al.*, 2010).

La tabla 8 muestra los valores de  $P_{am}$  (permeabilidad a través de la membrana artificial) y el porcentaje de flujo para el verapamilo, Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Los porcentajes de flujo del verapamilo, compuesto que se transporta principalmente por difusión pasiva transcelular, son elevados (82%). Estos valores son similares a los observados para el CH<sub>3</sub>Hg (64%) y muy superiores a los obtenidos para el Hg(II) (< 2.1%). Del mismo modo, los valores de  $P_{am}$  para el verapamilo son 100 veces superiores a los hallados para el Hg(II) y 2 veces superiores a los del CH<sub>3</sub>Hg. La concentración del compuesto [verapamilo, Hg(II) o CH<sub>3</sub>Hg] no influye en su transporte a través del sistema PAMPA.

**Tabla 8.** Porcentaje de flujo y coeficiente de permeabilidad a través de la membrana artificial ( $P_{am}$ ) del verapamilo, Hg(II) y  $CH_3Hg$  tras 16 horas de exposición. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n \geq 3$ ).

Compuesto	Concentración ( $\mu M$ )	Flujo (%)	$P_{am}$ ( $1 \times 10^{-6}$ cm/s)
Verapamilo	100	$81.9 \pm 5.1$	$10.0 \pm 1.5$
	500	$81.7 \pm 15.4$	$11.6 \pm 2.7$
Hg(II)	50	$2.1 \pm 0.5$	$0.13 \pm 0.02$
	100	$1.6 \pm 0.2$	$0.10 \pm 0.01$
$CH_3Hg$	50	$60.2 \pm 10$	$5.9 \pm 2.3$
	100	$64.3 \pm 2$	$5.9 \pm 0.3$

El  $CH_3Hg$  presenta una alta afinidad por la L-Cys, con la que forma complejos polares cuya principal vía de transporte transcelular es a través de transportadores de membrana (Bridges y Zalups, 2006b; Heggland *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta la importante contribución de la difusión pasiva transcelular en el transporte de  $CH_3Hg$  se ha considerado adecuado evaluar si esta contribución está afectada por la presencia de L-Cys, debido a la formación de complejos de carácter hidrofílico. Los resultados (tabla 9) ponen de manifiesto que en presencia de L-Cys (25, 200, 500  $\mu M$ ), el paso de  $CH_3Hg$  a través de las membranas lipídicas artificiales disminuye de una forma concentración dependiente indicativo de la formación de complejos  $CH_3Hg$ -L-Cys.

Adicionalmente se ha evaluado la influencia de la L-Cys en el transporte transcelular pasivo de  $CH_3Hg$  en presencia de distintos cationes divalentes (50  $\mu M$  de  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  y  $Cu^{+2}$ ), por los cuales la L-Cys presenta una alta afinidad (Belcastro *et al.*, 2005; Shankar *et al.*, 2011). Los resultados (tabla

9) muestran que independientemente de la concentración de L-Cys empleada, el porcentaje de transporte del CH<sub>3</sub>Hg a través de la capa lipídica artificial en presencia de estos cationes es igual al que presenta en ausencia de L-Cys. Ello sugiere que en estas condiciones posiblemente no se estén formando los complejos polares CH<sub>3</sub>Hg-L-Cys, ya que la afinidad de la L-Cys por el mercurio es inferior a la que muestra por los cationes ensayados (Belcastro *et al.*, 2005; Shankar *et al.*, 2011).

**Tabla 9.** Porcentaje de transporte de CH<sub>3</sub>Hg al lado aceptor en membranas artificiales lipídicas (PAMPA) tras 16 horas de exposición a: 1) CH<sub>3</sub>Hg, 2) CH<sub>3</sub>Hg en presencia de concentraciones crecientes de L-Cys y 3) CH<sub>3</sub>Hg en presencia de cationes divalentes (Mn<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> y Cu<sup>+2</sup>) y distintas concentraciones de L-Cys. Valores expresados como media ± desviación estándar (n ≥ 3). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) respecto al transporte de CH<sub>3</sub>Hg en ausencia de L-Cys.

CH <sub>3</sub> Hg (μM)	L-Cys (μM)	Cationes (μM)	Transporte (%)
50	—	—	52 ± 2.3
	25	—	27 ± 0.6*
	200	—	0.23 ± 0.03*
	500	—	0.10 ± 0.01*
	200	50	53 ± 1.6
	500	50	53 ± 0.7

## ***DISCUSIÓN***

En este capítulo se ha evaluado el transporte intestinal del Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg mediante el empleo de la línea celular Caco-2. Numerosos estudios ponen de manifiesto que es posible correlacionar los coeficientes de

permeabilidad aparente obtenidos en células Caco-2 con la magnitud de la absorción *in vivo* (Artursson y Karlsson, 1991; Yee, 1997), de ahí el extensivo empleo de esta línea celular en estudios *in vitro* de absorción intestinal.

Los datos obtenidos en el presente capítulo permiten apuntar a ciertos mecanismos como partícipes en el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Debido a la cantidad de información obtenida para cada especie mercurial y el distinto comportamiento de las mismas, se discuten los resultados de cada especie de forma independiente.

### **Mecanismos de transporte intestinal de Hg(II)**

Las investigaciones realizadas en esta tesis evidencian que el Hg(II) presenta una elevada retención en la monocapa celular Caco-2, que llega a alcanzar un 51% en exposiciones de 120 minutos a 1 mg/mL. Aduayom *et al.* (2003) también observaron en el clon TC7 de la línea celular Caco-2 una elevada acumulación intracelular de Hg(II). Esta alta acumulación *in vitro* de Hg(II) corrobora lo observado *in vivo* en el tracto gastrointestinal de roedores (Kostial *et al.*, 1981, 1983) donde se observaban altas acumulaciones. Por otro lado, los estudios de eliminación celular realizados muestran que el Hg(II) acumulado en las células Caco-2 se elimina con un flujo mayor hacia el lado basolateral, que emula la entrada a la circulación sistémica, que hacia el lado apical que corresponde al lumen intestinal. Esto evidencia que tras la eliminación del tóxico, la acumulación celular disminuye con el tiempo, aunque sigue siendo elevada varias horas después del tratamiento [15% después de 4 horas sin exposición a Hg(II)]. Teniendo en cuenta el carácter tóxico de esta especie, su acumulación en las células epiteliales del intestino podría ser una de las causas de los efectos adversos

que produce *in vivo* en el sistema gastrointestinal. De hecho, se han reportado procesos inflamatorios en estómago y ciego, y un incremento significativo de la incidencia de hiperplasia gástrica en roedores expuestos de forma subcrónica o crónica a mercurio inorgánico (NTP, 1993).

En cuanto al transporte de Hg(II) a través de la monocapa Caco-2, tras 2 horas de exposición éste alcanza un máximo de un 20% de la cantidad adicionada. En esta tesis se ha tenido en cuenta el criterio de Yee (1997) para correlacionar los valores de permeabilidad a través de la monocapa Caco-2 ( $P_{app}$ ) con la magnitud de la absorción *in vivo*. Según este criterio, un compuesto con un  $P_{app} < 1 \times 10^{-6}$  cm/s presenta baja absorción *in vivo* (0-20%), con un  $P_{app}$  entre  $1-10 \times 10^{-6}$  cm/s, se considera un compuesto de moderada absorción (20-70%) y con un  $P_{app} > 10 \times 10^{-6}$  cm/s, un compuesto de elevada absorción (70-100%). Los valores de  $P_{app}$  obtenidos oscilan entre  $1$  y  $3.9 \times 10^{-6}$  cm/s para las distintas concentraciones de Hg(II) ensayadas, por lo que la especie inorgánica podría considerarse un compuesto de absorción moderada. Los estudios realizados *in vivo* apuntan a una absorción del Hg(II) ( $\approx 20\%$ ; Nielsen, 1992), equivalente a la deducida de los ensayos con la línea celular Caco-2.

El transporte o acumulación de un compuesto a través del epitelio intestinal suele ser un proceso muy complejo en el que pueden intervenir distintas rutas: paracelular, transcelular pasiva, mecanismos mediados por portador y transcitosis (Artursson *et al.*, 2001). El conocimiento de estos mecanismos es de gran relevancia para la caracterización del proceso absorbivo, ya que permitirá conocer la cantidad de compuesto y el modo en que éste llega a la circulación sistémica. El efecto de la modulación de las uniones intercelulares sobre la permeabilidad se utiliza como criterio para determinar la participación de la ruta paracelular (Sun y Pang, 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la apertura de las uniones

intercelulares (apartado 4.2) no produce un aumento del  $P_{app}$  de Hg(II), lo cual indica que la difusión paracelular no es una vía importante en el transporte de esta forma inorgánica. La evaluación de la vía transcelular pasiva empleando membranas artificiales (tabla 8) y los resultados del estudio de los parámetros cinéticos (apartado 4.1) muestran una baja participación de esta ruta, hecho que era de esperar debido a la naturaleza hidrofílica del Hg(II) (Halbach, 1985).

La escasa participación de mecanismos de transporte pasivo sugiere que el movimiento de Hg(II) a través de la monocapa intestinal ocurre mayoritariamente por mecanismos mediados por portador. De hecho, en esta tesis se ha observado que el transporte en sentido absortivo presenta un componente saturable (figura 4). Se han llevado a cabo estudios para intentar caracterizar la naturaleza de este transporte transcelular en el que pueden intervenir una o varias moléculas portadoras. El transporte transcelular mediado por portador puede ser facilitado o dependiente de energía. Los estudios realizados disminuyendo la temperatura de ensayo, muestran una reducción en los valores de  $P_{app}$  (figura 6), primer indicativo de la participación de un transporte activo. Por otro lado, según Hidalgo y Borchardt (1990), valores de la energía de permeación ( $E_p$ ) entre 5 y 25 kcal/mol están frecuentemente asociados con un transporte activo, mientras que valores más bajos están relacionados con mecanismos de difusión pasiva o facilitada, no dependientes de energía. Los valores de  $E_p$  obtenidos para el Hg(II) indican que el transporte transcelular puede tener un componente activo. Adicionalmente, la inhibición del metabolismo y por tanto de la generación de energía mediante azida sódica y 2-desoxiglucosa, muestra una reducción del transporte A-B que permite concluir que existe un componente activo en el transporte transcelular en sentido absortivo del Hg(II). La participación de este componente activo está apoyada además por los

resultados del ratio de eliminación ( $E_r$ ), que muestran valores muy inferiores a la unidad y que según Laitinen (2006) indican que existe un proceso activo en dirección absorptiva.

El presente trabajo también muestra que el transporte de Hg(II) depende del pH en el lado apical. Así, la acidificación del medio apical conlleva un aumento del transporte que puede ser debido a la participación de transportadores protón-dependientes. El DMT1 (*SCL11A2*) es un miembro de la familia Nramp (proteína de resistencia natural asociada a macrófagos) presente en la membrana apical del intestino (Canonne-Hergaux *et al.*, 1999). Esta proteína es capaz de transportar una gran variedad de cationes metálicos divalentes esenciales (Fe, Zn, Mn, Co, Cu y Ni) mediante un mecanismo protón-dependiente (Zalups y Koropatnick, 2010). Existen también evidencias que apuntan a DMT1 como partícipe en la absorción de cationes metálicos tóxicos divalentes (Cd y Pb) (Okubo *et al.*, 2003; Bressler *et al.*, 2004), sin embargo, no existen estudios sobre su posible participación en el transporte de Hg(II). Los ensayos de inhibición realizados empleando Mn(II), un sustrato del DMT1 por el cual este transportador presenta una alta afinidad (Arredondo *et al.*, 2003), muestran una reducción muy importante del paso de Hg(II) del lado apical al interior celular. Este hecho apoya la posible participación del DMT1 en el transporte de Hg(II) a través de la monocapa de epitelio intestinal.

Estudios *in vitro* en distintos modelos renales han confirmado la participación de miembros de la familia de transportadores de aniones orgánicos (OAT1 y OAT3) en el transporte de mercurio inorgánico, especialmente en forma de conjugados con grupos tiol (Aslamkhan *et al.*, 2003; Zalups y Ahmad, 2004; Lash *et al.*, 2005). El OATPB es el transportador más abundante de esta familia en la membrana apical de células del epitelio intestinal y además su actividad es óptima a pH ácidos

(Kobayashi *et al.*, 2003). Sin embargo, el ensayo de inhibición empleando rifamicina, inhibidor de OATPs (Petri *et al.*, 2004), muestra que la incorporación celular del Hg(II) desde el lado apical no disminuye en presencia de este inhibidor hecho que no permite corroborar la participación del OATPB en la entrada de la especie inorgánica a la monocapa intestinal.

Además de los transportadores ya mencionados, la bibliografía hace referencia a la entrada o salida de Hg(II) por mecanismos de mimetismo molecular debido a que unido a dos moléculas de cisteína (cisteína-Hg-cisteína, dicisteinilmercurio) se asemeja al aminoácido cistina y, por tanto, podría emplear el sistema  $b^{0,+}$  transportador de este aminoácido en mamíferos (Thwaites *et al.*, 1996; Bridges *et al.*, 2004). En el presente trabajo la presencia de formas de cisteína en el medio apical no favorece la entrada de Hg(II) al interior celular, como cabría esperar atendiendo a lo descrito anteriormente. La incorporación de formas de cisteína en el medio apical implica una disminución del Hg(II) en el interior celular y un aumento del porcentaje no transportado, lo que podría indicar que las distintas formas de cisteína están actuando como inhibidores del transporte apical de la forma inorgánica de mercurio. Es posible que en las condiciones de este estudio la formación de complejos cisteína-Hg-cisteína no sea muy extensa, quedando cisteína libre en el medio que podría formar cistina (cisteína-cisteína). Si los complejos cisteína-Hg(II)-cisteína se transportan por el mismo mecanismo que la cistina esto podría reducir la entrada de esta forma mercurial. Adicionalmente, la presencia de cisteína libre podría afectar el transporte de dicisteinilmercurio a través del sistema  $B^{0,+}$  que transporta L-cisteína y que otros autores han postulado puede intervenir en el transporte de Hg(II) (Cannon *et al.*, 2001; Bridges *et al.*, 2007). Por otra parte, en este capítulo se ha demostrado que la presencia de L-Arg y L-Lys (sustratos del sistema  $b^{0,+}$ ; Kilberg *et al.*, 1993) y de L-Phe y L-Met (sustratos del sistema  $B^{0,+}$ ; Kilberg

*et al.*, 1993) disminuyen la acumulación intracelular de Hg(II), lo que sugiere la participación de estos sistemas en el transporte apical de Hg(II).

Por otro lado, los ensayos llevados a cabo en ausencia de Na<sup>+</sup> muestran que parte de la entrada de Hg(II) al interior celular se reduce cuando se elimina este catión del medio, lo que muestra que la incorporación de Hg(II) a la célula se puede producir por mecanismos Na<sup>+</sup> dependientes, como el sistema B<sup>0,+</sup> y por mecanismos Na<sup>+</sup> independientes, como el sistema b<sup>0,+</sup> o el transportador DMT1.

Hasta ahora se han interpretado los resultados de inhibición en base a los cambios en la acumulación celular, pero también es de interés destacar los resultados que suponen una reducción del paso neto de Hg(II) al lado basolateral. Esta disminución podría ser debida a una reducción del transporte de mercurio al interior celular desde el lado apical; sin embargo, no debe descartarse que en parte sea consecuencia de una competencia de los sustratos o inhibidores y el Hg(II) por los transportadores ubicados en la membrana basolateral. Se ha puesto de manifiesto una reducción del contenido basolateral en presencia de aminoácidos neutros (L-Phe y L-Met), sustratos del sistema L, transportador Na<sup>+</sup>-independiente (Kilberg *et al.*, 1993) situado en la membrana basolateral de los enterocitos y de la línea celular Caco-2. También se ha observado una disminución en presencia de aminoácidos catiónicos (L-Arg y L-Lys), sustratos del sistema y<sup>+</sup>L (Martín-Venegas *et al.*, 2009) situado en la membrana basolateral. La rifamicina reduce el transporte neto A-B de Hg(II), lo que podría indicar la participación de los OATPs presentes en la membrana basolateral de las células intestinales, OATPE y OATPD (Mikkaichi *et al.*, 2004; Kalliokoski y Niemi, 2009). Finalmente, hay que destacar la inhibición del paso basolateral debida a la presencia de Mn(II). El transporte de Mn(II) en células intestinales a través de la membrana basolateral no está muy

caracterizado. Algunos estudios demuestran la participación de la ferroportina 1 (FPN1), un importante exportador de hierro en el intestino delgado (Yin *et al.*, 2010; Madejczyk y Ballatori, 2012). Así, los datos de inhibición que suponen una reducción neta del transporte A-B pueden estar apuntando a transportadores apicales (DMT1, sistema  $b^{0,+}$  y  $B^{0,+}$ ) o a transportadores basolaterales (sistema L, sistema  $y^+L$ , FPN1 y OATPs) presentes en el epitelio intestinal.

### **Mecanismos de transporte intestinal de $CH_3Hg$**

Según el criterio derivado del estudio de Yee (1997), los valores de permeabilidad obtenidos para el  $CH_3Hg$  ( $1.6-5.4 \times 10^{-6}$  cm/s) indican que éste se absorbe moderadamente. Sin embargo, los estudios realizados *in vivo*, apuntan a una absorción elevada del  $CH_3Hg$  (Miettinen, 1973). Las diferencias *in vitro-in vivo* podrían atribuirse a factores fisiológicos no contemplados en el cálculo de la  $P_{app}$  y que pueden afectar a su transporte a través de la monocapa celular (pH, sales biliares, formación de conjugados de mercurio). Por otro lado, los compuestos de alta lipofilidad, como es el caso del  $CH_3Hg$  (Miettinen, 1973), tienden a acumularse de forma muy acentuada en la membrana celular (48-78%) y esto puede dificultar la correlación entre los estudios *in vivo* e *in vitro*.

Según Youdim *et al.* (2003), la adición de albúmina en el compartimento receptor favorece la permeabilidad de sustancias lipofílicas, disminuyendo la retención celular. Por otro lado, esta aproximación mimetiza mejor la presencia fisiológica de albúmina dentro de la cavidad serosa. La albúmina aumenta la permeabilidad de  $CH_3Hg$  y disminuye su retención, aunque no se observan cambios drásticos de estos parámetros tal y como era de esperar atendiendo a lo observado para compuestos de carácter lipofílico (Krishna *et*

*al.*, 2001). El ión metilmercurio forma un enlace con el átomo de azufre reducido de la cisteína (Bridges y Zalups, 2006b) dando lugar a complejos coordinados covalentemente. Posiblemente, esto dificulte su eliminación del interior celular aunque se disponga de albúmina en el compartimento aceptor y, por ese motivo, no se modifica de forma muy acentuada el transporte y la acumulación de  $\text{CH}_3\text{Hg}$  en presencia de esta proteína.

El carácter lipofílico de  $\text{CH}_3\text{Hg}$  se traduce en una importante participación de la vía transcelular pasiva, tal y como muestran los ensayos PAMPA (tabla 8), donde el  $\text{CH}_3\text{Hg}$  muestra un porcentaje de flujo a través de las membranas lipídicas artificiales (64%) similar al del verapamilo (82%), molécula con un transporte mayoritario a través de esta vía. Esta naturaleza del  $\text{CH}_3\text{Hg}$  también explicaría la escasa intervención de un transporte paracelular (apartado 4.2), característica de compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular (Shah *et al.*, 2006). Aunque la vía pasiva transcelular parece una de las principales formas de transporte del  $\text{CH}_3\text{Hg}$  en forma de  $\text{CH}_3\text{HgCl}$ , los parámetros cinéticos obtenidos en el presente estudio (apartado 4.1) también evidencian la participación de un transporte transcelular saturable y por tanto mediado por portador. De hecho, en presencia de cisteína la participación de la difusión pasiva no es relevante, indicativo de que en forma de complejos con este aminoácido posiblemente se transporte mediado por portador, tal y como sugieren otros estudios (Simmons-Willis *et al.*, 2002; Bridges y Zalups, 2006a, 2006b; Heggland *et al.*, 2009).

Los estudios llevados a cabo disminuyendo la temperatura de ensayo muestran una reducción de los valores de  $P_{\text{app}}$  (figura 6). Esto junto con los valores de energía de permeación hallados puede ser indicativo de un transporte transcelular activo. Se ha puesto de manifiesto sin embargo, que la constante de difusión también depende de la temperatura (Tanaka *et al.*,

1978) y que la temperatura puede afectar la fluidez de la membrana (Kanduser *et al.*, 2008) y el coeficiente de partición octanol/agua (Sugano *et al.*, 2010). Por tanto, la temperatura puede afectar el transporte de moléculas que se muevan por difusión pasiva como el CH<sub>3</sub>Hg. Para confirmar la existencia de un transporte dependiente de energía, se ha evaluado la permeabilidad del CH<sub>3</sub>Hg en presencia de un tratamiento inhibitor del metabolismo celular (azida sódica y desoxiglucosa) que ha puesto de manifiesto una reducción del transporte y por tanto, la existencia de un componente activo transcelular en su absorción. La existencia de este tipo de transporte en dirección A-B también se apoya con los valores del ratio de eliminación que, como se ha comentado para el Hg(II), indica un transporte activo en sentido absortivo cuando son inferiores a la unidad (Laitinen, 2006).

Se ha postulado que el CH<sub>3</sub>Hg se transporta a través de la membrana por medio de transportadores de aminoácidos neutros, debido a su similitud estructural con la metionina cuando está unido a L-Cys (Aschner y Clarksson, 1989; Simmons-Willis *et al.*, 2002). El transporte a través del epitelio intestinal de aminoácidos neutros como la metionina puede producirse a través del sistema B<sup>0,+</sup> mediante un mecanismo Na<sup>+</sup>-dependiente (Bröer, 2006). Un estudio previo en oocitos de *Xenopus laevis* microinyectados ha mostrado que el sistema B<sup>0,+</sup> puede intervenir en el transporte de CH<sub>3</sub>Hg conjugado con cisteína (Bridges y Zalups, 2006b). En esta tesis se ha puesto de manifiesto que el CH<sub>3</sub>Hg presenta un transporte Na<sup>+</sup> dependiente, ya que en ausencia de este ión se observa una disminución de la entrada de CH<sub>3</sub>Hg (figura 8) y un aumento del contenido de la especie en el lado apical. En cualquier caso, la acumulación y transporte en ausencia de Na<sup>+</sup> supone una importante proporción del transporte que, como ya se ha comentado, debe ser el resultado de la difusión pasiva.

Los datos de inhibición también apoyan la posible intervención del sistema de transporte de aminoácidos  $B^{0,+}$ , ya que en presencia de aminoácidos neutros y catiónicos, sustratos de este sistema (Kilberg *et al.*, 1993), se produce una reducción de la acumulación celular de  $CH_3Hg$ . A diferencia de lo que postulan o confirman otros autores (Bridges y Zalups, 2006a, 2006b), en nuestro estudio la conjugación de  $CH_3Hg$  con formas de cisteína no facilita el transporte apical de mercurio. Contrariamente, la presencia de formas de cisteína disminuye la cantidad de mercurio intracelular y aumenta el mercurio presente en el lado apical. La explicación podría ser la misma que la dada para el  $Hg(II)$ ; no toda la cisteína adicionada forma complejos con el  $CH_3Hg$  y, por tanto, queda cisteína libre en el medio que puede inhibir el transporte de la forma mercurial por competencia, ya que la cisteína es sustrato del sistema  $B^{0,+}$ .

Otro posible mecanismo de transporte transcelular mediado por portador de  $CH_3Hg$  unido a cisteína y N-acetilcisteína, son los OATs cuya participación se ha evidenciado en células de riñón (Zalups y Ahmad, 2005a, 2005b). La isoforma mayoritaria en el lado apical de los enterocitos, tal y como se ha comentado es el OATPB, transportador  $H^+$  dependiente. En este estudio se ha puesto de manifiesto que el aumento de la concentración de  $H^+$  en el lado apical favorece el transporte de  $CH_3Hg$ . Sin embargo, al igual que ocurría en el  $Hg(II)$ , su acumulación celular no se ve disminuida por el tratamiento con rifamicina, inhibidor de este tipo de transporte, por lo que no puede concluirse que a nivel apical haya una participación destacable de esta familia de transportadores.

Los datos de inhibición que indican una reducción de la acumulación celular de  $CH_3Hg$  apuntan al sistema  $B^{0,+}$  como partícipe en su transporte a través de la membrana apical. Por otra parte, los resultados de inhibición que indican una disminución en el movimiento neto de  $CH_3Hg$  hacia el lado

basolateral, también permiten inferir la participación de algunos transportadores presentes en la membrana basolateral. Se observa una disminución en el transporte en presencia de rifamicina, lo que puede sugerir la participación del OATPE y OATPD. Los aminoácidos neutros y catiónicos reducen el transporte basolateral del CH<sub>3</sub>Hg, por lo que nuevamente se puede postular la intervención de un transportador de aminoácidos. En la bibliografía se ha descrito que el sistema L (LAT1 y LAT2) interviene en el transporte de CH<sub>3</sub>Hg unido a L-cisteína (Simmons-Willis *et al.*, 2002). También podría participar el sistema y<sup>+</sup>L (y<sup>+</sup>LAT1 y y<sup>+</sup>LAT2), aunque esto no ha sido confirmado por otros autores.

Los datos obtenidos en el presente estudio permiten apuntar a determinados tipos de transporte en el paso del CH<sub>3</sub>Hg a través del epitelio intestinal. Además muestran que hay una acumulación celular muy importante que ya se ha puesto de manifiesto en estudios *in vivo* (Endo *et al.*, 1989) y que teniendo en cuenta el carácter tóxico del CH<sub>3</sub>Hg podría afectar al normal funcionamiento de la mucosa intestinal. Hasta ahora, sólo un estudio realizado en animales ha reportado la toxicidad gastrointestinal de la forma orgánica de mercurio después de la exposición oral (Mitsumori *et al.*, 1990). Estos autores demostraron un aumento de la incidencia de la ulceración del estómago en ratones después de una exposición de 2 años a cloruro de metilmercurio en el agua potable. Sin embargo, no existen estudios sobre el efecto en el intestino de la exposición a esta forma mercurial. Por otro lado, esta tesis también evidencia que tras el cese de la exposición, el CH<sub>3</sub>Hg acumulado en las células epiteliales del intestino se elimina tanto hacia el lado apical como hacia el lado basolateral, que emularía la cavidad serosa que permite la llegada del tóxico al torrente sanguíneo.

## **CONCLUSIONES**

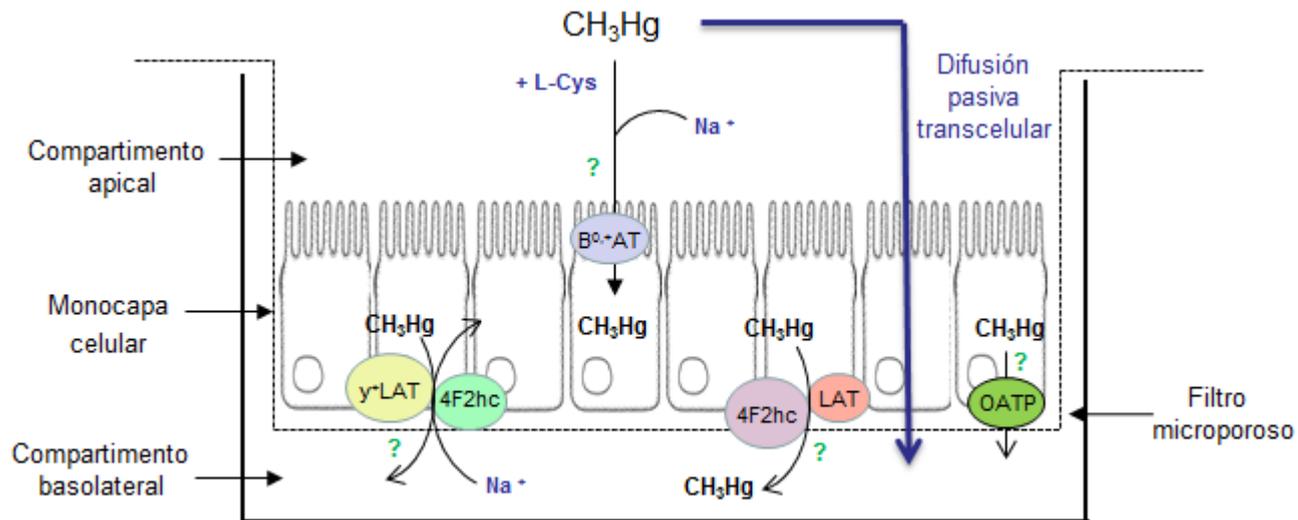
Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que el transporte y acumulación de las formas mercuriales depende de la concentración de exposición, siendo la retención celular muy superior al transporte. Esta acumulación se reduce cuando se elimina el tóxico del medio, pudiendo pasar el mercurio acumulado tanto al lumen como a la cavidad serosa para su posterior llegada a la circulación sistémica. Los ensayos sugieren que el transporte de Hg(II) es principalmente transcelular y mediado por portador y en él intervienen varios mecanismos, algunos de los cuales pueden ser activos. Adicionalmente, se observa un transporte dependiente de H<sup>+</sup> y de Na<sup>+</sup>. Estos resultados junto con los obtenidos en los ensayos de inhibición sugieren la posible participación en el transporte intestinal de Hg(II) del transportador de cationes divalentes (DMT1), de transportadores de aminoácidos e incluso algún miembro de la familia de los OATPs a nivel basolateral (figura 10).

El transporte de CH<sub>3</sub>Hg a través del epitelio se realiza por vía transcelular, principalmente por difusión pasiva a través de la bicapa lipídica, cuando esta especie mercurial está en forma de cloruro. Adicionalmente, su paso desde el lumen al interior celular puede estar mediado por transportadores de aminoácidos, como el sistema B<sup>0,+</sup>, cuando está unida a L-Cys. La salida de CH<sub>3</sub>Hg hacia la cavidad serosa puede ser resultado del transporte a través de los sistemas de transporte de aminoácidos (L y/o y<sup>+</sup>L) y de algún miembro de la familia de los OATP (figura 11).

Algunos de los transportadores mencionados ya se ha evidenciado que pueden intervenir en el transporte de Hg(II) o CH<sub>3</sub>Hg en sistemas modelos (Zalups y Ahmad, 2004; Zalups *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha confirmado su participación en el transporte intestinal de estas formas

mercuriales. Este ha sido el objetivo del capítulo 2 de la presente tesis doctoral.





**Figura 11.** Posibles mecanismos de transporte intestinal de  $\text{CH}_3\text{Hg}$ .

## *Capítulo 2*

---

**Identificación de transportadores implicados en el transporte intestinal de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg**



En el capítulo 1 de la presente tesis se han sugerido una serie de transportadores como partícipes en el transporte transcelular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. En concreto, se ha propuesto la participación del transportador de cationes divalentes (DMT1) y los transportadores de aminoácidos B<sup>0,+</sup> y b<sup>0,+</sup> en el transporte de Hg(II) y el sistema B<sup>0,+</sup> en el paso del CH<sub>3</sub>Hg desde el lado apical al interior celular. Adicionalmente, se ha sugerido un transporte basolateral de ambas formas mercuriales mediado por los sistemas de transporte de aminoácidos L o y<sup>+L</sup>.

Con el fin de confirmar la participación de algunos de estos transportadores en la entrada de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg al interior celular, en el presente capítulo se han aplicado técnicas de silenciamiento génico en células intestinales Caco-2 mediante ARN interferente de pequeño tamaño, técnicas de reducción de los niveles de ARNm mediante tratamiento químico y se han realizado ensayos en levaduras transformadas con uno de los transportadores de interés.

## **RESULTADOS**

### **1. Estudios de identificación de transportadores empleando la línea celular Caco-2**

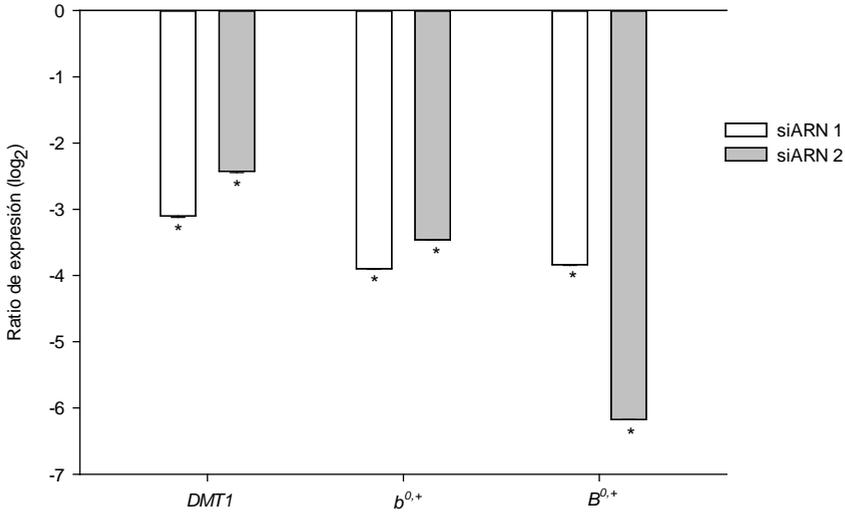
Todos los transportadores analizados se expresan en el clon de Caco-2 entre el segundo y el undécimo día post-siembra, periodo en el que se realizan los ensayos que se presentan a continuación.

#### **1.1. Inhibición de transportadores mediante silenciamiento transitorio y su efecto sobre la acumulación celular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg**

Se seleccionaron tres transportadores para confirmar mediante silenciamiento génico su participación en la entrada de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en las células Caco-2: sistema b<sup>0,+</sup>, sistema B<sup>0,+</sup> y el transportador DMT1. De todos los transportadores apuntados en el capítulo 1 se han escogido aquellos localizados en la membrana apical y, por tanto, en contacto con el lumen y partícipes directos en los procesos de entrada al epitelio intestinal. Los ensayos para el sistema DMT1 se han llevado a cabo únicamente con la especie inorgánica Hg(II), ya que este transportador es responsable del transporte de cationes divalentes. Los sistemas b<sup>0,+</sup> y B<sup>0,+</sup> se han ensayado con las formas mercuriales unidas a L-Cys ya que estudios previos indican que los complejos Hg-cisteína son los sustratos de estos dos sistemas de transporte (Bridges y Zalups, 2004; Bridges *et al.*, 2004, 2007).

Se realizaron transfecciones individuales con dos siARN distintos y con una mezcla de ambos. Los resultados obtenidos muestran un silenciamiento significativo de los tres transportadores estudiados en todas las condiciones aplicadas (figura 1). Las magnitudes de reducción de la expresión respecto a

las células Caco-2 no silenciadas son: DMT1 5.4 a 8.6 veces; sistema  $b^{0,+}$  11.0 a 13.9 veces; sistema  $B^{0,+}$  14.3 a 72.2 veces.



**Figura 1.** Expresión relativa de transportadores en células Caco-2 silenciadas en relación a células no silenciadas [ratio de expresión en base logarítmica 2 ( $\log_2$ )] (media  $\pm$  desviación estándar, n=6). Las diferencias estadísticamente significativas respecto a controles de células no silenciadas se marcan con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

Para el estudio de acumulación celular se eligieron las células tratadas con el siARN que supuso un silenciamiento génico mayor del transportador. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1. El silenciamiento de *DMT1* produce reducciones significativas en la acumulación celular de Hg(II) ( $29 \pm 3\%$ ). El silenciamiento del sistema transportador  $b^{0,+}$  da lugar a una reducción significativa de la acumulación celular de mercurio en células tratadas con Hg(II)+L-Cys ( $39 \pm 8\%$ ), pero no produce cambios en células tratadas con  $\text{CH}_3\text{Hg}+\text{L-Cys}$ . Por el contrario, el silenciamiento del sistema

transportador  $B^{0,+}$  reduce significativamente la acumulación de mercurio tras el tratamiento con  $\text{CH}_3\text{Hg}+\text{L-Cys}$  ( $16 \pm 3\%$ ) y no afecta a la acumulación tras la exposición a  $\text{Hg(II)}+\text{L-Cys}$ .

**Tabla 1.** Contenido intracelular de mercurio en células Caco-2 transfectadas con siRNA y en células control expuestas durante 60 minutos a  $\text{Hg(II)}$  (1 mg/L),  $\text{Hg(II)}+\text{L-Cys}$  (1 mg/L+2.5  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{CH}_3\text{Hg}+\text{L-Cys}$  (1 mg/L+2.5  $\mu\text{M}$ ). Valores expresados como ng  $\text{Hg}/10^6$  células (media  $\pm$  desviación estándar, n=6). Las diferencias estadísticamente significativas respecto a controles no transfectados se marcan con un asterisco ( $p<0.05$ ).

		<b>Hg(II)</b>	<b>Hg(II)+L-Cys</b>	<b>CH<sub>3</sub>Hg+L-Cys</b>
<i>DMT1</i>	Control	198.8 $\pm$ 0.9	—	—
	Transfectadas	145.0 $\pm$ 4.2*	—	—
Sistema $b^{0,+}$	Control	—	55.0 $\pm$ 0.8	50.7 $\pm$ 3.8
	Transfectadas	—	35.5 $\pm$ 0.8*	51.4 $\pm$ 3.3
Sistema $B^{0,+}$	Control	—	66.5 $\pm$ 1.0	68.2 $\pm$ 0.2
	Transfectadas	—	64.8 $\pm$ 1.1	56.0 $\pm$ 2.6*

1.2. Inhibición de la expresión del transportador *DMT1* mediante el empleo de hepcidina y su efecto sobre la acumulación y el transporte de Hg(II)

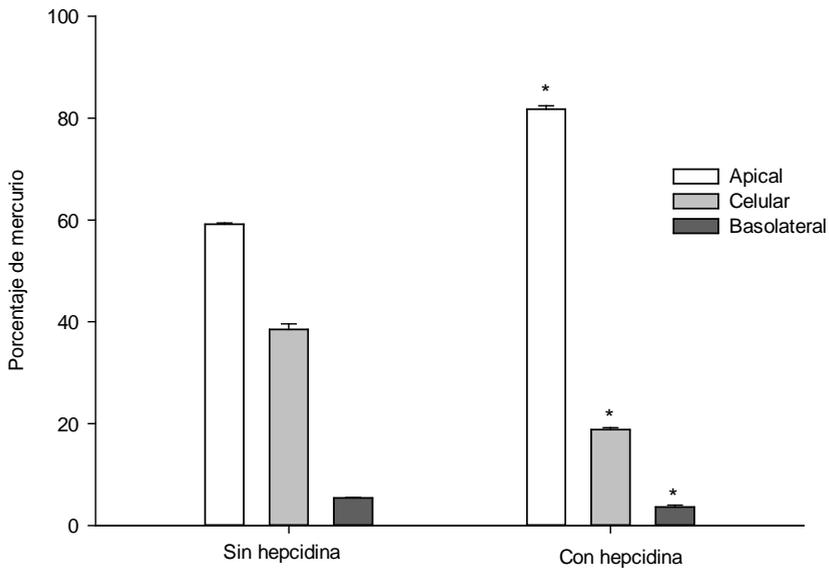
La tabla 2 muestra los resultados de expresión del transportador *DMT1* tras el tratamiento con hepcidina de células Caco-2 diferenciadas. En todos los tiempos y concentraciones ensayadas (tabla 2) se observan disminuciones de la expresión, pero sólo son significativas a concentraciones  $\geq 700$  nM. El máximo de inhibición de la expresión se produce tras 2 horas de exposición a 1200 nM de hepcidina, por lo que el ensayo de acumulación se ha realizado empleando estas condiciones.

**Tabla 2.** Expresión relativa del transportador *DMT1* en células Caco-2 diferenciadas tras el tratamiento con 200, 700 y 1200 nM de hepcidina durante 2 y 4 horas, en relación a células no tratadas. Valores expresados como ratio de expresión en base logarítmica 2 ( $\log_2$ ) y en tasa de cambio (*fold changes*, entre paréntesis) (media  $\pm$  desviación estándar, n=6). Las diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles no tratados con hepcidina se marcan con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

	Concentración hepcidina (nM)		
	200	700	1200
2 horas	-0.9 $\pm$ 0.07 (-1.8 $\pm$ 0.5)	-2.6 $\pm$ 0.01* (-6.1 $\pm$ 0.2)*	-3.5 $\pm$ 0.01* (-11.3 $\pm$ 0.08)*
4 horas	-1.2 $\pm$ 0.04 (-2.3 $\pm$ 0.4)	-3.0 $\pm$ 0.01* (-8.3 $\pm$ 0.1)*	—

Los resultados del ensayo de acumulación y transporte de Hg(II) se muestran en la figura 2. La reducción de la expresión del *DMT1* en células diferenciadas produce una disminución del contenido intracelular ( $51 \pm 2.3\%$ ) y del paso de Hg(II) al lado basolateral ( $33 \pm 7.7\%$ ). Esto a su vez

conlleva un aumento del porcentaje de mercurio presente en la parte apical ( $28 \pm 0.3\%$ ).



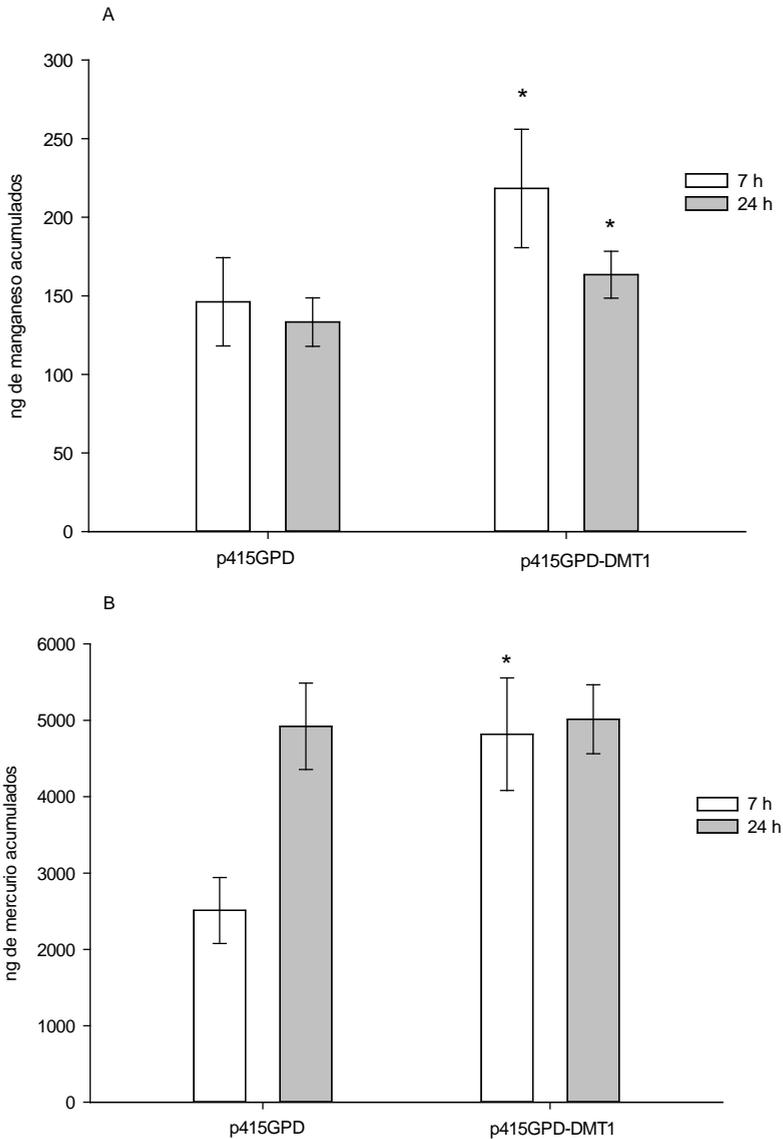
**Figura 2.** Porcentajes de mercurio en el lado apical, basolateral y en el interior celular de células Caco-2 diferenciadas con y sin tratamiento previo con 1200 nM de hepcidina (2 horas) y posterior exposición a 1 mg/L de Hg(II) (60 minutos). Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a la condición sin hepcidina para un mismo compartimento ( $p < 0.05$ ).

## **2. Estudio de la participación del transportador DMT1 en el transporte de Hg(II) empleando *S. cerevisiae***

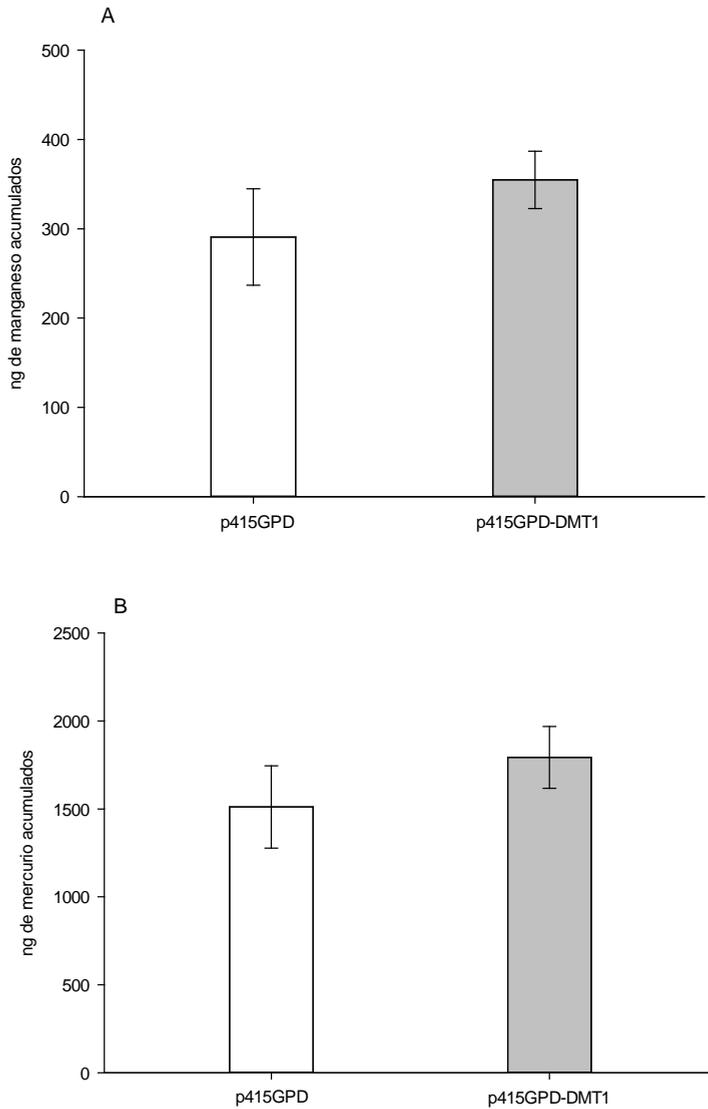
Para estudiar el papel de DMT1 en la entrada de Hg(II) al interior celular se transformaron la cepa silvestre BY4741 de *S. cerevisiae* y la cepa mutante carente de dos transportadores homólogos a DMT1 (*smf1Δsmf2Δ*), con el vector p415GPD y el plásmido p415GPD-DMT1 que permite la expresión constitutiva de *DMT1*.

Las cepas transformadas se expusieron durante 7 y 24 horas a Hg(II) y Mn(II), este último elegido como sustrato control ya que el DMT1 presenta una alta afinidad por este elemento (Gunshin *et al.*, 1997; Arredondo *et al.*, 2003). La figura 3 muestra que la expresión del transportador *DMT1* en la cepa mutante *smf1Δsmf2Δ* produce un aumento a las 7 horas de tratamiento en los niveles intracelulares de ambos cationes divalentes (Mn:  $37 \pm 6.4\%$ ; Hg:  $49 \pm 8.7\%$ ) respecto a la cepa control. A las 24 horas se observa un aumento del porcentaje de transporte de Mn(II) ( $21 \pm 4.8\%$ ) respecto a la cepa control y un aumento no significativo del transporte de Hg(II) ( $6.0 \pm 3.5\%$ ).

La cepa silvestre BY4741 transformada con p415GPD-DMT1 no muestra diferencias de acumulación a las 7 horas de exposición con respecto al control (datos no mostrados). Sin embargo, a las 24 horas de exposición muestra un ligero aumento no significativo en los niveles de manganeso ( $19 \pm 8.1\%$ ) y mercurio ( $20 \pm 5.6\%$ ) (figura 4).



**Figura 3.** Acumulación de manganeso y mercurio en la cepa mutante de levadura *smf1Δsmf2Δ* transformada con el vector p415GPD o expresando el transportador DMT1 (p415GPD-DMT1). Exposición a 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$  (3A) o 30  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  (3B) durante 7 y 24 horas (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=4$ ). Las diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles con p415GPD se marcan con un asterisco ( $p < 0.05$ ).



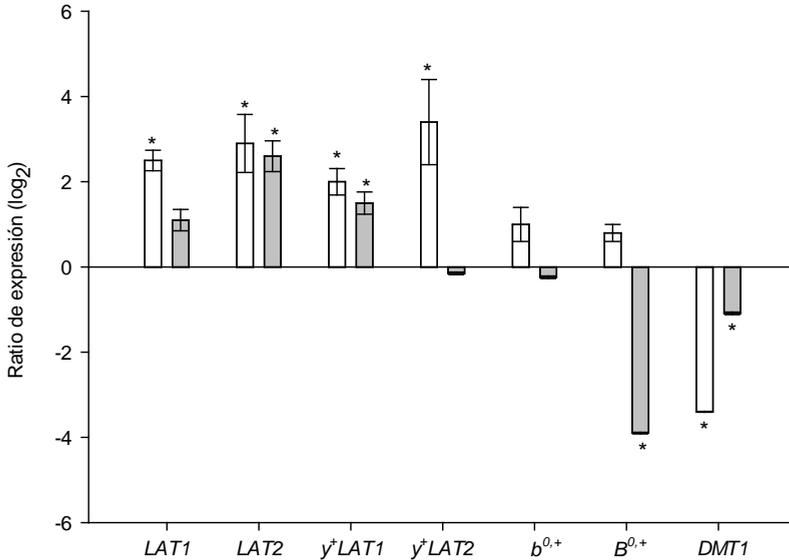
**Figura 4.** Acumulación de manganeso y mercurio en la cepa silvestre de levadura BY4741 transformada con el vector p415GPD o expresando el transportador DMT1 (p415GPD-DMT1). Exposición a 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$  (4A) o 30  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  (4B) durante 7 y 24 horas (media  $\pm$  desviación estándar, n=4).

### 3. Expresión relativa de los transportadores seleccionados en células expuestas a las formas mercuriales

Tras la exposición de células Caco-2 a 1 mg/L de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg con y sin L-Cys, se evaluaron los cambios en la expresión de los transportadores de aminoácidos situados en la parte apical (sistema  $B^{0,+}$  y  $b^{0,+}$ ) y en la parte basal ( $LAT1$ ,  $LAT2$ ,  $y^+LAT1$ ,  $y^+LAT2$ ). Adicionalmente, para el Hg(II) se evaluó la expresión del  $DMT1$ , ubicado en la parte apical.

#### 3.1. Evaluación de la expresión diferencial en células tratadas con Hg(II)

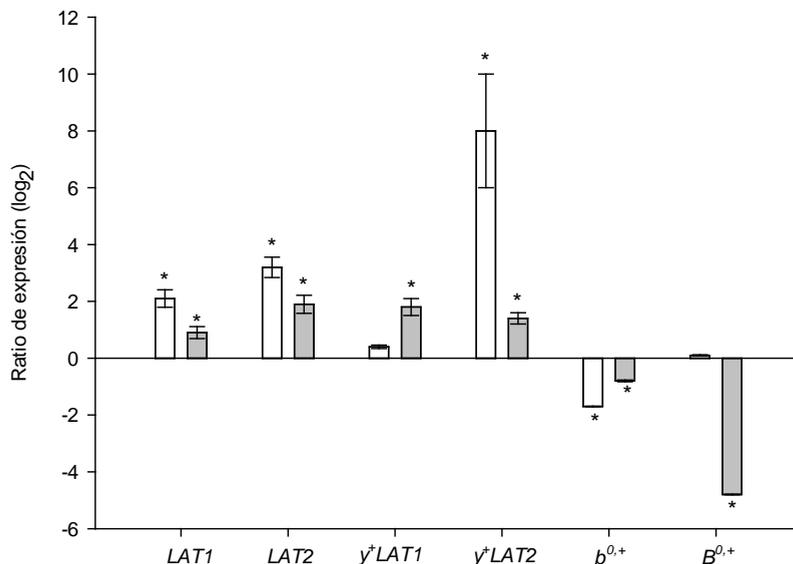
La figura 5 muestra los cambios en los niveles de ARNm de los distintos transportadores en relación a células control tras 24 y 48 horas de exposición a Hg(II). Se observan incrementos significativos de la expresión de los transportadores  $LAT1$ ,  $LAT2$ ,  $y^+LAT1$  e  $y^+LAT2$  y un descenso importante del transportador  $DMT1$ . A las 48 horas sólo se observan incrementos en la expresión de los transportadores  $LAT2$  e  $y^+LAT1$ , menores a los observados a 24 horas, y descensos significativos de la expresión del sistema  $B^{0,+}$  y del transportador  $DMT1$ .



**Figura 5.** Expresión relativa de transportadores [ratio de expresión en base logarítmica 2 ( $\log_2$ )] de células Caco-2 tratadas con Hg(II) (1 mg/L) (media  $\pm$  desviación estándar, n=8). Las barras representan diferentes tiempos de tratamiento: 24 horas (barras blancas) y 48 horas (barras grises). Para cada tiempo de exposición las diferencias estadísticamente significativas respecto a controles no tratados con mercurio se marcan con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Evaluación de la expresión diferencial en células tratadas con CH<sub>3</sub>Hg

La figura 6 muestra los cambios observados en la expresión de los distintos transportadores tras el tratamiento con 1 mg/L de CH<sub>3</sub>Hg durante 24 y 48 horas. Los resultados ponen de manifiesto una sobreexpresión de *LAT1*, *LAT2* e *y<sup>+</sup>LAT2* y una regulación a la baja del *b<sup>0,+</sup>* a los dos tiempos de exposición. Adicionalmente, a las 48 horas se observa un aumento significativo de la expresión de *y<sup>+</sup>LAT1* y una disminución del *B<sup>0,+</sup>*.

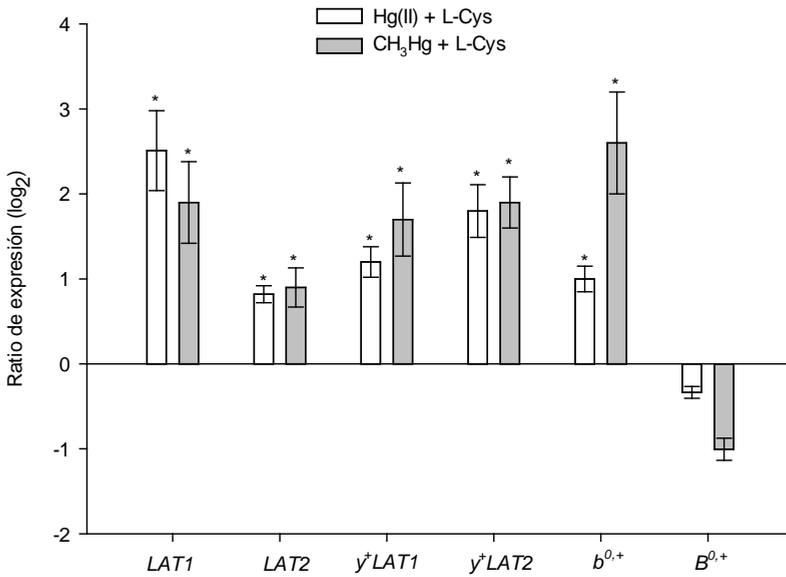


**Figura 6.** Expresión relativa de transportadores [ratio de expresión en base logarítmica 2 ( $\log_2$ )] de células Caco-2 tratadas con  $\text{CH}_3\text{Hg}$  (1 mg/L) (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=8$ ). Las barras representan diferentes tiempos de tratamiento: 24 horas (barras blancas) y 48 horas (barras grises). Para cada tiempo de exposición las diferencias estadísticamente significativas respecto a controles no tratados con mercurio se marcan con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Evaluación de la expresión diferencial en células tratadas con $\text{Hg(II)}$ y $\text{CH}_3\text{Hg}$ en presencia de L-Cys

Se ha evaluado el cambio de expresión de los distintos transportadores tras ser expuestas las células durante 24 horas a  $\text{Hg(II)}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}$  en presencia de L-Cys, La figura 7 muestra los cambios de expresión en relación a células no tratadas. Los resultados ponen de manifiesto una sobreexpresión significativa de todos los transportadores analizados a

excepción del sistema  $B^{0,+}$ , que presenta una disminución no significativa con ambos tratamientos.



**Figura 7.** Expresión relativa de transportadores [ratio de expresión en base logarítmica 2 ( $\log_2$ )] de células Caco-2 expuestas durante 24 horas a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (1 mg/L) con 5  $\mu$ M de L-Cys. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=8). Las diferencias estadísticamente significativas respecto a controles no tratados con mercurio y L-Cys se marcan con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

## **DISCUSIÓN**

El transporte celular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg se ha estudiado en distintos modelos *in vitro* y en animales de laboratorio. En células renales transfectadas se ha evidenciado que el Hg(II) unido a cisteína o homocisteína es sustrato del transportador b<sup>0+</sup> (Bridges y Zalups, 2004; Bridges *et al.*, 2004). En células del epitelio retinal humano se ha sugerido que el Hg(II) unido a cisteína puede ser transportado por el sistema B<sup>0+</sup> (Bridges *et al.*, 2007).

En cuanto al CH<sub>3</sub>Hg, se ha comprobado en oocitos de *Xenopus laevis* que unido a cisteína o homocisteína es un sustrato del sistema B<sup>0+</sup> (Bridges y Zalups, 2006b). También se ha probado en oocitos la implicación del sistema L (LAT1 y LAT2) en el transporte de CH<sub>3</sub>Hg-L-Cys (Simmons-Willis *et al.*, 2002). En células endoteliales de cerebro y en otros tipos celulares cerebrales (Aschner *et al.*, 1990; Mokrza *et al.*, 1995; Heggland *et al.*, 2009), en placenta (Kajiwara *et al.*, 1996) y en células hepáticas (Wang *et al.*, 2000) los estudios indican la posible participación del sistema L en el transporte de CH<sub>3</sub>Hg-L-Cys. Este sistema también ha sido sugerido en el cerebro de ratas (Kerper *et al.*, 1992).

Los estudios descritos anteriormente se han llevado a cabo en sistemas modelo o en tipos celulares de órganos diana, sin embargo, hasta el momento no se han identificado o sugerido transportadores responsables del transporte intestinal de las formas mercuriales. El estudio de la identificación de los transportadores intestinales responsables de la absorción de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg llevado a cabo en esta tesis se ha centrado en aquéllos que se encuentran en el dominio apical de los enterocitos en humanos y que, por ello, podrían intervenir en la entrada del tóxico desde el lumen al interior del epitelio intestinal. Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos

anteriormente descritos y los resultados del capítulo 1, se ha seleccionado el DMT1 como posible transportador del Hg(II) y los sistemas  $b^{0,+}$  y  $B^{0,+}$  como posibles partícipes en el transporte de Hg(II) y  $\text{CH}_3\text{Hg}$  unidos a L-Cys.

En el capítulo 1 se ha puesto de manifiesto que el transporte de Hg(II) aumenta a pHs ligeramente ácidos y que, por tanto, podría estar mediado en parte por un transportador dependiente de protones. Adicionalmente, se ha observado que este transporte se inhibe de forma muy acentuada con la presencia de Mn(II) en el medio. Este ha sido el motivo por el cual se ha llevado a cabo del estudio del DMT1, también conocido como NRAMP2 o DCT1 (transportador de cationes divalentes 1), como posible transportador de Hg(II). Este transportador está altamente expresado en el intestino delgado, concretamente en las vellosidades de los enterocitos y especialmente en las criptas y segmentos inferiores de las vellosidades (Gunshin *et al.*, 1997). Aunque se ha vinculado al transporte de distintos cationes divalentes no existen evidencias directas de su participación en el transporte del Hg(II).

Para evaluar la posible participación del transportador DMT1 en la entrada de Hg(II) al interior celular se han empleado tres aproximaciones complementarias. Inicialmente, se ha determinado la acumulación celular en dos cepas de *S. cerevisiae* (BY4741 y *smf1smf2Δ*) transfectadas con un plásmido que contiene la secuencia *DMT1*. La cepa *smf1Δsmf2Δ* es una cepa deficiente en el transporte de hierro ya que carece de la familia de transportadores SMF homólogos al transportador Nramp2 en humanos (Canonne-Hergaux *et al.*, 1999; Bannon *et al.*, 2002) mientras que la cepa BY4741 contiene la familia de transportadores SMF. Los estudios de acumulación de Hg(II) han puesto de manifiesto que la cepa *smf1Δsmf2Δ* que expresa el *DMT1* presenta niveles de mercurio superiores a la cepa

control (figura 3). Sin embargo, la introducción de *DMT1* en la cepa silvestre no supone un aumento significativo del mercurio intracelular, posiblemente por la presencia de los transportadores SMF. El aumento observado en la cepa deficiente indica que el DMT1 puede transportar Hg(II). Esta es la primera evidencia directa del papel del transportador DMT1 en la captación del Hg(II).

Adicionalmente a los estudios con levaduras se ha llevado a cabo un estudio de silenciamiento génico empleando la línea celular Caco-2. El silenciamiento parcial del *DMT1* empleando ARN interferente de pequeño tamaño supone una reducción importante de la acumulación intracelular de Hg(II) (tabla 1). Este hecho muestra que el transportador DMT1 puede participar en la entrada de Hg(II) al interior de la monocapa de epitelio intestinal.

Debido a la dificultad de transfección de la línea celular Caco-2 diferenciada, los estudios de silenciamiento se han llevado a cabo en células no diferenciadas en placas multipocillo. Como se ha comentado con anterioridad, esta aproximación ha permitido comprobar una reducción de la acumulación celular de Hg(II) pero no permite una evaluación del efecto del silenciamiento parcial del *DMT1* sobre el transporte de Hg(II) a través de la monocapa epitelial. Para evaluar este punto se ha llevado a cabo un tratamiento con hepcidina de la monocapa celular diferenciada sobre soportes porosos en el sistema bicameral Transwell®. La hepcidina es un péptido pequeño producido principalmente por el hígado (Brasse-Lagnel *et al.*, 2011) que se considera el mayor regulador de la homeostasis del hierro. La hepcidina se une a la ferroportina (FPN1), molécula responsable de la eliminación intracelular de hierro y de la absorción intestinal de este elemento (Donovan *et al.*, 2005). Esta unión induce la fosforilación de FPN1, su internalización, ubiquitinación y su posterior degradación en los

lisosomas (Zhao y Enns, 2012). Así, cuando los niveles de hierro son elevados, hay una sobreexpresión de la hepcidina y una reducción de los niveles de FPN1 con el fin de limitar la absorción de este elemento.

Se ha descrito que la adición de hepcidina sintética a las células Caco-2 produce una reducción de los niveles de ARNm del DMT1 (Mena *et al.*, 2007; Brasse-Lagnel *et al.*, 2011), que se traduce en una disminución de la entrada del hierro en la célula (Yamaji *et al.*, 2004; Mena *et al.*, 2007; Brasse-Lagnel *et al.*, 2011). Esta reducción de la expresión de *DMT1* puede ser una respuesta a la disminución de los contenidos de FPN1 inducidos por la hepcidina, para evitar de esta forma una carga intracelular excesiva de hierro. En este capítulo, se ha puesto de manifiesto que la reducción del ARNm del *DMT1* tras un tratamiento con 1200 nM de hepcidina durante 2 horas, produce una disminución de la entrada del Hg(II) y una reducción del transporte apical-basolateral del Hg(II) (figura 2). Este hecho es un indicativo más del papel relevante de DMT1 en el transporte de Hg(II).

Recopilando la información obtenida, se ha evidenciado que una sobreexpresión del transportador *DMT1* en *S. cerevisiae* produce un incremento del transporte de Hg(II), mientras que un descenso de los niveles de ARNm del *DMT1* en células Caco-2 en distintos estadios de diferenciación supone una reducción de la acumulación y el transporte A-B del Hg(II). Estos datos permiten concluir que el DMT1 puede participar en la absorción intestinal de Hg(II). Los resultados de expresión del transportador *DMT1* en células Caco-2 diferenciadas tras un periodo de exposición de 24 y 48 horas a Hg(II) (figura 5) muestran una disminución significativa del mismo. Este hecho podría entenderse como un mecanismo de defensa frente a la entrada excesiva de Hg(II) al interior celular dado el carácter tóxico de esta especie.

Por otra parte, los resultados de los estudios de competencia de sustrato realizados en el capítulo 1 también apuntan a una posible participación de los sistemas  $B^{0,+}$  y  $b^{0,+}$  en la entrada del Hg(II) al interior celular, ya que esta entrada se reduce en presencia de aminoácidos en el lado apical. Los resultados del silenciamiento de estos genes muestran que la disminución de los niveles de ARNm del sistema  $b^{0,+}$  produce una reducción significativa de la captación del Hg(II) en presencia de L-Cys por la monocapa celular Caco-2 (tabla 1). Este dato junto a los obtenidos en el capítulo 1 indica que el sistema  $b^{0,+}$  está implicado en la entrada al epitelio intestinal del Hg(II) unido a cisteína. Este sistema transportador ya ha sido previamente reportado como responsable del transporte de Hg(II) unido a cisteína (Bridges *et al.*, 2004) y homocisteína (Bridges y Zalups, 2004) en células de riñón transfectadas. El Hg(II) unido a cisteína tiene una estructura muy semejante a la cistina, aminoácido por el que el sistema  $b^{0,+}$  tiene una alta afinidad (Palacin *et al.*, 1998), por lo que se postula que el Hg(II)-L-Cys se transporta por un mecanismo de mimetismo molecular. Para el otro sistema de transporte estudiado, el sistema  $B^{0,+}$ , los resultados obtenidos en este capítulo no permiten concluir su implicación en el transporte intestinal de Hg(II)-L-Cys a pesar de que otros autores han sugerido su participación en células fotorreceptoras RPE (Bridges *et al.*, 2007).

En cuanto al  $CH_3Hg$ , el capítulo 1 ha puesto de manifiesto que una parte importante del transporte se produce por difusión pasiva cuando esta especie está en forma de sales de cloruro. Sin embargo, también se observa una participación de un transporte mediado por portador, parte del cual se ve inhibido en presencia de aminoácidos en el lado apical. Los resultados del silenciamiento de los sistemas transportadores de aminoácidos  $B^{0,+}$  y  $b^{0,+}$  han demostrado que sólo la reducción de la expresión del sistema  $B^{0,+}$  conlleva una reducción significativa de la acumulación intracelular de  $CH_3Hg$  en

presencia de L-Cys (tabla 1). Los resultados de silenciamiento y los obtenidos previamente en el capítulo 1 permiten apuntar a este sistema como partícipe de la entrada de CH<sub>3</sub>Hg-L-Cys al interior del epitelio intestinal. Tal y como se ha comentado previamente, el CH<sub>3</sub>Hg-L-Cys se ha demostrado que es un sustrato del sistema B<sup>0+</sup> en oocitos de *Xenopus laevis* (Bridges y Zalups, 2006b). La participación de este sistema podría justificarse nuevamente por un mecanismo de mimetismo molecular, ya que el CH<sub>3</sub>Hg unido a cisteína se asemeja estructuralmente al aminoácido metionina transportado por el sistema B<sup>0+</sup> (Martín-Venegas *et al.*, 2009). La exposición de las células Caco-2 a CH<sub>3</sub>Hg junto a L-Cys conlleva una reducción de los niveles de ARNm del sistema B<sup>0+</sup>. Posiblemente, al igual que ocurre para el *DMT1* en presencia de Hg(II), se trate de un mecanismo de defensa para evitar un aumento excesivo del tóxico en el interior celular.

En este capítulo también se han puesto de manifiesto variaciones de expresión en los transportadores tras exposición de las células Caco-2 a las formas mercuriales. En líneas generales, se puede hablar de una disminución de los niveles de los transportadores presentes en el lado apical (*DMT1*, sistema B<sup>0+</sup> y sistema b<sup>0+</sup>). Tal y como se ha comentado previamente, la reducción del transportador *DMT1* en presencia de Hg(II) y del sistema B<sup>0+</sup> en presencia de CH<sub>3</sub>Hg-L-Cys, puede ser un mecanismo celular de defensa para reducir la entrada de mercurio al interior celular desde el lado luminal.

En cuanto a los transportadores de aminoácidos basolaterales (*LAT1*, *LAT2*, y<sup>+</sup>*LAT1*, y<sup>+</sup>*LAT2*), se observa un aumento de su expresión independientemente del tratamiento aplicado. Las isoformas del sistema L se sitúan preferentemente en la membrana basolateral del epitelio intestinal (Rossier *et al.*, 1999; Bauch *et al.*, 2003; Verrey, 2003; Nguyem *et al.*, 2007), aunque algunos autores, de forma indirecta, han situado LAT1 en la membrana apical (Stevens *et al.*, 1982; Berger *et al.*, 2000). Ambas

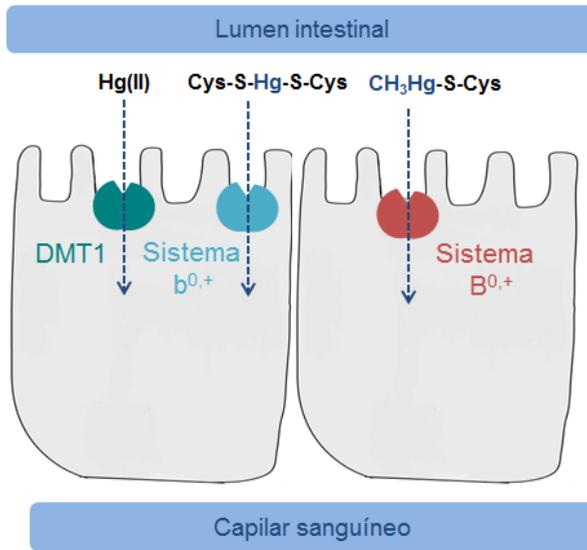
isoformas transportan aminoácidos neutros mediante un mecanismo  $\text{Na}^+$ -independiente (Segawa *et al.*, 1999). El sistema  $\text{y}^+\text{L}$  es responsable de un transporte de aminoácidos básicos independiente de sodio y de un transporte de aminoácidos neutros dependiente de sodio, pero con baja afinidad (Martín-Venegas *et al.*, 2009). Al igual que el sistema L se sitúa preferentemente en la membrana basolateral de las células epiteliales (Kizhatil y Albritton, 2002; Bauch *et al.*, 2003; Bröer, 2008).

Estos transportadores se han sugerido en el capítulo 1 como posibles partícipes en el paso de las formas mercuriales desde el interior celular al lado basolateral, debido a la reducción del transporte A-B observado en presencia de aminoácidos. La posible implicación de estos sistemas en el transporte de formas mercuriales también ha sido sugerido en trabajos previos en otras líneas celulares o modelos (Aschner *et al.*, 1990; Kerper *et al.*, 1992; Mokrza *et al.*, 1995; Kajiwara *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000; Simmons-Willis *et al.*, 2002; Bridges y Zalups, 2004; Bridges *et al.*, 2004; Heggland *et al.*, 2009). De hecho, en oocitos de *Xenopus laevis* se ha demostrado la implicación del sistema L en el transporte de  $\text{CH}_3\text{Hg-L-Cys}$  (Simmons-Willis *et al.*, 2002). Sería necesario llevar a cabo un estudio más detallado, semejante al realizado en el presente capítulo, para confirmar la participación de estos sistemas de transporte en la salida de las formas mercuriales hacia el lado basal. De ser cierta su implicación, el aumento de la expresión observado en Caco-2 podría suponer nuevamente un mecanismo de defensa celular al aumentar los transportadores implicados en la eliminación celular del tóxico. Este efecto podría no ser beneficioso a nivel sistémico ya que finalmente una mayor cantidad de mercurio podría alcanzar la circulación sanguínea.

## **CONCLUSIONES**

Este capítulo aporta información relevante respecto a los transportadores implicados en la entrada del Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg al epitelio intestinal. La forma en la que se encuentra el mercurio en el lumen intestinal puede variar dependiendo de la fuente de entrada y de los componentes dietarios presentes en el lumen. Una parte puede unirse a grupos tiol de bajo peso molecular (GSH, cisteína) y entrar al interior celular mediado por los sistemas de transporte de aminoácidos b<sup>0,+</sup> y B<sup>0,+</sup> debido a la similitud estructural con estas moléculas (figura 8).

Otra parte podría estar en forma de sales de cloruro o nitrato, entre otras. En este caso, los ensayos realizados apuntan claramente a la mediación del transportador de cationes divalente DMT1 en la entrada de Hg(II) al interior celular (figura 8). Para el CH<sub>3</sub>Hg en forma salina, molécula con un marcado carácter apolar, su principal vía de entrada sería por difusión pasiva a través de la monocapa epitelial, tal y como se ha demostrado en el capítulo 1. Una vez en el interior del epitelio intestinal posiblemente ambas formas mercuriales se unan a grupos tiol y así sean transportadas hacia el lado basal por transportadores de aminoácidos (sistema L, sistema y<sup>+L</sup>). Este punto debe ser confirmado con estudios más detallados.



**Figura 8.** Transportadores implicados en el transporte intestinal de  $\text{Hg(II)}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}$  en el dominio apical de los enterocitos.

## *Capítulo 3*

---

**Evaluación de la influencia del modelo *in vitro* de epitelio intestinal y los factores existentes en el lumen sobre la permeabilidad y acumulación del Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg**



Los estudios *in vitro* de transporte intestinal emplean generalmente la línea celular Caco-2 como modelo de epitelio intestinal; no obstante, esta línea presenta algunas limitaciones que, en función de las características del compuesto, pueden ser importantes para el estudio de su transporte intestinal. Una de ellas es presentar un espacio intercelular inferior al observado en el intestino humano. Esto no debe ser una limitación importante en la evaluación del transporte de las formas mercuriales ya que, tal y como se ha evidenciado en el capítulo 1, el transporte paracelular no es relevante en su absorción. Otra limitación a destacar es la ausencia de la capa de mucus secretada por las células caliciformes que *in vivo* recubren el epitelio intestinal humano y que se ha visto puede afectar el transporte de determinados compuestos (Wikman *et al.*, 1993; Mahler *et al.*, 2009). Una posibilidad de subsanar dicha limitación, es la adición de las células HT29-MTX secretoras de mucus al monocultivo Caco-2. Este modelo de co-cultivo ha sido usado para evaluar la absorción intestinal de drogas (Hilgendorf *et al.*, 2000; Mahler *et al.*, 2009) y algunos elementos traza (Calatayud *et al.*, 2012a; Rocha *et al.*, 2012).

En este capítulo se evalúa la influencia de la incorporación de la línea celular HT29-MTX sobre el coeficiente de permeabilidad aparente y la acumulación celular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Asimismo, con el fin de integrar en el modelo otros factores presentes de forma habitual o tras la ingesta de alimentos en el tracto intestinal, se analiza la influencia del ácido taurocólico, la L-Cys y la presencia de una matriz alimentaria sobre el proceso absorbivo de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg.

## **RESULTADOS**

### **1. Integridad de la membrana y caracterización del co-cultivo Caco-2/HT29-MTX**

Las concentraciones de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg utilizadas en los distintos ensayos de transporte y acumulación no han afectado la integridad de la monocapa celular tal y como han puesto de manifiesto los valores de RET y la permeabilidad aparente del LY. Por otro lado, la viabilidad celular tras la exposición a las especies de mercurio fue superior al 80% en todos los tratamientos realizados.

La incorporación de HT29-MTX al cultivo celular conlleva la disminución de la RET,

- Caco-2:  $330 \pm 30 \text{ Ohms} \times \text{cm}^2$ ,
- Caco-2/HT29-MTX (70/30):  $238 \pm 10 \text{ Ohms} \times \text{cm}^2$
- Caco-2/HT29-MTX (50/50):  $208 \pm 7 \text{ Ohms} \times \text{cm}^2$

Esto da lugar a un aumento del valor de  $P_{\text{app}}$  del LY,

- Caco-2:  $0.13 \pm 0.02 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$
- Caco-2/HT29-MTX (70/30):  $5 \pm 0.24 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$
- Caco-2/HT29-MTX (50/50):  $7 \pm 0.25 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$

Estos datos indican que la presencia de las células HT29-MTX supone un aumento del paso paracelular de la monocapa epitelial, que puede atribuirse a un incremento del tamaño de poro entre las uniones intercelulares o a un aumento del número de poros de la monocapa celular, tal y como han descrito otros autores (Hildgendorf *et al.*, 2002; Linnankoski *et al.*, 2010).

## 2. Influencia del modelo celular sobre el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

### 2.1. Coeficiente de permeabilidad aparente de las especies mercuriales

Los valores de  $P_{app}$  para el Hg(II) y el CH<sub>3</sub>Hg en los distintos modelos celulares se muestran en la tabla 1. Para ambas especies, el  $P_{app}$  se reduce significativamente en los co-cultivos respecto a los valores hallados en el monocultivo Caco-2. El aumento de la proporción de HT29-MTX en los co-cultivos afecta de forma distinta a cada especie. Así, el  $P_{app}$  del Hg(II) no varía entre las monocapas 70/30 y 50/50, mientras que para el CH<sub>3</sub>Hg presenta una disminución significativa en el co-cultivo 50/50.

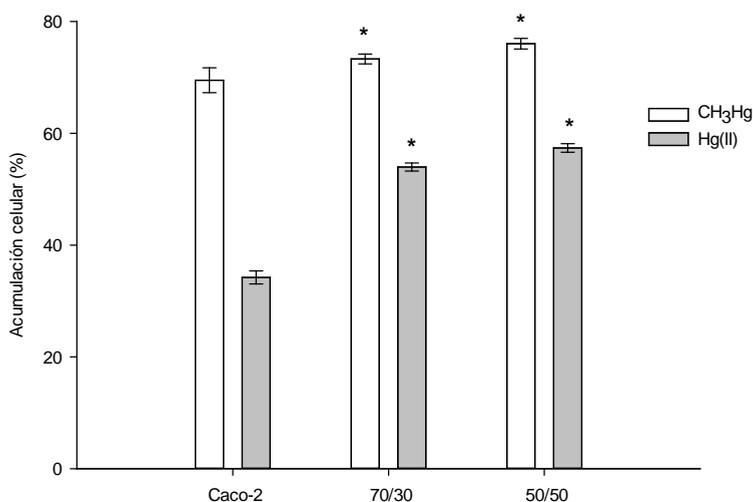
**Tabla 1.** Coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app} \times 10^{-6}$  cm/s) de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (0.8 mg/L) en monocapas Caco-2 y Caco-2/HT29-MTX (70/30, 50/50). Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Las diferentes letras indican diferencias significativas del  $P_{app}$  entre las monocapas tratadas con una misma especie mercurial (p<0.05).

Modelo celular	$P_{app}$ ( $1 \times 10^{-6}$ cm/s)	
	Hg(II)	CH <sub>3</sub> Hg
Caco-2	4.30 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	3.56 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
Caco-2/HT29-MTX (70/30)	3.13 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	2.68 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
Caco-2/HT29-MTX (50/50)	3.11 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	2.44 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>

### 2.2. Acumulación celular de las especies mercuriales

La figura 1 muestra el porcentaje de mercurio acumulado en la monocapa celular tras la exposición a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Los resultados ponen de manifiesto que existe una importante acumulación celular de ambas

especies, siendo en todas las monocapas superior para el  $\text{CH}_3\text{Hg}$  que para el  $\text{Hg}(\text{II})$ . El aumento de la proporción de HT29-MTX en el cultivo supone un incremento de los contenidos celulares de mercurio, especialmente para el  $\text{Hg}(\text{II})$  que ve incrementada su retención un 23% en el co-cultivo 50/50 respecto al monocultivo de Caco-2.



**Figura 1.** Contenido celular de mercurio en la monocapa Caco-2 y en los co-cultivos Caco-2/HT29-MTX (70/30 y 50/50) expuestos a 0.8 mg/L de  $\text{CH}_3\text{Hg}$  o  $\text{Hg}(\text{II})$  durante 120 minutos. Datos expresados como porcentaje respecto a la cantidad de mercurio adicionada inicialmente al cultivo (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ). El asterisco indica diferencias significativas de los co-cultivos respecto a la monocapa Caco-2 ( $p < 0.05$ ).

### 2.3. Evaluación de la retención celular de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en el mucus secretado por las células HT29-MTX

Para evaluar si el menor coeficiente de permeabilidad y la mayor acumulación celular de mercurio en los co-cultivos era consecuencia de la capa de mucus que secretan las células HT29-MTX, se ha estudiado la cantidad de mercurio presente en el mucus tras 120 minutos de exposición. Los resultados evidencian una elevada acumulación de mercurio en el mucus, la cual varía con la especie mercurial ensayada (CH<sub>3</sub>Hg: 70 ± 0.16%; Hg(II): 30 ± 0.74%).

La eliminación de mucus de las células HT29-MTX previo al ensayo de transporte, supone una menor retención celular de las formas mercuriales (Tabla 2).

**Tabla 2.** Porcentaje de acumulación celular tras 120 minutos de exposición de monocultivos HT29-MTX a 0.8 mg/L de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en condiciones normales y previa eliminación del mucus.

<b>Tratamiento</b>	<b>Acumulación celular (%)</b>	
	<b>Con mucus</b>	<b>Sin mucus</b>
Hg(II)	47.50 ± 0.04	13.50 ± 0.74
CH <sub>3</sub> Hg	85.80 ± 0.37	15.90 ± 0.16

### 3. Evaluación de la influencia de factores presentes en el tracto gastrointestinal sobre la permeabilidad y acumulación del Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

#### 3.1. Influencia de la L-Cys en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

La tabla 3 muestra los contenidos totales de mercurio en el compartimento apical, basolateral y celular del co-cultivo Caco-2/HT29-MTX (70/30) expuesto durante 120 minutos a CH<sub>3</sub>Hg, Hg(II) o a mezclas de ambas especies con L-Cys. La presencia de L-Cys disminuye de forma significativa la retención celular de ambas especies mercuriales. En cuanto al transporte al lado basolateral se observa un aumento significativo para el Hg(II), mientras que para el CH<sub>3</sub>Hg no varía en presencia de L-Cys.

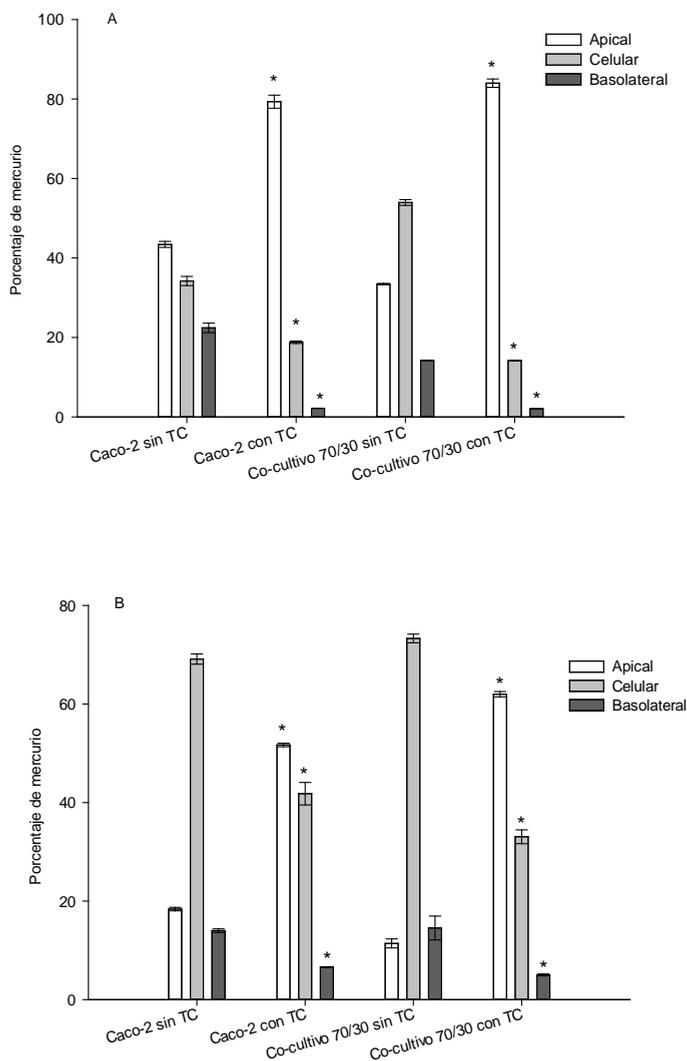
**Tabla 3.** Porcentaje de mercurio en los distintos compartimentos (apical, celular y basolateral) de co-cultivos Caco-2/HT29-MTX (70/30) expuestos durante 120 minutos a 0.7 mg/L de Hg(II) o CH<sub>3</sub>Hg en presencia o ausencia de L-Cys (5 μM). Valores expresados como media ± desviación estándar (n=3). Los resultados marcados con un asterisco indican diferencias significativas de los tratamientos con L-Cys respecto a los tratamiento sólo con las formas mercuriales (p<0.05).

Tratamiento	Adición (ng)	Porcentaje de mercurio		
		Apical (%)	Celular (%)	Basolateral (%)
Hg(II)	600	48 ± 3	45 ± 2	7 ± 0.9
Hg(II) + L-Cys	650	46 ± 0.6*	38 ± 0.2*	12 ± 0.2*
CH <sub>3</sub> Hg	630	21 ± 0.1	73 ± 1	6 ± 0.2
CH <sub>3</sub> Hg+ L-Cys	600	23 ± 1	70 ± 0.2*	6 ± 0.3

Las modificaciones observadas en presencia de L-Cys en co-cultivos son de menor magnitud que las puestas de manifiesto en los monocultivos Caco-2 (capítulo 1, figura 9), especialmente para el CH<sub>3</sub>Hg.

### 3.2. Influencia del ácido taurocólico en el transporte y acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Las sales biliares están presentes en el lumen de forma habitual. Se ha descrito que el ácido taurocólico, uno de los componentes mayoritarios de la bilis, puede influenciar la absorción de elementos traza (Rocha *et al.*, 2012) y compuestos lipofílicos (Hilgendorf *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta la naturaleza de las formas mercuriales, se ha creído de interés evaluar el efecto del ácido taurocólico (20 mM) en su transporte en monocultivos Caco-2 y en co-cultivos Caco-2/HT29-MTX (70/30). Los resultados obtenidos (figura 2) ponen de manifiesto que independientemente del modelo celular empleado, la presencia de ácido taurocólico reduce significativamente la acumulación de las formas mercuriales [Caco-2 (Hg 45%; CH<sub>3</sub>Hg 39%); Caco-2/HT29-MTX (Hg 74%; CH<sub>3</sub>Hg 45%)] y su transporte a través de la monocapa intestinal [Caco-2 (Hg 90%; CH<sub>3</sub>Hg 53%); Caco-2/HT29-MTX (Hg 86%; CH<sub>3</sub>Hg 66%)].



**Figura 2.** Porcentajes de mercurio en los distintos compartimentos (apical, basolateral y celular) de las monocapas Caco-2 y Caco-2/HT29-MTX (70/30) expuestas a 0.7 mg/L de Hg(II) (A) o CH<sub>3</sub>Hg (B), en presencia o ausencia de ácido taurocólico (TC, 20 mM). Valores expresados como media ± desviación estándar (n=3). El asterisco indica diferencias significativas en un mismo compartimento del tratamiento con TC respecto al tratamiento sin TC para las distintas monocapas (p< 0.05).

### 3.3. Influencia de la matriz alimentaria en el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg

Tras aplicar una digestión gastrointestinal simulada a tres muestras de pez espada, el contenido de mercurio solubilizado oscila entre 0.02 y 0.03 mg/L. La tabla 4 muestra los resultados del transporte de mercurio de estas fracciones bioaccesibles adicionadas durante 60 minutos al co-cultivo Caco-2/HT29-MTX (70/30). Teniendo en cuenta que la especie mayoritaria en la fracción soluble de pez espada es el CH<sub>3</sub>Hg (Torres-Escribano *et al.*, 2011), se ha ensayado también el transporte de un patrón de esta especie preparado en el blanco de digestión gastrointestinal.

El transporte y la retención del mercurio de la fracción bioaccesible de las tres muestras de pez espada difieren de la observada en el patrón. La presencia de la matriz alimentaria aumenta significativamente el porcentaje no absorbido (de 48% a  $\geq 73\%$ ) y disminuye significativamente la captación celular (de 33% a  $\leq 14\%$ ).

**Tabla 4.** Contenido de mercurio en los distintos compartimentos (apical, celular y basolateral) de co-cultivos Caco-2/HT29-MTX (70/30) expuestos durante 60 minutos a la fracción bioaccesible de pez espada (n=3) y al patrón de CH<sub>3</sub>Hg preparado en blanco de digestión gastrointestinal (n=2). Valores expresados como ng de Hg/mg proteína (media ± desviación estándar) y en porcentaje respecto al mercurio adicionado (entre paréntesis). Los resultados marcados con un asterisco indican diferencias significativas de la fracción bioaccesible de pez espada respecto al patrón de CH<sub>3</sub>Hg (p<0.05).

Muestras	Adición (ng)	Apical	Celular	Basolateral
Pez espada	50	38.3 ± 0.3 (77%)*	5.55 ± 0.34 (11%)*	1.25 ± 0.05 (3%)
	35	32.2 ± 1.3 (92%)*	3.22 ± 0.07 (9%)*	0.87 ± 0.30 (3%)
	31	22.6 ± 1.8 (73%)*	4.18 ± 0.02 (14%)*	1.15 ± 0.26 (4%)
CH <sub>3</sub> Hg patrón	29	14.0 ± 0.8 (48%)	9.68 ± 1.20 (33%)	1.31 ± 0.30 (5%)

## DISCUSIÓN

Para evaluar el transporte es importante considerar la composición celular del epitelio intestinal donde coexisten distintos tipos celulares. En el transporte intestinal intervienen mayoritariamente los enterocitos pero también existe una importante contribución de las células caliciformes y especialmente de la capa de mucus que secretan. El empleo de co-cultivos Caco-2/HT29-MTX constituye, por tanto, una aproximación más realista a las características presentes *in vivo*. Este modelo de epitelio intestinal ha sido ampliamente utilizado en la bibliografía para múltiples propósitos (Wikman-Lared y Artursson, 1995; Laparra y Sanz, 2009; Mahler *et al.*, 2009), si bien no existen antecedentes sobre su uso para el estudio de la absorción

intestinal de las especies mercuriales. Este capítulo de tesis aporta información novedosa ya que evalúa el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg empleando un modelo celular que emula la composición celular mayoritaria del epitelio intestinal.

La introducción de HT29-MTX en el modelo celular aumenta el paso paracelular de la monocapa epitelial ya que produce uniones intercelulares más laxas, con un tamaño medio del radio de poro más semejante al del intestino delgado. De hecho, los co-cultivos Caco-2/HT29-MTX utilizados en esta tesis presentan un descenso de los valores de RET (37%) y un incremento del P<sub>app</sub> del LY (7 veces) respecto al monocultivo Caco-2. Esta apertura no debería facilitar el transporte de las formas mercuriales ya que, tal y como se ha comprobado en el capítulo 1, la vía paracelular no es un componente destacable de su transporte intestinal. No obstante, la incorporación de HT29-MTX en el cultivo celular modifica el transporte, existiendo una disminución de la permeabilidad en sentido absorbivo de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. La disminución observada podría ser atribuida al efecto de la capa de mucus producida por las células HT29-MTX. Se ha descrito que esta capa actúa como barrera para la difusión de compuestos lipofílicos (Karlsson *et al.*, 1993; Behrens *et al.*, 2001) y por lo tanto afectaría al CH<sub>3</sub>Hg que, atendiendo a los coeficientes de partición octanol/agua, se puede considerar un compuesto lipofílico (Halbach, 1985; Quig, 1998). Por otro lado, esta capa de mucus presenta extremos amino y carboxiterminales ricos en residuos de cisteína (Gum *et al.*, 1992; Lau *et al.*, 2004), por cuyos grupos sulfhidrido las especies de mercurio presentan alta afinidad (Quig, 1998; Heggland *et al.*, 2009; Bridges y Zalups, 2010).

La hipótesis de la interacción de las formas mercuriales con el mucus se corrobora con los resultados de los ensayos de acumulación realizados en esta tesis, que ponen de manifiesto que a medida que aumenta la proporción

de HT29-MTX en el co-cultivo hay una mayor retención celular de mercurio. El mucus es el responsable de los cambios en la acumulación, ya que la mayoría del mercurio queda retenido en esta capa glicoproteica [40% para Hg(II) y 70% para CH<sub>3</sub>Hg]. La capa de mucus supone, por lo tanto, una barrera para el transporte de ambas especies de mercurio y su efecto debería ser considerado al estimar la absorción de mercurio *in vitro*. Hay que destacar que en determinadas circunstancias como infecciones o procesos inflamatorios crónicos, donde se produce una disminución del grosor de esta capa (Fyderek *et al.*, 2009; Wlodarska *et al.*, 2011), la absorción de estas formas mercuriales podría verse incrementada.

Por otro lado, en elementos traza como fluoruro o el arsénico se ha evidenciado una modificación del transporte en presencia de componentes habituales en el lumen gastrointestinal (sales biliares, determinadas sustancias tioladas) o de componentes solubilizados desde la matriz alimentaria (Calatayud *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2012). En la presente tesis se ha evaluado la influencia de estos componentes sobre el transporte de las formas mercuriales. La introducción del ácido taurocólico, componente mayoritario de las sales biliares, produce un descenso significativo aunque no pronunciado del transporte y de la acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Se ha puesto de manifiesto en roedores que el ácido taurocólico a concentraciones premicelares (<0.5 mM) se une a cationes como el calcio y el ion ferroso y favorece su absorción (Sanyal *et al.*, 1991, 1994). Sin embargo, a concentraciones superiores (0.5 a 50 mM), la constante de afinidad del ácido taurocólico por estos cationes se reduce significativamente y no se ve favorecido su transporte (Sanyal *et al.*, 1990; 1994). La concentración de taurocolato empleada en este trabajo es muy superior a las concentraciones consideradas premicelares y, posiblemente por ello, no se observa un aumento en el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en presencia de este

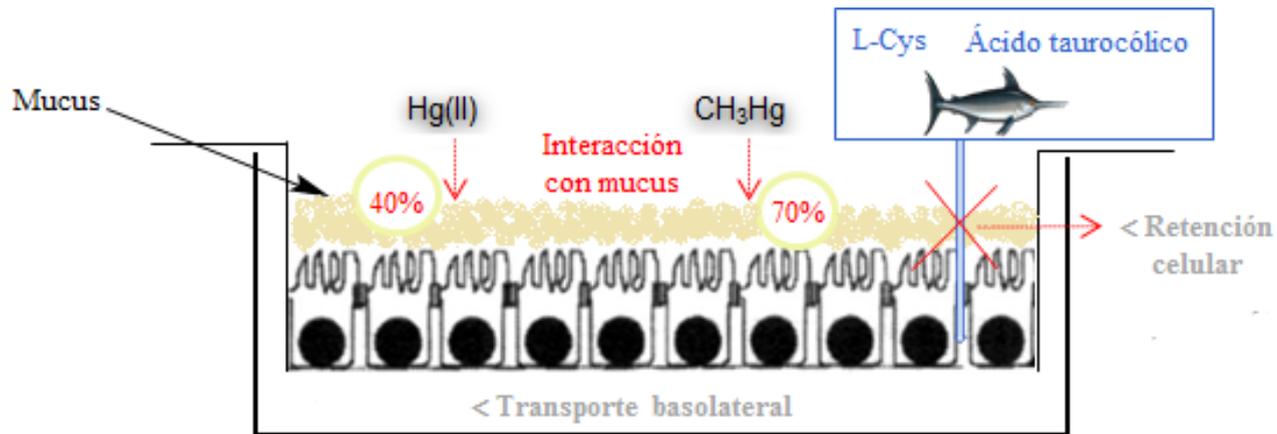
componente de las sales biliares. Por otro lado, el taurocolato es un sustrato de los transportadores de aniones orgánicos (OATP) (Hagenbuch y Gui, 2008) que también se han descrito como mecanismos de transporte de las formas mercuriales, especialmente de la inorgánica (Bridges y Zalups, 2010), y se han apuntado como partícipes en el transporte basolateral de ambas formas mercuriales en el capítulo 1. Podría existir, por tanto, una reducción del paso basolateral del mercurio cuando el taurocolato está en exceso frente a las formas mercuriales, condiciones empleadas en este trabajo (20 mM de taurocolato vs 4  $\mu$ M de mercurio).

Otro factor que se ha evidenciado importante en el transporte de mercurio es la formación de complejos con distintas formas de cisteína. Se sabe que la cisteína puede estar presente en el lumen procedente de la dieta (Siamak *et al.*, 1973) o, tal y como apuntan otros autores en ensayos con roedores, procedente de la degradación de la mucosa intestinal (Dahm y Jones, 1994). Tal y como se ha comentado previamente, el Hg(II) o CH<sub>3</sub>Hg forman fuertes uniones con el átomo reducido de azufre presente en la cisteína (Bridges *et al.*, 2007). En este capítulo se ha evaluado el efecto de L-Cys en el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en co-cultivos Caco-2/HT29-MTX. Los resultados indican que la presencia de L-Cys aumenta el paso al lado basolateral y reduce la acumulación celular, tal y como se había puesto de manifiesto previamente en el monocultivo Caco-2 (capítulo 1). Este aumento del transporte puede ser la causa directa de la menor retención observada en las monocapas intestinales. Adicionalmente, la disminución del contenido celular en co-cultivos podría atribuirse a una menor retención en el mucus ya que los complejos especie mercurial-cisteína no presentan el mismo grado de reactividad y, por tanto, interaccionarán en menor medida con los residuos sulfhidrilo de la mucina.

Se ha descrito que algunos componentes de la dieta (salvado dietético y clorofilas) pueden afectar la captación celular del mercurio (Rowland *et al.*, 1986; Hwang y Shim, 2008). En este capítulo se ha evidenciado que los componentes solubilizados durante la digestión gastrointestinal de pez espada disminuyen la entrada de mercurio en co-cultivos Caco-2/HT29-MTX, si bien el porcentaje de transporte al lado basolateral no presenta diferencias importantes. Este descenso en la entrada, que se traduce en una menor acumulación celular, podría ser debido a que algunos componentes de la matriz alimentaria afectan a la absorción por formación de complejos con el mercurio cuya tasa de transporte sea menor. En este sentido, se ha descrito que el mercurio unido a selenio (HgSe) presenta una reducida tasa de absorción *in vivo* (Endo *et al.*, 2003). En el pez espada la concentración de Se es elevada y en ocasiones presenta una mayor abundancia molar que el mercurio (Calatayud *et al.*, 2012c), lo cual podría favorecer la formación de estos complejos. Adicionalmente, otros componentes alimentarios también podrían interferir en la absorción del mercurio, compitiendo por los mismos mecanismos de transporte. Este podría ser el caso de los aminoácidos, abundantes en una matriz proteica como el pez espada.

## **CONCLUSIONES**

Los resultados del presente capítulo amplían los conocimientos existentes sobre el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg a través del epitelio intestinal y evidencian que el modelo celular es determinante en la evaluación de este transporte dada la alta retención de las especies de mercurio en el mucus. Asimismo, la presencia de sales biliares, cisteína o componentes dietéticos disminuyen la acumulación y el paso de ambas especies de mercurio a la cavidad serosa (figura 5). Todos estos factores deben tenerse en cuenta en los estudios *in vitro* encaminados a evaluar el transporte y absorción de las formas mercuriales. Adicionalmente estos resultados indican que puede reducirse la absorción intestinal de mercurio mediante el empleo de componentes procedentes de la dieta. Este aspecto debería ser considerado a la hora de diseñar estrategias dietéticas encaminadas a la reducción de la exposición oral a mercurio.



**Figura 3.** Efecto del mucus, el ácido taurocólico, la L-Cys y la matriz alimentaria sobre la absorción intestinal del Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg.

## *Capítulo 4*

---

**Estudios de toxicidad de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en monocapas epiteliales del intestino con distintos estadios de diferenciación**



Dado que la principal vía de exposición humana al mercurio es la oral y atendiendo a su carácter tóxico, la acumulación de este elemento traza en el intestino podría afectar a la estructura y funcionalidad del mismo y, por tanto, a los procesos de digestión, absorción y a la importante función barrera de este tramo del tracto digestivo. De hecho se han puesto de manifiesto desórdenes gastrointestinales en exposiciones prolongadas a mercurio *in vivo* (NTP, 1993). En estudios realizados en otros tipos celulares o tejidos se han descrito varios mecanismos celulares relacionados con la toxicidad de las formas mercuriales (Hussain *et al.*, 1997; Zalups y Lash, 1997; Gatti *et al.*, 2004; Shanker *et al.*, 2005; Frasco *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008), si bien no existen estudios a nivel intestinal.

En el presente capítulo se evalúa el posible efecto tóxico que las formas mercuriales más comunes en alimentos [Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg] pueden ejercer sobre el modelo de epitelio intestinal formado por las células Caco-2. Este efecto se estudia en distintos estadios de diferenciación, intentado de esta forma abarcar las poblaciones celulares existentes en el epitelio, tejido en continuo proceso de renovación. También se evalúan los posibles mecanismos responsables de la toxicidad y algunos de los efectos que esta toxicidad puede ejercer sobre la estructura y función de esta capa externa de la pared intestinal.

## **RESULTADOS**

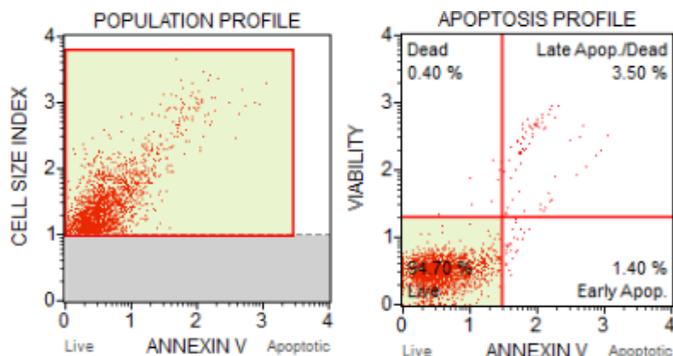
### **1. Identificación de los estadios de diferenciación**

Muchos estudios muestran que después de alcanzar la confluencia, las células Caco-2 se diferencian progresivamente hasta que adquieren las características típicas de los enterocitos maduros (Hidalgo *et al.*, 1989). Con el fin de confirmar este punto, en el presente estudio se ha evaluado la expresión del gen de la fosfatasa alcalina intestinal (*ALPI*), utilizado por otros autores como marcador de diferenciación de los enterocitos (Calatayud *et al.*, 2012d; Yang *et al.*, 2013). En todos los ensayos realizados, la expresión génica de *ALPI* es mayor en las células Caco-2 a los 10 días post-siembra ( $202 \pm 46$  veces) que a los 4 días post-siembra. Estos datos confirman que hay un mayor grado de diferenciación celular a los 10 días.

### **2. Evaluación de viabilidad y tipo de muerte celular (apoptosis vs necrosis)**

Durante las etapas tempranas de apoptosis, la fosfatidilserina, confinada normalmente en la capa interna de la bicapa lipídica, se trasloca a la superficie externa. La anexina V es un miembro de la familia de proteínas de unión a fosfolípidos que presenta una alta afinidad por la fosfatidilserina. Por tanto, todas las células que hayan iniciado el proceso de apoptosis, serán marcadas por esta proteína. Por otro lado, el fluoróforo no permeable 7-aminoactinomicina D (7-AAD) se emplea para marcar aquellas células que han perdido la integridad de la membrana, bien sean necróticas o apoptóticas tardías. El ensayo utilizado permite distinguir células viables [Anexina(-), 7-AAD(-)], células apoptóticas [tempranas: Anexina(+), 7-AAD(-) o tardías:

Anexina(+), 7-AAD(+)] y células necróticas [Anexina(-), 7-AAD(+)] (figura 1).



**Figura 1.** Distribución de la población celular empleando la doble tinción (Anexina y 7-AAD).

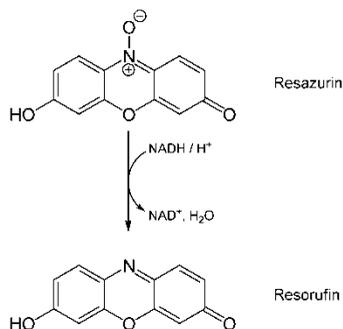
Las células Caco-2 expuestas durante 6 horas a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg no presentan disminuciones de viabilidad relevantes ( $\leq 10\%$ ). Estas disminuciones sólo son destacables tras 24 horas de tratamiento con CH<sub>3</sub>Hg a la mayor concentración (2 mg/L, tabla 1). Estas reducciones son similares para ambos estadios de diferenciación (diferenciadas: 20%; indiferenciadas: 23%). La disminución de la viabilidad celular va acompañada de un aumento de la población apoptótica y necrótica. Hay que destacar que en algunos tratamientos con mercurio el porcentaje de apoptosis es superior al observado para la estaurosporina, un importante inductor de apoptosis.

**Tabla 1.** Porcentaje de viabilidad, necrosis y apoptosis de células Caco-2 diferenciadas y no diferenciadas expuestas a estaurosporina, Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 24 horas. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). El asterisco indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

Tratamiento		Diferenciadas			No diferenciadas		
		Viabilidad (%)	Necrosis (%)	Apoptosis (%)	Viabilidad (%)	Necrosis (%)	Apoptosis (%)
Control		96.6 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.7	97.3 $\pm$ 0.5*	0.28 $\pm$ 0.03	2.4 $\pm$ 0.33
Estaurosporina 2 $\mu$ M		94.2 $\pm$ 0.3*	1.2 $\pm$ 0.1*	6.7 $\pm$ 0.2*	82.1 $\pm$ 0.6*	0.22 $\pm$ 0.06	11.1 $\pm$ 0.64*
Hg(II) (mg/L)	0.1	93.4 $\pm$ 0.3*	0.8 $\pm$ 0.3*	4.9 $\pm$ 0.5*	94.4 $\pm$ 0.6*	0.42 $\pm$ 0.2	5.1 $\pm$ 0.6*
	0.5	92.2 $\pm$ 0.3*	1.5 $\pm$ 0.04	6.2 $\pm$ 0.3*	92.8 $\pm$ 0.3*	0.42 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.2*
	1	92.0 $\pm$ 0.9*	1.2 $\pm$ 0.5	6.7 $\pm$ 0.5*	91.4 $\pm$ 0.3*	0.8 $\pm$ 0.01*	7.6 $\pm$ 0.4*
	2	86.7 $\pm$ 1.4*	1.3 $\pm$ 0.3	11.2 $\pm$ 1.3*	83.8 $\pm$ 2.0*	0.67 $\pm$ 0.2*	12.7 $\pm$ 2.0*
CH <sub>3</sub> Hg (mg/L)	0.1	87.8 $\pm$ 0.8*	3.4 $\pm$ 0.2*	9.6 $\pm$ 0.9*	92.1 $\pm$ 0.6*	0.33 $\pm$ 0.01	5.7 $\pm$ 0.3*
	0.5	86.1 $\pm$ 0.6*	4.5 $\pm$ 0.8*	11.2 $\pm$ 0.3*	91.4 $\pm$ 0.8*	0.8 $\pm$ 0.1*	7.0 $\pm$ 0.2*
	1	84.3 $\pm$ 3.7*	2.6 $\pm$ 0.2	13.5 $\pm$ 3.5*	86.2 $\pm$ 1.3*	2.7 $\pm$ 0.3*	16.3 $\pm$ 0.9*
	2	73.0 $\pm$ 0.8*	5.3 $\pm$ 0.4*	24.5 $\pm$ 1.0*	75.1 $\pm$ 3.5*	3.6 $\pm$ 0.6*	22.3 $\pm$ 2.3*

### 3. Evaluación de la actividad mitocondrial

La conversión de resazurina a resorufina (figura 2), medible coloriméricamente, se asocia con el número de células viables.



**Figura 2.** Conversión de resazurina a resorufina.

La tabla 2 muestra la actividad mitocondrial de las células Caco-2 tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg respecto a las células control no tratadas. Los resultados indican que tras 4 horas de exposición no existen diferencias significativas entre células tratadas y no tratadas. A las 6 horas se observan descensos de actividad significativos, si bien sólo pueden considerarse destacables a partir de las 24 horas y a las concentraciones más elevadas ( $\geq 1$  mg/L). Tras 24 horas las reducciones de actividad son dependientes de la concentración de mercurio. A la concentración más elevada de exposición (2 mg/L) la reducción es superior para la especie orgánica [CH<sub>3</sub>Hg: 62-67%; Hg(II) 39-52%]. En líneas generales, la disminución de la actividad mitocondrial no depende del estadio de diferenciación.

**Tabla 2.** Porcentaje de actividad mitocondrial de células Caco-2 diferenciadas (D) y no diferenciadas (ND) tratadas a distintos tiempos con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg, respecto a células control no tratadas. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=4). El asterisco indica diferencias significativas (p<0.05) con respecto al control.

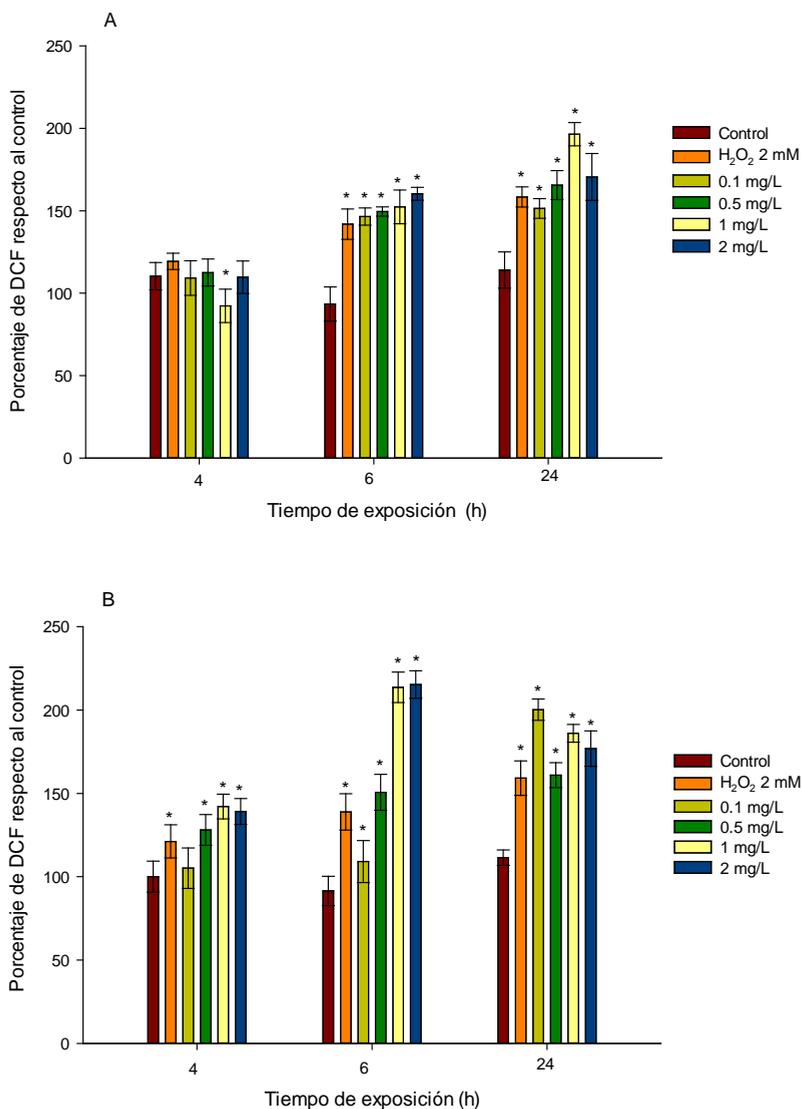
Tratamiento (mg/L)		4 horas		6 horas		24 horas	
		D	ND	D	ND	D	ND
Hg(II)	0.1	96.7 $\pm$ 8.6	119.9 $\pm$ 1.3	90.1 $\pm$ 9.6	91 $\pm$ 0.7	84.5 $\pm$ 8.1	81.4 $\pm$ 3.2*
	0.5	91.3 $\pm$ 6.1	107.6 $\pm$ 2.6	74.3 $\pm$ 12*	84.6 $\pm$ 2.5	70.6 $\pm$ 8.1*	72.6 $\pm$ 2.5*
	1	81.2 $\pm$ 7.7	104.3 $\pm$ 2.6	71.4 $\pm$ 6.1*	80.8 $\pm$ 0.9	66.6 $\pm$ 3.5*	66.7 $\pm$ 5.1*
	1.5	79.1 $\pm$ 6.4*	116.0 $\pm$ 5.1	70.8 $\pm$ 3.5*	79.7 $\pm$ 3.3	66.7 $\pm$ 4.0*	58.9 $\pm$ 3.6*
	2	77.2 $\pm$ 3.4*	107.6 $\pm$ 1.0	70.3 $\pm$ 10*	76.5 $\pm$ 2.0	61.1 $\pm$ 5.6*	48.2 $\pm$ 3.9*
CH <sub>3</sub> Hg	0.1	104.6 $\pm$ 2.5	104.4 $\pm$ 1.6	86.7 $\pm$ 2.1*	80.6 $\pm$ 4.5	86.4 $\pm$ 7.8	74.3 $\pm$ 1.9
	0.5	94.9 $\pm$ 5.9	107.8 $\pm$ 1.3	80.3 $\pm$ 2.6*	78.1 $\pm$ 2.3	79.0 $\pm$ 7.8*	68.5 $\pm$ 6.5*
	1	96.2 $\pm$ 4.5	110.4 $\pm$ 1.5	79.5 $\pm$ 2.5*	77.0 $\pm$ 2.7	76.9 $\pm$ 1.7*	63.4 $\pm$ 4.3*
	1.5	93.7 $\pm$ 7.4	124.1 $\pm$ 2.1	78.3 $\pm$ 3.5*	76.5 $\pm$ 1.7	68.3 $\pm$ 5.7*	46.1 $\pm$ 8.3*
	2	92.9 $\pm$ 7.2	121.8 $\pm$ 3.2	77.5 $\pm$ 1.9*	74.1 $\pm$ 5.4	38.3 $\pm$ 4.5*	32.8 $\pm$ 6.7*

#### **4. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o nitrógeno (NOS)**

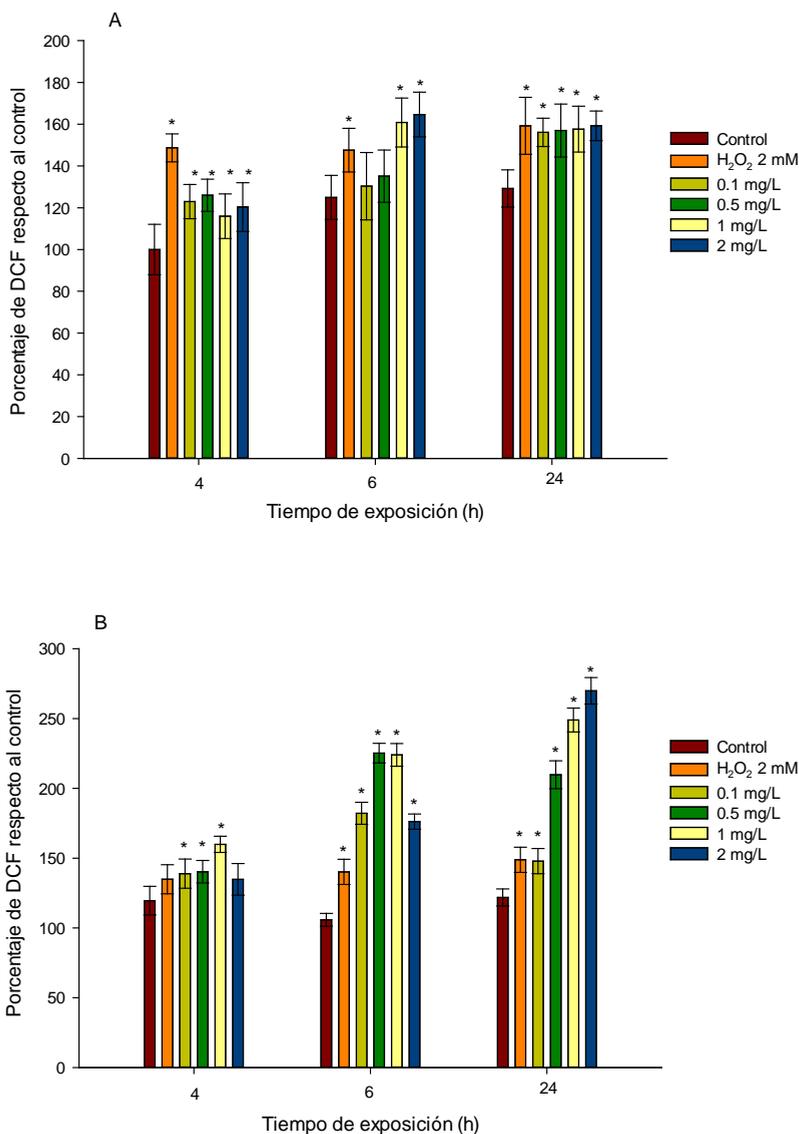
La oxidación de DCFH-DA al compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) por las especies reactivas de oxígeno (ROS) o nitrógeno (RNS) es un indicador altamente sensible que se emplea para la evaluación de la generación de estrés oxidativo a nivel celular (Wan *et al.*, 2003).

La figura 3 y 4 muestran la formación de DCF por las células Caco-2 diferenciadas (figuras A) y no diferenciadas (figuras B) tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg a distintos tiempos de exposición. En células no diferenciadas existe un aumento de ROS y/o RNS tras 4 horas de tratamiento, que es similar para ambas especies mercuriales [Hg(II): 128-142%; CH<sub>3</sub>Hg: 115-140%] y que se pone de manifiesto desde las concentraciones más bajas. En células diferenciadas el aumento se produce también tras 4 horas de exposición a CH<sub>3</sub>Hg (116-126%); sin embargo, el tratamiento con Hg(II) sólo genera una mayor proporción de ROS y/o RNS tras 6 horas de exposición (156-167%).

A las 24 horas todas las concentraciones de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg aumentan los niveles de ROS y/o RNS respecto al control, siendo en general mayores los aumentos en células indiferenciadas [diferenciadas: 121-172%; no diferenciadas: 122-222%]. La generación de ROS y/o RNS es mayor o igual en las células tratadas con las formas mercuriales que en las células tratadas con 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, considerado un importante inductor de estrés oxidativo.



**Figura 3.** Porcentaje de fluorescencia debido a la formación de diclorofluoresceína (DCF) en células Caco-2 diferenciadas (A) y no diferenciadas (B) expuestas a 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a distintas concentraciones de Hg(II) (0.1, 0.5, 1 y 2 mg/L). Resultados expresados respecto al control no tratado (media ± desviación estándar; n=3). El asterisco indica diferencias significativas (p<0.05) con respecto al control.



**Figura 4.** Porcentaje de fluorescencia debido a la formación de diclorofluoresceína (DCF) en células Caco-2 diferenciadas (A) y no diferenciadas (B) expuestas a 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a distintas concentraciones de CH<sub>3</sub>Hg (0.1, 0.5, 1 y 2 mg/L). Resultados expresados respecto al control no tratado (media ± desviación estándar; n=3). El asterisco indica diferencias significativas (p<0.05) con respecto al control.

## 5. Contenidos intracelulares de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH)

El glutatión, tripéptido formado por cisteína, glutamato y glicina, es el principal antioxidante no enzimático del organismo. Según su estado de oxidación puede estar como glutatión reducido (GSH) u oxidado (GSSG). La enzima glutatión peroxidasa (GPx) reduce los peróxidos empleando GSH como dador de electrones, dando lugar a GSSG como producto final (Townsend *et al.*, 2003). Por ese motivo, en situaciones de estrés oxidativo pueden disminuir los niveles de GSH intracelular y aumentar los de GSSG. Por tanto, la relación GSSG/GSH se puede emplear como indicativo de estrés oxidativo.

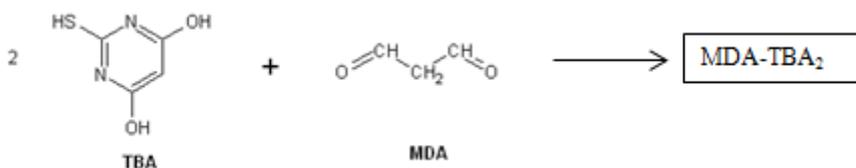
La tabla 3 muestra las concentraciones de GSH total (GSH+GSSG), GSH y el ratio GSSG/GSH en células Caco-2 diferenciadas y no diferenciadas tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 30 minutos. Ambas especies producen una disminución de los contenidos intracelulares de GSH total. Para Hg(II) la disminución respecto al control sólo es significativa a concentraciones de 2 mg/L, tanto en células diferenciadas como no diferenciadas. Para el CH<sub>3</sub>Hg el descenso es significativo a concentraciones  $\geq 1$  mg/L en células no diferenciadas y a partir de 2 mg/L en células diferenciadas. La disminución de los valores de GSH reducido no supone en la mayoría de los casos un aumento de los contenidos de GSSG, exceptuando las células expuestas a las concentraciones más elevadas de CH<sub>3</sub>Hg.

**Tabla 3.** Concentraciones de GSH total (T-GSH, GSH + GSSG,  $\mu\text{M}/\text{mg}$  proteína), GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  proteína) y ratios GSSG/GSH en células Caco-2 diferenciadas y no diferenciadas tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Hg(II) y  $\text{CH}_3\text{Hg}$  durante 30 minutos. Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). El asterisco indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

		Diferenciadas			No diferenciadas		
Tratamiento		T-GSH	GSH	GSSG/GSH	T-GSH	GSH	GSSG/GSH
Control		12.0 $\pm$ 1.7	11.8 $\pm$ 1.1	0.023	8.9 $\pm$ 0.5	8.8 $\pm$ 0.5	0.013
$\text{H}_2\text{O}_2$ 2 mM		9.1 $\pm$ 0.6*	8.9 $\pm$ 0.6*	0.023	8.5 $\pm$ 0.5	8.4 $\pm$ 0.5	0.012
Hg(II) (mg/L)	0.1	10.1 $\pm$ 0.5	9.9 $\pm$ 0.5	0.020	9.0 $\pm$ 0.8	8.9 $\pm$ 0.7	0.008
	0.5	9.8 $\pm$ 1.2	9.6 $\pm$ 1.2	0.023	9.4 $\pm$ 0.4	9.3 $\pm$ 0.4	0.009
	1	9.2 $\pm$ 1.5	8.9 $\pm$ 1.5	0.027	8.7 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 0.3	0.009
	2	7.7 $\pm$ 1.2*	7.5 $\pm$ 1.0*	0.029	7.8 $\pm$ 0.1*	7.8 $\pm$ 0.2*	0.010
$\text{CH}_3\text{Hg}$ (mg/L)	0.1	12.3 $\pm$ 1.1	12.0 $\pm$ 1.0	0.015	9.6 $\pm$ 0.2	9.5 $\pm$ 0.1	0.010
	0.5	11.0 $\pm$ 0.2	10.8 $\pm$ 0.2	0.018	9.2 $\pm$ 0.2	9.0 $\pm$ 0.2	0.008
	1	10.5 $\pm$ 0.5	10.3 $\pm$ 0.5	0.023	7.9 $\pm$ 0.1*	7.6 $\pm$ 0.0*	0.050*
	2	7.2 $\pm$ 0.2*	6.9 $\pm$ 0.2*	0.028	7.7 $\pm$ 0.2*	7.4 $\pm$ 0.2*	0.051*

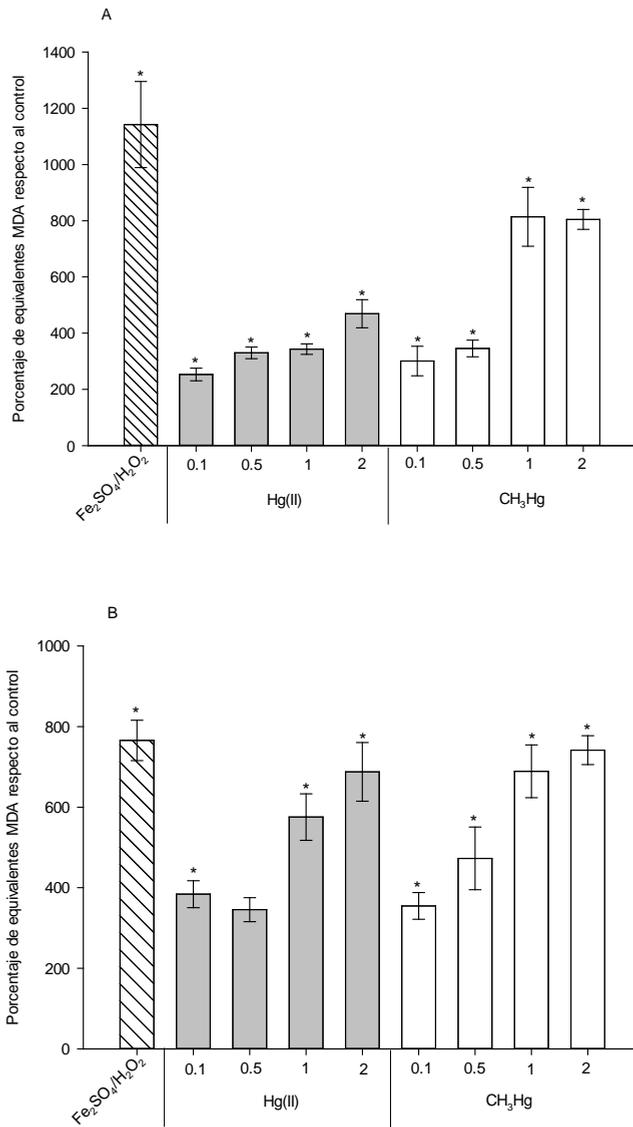
## 6. Evaluación de la peroxidación lipídica

Los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana son oxidados por reacciones mediadas por radicales libres. El malondialdehído (MDA) es uno de los productos finales de este proceso oxidativo. A pH ácidos y altas temperaturas, el MDA participa en reacciones de adición nucleofílica con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), generando un aducto 1:2 MDA:TBA (figura 5) detectable colorimétrica o fluorimétricamente (Janero, 1990).



**Figura 5.** Reacción del malondialdehído y el ácido tiobarbitúrico.

Los ensayos llevados a cabo empleando esta técnica (figura 6) muestran que las células tratadas con ambas especies mercuriales presentan niveles intracelulares de MDA superiores al control tras 30 minutos de tratamiento y en ambos estadios de diferenciación. Los porcentajes de aumento de los equivalentes de MDA respecto al control en células diferenciadas (figura 6A) son mayores para el  $\text{CH}_3\text{Hg}$  (301-832%) que para el  $\text{Hg(II)}$  (253-604%). Por el contrario, en células indiferenciadas (figura 6B), el aumento de MDA es similar para ambas especies [ $\text{Hg(II)}$ : 384-848%;  $\text{CH}_3\text{Hg}$ : 355-832%].



**Figura 6.** Porcentaje de equivalentes de malonaldehído (MDA) respecto al control en células Caco-2 diferenciadas (A) y no diferenciadas (B) expuestas durante 30 minutos a FeSO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM/2 mM) y distintas concentraciones (mg/L) de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Valores expresados como media ± desviación estándar (n=3). El asterisco indica diferencias significativas (p<0.05) con respecto al control.

## **7. Expresión diferencial de los genes que codifican para las proteínas de estrés térmico (*HSP*), metalotioneínas (*MT*) y factor de necrosis tumoral (*TNF $\alpha$* )**

Las tablas 4 y 5 muestran la expresión relativa de la metalotioneína 2A (*MT2A*), de las proteínas de choque térmico (*HSP27* y *HSP90*) y del *TNF $\alpha$*  en células diferenciadas y no diferenciadas, tras distintos tiempos de exposición a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. En general, independientemente del estadio de diferenciación celular, los tratamientos conllevan cambios significativos en la expresión de los genes estudiados.

En células diferenciadas (tabla 4), las inducciones se producen principalmente a las 4 horas de exposición, mientras que a las 6 y 24 horas hay una mayor regulación a la baja. Los mayores cambios de expresión se producen en el gen que codifica la *MT2A*, donde se observan sobreexpresiones en todos los tratamientos a las 4 horas (ratio de expresión en escala logarítmica en base 2: 5.4-6.2) e importantes descensos de la regulación a tiempos superiores (ratio de expresión en escala logarítmica en base 2: 2.8-8.2). La citoquina *TNF $\alpha$*  y la proteína de choque térmico *HSP90* sólo presentan modificaciones puntuales, observándose siempre una mayor inducción por parte de la forma orgánica de mercurio a tiempos cortos. La proteína *HSP27* es la menos afectada por los tratamientos, observándose en general regulaciones a la baja.

En células indiferenciadas (tabla 5) se observa un menor número de genes con regulaciones a la baja. El gen que codifica a *HSP90* es el único que experimenta una sobreexpresión con todos los tratamientos y en la mayoría de los tiempos ensayados. También es destacable la sobreexpresión de *TNF $\alpha$*  en células tratadas 4 horas con CH<sub>3</sub>Hg, con inducciones muy superiores a las observadas en células diferenciadas (ratio de expresión en escala logarítmica

en base 2: 8.3 para 0.5 mg/L y 3.9 para 1 mg/L). En cuanto a *HSP27*, su expresión experimenta modificaciones a la alza, a excepción del tratamiento con 0.5 mg/L de CH<sub>3</sub>Hg durante 6 horas.

**Tabla 4.** Expresión relativa de proteínas de choque térmico 27 (*HSP27*) y 90 (*HSP90*), metalotioneína 2A (*MT2A*), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*TNF $\alpha$* ) (ratio de expresión en escala logarítmica en base 2) en células Caco-2 diferenciadas tratadas con 0.5 y 1 mg/L de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 4, 6 y 24 horas (media  $\pm$  desviación estándar, n=3). El asterisco indica diferencias significativas (p<0.05) con respecto al control. En azul se indican los incrementos significativos en la expresión y en rojo los descensos significativos.

	Hg (II) 0.5 mg/L			Hg (II) 1 mg/L		
	4 h	6 h	24 h	4 h	6 h	24 h
<i>HSP27</i>	8 $\pm$ 0.01*	-1.1 $\pm$ 0.04	-0.14 $\pm$ 0.02	-1.4 $\pm$ 0.11	-1.0 $\pm$ 0.05	-0.21 $\pm$ 0.04
<i>HSP90</i>	1.5 $\pm$ 0.51	-0.15 $\pm$ 0.02	-0.18 $\pm$ 0.03	3.0 $\pm$ 1.14*	1.2 $\pm$ 0.34	-1.5 $\pm$ 0.06
<i>MT2A</i>	5.7 $\pm$ 1.9*	-5.2 $\pm$ 0.01*	-3.9 $\pm$ 0.01*	5.7 $\pm$ 1.17*	-3.0 $\pm$ 0.01*	-1.2 $\pm$ 0.04
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	-1.2 $\pm$ 0.08	-0.07 $\pm$ 0.03	-2.3 $\pm$ 0.03*	-0.05 $\pm$ 0.01	0.83 $\pm$ 0.06	-0.59 $\pm$ 0.10

	CH <sub>3</sub> Hg 0.5 mg/L			CH <sub>3</sub> Hg 1 mg/L		
	4 h	6 h	24 h	4 h	6 h	24 h
<i>HSP27</i>	0.02 $\pm$ 0.008	-3.9 $\pm$ 0.01*	-2.6 $\pm$ 0.02*	1.6 $\pm$ 0.54	-1.6 $\pm$ 0.03*	0.03 $\pm$ 0.01
<i>HSP90</i>	3.8 $\pm$ 1.13*	-2.1 $\pm$ 0.03	-2.3 $\pm$ 0.02*	5.2 $\pm$ 1.5*	-0.23 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.09
<i>MT2A</i>	5.4 $\pm$ 1.64*	-8.2 $\pm$ 0.00*	-5.3 $\pm$ 0.01*	6.2 $\pm$ 1.00*	-6.4 $\pm$ 0.01*	-2.8 $\pm$ 0.01*
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	3.8 $\pm$ 1.27*	-2.7 $\pm$ 0.01*	-5.5 $\pm$ 0.01*	3.1 $\pm$ 1.15*	-0.24 $\pm$ 0.04	-3.1 $\pm$ 0.01*

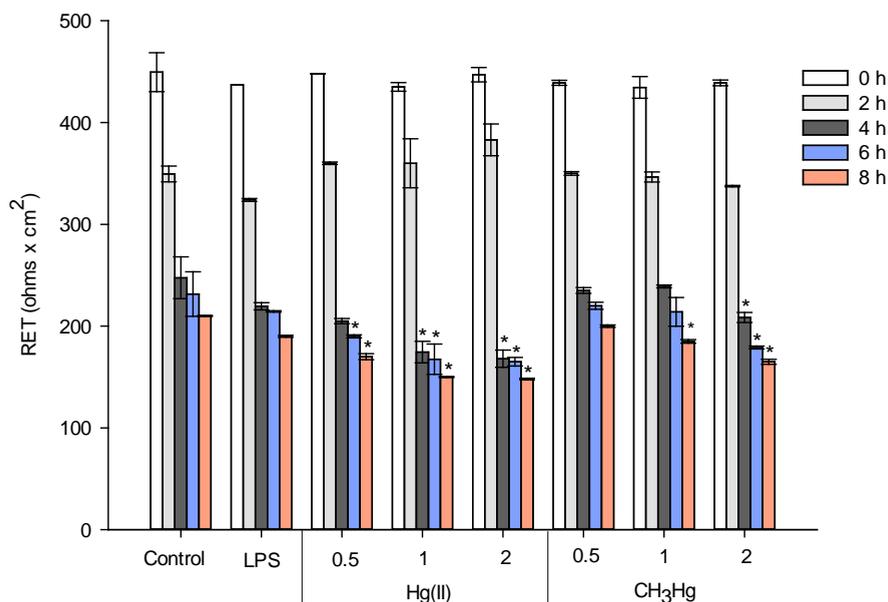
**Tabla 5.** Expresión relativa de proteínas de choque térmico 27 (*HSP27*) y 90 (*HSP90*), metalotioneína 2A (*MT2A*), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*TNF $\alpha$* ) (ratio de expresión en escala logarítmica en base 2) de células Caco-2 indiferenciadas tratadas con 0.5 y 1 mg/L de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 4, 6 y 24 horas (media  $\pm$  desviación estándar, n=3). El asterisco indica diferencias significativas (p<0.05) con respecto al control. En azul se indican los incrementos significativos en la expresión y en rojo los descensos significativos.

	<b>Hg (II) 0.5 mg/L</b>			<b>Hg (II) 1 mg/L</b>		
	4 h	6 h	24 h	4 h	6 h	24 h
<i>HSP27</i>	0.92 $\pm$ 0.27	1.5 $\pm$ 0.43*	0.49 $\pm$ 0.15	1.4 $\pm$ 0.34*	1.0 $\pm$ 0.58*	1.7 $\pm$ 0.51*
<i>HSP90</i>	2.3 $\pm$ 0.99*	2.4 $\pm$ 0.95*	1.9 $\pm$ 0.69*	2.7 $\pm$ 0.60*	1.6 $\pm$ 1.00*	4.1 $\pm$ 1.70*
<i>MT2A</i>	0.55 $\pm$ 0.15	0.007 $\pm$ 0.001	4.1 $\pm$ 1.42*	1.5 $\pm$ 0.29*	1.0 $\pm$ 0.05*	3.9 $\pm$ 0.27*
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	3.4 $\pm$ 0.95*	-0.87 $\pm$ 0.13	1.8 $\pm$ 0.92*	2.3 $\pm$ 0.92*	-1.0 $\pm$ 0.14*	2.4 $\pm$ 0.28*

	<b>CH<sub>3</sub>Hg 0.5 mg/L</b>			<b>CH<sub>3</sub>Hg 1 mg/L</b>		
	4 h	6 h	24 h	4 h	6 h	24 h
<i>HSP27</i>	1.4 $\pm$ 0.54*	-1.6 $\pm$ 0.06*	0.8 $\pm$ 0.22	1.4 $\pm$ 0.41*	0.15 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.11
<i>HSP90</i>	3.2 $\pm$ 1.63*	0.46 $\pm$ 0.19	4.9 $\pm$ 1.91*	3.4 $\pm$ 0.45*	2.36 $\pm$ 0.93*	5.0 $\pm$ 1.02*
<i>MT2A</i>	1.1 $\pm$ 0.33*	-0.96 $\pm$ 0.05*	1.4 $\pm$ 0.44*	2.3 $\pm$ 0.61*	0.48 $\pm$ 0.13	1.9 $\pm$ 0.77*
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	8.3 $\pm$ 1.76*	-5.5 $\pm$ 0.001*	3.6 $\pm$ 0.91*	3.9 $\pm$ 0.40*	-0.69 $\pm$ 0.09	3.1 $\pm$ 1.06*

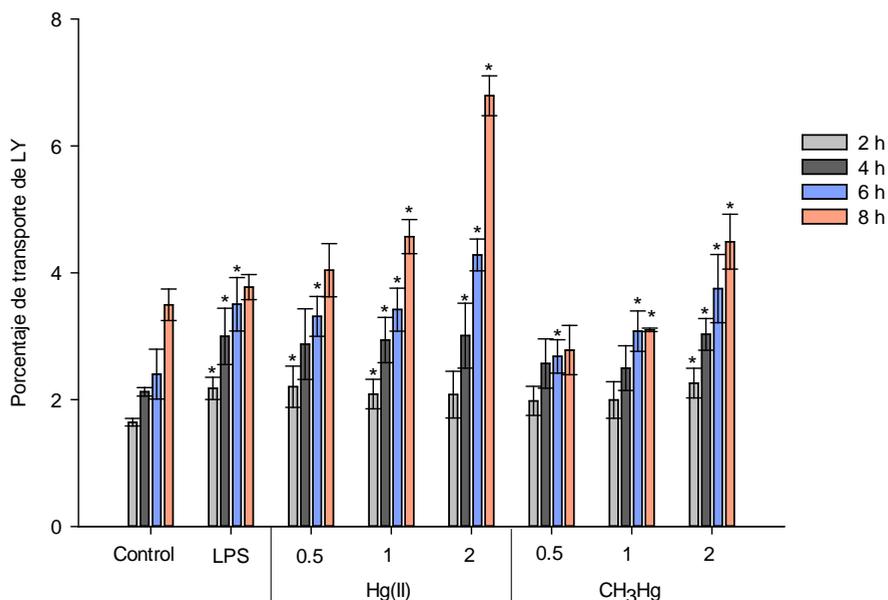
## 8. Evaluación de la permeabilidad de las monocapas celulares

Las células tratadas con las formas mercuriales presentan una disminución de la RET respecto a los controles no tratados (figura 7). Esta disminución se pone de manifiesto desde las 4 horas y a las concentraciones superiores o iguales a 1 mg/L para el Hg(II) (14-36%) y desde las 4 horas y 2 mg/L para el CH<sub>3</sub>Hg (12%).



**Figura 7.** Valores de RET (Ohms  $\times$  cm<sup>2</sup>) en células Caco-2 diferenciadas tras distintos tiempos de exposición a lipopolisacárido (LPS 0.05 mg/L), Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (0.5, 1 y 2 mg/L). Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3). El asterisco indica diferencias significativas (p<0.05) con respecto al control.

La disminución de la RET conlleva un aumento del porcentaje de transporte de LY para las células tratadas con ambas especies mercuriales (figura 8), mayor para el Hg(II) (132-206%) que para el CH<sub>3</sub>Hg (119-167%).



**Figura 8.** Porcentaje de Lucifer yellow (LY) transportado al lado basolateral en células Caco-2 diferenciadas tras distintos tiempos de exposición a lipopolisacárido (LPS 0.05 mg/L), Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg (0.5, 1 y 2 mg/L). Valores expresados como media ± desviación estándar (n=3). El asterisco indica diferencias significativas (p<0.05) con respecto al control.

### **9. Expresión diferencial de los genes que codifican para las proteínas constituyentes de las uniones intercelulares (claudina 1, ocludina, zonula occludens 1 y molécula de adhesión intercelular 1)**

La tabla 6 muestra la expresión relativa de los genes que codifican proteínas de las uniones intercelulares [claudina 1 (*CLDN1*), ocludina (*OCLN*), zonula occludens 1 (*ZOI*) y molécula de adhesión intercelular 1 (*JAMI*)] en células diferenciadas expuestas durante 4, 6 y 24 horas a 0.5 y 1 mg/L de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Los resultados muestran que la exposición a ambas formas mercuriales produce cambios significativos en la expresión de los genes estudiados, predominando las reducciones de la expresión. Estas reducciones son significativas a las 24 horas para la células tratadas con Hg(II) independientemente de la concentración, excepto para el gen *JAMI* que no experimenta cambios significativos. En las células expuestas a CH<sub>3</sub>Hg se observan reducciones a todos los tiempos para la concentración de 1 mg/L, y a las 6 y 24 horas para la concentración más baja (0.5 mg/L).

Únicamente el gen que codifica *ZOI* experimenta regulaciones al alza a los tiempos cortos de tratamiento. Se evidencia una sobreexpresión de este gen en células tratadas con Hg(II) a las 4 y 6 horas de tratamiento y en células expuestas a CH<sub>3</sub>Hg tras 4 horas de exposición a 0.5 mg/L (ratio de expresión en escala logarítmica en base 2: 3.17-4.53).

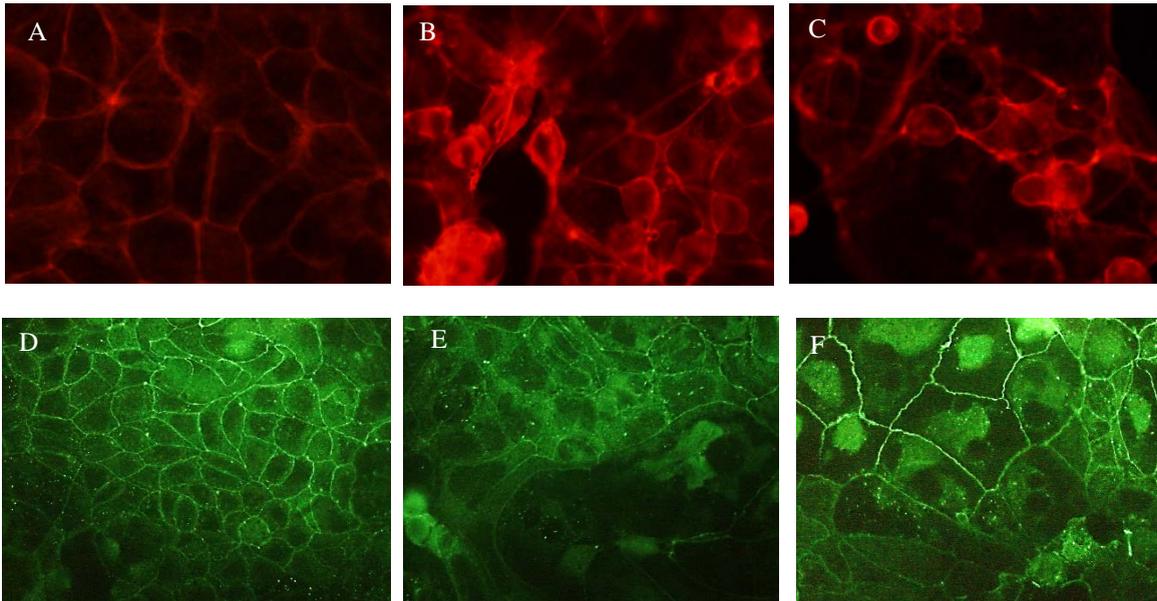
**Tabla 6.** Expresión relativa de proteínas constituyentes de las uniones intercelulares [claudina 1 (*CLDNI*), ocludina (*OCLN*), zonula occludens 1 (*ZOI*) y molécula de adhesión de intercelular 1 (*JAMI*)] (ratio de expresión en escala logarítmica en base 2) en células Caco-2 diferenciadas tratadas con 0.5 y 1 mg/L de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 4, 6 y 24 horas (media ± desviación estándar, n=3). El asterisco indica diferencias significativas (p<0.05) con respecto al control. En azul se indican los incrementos significativos en la expresión y en rojo los descensos significativos.

	Hg (II) 0.5 mg/L			Hg (II) 1 mg/L		
	4 h	6 h	24 h	4 h	6 h	24 h
<i>CLDNI</i>	0.25 ± 0.08	-0.02 ± 0.001	-2.42 ± 0.03*	0.94 ± 0.25	-0.01 ± 0.001	-3.54 ± 0.01*
<i>OCLN</i>	0.71 ± 0.21	-1.23 ± 0.08	-2.25 ± 0.03*	1.42 ± 0.42	-0.44 ± 0.15	-3.51 ± 0.01*
<i>ZOI</i>	3.67 ± 1.08*	4.53 ± 1.72*	-3.68 ± 0.01*	4.03 ± 1.26*	4.28 ± 1.84*	-3.25 ± 0.02*
<i>JAMI</i>	1.81 ± 0.12	-0.28 ± 0.07	-1.34 ± 0.07	1.84 ± 0.20	0.48 ± 0.18	-0.94 ± 0.09

	CH <sub>3</sub> Hg 0.5 mg/L			CH <sub>3</sub> Hg 1 mg/L		
	4 h	6 h	24 h	4 h	6 h	24 h
<i>CLDNI</i>	-0.45 ± 0.06	-2.83 ± 0.02*	-4.84 ± 0.01*	-6.48 ± 0.01*	-6.65 ± 0.01*	-4.12 ± 0.01*
<i>OCLN</i>	-0.46 ± 0.07	-3.21 ± 0.01*	-4.95 ± 0.01*	-5.16 ± 0.01*	-6.43 ± 0.01*	-4.43 ± 0.01*
<i>ZOI</i>	3.17 ± 0.95*	-4.16 ± 0.004*	-6.95 ± 0.01*	-6.10 ± 0.01*	-5.01 ± 0.01*	-5.54 ± 0.01*
<i>JAMI</i>	1.11 ± 0.13	-2.83 ± 0.02*	-2.48 ± 0.02*	-5.49 ± 0.01*	-6.96 ± 0.01*	-2.18 ± 0.04*

## **10. Evaluación de la distribución de la actina filamentosa (F-actina) y ZO1 mediante microscopía de fluorescencia**

La figura 9 muestra la distribución de la F-actina y de la proteína de unión intercelular ZO1 en células Caco-2 expuestas durante 24 horas a 1 mg/L de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. En las células control la F-actina y la ZO1 se localizan principalmente en la periferia celular, dando una imagen característica en empedrado (A y D). El tratamiento con Hg(II) (B y E) y CH<sub>3</sub>Hg (C y F) provoca una desestructuración de la monocapa celular, lo que se refleja en una mayor presencia de actina y ZO1 en el citoplasma. Por otro lado, las células tratadas con CH<sub>3</sub>Hg muestran un aumento del volumen celular (C y F).



**Figura 9.** Imágenes de la distribución en células Caco-2 de la F-actina tras tinción con TRITC-faloidina (A-C) y de la ZO1 tras inmunofluorescencia (D-F). A y D: células control; B y E: células tratadas con Hg (II) (1 mg/L, 24 horas); C y F: células tratadas con CH<sub>3</sub>Hg (1 mg/L, 24 horas). Imágenes tomadas con el objetivo de 40X.

## **DISCUSIÓN**

Las evidencias procedentes de los estudios clínicos, de los ensayos *in vitro* y con animales de experimentación sugieren que la pérdida de la propiedad barrera del epitelio intestinal pueden desempeñar un papel tanto en la iniciación como en el desarrollo de enfermedades (Suzuki, 2013). Numerosos estudios ponen de manifiesto alteraciones en las propiedades barrera del epitelio intestinal por microorganismos, drogas o compuestos con probado carácter tóxico (Tafazoli *et al.*, 2003; Elamin *et al.*, 2013; Suzuki, 2013); sin embargo, los antecedentes para elementos traza tóxicos son muy escasos. El único estudio sobre el efecto de la exposición a mercurio se ha llevado a cabo empleando como modelo saco evertido de colon de rata (Böhme *et al.*, 1992). Los autores muestran que el Hg(II) y el CH<sub>3</sub>Hg pueden producir cambios en la permeabilidad del epitelio debido a alteraciones en los enterocitos y a una pérdida de continuidad del epitelio. Estos efectos se observan a concentraciones superiores a 10 μM (> 2 mg/L). Se desconocen sin embargo los efectos que pueden causar las concentraciones habituales en los alimentos, generalmente inferiores a 1 mg/L.

En este capítulo se ha evaluado el efecto de exposiciones agudas a concentraciones iguales o inferiores a 2 mg/L de las formas mercuriales más comunes en alimentos [CH<sub>3</sub>Hg y Hg(II)] sobre el modelo de epitelio intestinal generado por la línea celular Caco-2. El estudio se ha llevado a cabo en células con un alto grado de diferenciación y en células en fase inicial de diferenciación, para emular las distintas poblaciones de células absortivas presentes habitualmente en el tracto intestinal. El epitelio del intestino delgado se compone principalmente de células absortivas y secretoras de mucus diferenciadas, con criptas situadas en la base de las vellosidades donde residen las células replicantes, incluyendo las células

madre putativas (Chopra *et al.*, 2010). Las células experimentan un proceso de diferenciación a medida que ascienden desde las criptas hacia la punta de las vellosidades, donde finalmente son eliminadas al lumen por un proceso de descamación. Este continuo proceso de renovación permite mantener la homeostasis de la monocapa epitelial y reparar el tejido dañado. Los resultados obtenidos en esta tesis indican que las formas mercuriales afectan a ambos estadios de diferenciación y que, en líneas generales, la respuesta celular al tóxico es semejante para células diferenciadas y no diferenciadas. Esto podría comprometer la función e incluso la renovación de esta capa epitelial.

La exposición de las células intestinales a las formas mercuriales conlleva la generación de especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno, que puede llegar a ser mayor que la producida por el peróxido de hidrógeno, considerado un potente oxidante. La generación de estrés oxidativo y/o nitrosativo por parte de las formas mercuriales se ha evidenciado previamente en otros tipos celulares, incluso se ha puesto de manifiesto en células intestinales expuestas a CH<sub>3</sub>Hg (Vala, 2012). Sin embargo, es la primera vez que se observa este efecto en células procedentes del epitelio intestinal tratadas con Hg(II). La exposición también supone un aumento del ratio GSSG/GSH, aunque sólo a las concentraciones más elevadas de CH<sub>3</sub>Hg. Esto podría indicar que las células tratadas con esta especie emplean GSH reducido para neutralizar los radicales libres.

Independientemente de los cambios en el ratio GSH reducido/oxidado, ambas especies mercuriales producen a las concentraciones más elevadas ( $\geq 1$  mg/L) una disminución significativa de los contenidos intracelulares de GSH. La depleción del contenido total de glutatión podría ser en parte consecuencia del papel del GSH reducido en el transporte del mercurio internalizado en la célula. El mercurio inorgánico conjugado con GSH se

transporta en mayor proporción que el cloruro de mercurio (Zalups, 1998). Dutczak y Ballatori (1994) en un estudio en membranas canaliculares de hígado concluyen que el transporte de complejos de glutatión-metal por los sistemas de flujo de salida para el GSH puede ser un mecanismo común para la eliminación celular de  $\text{CH}_3\text{Hg}$ . La pérdida intracelular de GSH también podría atribuirse a una inhibición del metabolismo de este tripéptido por parte de las formas mercuriales. Se sabe que uno de los mecanismos de toxicidad del mercurio es su unión a proteínas a través de grupos tiol y la inactivación de las mismas. En este sentido, existen estudios en roedores expuestos a  $\text{Hg(II)}$  que muestran una reducción de la actividad de la enzima  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa responsable de la síntesis de GSH (Chung *et al.*, 1982). Otro posible mecanismo de reducción del metabolismo del glutatión podría estar relacionado con la disminución de la disponibilidad de los aminoácidos que forman este tripéptido o con una depleción del ATP necesario para su síntesis. Se ha evidenciado que las formas mercuriales tiene una gran afinidad por la L-Cys (Zalups, 2000), lo que podría reducir su disponibilidad para la formación de glutatión. Asimismo, algunos estudios muestran que la exposición a  $\text{Hg(II)}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}$  reduce el contenido intracelular de ATP (Kuznetsov *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 2010).

Este desequilibrio redox puede ser el causante de la peroxidación lipídica observada a tiempos cortos y a todas las concentraciones ensayadas, fenómeno documentado para exposiciones a mercurio (Lund *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1996). La peroxidación de la monocapa intestinal en presencia de mercurio también puede atribuirse en parte a su capacidad de inhibir la glutatión peroxidasa (GSH-Px), al interactuar con el selenio (Seppänen *et al.*, 2004), lo que atenúa totalmente el efecto protector de este enzima en la peroxidación lipídica. Esta peroxidación lipídica puede perturbar la estructura de la bicapa y modificar propiedades de membrana tales como la

fluidez, la permeabilidad a diferentes sustancias y el espesor de la misma (Wong-Ekkabut *et al.*, 2007). En el epitelio intestinal estos cambios pueden suponer una afección del proceso de absorción y de la función barrera.

La respuesta de las células intestinales al estrés generado por la exposición a las especies mercuriales también se manifiesta por modulaciones de la regulación transcripcional de proteínas de estrés. Se observan inducciones de su expresión, especialmente en células indiferenciadas y a tiempos cortos en células diferenciadas. Las proteínas de estrés engloban una serie de familias entre las que cabe destacar las metalotioneínas (MT) y las proteínas de choque térmico (HSP), las cuales se ha demostrado que se inducen por la exposición a especies mercuriales (Goering *et al.*, 2000; Sutton *et al.*, 2002; Yasutake y Nakamura, 2011). Las MT tienen una composición aminoacídica rica en cisteína (30%), residuos capaces de unir iones metálicos. La inducción de MT protege a las células de la toxicidad de metales tóxicos, así como del estrés oxidativo generado por los radicales libres (Klaassen y Liu, 1998). Por lo que respecta a las HSP, son un grupo altamente conservado de proteínas con funciones importantes en la homeostasis proteica, que se inducen ante estímulos de estrés. El incremento en la síntesis de HSP puede evitar fallos en el plegamiento de las proteínas así como su agregación (Kalmar y Greensmith, 2009).

Por otro lado, también se han observado en el presente capítulo reducciones de la expresión de las proteínas de estrés, principalmente en células diferenciadas expuestas durante 24 horas a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Esta reducción puede afectar las funciones de detoxificación de los contaminantes ingeridos con los alimentos (como As, Cd, incluso el propio Hg), la homeostasis de metales (como Zn y Cu) y los procesos de protección frente al estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos indican que las formas mercuriales presentes en los alimentos, a las concentraciones habituales en ellos, podrían afectar a la homeostasis celular de la capa epitelial del intestino y, por tanto, a su función. El tratamiento de la monocapa epitelial diferenciada con las formas mercuriales supone un aumento del paso del LY, indicativo de un aumento de la permeabilidad paracelular y de una afección de la función barrera. Algunos estudios muestran que un estrés oxidativo y nitrosativo de la mucosa intestinal precede al aumento de la permeabilidad paracelular (Maeda *et al.*, 2010). También se apunta a la citoquina TNF $\alpha$ , que tal y como se ha puesto de manifiesto en el presente estudio está sobreexpresada en muchos tratamientos, como responsable de aumentos de la permeabilidad intestinal (Ma *et al.*, 2004). Este aumento de la permeabilidad ha sido previamente reportado para el Hg(II) en la barrera hematoencefálica (Culot *et al.*, 2008) y en monocapas epiteliales glomerulares (Coers *et al.*, 1995). La presente tesis supone el primer aporte sobre el efecto del Hg(II) en monocapas de epitelio intestinal. Para el CH<sub>3</sub>Hg se ha puesto de manifiesto previamente un aumento de la permeabilidad en monocapas epiteliales de intestino (Vala, 2012), si bien en la presente tesis este efecto se observa a concentraciones inferiores (0.5-1 mg/L), similares a las existentes en los alimentos.

La formación y el mantenimiento de la barrera intestinal dependen de una serie de contactos célula-célula que circunscriben el margen apical-lateral de cada célula, conocidos colectivamente como el complejo de unión apical. Este complejo incluye las uniones estrechas (TJ), que forman una barrera física para el movimiento entre las células de iones, macromoléculas, células inmunes y patógenos (Shen *et al.*, 2011) y la uniones adherentes (AJ), que promueven la integridad del tejido mediante el establecimiento de una fuerte interface adhesiva entre las células individuales (Harris y Tepass, 2010).

Tanto las AJ como las TJ están íntimamente asociados con el citoesqueleto de actina por proteínas citosólicas de anclaje como la zonula occludens y que son funcionalmente reguladas por los filamentos de actomiosina circunferenciales (Hartsock y Nelson, 2008).

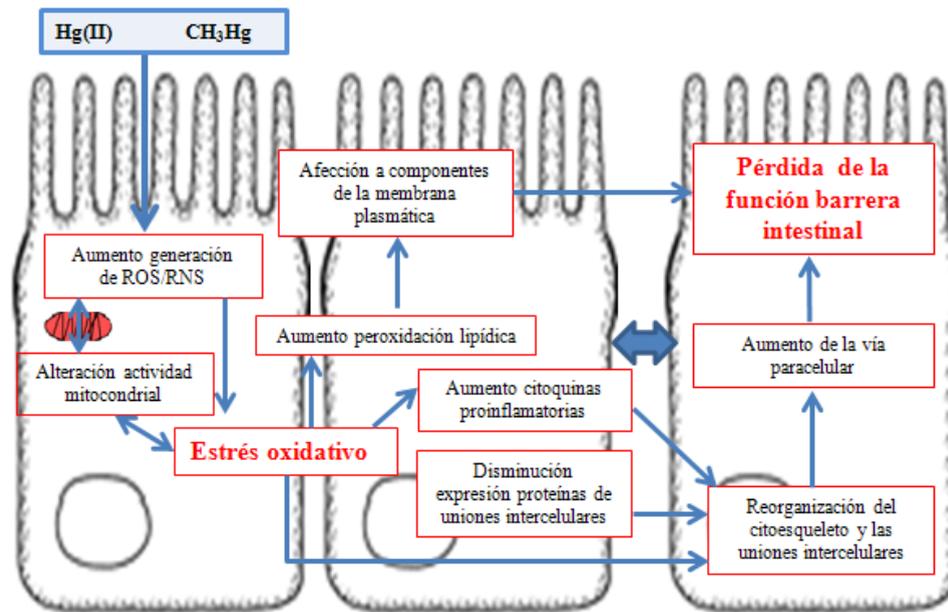
Se considera que muchas de las patologías que causan aumentos de la permeabilidad y disminuciones de la función barrera son debidas a defectos en la estructura y/o función de esta red de uniones (Suzuki, 2013). En este capítulo se ha puesto de manifiesto que el tratamiento con las formas mercuriales afecta la expresión de algunas de las proteínas que forman parte de este complejo, observándose en líneas generales una disminución de la expresión de proteínas integrantes de las TJ (*CLND1*, *OCN* y *JAMI*) y de una proteína de unión al citoesqueleto (*ZO1*). Adicionalmente, se observa una modificación de la distribución de la actina filamentosa del citoesqueleto y de la *ZO1*.

Todos estos procesos son posiblemente la causa de la pérdida de la forma geométrica y del aumento de la permeabilidad paracelular observados en las células tratadas con mercurio. Al-Sadi *et al.* (2011) muestran que la depleción de ocludina en Caco-2 o en ratones conlleva un aumento de la ruta paracelular. También se ha visto que la permeabilidad paracelular, la localización y el anclaje de las proteínas de las TJ se alteran en las células deficientes en *ZO1/2* (Fanning *et al.*, 2012). Del mismo modo, se ha puesto de manifiesto que cambios importantes en la distribución de la actina filamentosa generan modificaciones de la permeabilidad selectiva del epitelio intestinal (Kawkitinarong *et al.*, 2004). El efecto de las formas mercuriales sobre el citoesqueleto se ha evidenciado en neuronas de embrión de pollo, donde la exposición a mercurio inorgánico produce una reorganización de la actina (Choi *et al.*, 2011). Kawedia *et al.* (2008) observan en monocapas epiteliales de células salivales un efecto del Hg(II)

asociado a cambios moleculares en la ocludina. Sin embargo, el efecto en células epiteliales de intestino sólo se ha demostrado en monocapas expuestas a 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CH}_3\text{Hg}$ , donde produce una alteración de la localización de la ZO1 y la ocludina (Vala, 2012).

## **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en este capítulo permiten concluir que las formas mercuriales presentes en los alimentos tienen un importante efecto citotóxico sobre el modelo celular de epitelio intestinal y que este efecto conlleva un aumento de la permeabilidad epitelial (figura 10). Esta apertura de las uniones intercelulares puede permitir el paso de compuestos que en condiciones normales y debido a la selectividad de los poros intercelulares, no lo harían y, por tanto, pueden llegar a la circulación sistémica compuestos con un cierto grado de toxicidad. Por otro lado, puede favorecer el contacto de sustancias antigénicas con la lámina propia subyacente y desencadenar una respuesta inflamatoria local, que a su vez exacerbe los efectos ya observados. Son necesarios estudios *in vivo* que confirmen lo observado *in vitro* y permitan dilucidar si las formas mercuriales son capaces de alterar la barrera intestinal a las concentraciones habituales en los alimentos.



**Figura 10.** Mecanismo de acción de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en células epiteliales del intestino.



## *Capítulo 5*

---

**Estudios *in vivo* de la acumulación y los efectos sobre los transportadores del epitelio gastrointestinal de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg**



La exposición a mercurio puede afectar no sólo a la función barrera del tracto gastrointestinal, tal y como se ha evidenciado en el capítulo 4, sino que también podría afectar a las funciones digestivas, al alterar la secreción de sustancias importantes para este proceso, o a las funciones absortivas, al modificar la permeabilidad paracelular y/o transcelular de las células intestinales. En cuanto a las funciones absortivas del intestino, los resultados obtenidos en el capítulo 4 evidencian que el mercurio puede modificar la permeabilidad paracelular, lo cual además de suponer una reducción de la función barrera puede producir cambios en el transporte de los compuestos que utilizan esta vía para su absorción. Además, estudios previos han demostrado que la exposición a mercurio puede tener un efecto sobre la expresión de transportadores en otros tejidos, en algunos casos como mecanismo de defensa (Di Giusto *et al.*, 2009). En el tracto digestivo este sistema de protección celular puede afectar a la absorción de compuestos que empleen estos transportadores en su proceso de absorción intestinal. Algunos de estos compuestos pueden ser necesarios para un adecuado funcionamiento del organismo.

En este capítulo se ha estudiado *in vivo* el efecto de la exposición a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg sobre la expresión de transportadores de diferentes tramos del tracto gastrointestinal.

## RESULTADOS

### 1. Evaluación de la acumulación de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg en los distintos tramos del tracto gastrointestinal

La tabla 1 muestra las concentraciones de mercurio halladas en distintos tramos gastrointestinales de ratas control y ratas expuestas a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 4 días mediante una dosis única administrada por sonda gástrica. Los resultados ponen de manifiesto que la acumulación tisular de mercurio es muy elevada para ambas especies, siendo el colon el tramo que presenta una menor concentración. En general, la forma inorgánica presenta una mayor acumulación.

La elevada retención de mercurio observada en este capítulo confirma los resultados obtenidos con células epiteliales del intestino (capítulo 1 y 3). Estos resultados también coinciden con los obtenidos por Sasser *et al.* (1978) en ratas, que evidencian una mayor retención de la especie inorgánica y una acumulación semejante de mercurio en yeyuno y estómago.

**Tabla 1.** Concentraciones de mercurio (mg/kg peso fresco) en tramos gastrointestinales de ratas control y ratas expuestas a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg durante 4 días. Valores expresados como media ± desviación estándar (n=4).

	Mercurio (mg/kg peso fresco)		
	Estómago	Yeyuno	Colon
Control	0.019-0.017	0.004-0.007	0.009-0.015
Hg(II)	19.9-123.8	15.08-57.6	16.9-33.2
CH <sub>3</sub> Hg	37-40.9	42.5-43.5	6.8-17.7

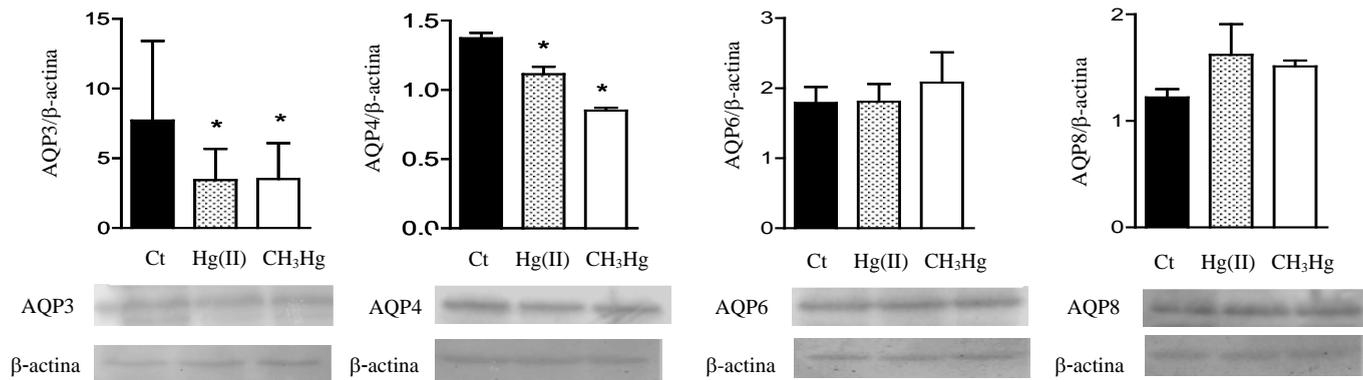
## **2. Estudio de expresión proteica de transportadores en los distintos tramos gastrointestinales**

Se ha estudiado la expresión proteica de varios transportadores del estómago, yeyuno y colon de ratas control y ratas tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Se han analizado los transportadores de aminoácidos y<sup>+</sup>LAT1, LAT1 y LAT2, el transportador de aniones orgánicos OATP3/1, el transportador de cationes divalentes DMT1 y las acuaporinas AQP3, 4, 6, 7 y 8. La AQP7 sólo se ha evaluado en el yeyuno y colon, ya que se ha descrito que no está presente en la mucosa gástrica (Laforenza *et al.*, 2005).

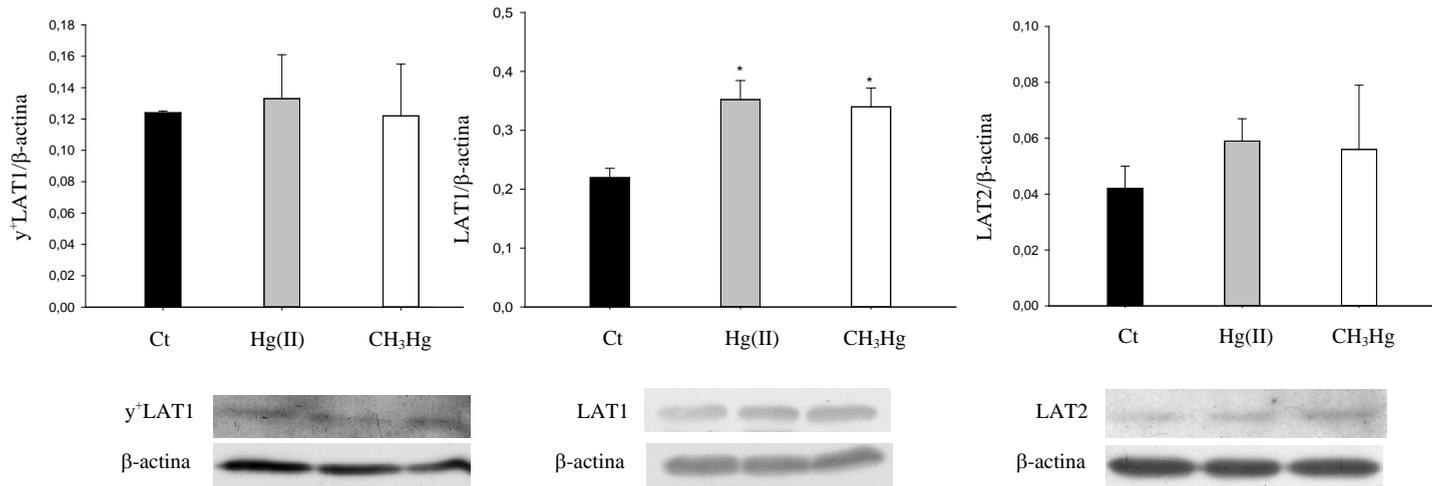
### 2.1. Evaluación de los contenidos proteicos de los transportadores en el estómago

El análisis densitométrico de las bandas, normalizado por los niveles de β-actina (figura 1), muestra que las acuaporinas AQP3 y AQP4 se reducen significativamente tanto en las ratas tratadas con Hg(II) como en las expuestas a CH<sub>3</sub>Hg. El contenido de AQP3 disminuye un 50%, mientras que la reducción de la AQP4 varía entre un 20 y un 40%. Las proteínas AQP8 y AQP6 no se ven afectadas por los tratamientos con mercurio.

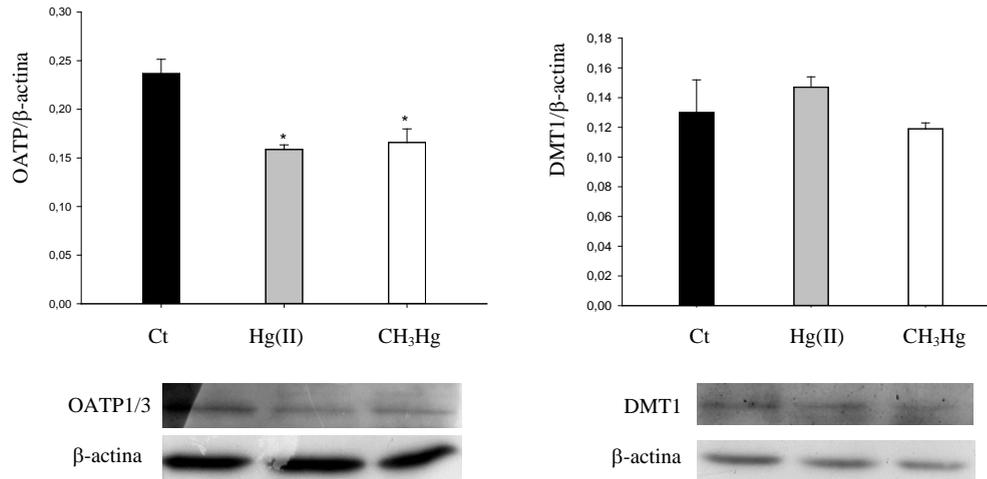
Respecto al resto de transportadores estudiados (figuras 2 y 3), se observa un aumento significativo de la proteína LAT1 en porcentajes similares para ambas especies mercuriales [Hg(II): 38%; CH<sub>3</sub>Hg: 35%], y una reducción elevada de la proteína OATP1/3 también con porcentajes similares para ambas especies [Hg(II): 33%; CH<sub>3</sub>Hg: 31%]. LAT2, y<sup>+</sup>LAT1 y DMT1 no experimentan cambios en sus niveles proteicos.



**Figura 1.** Niveles proteicos de AQP3, 4, 6 y 8 en el estómago de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Cada barra de la gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar de 4 ensayos diferentes. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.



**Figura 2.** Niveles proteicos de  $\gamma$ -LAT1, LAT1 y LAT2 en el estómago de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Cada barra de la gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar de 4 ensayos diferentes. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

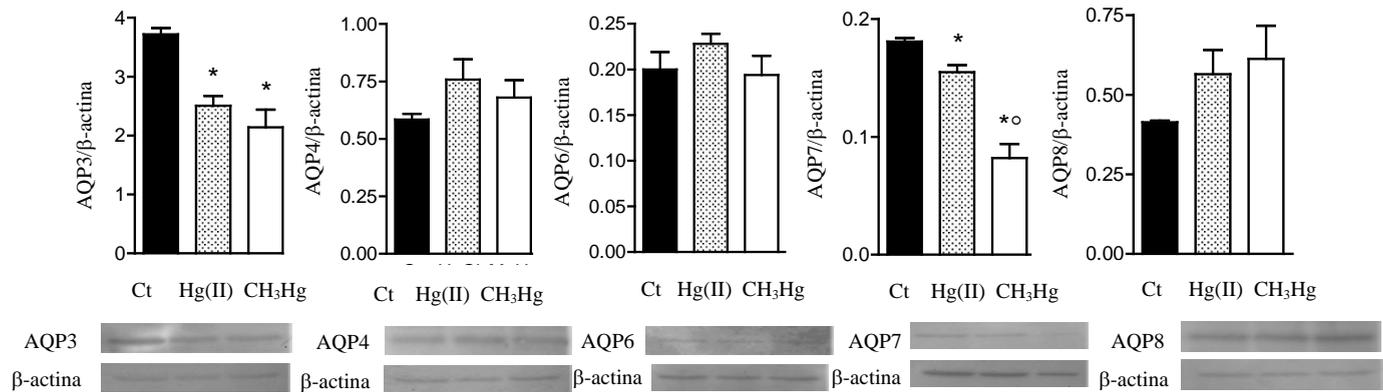


**Figura 3.** Niveles proteicos de OATP1/3 y DMT1 en el estómago de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Cada barra de la gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar de 4 ensayos diferentes. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

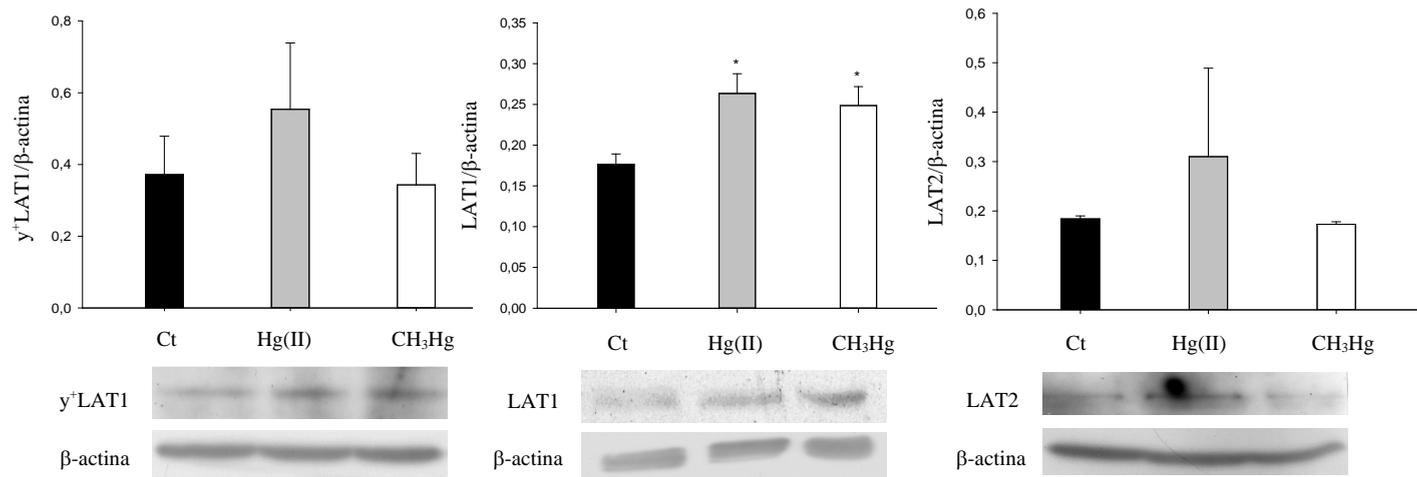
## 2.2. Evaluación de los contenidos proteicos de los transportadores en el yeyuno

El análisis densitométrico de las bandas obtenidas en los experimentos de inmunotransferencia muestra que las proteínas AQP3 y AQP7 se reducen significativamente en las ratas tratadas con Hg(II) y con CH<sub>3</sub>Hg (figura 4). Los niveles de AQP3 disminuyen un 40-50% y los de AQP7 entre un 45-50%. Las proteínas AQP4, 6 y 8 no se modifican tras los tratamientos.

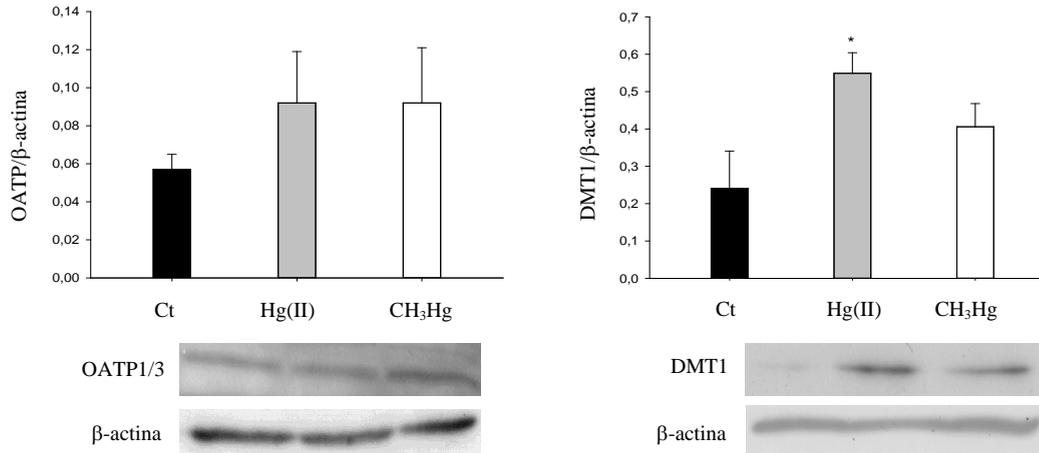
Respecto al resto de transportadores estudiados (figuras 5 y 6), sólo se observan cambios en los niveles proteicos de LAT1 y DMT1. El transportador LAT1 aumenta en ratas tratadas con ambas formas mercuriales [Hg(II): 33%; CH<sub>3</sub>Hg: 29%,], mientras que DMT1 aumenta sólo tras el tratamiento con Hg(II) (56%).



**Figura 4.** Niveles proteicos de AQP3, 4, 6, 7 y 8 en el yeyuno de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Cada barra de la gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar de 4 ensayos diferentes. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.



**Figura 5.** Niveles proteicos de  $\gamma$ -LAT1, LAT1 y LAT2 en el yeyuno de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Cada barra de la gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar de 4 ensayos diferentes. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

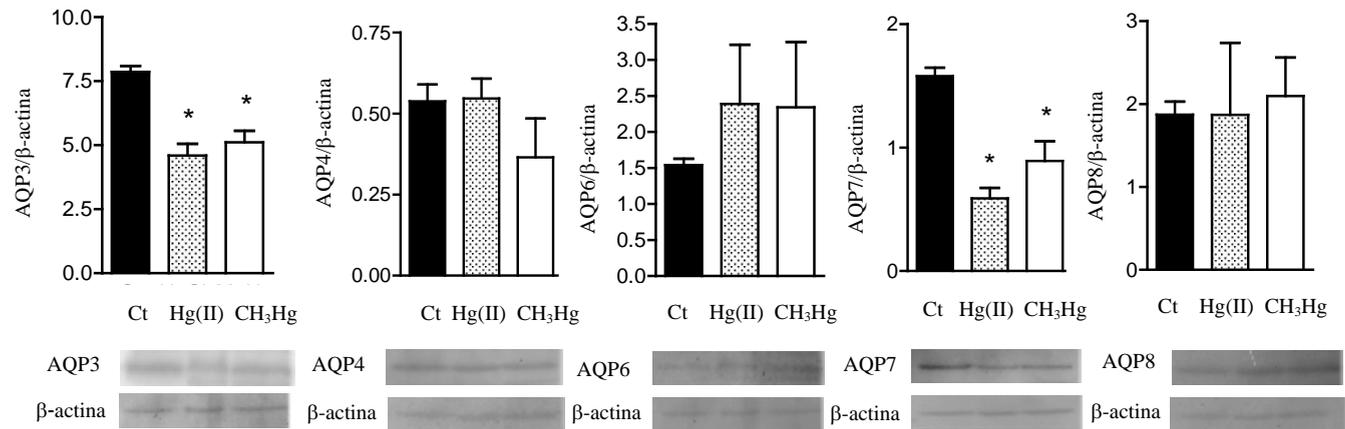


**Figura 6.** Niveles proteicos de OATP1/3 y DMT1 en el yeyuno de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Cada barra de la gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar de 4 ensayos diferentes. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

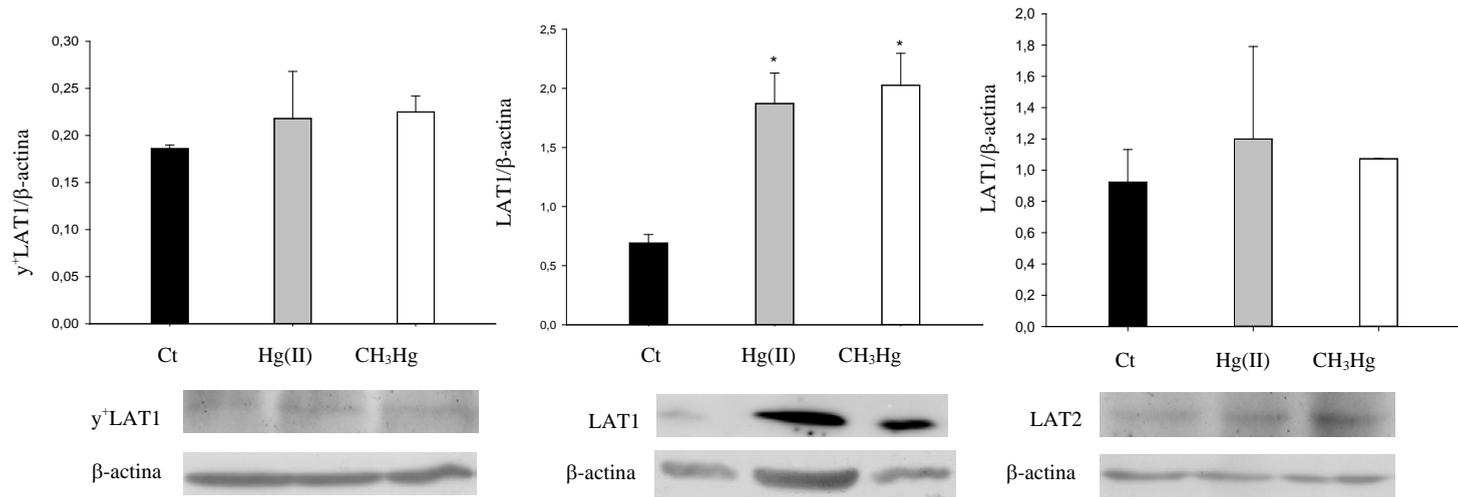
### 2.3. Evaluación de los contenidos proteicos de los transportadores en el colon

Los experimentos de immunoblotting muestran una regulación a la baja de las proteínas AQP3 y AQP7 en las ratas tratadas con ambas formas mercuriales (figura 7). El contenido de la AQP3 disminuye un 38-41% y el de AQP7 un 44-63%. El resto de acuaporinas no muestran modificaciones en sus niveles.

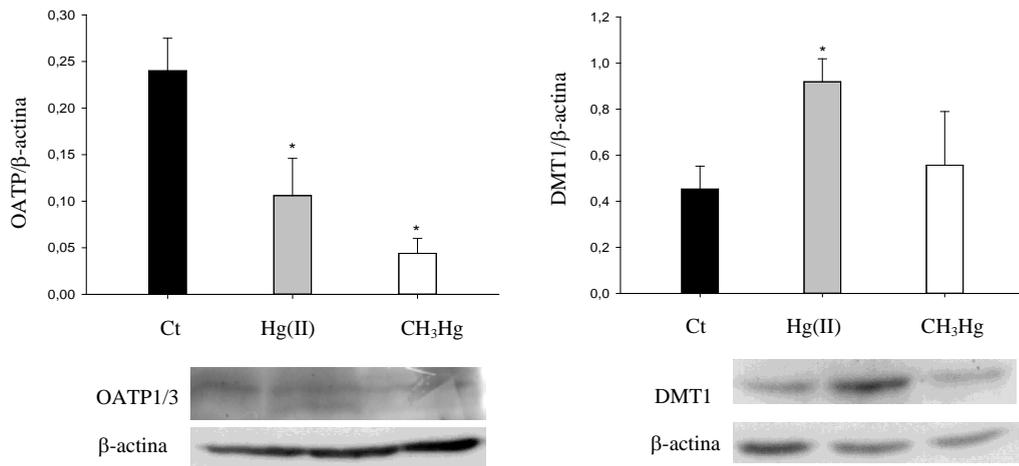
Respecto a los transportadores de aminoácidos (figura 8), no se observan cambios en  $y^+$ LAT1 y LAT2, mientras que LAT1 es el transportador que presenta un mayor aumento tras el tratamiento con ambas formas mercuriales [62% y 66% para el tratamiento con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg respectivamente]. Adicionalmente, existe una reducción de la proteína OATP1/3 tras el tratamiento con ambas formas mercuriales [Hg(II): 56% y CH<sub>3</sub>Hg: 82%] y un aumento de los niveles de DMT1 en ratas expuestas a Hg(II) (51%) (figura 9).



**Figura 7.** Niveles proteicos de AQP3, 4, 6, 7 y 8 en el colon de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Cada barra de la gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar de 4 ensayos diferentes. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.



**Figura 8.** Niveles proteicos de  $\gamma$ -LAT1, LAT1 y LAT2 en el colon de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Cada barra de la gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar de 4 ensayos diferentes. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.



**Figura 9.** Niveles proteicos de OATP1/3 y DMT1 en el colon de ratas control y de ratas tratadas con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Cada barra de la gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar de 4 ensayos diferentes. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

## **DISCUSIÓN**

En el capítulo 4 se ha puesto de manifiesto que las formas mercuriales ocasionan un desequilibrio redox que produce una respuesta celular con aumento de citoquinas proinflamatorias, y una redistribución de proteínas constituyentes del citoesqueleto y de las uniones intercelulares. Todo esto se traduce en un aumento del paso paracelular y, por tanto, en la pérdida de la función barrera del epitelio. En este capítulo se ha evaluado *in vivo* el efecto del mercurio sobre algunos de los componentes del complejo sistema responsable de la absorción intestinal, otra de las funciones del tracto gastrointestinal. La información previa al respecto es muy escasa (Ikarashi *et al.*, 2012).

Se ha analizado el efecto de estos tratamientos sobre la expresión proteica de transportadores implicados en la absorción de nutrientes o compuestos necesarios para el adecuado funcionamiento del organismo [aminoácidos (LAT1, LAT2, y<sup>+</sup>LAT1), cationes divalentes como el Fe (DMT1), aniones orgánicos como las sales biliares (OATP1/3)] y de canales responsables del equilibrio osmótico y del transporte de iones (AQP3, 4, 6, 7 y 8). Esta elección se ha basado no sólo en su importancia como transportadores de nutrientes, sino en algunos casos, en su posible participación en el transporte de las formas mercuriales (Bridges y Zalups, 2004, 2010; Bridges *et al.*, 2004, 2007; Zalups y Ahmad, 2004, 2005a, 2005b; Zalups *et al.*, 2004) o atendiendo a los desórdenes gastrointestinales o sistémicos descritos en exposiciones a mercurio (Arena, 1971; Gerstner y Huff, 1977; NTP, 1993; Banerjee y Bhattacharya, 1995; McGinnis, 2001; Kamijo *et al.*, 2004).

Hay que destacar que de todos los transportadores investigados, sólo las acuaporinas presentan cambios en su expresión en todos los tratamientos y en todos los tramos gastrointestinales ensayados. En concreto se observan

importantes reducciones de sus contenidos proteicos. El movimiento de agua a través de la bicapa lipídica de las membranas tiene lugar a través de la vía paracelular y por mecanismos transcelulares diversos [difusión pasiva, transporte facilitado por las acuaporinas y por co-transporte con iones o nutrientes (Laforenza *et al.*, 2005; Laforenza, 2012)]. Las acuaporinas constituyen una familia que puede subdividirse en dos grupos: las acuaporinas clásicas (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 y AQP8) y las acuagliceroporinas (AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10). Se diferencian fundamentalmente en que las primeras sólo son permeables al agua y las segundas también permiten el paso de glicerol y otros solutos de bajo peso molecular.

Se ha puesto de manifiesto una relación entre la localización de estos canales de agua en el tracto gastrointestinal y su función. Así, AQP3 y AQP4 se presentan en el dominio basolateral y son más abundantes en el epitelio de tramos con una elevada actividad secretora como el estómago. AQP7 y AQP8, con posición apical, presentan una mayor expresión en el intestino delgado, zona de mayor absorción. Por otro lado, el colon con actividad secretora y absorptiva presenta una elevada expresión tanto de acuaporinas basolaterales como apicales (Laforenza, 2012). Estas observaciones parecen demostrar una redundancia compensatoria de las acuaporinas en el tracto gastrointestinal a nivel celular debido posiblemente a su papel fundamental en el movimiento de agua y la digestión de nutrientes (Koyama *et al.*, 1999; Laforenza, 2012).

Numerosos estudios han mostrado que el mercurio inorgánico es un inhibidor de la actividad de las acuaporinas, ya que puede unirse a los residuos de cisteína que contienen (Preston *et al.*, 1993), sin embargo, no se ha descrito si el metilmercurio ejerce un efecto inhibitorio de estos canales. La inhibición por parte del CH<sub>3</sub>Hg podría producirse por un mecanismo

similar al del mercurio inorgánico, ya que también presenta una gran afinidad por los grupos tiol de las proteínas (Bridges y Zalups, 2006b; Wagner *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha descrito que el metilmercurio puede transformarse en mercurio inorgánico por acción de la flora microbiana (Seko *et al.*, 2001) y, por lo tanto, podría inhibir las acuaporinas tras su biotransformación en el lumen intestinal. Los estudios de inhibición realizados por otros autores muestran que de todas las acuaporinas descritas, sólo AQP4 y AQP6 no son inhibidas por la unión del mercurio. La AQP4 es una acuaporina insensible al mercurio debido a la ausencia de la cisteína en la posición 189 (Jung *et al.*, 1994), lugar de unión del mercurio. En cuanto a la AQP6 es un canal de agua con permeabilidad aniónica que es funcionalmente activada por Hg(II) (Yasui *et al.*, 1999; Yasui, 2009).

En este capítulo de tesis se ha puesto de manifiesto una reducción del nivel proteico de AQP3, AQP4 y AQP7, la cual varía dependiendo del tramo y cuya interpretación también es distinta, ya que la función de las acuaporinas en los distintos tramos no es exactamente la misma. En el estómago de las ratas expuestas a ambas formas mercuriales se observa una reducción importante de la AQP3 y la AQP4. La función fisiológica de estas acuaporinas en el estómago no está clara. La localización y la abundancia de la AQP4 en la membrana basolateral de las células parietales gástricas (Frigeri *et al.*, 1995), tipo celular responsable de la secreción de ácidos, hacía pensar que esta acuaporina podía tener una función relevante en la secreción gástrica de ácidos. Sin embargo, estudios en ratones AQP4-knockout no muestran diferencias en la secreción ácida y el pH estomacal con respecto a animales control (Wang *et al.*, 2000). Posiblemente, la AQP4 tenga un papel en el mantenimiento de la osmolaridad y el volumen celular durante la secreción gástrica. En cuanto a la AQP3 no hay datos disponibles sobre su función fisiológica a nivel gástrico. Podemos especular que la

regulación a la baja de AQP3 y AQP4 podría reducir el flujo de agua dirigido hacia el lumen gástrico. Este flujo de agua es fisiológicamente necesario para equilibrar la osmolaridad durante el vaciado. Esto, a su vez, evitaría la dilución de mercurio y podría aumentar su toxicidad en la mucosa.

En el tramo correspondiente al intestino delgado la exposición al mercurio produce reducciones de AQP3 y AQP7. Se ha demostrado que la permeabilidad osmótica del agua en vesículas de la membrana en borde de cepillo del intestino delgado de rata se reduce significativamente en presencia de Hg(II) (Tritto *et al.*, 2007). Estos autores sugieren que la AQP7 y la AQP8 pueden contribuir al movimiento de agua en el dominio apical de las células epiteliales del intestino delgado, por ese motivo hay una inhibición de la permeabilidad del agua en presencia de mercurio. Tritto *et al.* (2007) apuntan a estas acuaporinas porque son las que se detectan en el dominio apical de las células absortivas del intestino delgado de ratas. Esta deducción posiblemente es extensible a la AQP3, pero en lo referente al movimiento en el dominio basolateral ya que esa es su localización en el epitelio intestinal de ratas (Ma y Verkman, 1999). La reducción de la expresión de la AQP3 y la AQP7 puede disminuir el movimiento transcelular de agua en el yeyuno y esto puede suponer un problema para el mantenimiento del equilibrio osmótico del contenido intestinal tras la absorción de iones y nutrientes.

Por último, se debe hacer una consideración especial a los efectos de las especies de mercurio en el colon. A pesar de ser la porción distal del tracto gastrointestinal, el colon está expuesto a los efectos tóxicos del mercurio a causa de la recirculación enterohepática de este metal (Norseth y Clarkson, 1971) y a que la cantidad de mercurio principalmente en forma inorgánica no absorbida por el intestino delgado es considerablemente alta (Endo *et al.*, 2003). El colon tiene un papel fundamental en el balance hídrico, por lo que

es probable que participe en los síntomas producidos por la exposición aguda y crónica a mercurio, los procesos diarreicos y la acumulación de fluidos (Böhme *et al.*, 1992). Desde hace tiempo se sabe que los compuestos mercuriales inducen colitis pseudomembranosa en los seres humanos y roedores, probablemente mediante la inhibición de los transportadores de solutos e iones y por la inducción de la secreción de cloruros (Böhme *et al.*, 1992). En esta tesis se ha puesto de manifiesto que las formas mercuriales también pueden afectar el movimiento del agua a nivel colónico, ya que producen una reducción de la expresión proteica de AQP3 y AQP7.

La AQP3, situado en el dominio basolateral de las células epiteliales, desempeña un papel importante en la regulación del movimiento del agua en el colon. Esta acuaporina parece mediar la reabsorción de agua desde las heces y su transporte desde el lumen a través de la capa endotelial a los vasos sanguíneos ayudada por la AQP1 (Day *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la administración rectal de Hg(II) en ratas afecta el funcionamiento de la AQP3 en el colon y causa diarrea (Ikarashi *et al.*, 2012). Según estos autores hay un incremento del contenido de agua (alrededor de 4 veces) en las heces de ratas tratadas con mercurio en comparación con las ratas control. La modificación de la actividad de las acuaporinas no está únicamente relacionada con la permeabilidad al agua y el equilibrio osmótico. Se ha descrito que la AQP3 también tiene una importante función en la proliferación de los enterocitos. Los ratones deficitarios en esta acuaporina muestran una proliferación celular reducida que resulta en una mayor severidad en el desarrollo de la colitis y provoca una alta mortalidad (Thiagarajah *et al.*, 2007). Por lo tanto, las lesiones necróticas de la mucosa gástrica y las úlceras de estómago en ratas expuestas al mercurio (NTP, 1993) podrían ser debidas, en parte, a una proliferación celular defectuosa como consecuencia de la regulación a la baja y/o inhibición de la AQP3. Así,

el tratamiento con mercurio podría afectar a la regeneración del epitelio intestinal por su efecto sobre la AQP3.

Además del efecto notable sobre las acuaporinas, en el presente estudio se ha puesto de manifiesto un aumento también destacable de la expresión de DMT1 en el yeyuno y el colon de las ratas tratadas con Hg(II). El DMT1, tal y como se ha comentado en los capítulos 1 y 2, es un transportador de cationes divalentes, protón-dependiente, que se encuentra en el dominio apical de los enterocitos y que es responsable del transporte de cationes esenciales (Fe, Zn, Mn, Co, Cu y Ni) (Zalups y Koropatnick, 2010). Se ha apuntado como el principal transportador de hierro no hemo en el intestino (Morgan y Oates, 2002).

Los estudios en animales relacionan la exposición a mercurio inorgánico con una disminución de la concentración plasmática de hierro y por lo tanto, indican que el mercurio puede causar una anemia por déficit de hierro (Saljooghi y Delavar-Mendi, 2013). La absorción de hierro desde el intestino está regulada por las necesidades sistémicas de este elemento, de modo que aumenta cuando hay deficiencia de hierro y disminuye cuando hay altos niveles del mismo. Los niveles de expresión del transportador DMT1, su distribución intracelular y su actividad responden muy rápidamente a los niveles de hierro en la dieta y a los niveles de hierro almacenado (Morgan y Oates, 2002). De hecho, la expresión duodenal de DMT1 en animales aumenta cuando hay una deficiencia de hierro (Morgan, 2004). Esta podría ser la causa del aumento de la expresión del DMT1 intestinal en las ratas tratadas con mercurio inorgánico. Por otro lado, teniendo en cuenta que se ha confirmado *in vitro* la participación de DMT1 en el transporte de mercurio inorgánico (capítulo 2), la exposición a mercurio aumentaría no sólo la absorción de otros cationes divalentes, sino su propio transporte a través del epitelio intestinal, con las connotaciones toxicológicas que esto conlleva.

Los contenidos proteicos del polipéptido transportador de aniones orgánicos OATP1/3 se reducen con el tratamiento con ambas formas mercuriales. No tenemos conocimiento de estudios previos que investiguen el efecto del tratamiento con Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg sobre la expresión de estos transportadores a nivel intestinal. Existe, sin embargo, un estudio que evidencia que el Hg(II) reduce la expresión del Oat1 y Oat3 en el riñón (Di Giusto *et al.*, 2009). Estos transportadores, situados en la membrana basolateral de los túbulos proximales, median el transporte de Hg(II) unido a grupos tiol de bajo peso molecular. Por tanto, la reducción de su expresión supone una menor entrada de mercurio. Di Giusto *et al.* (2009) interpretan esta disminución de los contenidos proteicos de los Oats como un mecanismo de defensa desarrollado por la célula para protegerse de la toxicidad de este elemento traza. El Oat3 se encuentra en la membrana apical de las células epiteliales del intestino en ratas (Tirona y Kim, 2002). La reducción observada en esta tesis podría deberse también a un mecanismo de defensa, si bien no se ha evidenciado que este grupo de transportadores intervenga en la entrada de las formas mercuriales a nivel intestinal en ratas.

Por otro lado, hay que indicar que la reducción de este transportador supondría una disminución de la absorción intestinal de los sustratos de esta familia de transportadores que incluyen un grupo heterogéneo de ácidos débiles con carga negativa a pH fisiológico ( $pK_a < 7$ ) (Anzai *et al.*, 2006). Además de los sustratos endógenos (sales biliares, bilirrubina, etc), hay toda una serie de sustancias exógenas, la mayoría medicamentos, que se transportan por esta vía (Grandvoinet *et al.*, 2012).

Hay que destacar también el aumento de la expresión del transportador de aminoácidos LAT1, evidenciado en ratas expuestas a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg. Los transportadores de aminoácidos del sistema L son responsables del transporte Na<sup>+</sup>-independiente de aminoácidos neutros, aromáticos y de

cadena lineal, entre los que se encuentran algunos aminoácidos esenciales. LAT1 se considera una proteína de membrana inducible por sustancias tales como las hormonas, los factores de crecimiento y las interleuquinas, y cuya expresión sufre regulaciones a la alza en asociación con procesos que requieren una elevada síntesis proteica (Ohno *et al.*, 2009), por ese motivo aumenta en procesos de transformación celular (Yanagida *et al.*, 2001). Aunque existen datos que evidencian que la exposición a mercurio puede conllevar proliferación celular (NTP, 1993; Aguado *et al.*, 2013), se trata de exposiciones de larga duración. En general, las exposiciones agudas a Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg están relacionadas con una inhibición de la proliferación celular (Shenker *et al.*, 1992; Bose *et al.*, 2012).

También puede haber un aumento de la expresión de LAT1 en procesos de regeneración tisular. En concreto se ha demostrado este efecto en ratas que presentan ulceraciones gástricas debido a un tratamiento con ácido acético (Miyamoto *et al.*, 2001). Hay que destacar que en animales expuestos a mercurio se presentan alteraciones tisulares tales como necrosis y úlceras en distintos tramos del tracto gastrointestinal (NTP, 1993). Éste podría ser un motivo de aumento de la expresión del LAT1, cuya posición en el tracto gastrointestinal de ratas parece ser apical (Ohno *et al.*, 2009). Por otro lado, el aumento de la expresión de LAT1 podría afectar el transporte de mercurio, ya que determinados estudios asocian este transportador de aminoácidos con el transporte de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg unidos a grupos tiol de bajo peso molecular (Aschner *et al.*, 1990; Kerper *et al.*, 1992; Mokrzan *et al.*, 1995; Simmons-Willis *et al.*, 2002). Por tanto, al igual que ocurre con el incremento del DMT1, la respuesta tisular para contrarrestar el efecto tóxico del mercurio, podría tener un efecto negativo al favorecer la entrada de mercurio por aumento de la expresión de un transportador que podría participar en su transporte apical en ratas.

## **CONCLUSIONES**

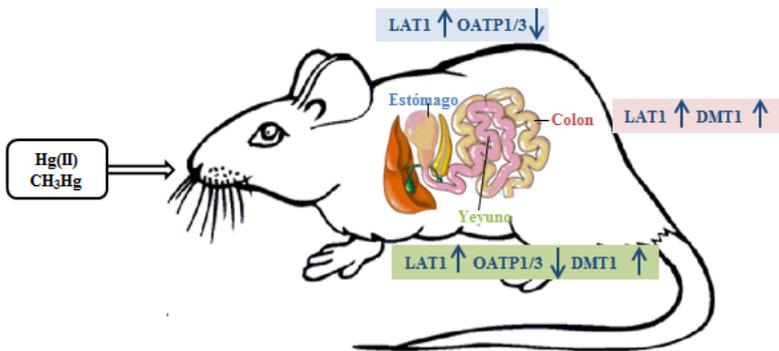
El estudio realizado en este capítulo aporta información novedosa sobre el efecto de la ingesta de mercurio en la expresión de distintos transportadores del tracto gastrointestinal y contribuye a la comprensión de los mecanismos celulares de toxicidad gastrointestinal de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede inferir que los desórdenes gastrointestinales descritos en humanos y animales expuestos a mercurio, podrían deberse al menos en parte a su efecto sobre las acuaporinas. La reducción de la permeabilidad osmótica del agua en las células epiteliales debido a una disminución en la actividad de las acuaporinas, puede perjudicar el transporte activo del fluido y el equilibrio osmótico, produciendo una acumulación de líquido en el lumen y la consiguiente diarrea. Esta inhibición de las acuaporinas podría ser el resultado de: 1) la inhibición directa de la actividad por su unión a los residuos de cisteína, tal y como han apuntado otros autores, y 2) la regulación a la baja principalmente de AQP3 y AQP7, tal y como se ha demostrado en el presente capítulo. Estos dos efectos no están correlacionados pero funcionalmente se refuerzan.

Los cambios observados en los otros transportadores podrían ser debidos a una respuesta celular para protegerse del daño producido por la exposición al mercurio, al disminuir la entrada del elemento a la mucosa gastrointestinal (reducción del OATP) o hacer frente a las demandas sistémicas o celulares que tienen los animales tratados con el mercurio (aumento del DMT1 y el LAT1). En este último caso, el aumento de la expresión del DMT1 y el LAT1 podrían favorecer la entrada del mercurio presente en el lumen al interior del epitelio gastrointestinal y, por tanto, aumentar el efecto tóxico que este elemento traza pueda ejercer. Finalmente, indicar que las

modificaciones en la expresión de transportadores (figura 10) pueden afectar a la absorción de sus sustratos (cationes divalentes, aminoácidos y ácidos orgánicos) y, en consecuencia, al adecuado funcionamiento del organismo.

Son necesarias más investigaciones para determinar el papel potencial de la expresión alterada de los transportadores estudiados en la toxicidad del mercurio en el tracto gastrointestinal y su repercusión a nivel sistémico.



**Figura 10.** Efecto de la exposición a  $Hg(II)$  y  $CH_3Hg$  en los niveles proteicos de transportadores del tracto gastrointestinal de ratas.

## *Conclusiones*

---



Las conclusiones obtenidas en la presente tesis doctoral para cada uno de los objetivos planteados son las siguientes:

1. Estudio del transporte intestinal de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg y de los factores que influyen en el mismo

- Existe una elevada acumulación celular de ambas formas mercuriales en las monocapas epiteliales, siendo superior para el CH<sub>3</sub>Hg.
- Se ha observado una importante eliminación del Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg acumulado hacia el lado apical (que correspondería al lumen) y al lado basolateral (correspondiente a la cavidad serosa) tras la eliminación del tóxico del medio.
- El transporte en sentido absortivo está favorecido frente al secretorio para ambas formas mercuriales.
- El transporte de Hg(II) es principalmente transcelular y mediado por portador y en él intervienen mecanismos de transporte activo. En forma de cloruro, el transportador de cationes DMT1 interviene en el transporte desde el lado luminal al interior epitelial. Esta participación justifica la dependencia de protones y el hecho de que el transporte se reduzca en presencia de Mn(II), un sustrato por el que DMT1 presenta una elevada afinidad. Adicionalmente cuando el Hg(II) está unido a L-Cys puede transportarse por medio del transportador de aminoácidos b<sup>0,+</sup>, tal y como ponen de manifiesto los ensayos de silenciamiento. La intervención de este transportador explica la inhibición del transporte en presencia de aminoácidos catiónicos.
- El transporte de CH<sub>3</sub>Hg a través del epitelio se realiza por vía transcelular, principalmente por difusión pasiva a través de la bicapa lipídica, cuando esta especie mercurial está en forma de cloruro.

Cuando está unida a L-Cys, su paso desde el lumen al interior celular está mediado por el transportador de aminoácidos B<sup>0,+</sup>. Este hecho se corrobora con la inhibición del transporte en presencia de aminoácidos y la dependencia de Na<sup>+</sup>.

- La salida de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg hacia la cavidad serosa desde el interior de la monocapa epitelial disminuye en presencia de aminoácidos y rifamicina. Este hecho sugiere que el transporte a través del dominio basolateral emplea los sistemas de transporte de aminoácidos (sistema L y/o y<sup>+</sup>L) y algún miembro de la familia de los OATP. La participación de los transportadores L e y<sup>+</sup>L también podría venir avalada por el aumento de la expresión génica de estos transportadores en presencia de las distintas formas de mercurio. Este hecho podría interpretarse como un mecanismo de defensa celular para evitar la acumulación intracelular del tóxico.

- El modelo celular es determinante en la evaluación del transporte de ambas formas mercuriales debido a la alta retención de éstas por parte del mucus secretado por las células HT29-MTX. Además, en situaciones más cercanas a las existentes *in vivo* (presencia de sales biliares, L-Cys o componentes procedentes de la dieta) se produce una disminución de la captación de ambas especies de mercurio. Todos estos factores deberían considerarse *in vitro* para realizar una evaluación más precisa. Además pueden ser la base de estrategias para reducir la exposición oral al tóxico.

2. Estudios sobre la toxicidad de Hg(II) y CH<sub>3</sub>Hg a nivel intestinal.

- Tanto el Hg(II) como el CH<sub>3</sub>Hg afectan la viabilidad de las células epiteliales del intestino a tiempos de exposición relativamente cortos y en concentraciones del mismo orden que las encontradas en matrices alimentarias. Este efecto tóxico está mediado en parte por la generación de especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno. Esto lleva a un desequilibrio redox, a una pérdida de integridad de membrana debido a la peroxidación lipídica y a la pérdida de la homeostasis celular.

- Los efectos citotóxicos indicados anteriormente son probablemente los responsables de las modificaciones en la expresión y localización de proteínas del complejo de uniones intercelulares y del citoesqueleto, y por tanto del consiguiente aumento de la permeabilidad celular y la pérdida de la función barrera.

- Los resultados *in vivo* han demostrado que ambas formas mercuriales presentan una alta acumulación en el tracto gastrointestinal, confirmando los resultados obtenidos empleando células epiteliales del intestino.

- Los ensayos *in vivo* han puesto de manifiesto que existe una modulación de la expresión de transportadores presentes en el tracto gastrointestinal. Existe una regulación a la baja de las acuaporinas que puede afectar la permeabilidad del agua y el equilibrio osmótico, produciendo una acumulación de líquido en el lumen y la consiguiente diarrea descrita en previos estudios *in vivo*. Además hay un aumento del transportador DMT1 en presencia de Hg(II) posiblemente para compensar las anemias causadas por la exposición a esta especie, y una reducción del OATP3 probablemente para evitar una entrada de

las formas mercuriales. Asimismo se observa un incremento del LAT1 que podría deberse a una necesidad proteica en un proceso de regeneración tisular debido al efecto del mercurio sobre la mucosa.

- Las modificaciones en la expresión de estos transportadores pueden afectar a la absorción de sus sustratos (cationes divalentes, iones, aminoácidos y ácidos orgánicos) y, en consecuencia, al adecuado funcionamiento del organismo.

## *Bibliografía*

---



- Aberg, B., Ekman, L., Falk, R., Greitz, U., Persson, G., Snihs, J.O. (1969). Metabolism of methyl mercury ( $^{203}\text{Hg}$ ) compounds in man. *Arch. Environ. Health* 19, 478-484.
- Aduayom, I., Campbell, P.G.C., Denizeau, F., Jumarie, C. (2003). Different transport mechanisms for cadmium and mercury in Caco-2 cells: Inhibition of Cd uptake by Hg without evidence for reciprocal effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189, 56-67.
- AECOSAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria, Nutrición y Consumo) (2011). Recomendaciones de la agencia española de seguridad alimentaria y nutrición para poblaciones sensibles: mujeres embarazadas o en periodo de lactancia y población infantil. [http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/rincon\\_consumidor/Recomendaciones\\_mercurio.pdf](http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/rincon_consumidor/Recomendaciones_mercurio.pdf) (Acceso mayo 2014).
- Aguado, A., Galan, M., Zhenyukh, O., Wiggers, G.A., Roque, F.R., Redondo, S., Pecanha, F., Martin, A., Fortuno, A., Cachofeiro, V., Tejerina, T., Salaiques, M., Briones, A.M. (2013). Mercury induces proliferation and reduces cell size in vascular smooth muscle cells through MAPK, oxidative stress and cyclooxygenase-2 pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 188-200.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2010). Adhesión celular, uniones estrechas y matriz extracelular. En: *Biología molecular de la célula*. 5ª ed. Editorial Omega, Barcelona. ISBN: 8428215073, pp. 1017-1031.
- Al-Sadi, R., Khatib, K., Guo, S., Ye, D., Youssef, M., Ma, T. (2011). Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G1054-G1064.
- Amin-Zaki, L., Elhassani, S., Majeed, M.A., Clarkson, T.W., Doherty, R.A., Greenwood, M. (1974). Intra-uterine methylmercury poisoning in Iraq. *Pediatrics* 54, 587-595.
- Anderson, J.M., Van Itallie, C.M. (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002584.
- Anzai, N., Kanai, Y., Endou, H. (2006). Organic anion transporter family: current knowledge. *J. Pharmacol. Sci.* 100, 411-426.
- Arena, J.M. (1971). Treatment of mercury poisoning. *Mod. Treat.* 8, 619-625.
- Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C.V., Núñez, M.T. (2003). DMT1, a physiologically relevant apical  $\text{Cu}^{1+}$  transporter of intestinal cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 284, C1525-C1530.

- Artursson, P., Karlsson, J. (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 880-885.
- Artursson, P., Palm, K., Luthman, K. (1996). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 22, 67-84.
- Artursson, P., Palm, K., Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 27-43.
- Aschner, M., Clarkson, T.W. (1989). Methyl mercury uptake across bovine brain capillary endothelial cells in vitro: The role of amino acids. *Pharmacol. Toxicol.* 64, 293-297.
- Aschner, M., Eberle, N.B., Goderie, S., Kimelberg, H.K. (1990). Methylmercury uptake in rat primary astrocyte cultures: the role of the neutral amino acid transport system. *Brain Res.* 521, 221-228.
- Aschner, M., Onishchenko, N., Ceccatelli, S. (2010). Toxicology of alkylmercury compounds. *Met. Ions Life Sci.* 7, 403-434.
- Aslamkhan, A.G., Han, Y.H., Yang, X.P., Zalups, R.K., Pritchard, J.B. (2003). Human renal organic anion transporter 1-dependent uptake and toxicity of mercuric-thiol conjugates in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Pharmacol.* 63, 590-596.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1999). Toxicological profile for mercury. Centers for Disease Control and Prevention (TP-83/10). US Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. USA.
- Aviello, G., Canadanovic-Brunet, J.M., Milic, N., Capasso, R., Fattorusso, E., Tagliatalata-Scafati, O., Fasolino, I., Izzo, A.A., Borrelli, F. (2011). Potent antioxidant and genoprotective effects of boeravinone G, a rotenoid isolated from *Boerhaavia diffusa*. *PLoS One* 6, e19628.
- Ayensu, W.K., Tchounwou, P.B. (2006). Microarray analysis of mercury-induced changes in gene expression in human liver carcinoma (HepG2) cells: importance in immune responses. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 3, 141-173.
- Ballatori, N., Clarkson, T.W. (1985). Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. *Toxicol. Sci.* 5, 816-831.
- Balusikova, K., Neubauerova, J., Dostalickova-Cimburova, M., Horak, J., Kovar, J. (2009). Differing expression of genes involved in non-transferrin iron transport across plasma membrane in various cell types under iron deficiency and excess. *Mol. Cell. Biochem.* 321, 123-133.

- Banerjee, S., Bhattacharya, S. (1995). Histopathological changes induced by chronic nonlethal levels of Elsan, mercury, and ammonia in the small intestine of *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 62-68.
- Bannon, D.I., Portnoy, M.E., Olivi, L., Lees, P.S.J., Culotta, V.C., Bressler, J.P. (2002). Uptake of lead and iron by divalent metal transporter 1 in yeast and mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 978-984.
- Bauch, C., Forster, N., Loffing-Cueni, D., Summa, V., Verrey, F. (2003). Functional cooperation of epithelial heteromeric amino acid transporters expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 278, 1316-1322.
- Behrens, I., Stenberg, P., Artursson, P., Kissel, T. (2001). Transport of lipophilic drug molecules in a new mucus-secreting cell culture model based on HT29-MTX cells. *Pharm. Res.* 18, 1138-1145.
- Belcastro, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M. (2005). Interaction of cysteine with  $\text{Cu}^{2+}$  and group IIb ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ) metal cations: a theoretical study. *J. Mass Spectrom.* 40, 300-306.
- Berger, V., Larondelle, Y., Trouet, A., Schneider, Y.J. (2000). Transport mechanisms of the large neutral amino acid L-phenylalanine in the human intestinal epithelial Caco-2 cell line. *J. Nutr.* 130, 2780-2788.
- Berlin, M. (1979). Dose-response relations and diagnostic indices of mercury concentrations in critical organs upon exposure to mercury and mercurials. En: *Effects and Dose-Response Relationships of Toxic Metals*. Nordberg, G. F. (Ed.), Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam. ISBN: 0444413707, pp. 235-245.
- Böhme, M., Diener, M., Mestres, P., Rummel, W. (1992). Direct and indirect actions of  $\text{HgCl}_2$  and methyl mercury chloride on permeability and chloride secretion across the rat colonic mucosa. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114, 285-294.
- Borges, O., Lebre, F., Bento, D., Borchard, G., Junginger, H.E. (2010). Mucosal vaccines: Recent progress in understanding the natural barriers. *Pharm. Res.* 27, 211-223.
- Bose, R., Onishchenko, N., Edoff, K., Janson Lang, A.M., Ceccatelli, S. (2012). Inherited effects of low-dose exposure to methylmercury in neural stem cells. *Toxicol. Sci.* 130, 383-390.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

- Brasse-Lagnel, C., Karim, Z., Letteron, P., Bekri, S., Bado, A., Beaumont, C. (2011). Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. *Gastroenterology* 140, 1261-1271.e1.
- Bressler, J.P., Olivi, L., Cheong, J.H., Kim, Y., Bannona, D. (2004). Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1012, 142-152.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K. (2004). Homocysteine, system  $b^{0,+}$  and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury. *Am. J. Pathol.* 165, 1385-1394.
- Bridges, C.C., Bauch, C., Verrey, F., Zalups, R.K. (2004). Mercuric conjugates of cysteine are transported by the amino acid transporter system  $b^{0,+}$ : implications of molecular mimicry. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 663-673.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 274-308.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K. (2006a). System  $b^{0,+}$  and the transport of thiol-s-conjugates of methylmercury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 948-956.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K. (2006b). Molecular mimicry as a mechanism for the uptake of cysteine S-conjugates of methylmercury and inorganic mercury [1]. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1117-1118.
- Bridges, C.C., Battle, J.R., Zalups, R.K. (2007). Transport of thiol-conjugates of inorganic mercury in human retinal pigment epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221, 251-260.
- Bridges, C.C., Zalups, R.K. (2010). Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 13, 385-410.
- Bröer, S. (2008). Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.* 88, 249-286.
- Calatayud, M., Devesa, V., Montoro, R., Velez, D. (2011). In vitro study of intestinal transport of arsenite, monomethylarsonous acid, and dimethylarsinous acid by Caco-2 cell line. *Toxicol. Lett.* 204, 127-133.
- Calatayud, M., Vazquez, M., Devesa, V., Velez, D. (2012a). In vitro study of intestinal transport of inorganic and methylated arsenic species by Caco-2/HT29-MTX cocultures. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2654-2662.

- Calatayud, M., Barrios, J.A., Vélez, D., Devesa, V. (2012b). In vitro study of transporters involved in intestinal absorption of inorganic arsenic. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 446-453.
- Calatayud, M., Devesa, V., Virseda, J.R., Barbera, R., Montoro, R., Velez, D. (2012c). Mercury and selenium in fish and shellfish: occurrence, bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2696-2702.
- Calatayud, M., Vélez, D., Devesa, V. (2012d). Metabolism of inorganic arsenic in intestinal epithelial cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2402-2411.
- Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, R., Greenwood-Van Meerveld, B., Verne, G.N. (2012). Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 503-512.
- Cannon, V.T., Zalups, R.K., Barfuss, D.W. (2001). Amino acid transporters involved in luminal transport of mercuric conjugates of cysteine in rabbit proximal tubule. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 780-789.
- Cano-Cebrian, M.J., Zornoza, T., Granero, L., Polache, A. (2005). Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: a target for drug delivery. *Curr. Drug Deliv.* 2, 9-22.
- Canonne-Hergaux, F., Gruenheid, S., Ponka, P., Gros, P. (1999). Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* 93, 4406-4417.
- Carvalho, C.M., Chew, E.H., Hashemy, S.I., Lu, J., Holmgren, A. (2008). Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity. *J. Biol. Chem.* 283, 11913-11923.
- Cebulska-Wasilewska, A., Panek, A., Zabinski, Z., Moszczynski, P., Au, W.W. (2005). Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. *Mut. Res-Genetic Toxicol. Environ.* 586, 102-114.
- Cesta, M.F. (2006). Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Pathol.* 34, 599-608.
- Cha, C.W. (1987). A study on the effect of garlic to the heavy metal poisoning of rat. *J. Korean Med. Sci.* 2, 213-224.
- Chen, Y.W., Huang, C.F., Yang, C.Y., Yen, C.C., Tsai, K.S., Liu, S.H. (2010). Inorganic mercury causes pancreatic beta-cell death via the oxidative stress-induced apoptotic and necrotic pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243, 323-331.

- Cheroutre, H., Madakamutil, L. (2004). Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 290-300.
- Choi, W.S., Kim, S.J., Kim, J.S. (2011). Inorganic lead (Pb)- and mercury (Hg)-induced neuronal cell death involves cytoskeletal reorganization. *Lab. Anim. Res.* 27, 219-225.
- Chopra, D.P., Dombkowski, A.A., Stemmer, P.M., Parker, G.C. (2010). Intestinal epithelial cells in vitro. *Stem Cells Dev.* 19, 131-142.
- Christie, N.T., Cantoni, O., Sugiyama, M., Cattabeni, F., Costa, M. (1986). Differences in the effects of Hg(II) on DNA repair induced in Chinese hamster ovary cells by ultraviolet or X-rays. *Mol. Pharmacol.* 29, 173-178.
- Chung, A.S., Maines, M.D., Reynolds, W.A. (1982). Inhibition of the enzymes of glutathione metabolism by mercuric chloride in the rat kidney: reversal by selenium. *Biochem. Pharmacol.* 31, 3093-3100.
- Chuu, J.J., Huang, Z.N., Yu, H.H., Chang, L.H., Lin-Shiau, S.Y. (2008). Attenuation by methyl mercury and mercuric sulfide of pentobarbital induced hypnotic tolerance in mice through inhibition of ATPase activities and nitric oxide production in cerebral cortex. *Arch. Toxicol.* 82, 343-353.
- Clarkson, T.W. (1989). Mercury. *Int. J. Toxicol.* 8, 1291-1295.
- Clarkson, T.W. (1993). Molecular and ionic mimicry of toxic metals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33, 545-571.
- Clarkson, T.W., Magos, L. (2006). The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 609-662.
- Clarkson, T.W., Vyas, J.B., Ballatori, N. (2007). Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am. J. Ind. Med.* 50, 757-764.
- Coers, W., Vos, J.T.W.M., Van der Meide, P. H., Van der Horst, M.L.C., Huitema, S., Weening, J.J. (1995). Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and IL-4 expressed during mercury-induced membranous nephropathy are toxic for cultured podocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 102, 297-307.
- Comisión de la Comunidades Europeas (2005). Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo - Estrategia comunitaria sobre el mercurio {SEC(2005) 101}. Bruselas, 28.01.2005. COM(2005) 20 final.
- Corr, S.C., Gahan, C.C.G.M., Hill, C. (2008). M-cells: Origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 2-12.

- Crespo-López, M.E., Macêdo, G.L., Pereira, S.I.D., Arrifano, G.P.F., Picanço-Diniz, D.L.W., Nascimento, J.L.M., Herculano, A.M. (2009). Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacol. Res.* 60, 212-220.
- Culot, M., Lundquist, S., Vanuxeem, D., Nion, S., Landry, C., Delplace, Y., Dehouck, M.P., Berzowski, V., Fenart, L., Cecchelli, R. (2008). An in vitro blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol. In Vitro* 22, 799-811.
- Cui, W., Li, L.X., Sun, C.M., Wen, Y., Zhou, Y., Dong, Y.L., Liu, P. (2010). Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 330-337.
- Dahm, L.J., Jones, D.P. (1994). Secretion of cysteine and glutathione from mucosa to lumen in rat small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 267, G292-G300.
- Dave, M.H., Schulz, N., Zecevic, M., Wagner, C.A., Verrey, F. (2004). Expression of heteromeric amino acid transporters along the murine intestine. *J. Physiol.* 558, 597-610.
- Day, R.E., Kitchen, P., Owen, D.S., Bland, C., Marshall, L., Conner, A.C., Bill, R.M., Conner, M.T. (2014). Human aquaporins: regulators of transcellular water flow. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 1492-1506.
- Del Cerro-Martín, G., Barnuevo Villanueva, J.R., Vega, M.M., Ramos Pino, M., Carrasco Milara, J., Conde Mansilla, A. (2012). El ciclo de vida del mercurio. En: Buscando soluciones para la gestión medioambiental responsable del mercurio. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, España. ISBN: 978-84-491-1232-4, pp. 17-25.
- Denny, M.F., Atchison, W.D. (1996). Mercurial-induced alterations in neuronal divalent cation homeostasis. *Neurotoxicology* 17, 47-61.
- Di Giusto, G., Anzai, N., Ruiz, M.L., Endou, H., Torres, A.M. (2009). Expression and function of Oat1 and Oat3 in rat kidney exposed to mercuric chloride. *Arch. Toxicol.* 83, 887-897.
- Directiva 86/609/CEE del Consejo de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines. Diario Oficial de la Unión Europea, 18.12.1986.

- Directiva 2005/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los requisitos de diseño ecológico para lámparas fluorescentes sin balastos integrados, para lámparas de descarga de alta intensidad y para balastos y luminarias que puedan funcionar con dichas lámparas, y se deroga la Directiva 2000/55/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea, 22.7.2005.
- Directiva 2006/66/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de septiembre de 2006, relativa a las pilas y acumuladores y a los residuos de pilas y acumuladores, y por la que se deroga la Directiva 91/157/CEE. Diario Oficial de la Unión Europea, 26.9.2006.
- Directiva 2010/75/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de noviembre de 2010, sobre las emisiones industriales (prevención y control integrados de la contaminación). Diario Oficial de la Unión Europea, 17.12.2010.
- Donovan, A., Lima, C.A., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., Zon, L.I., Robine, S., Andrews, N.C. (2005). The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell. Metab.* 1, 191-200.
- Dutczak, W.J., Ballatori, N. (1994). Transport of the glutathione-methylmercury complex across liver canalicular membranes on reduced glutathione carriers. *J. Biol. Chem.* 269, 9746-9751.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal* 10, 2985.
- Elamin, E.E., Masclee, A.A., Dekker, J., Jonkers, D.M. (2013). Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutr. Rev.* 71, 483-499.
- Endo, T., Nakaya, S., Kimura, R. (1988a). Mechanisms of absorption of inorganic mercury from rat small intestine. II. Composite effects of pH and halide ions on transport of mercuric chloride into isolated brush border membrane vesicles in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 63, 361-368.
- Endo, T., Nakaya, S., Kimura, R. (1988b). Mechanisms of absorption of inorganic mercury from rat small intestine. I. Solvent drag effect on absorption of inorganic mercury. *Pharmacol. Toxicol.* 63, 8-15.
- Endo, T., Nakaya, S., Kimura, R. (1989). Factors involved in absorption of organic mercuric compounds from rat small intestine: Comparative study with mercuric chloride in situ. *Pharmacol. Toxicol.* 65, 128-135.
- Endo, T., Nakaya, S., Kimura, R. (1990). Mechanisms of absorption of inorganic mercury from rat small intestine. III. Comparative absorption studies of inorganic mercuric compounds in vitro. *Pharmacol. Toxicol.* 66, 347-353.

- Endo, T., Nakaya, S., Kimura, R. (1991). Mechanisms of absorption of inorganic mercury from rat small intestine. IV: Effect of chelating agents and cysteine on absorption of mercuric chloride in situ and in vitro. *Pharmacol. Toxicol.* 68, 171-176.
- Endo, T., Sakata, M., Shaikh, Z.A. (1995). Mercury uptake by primary cultures of rat renal cortical epithelial cells. I. Effects of cell density, temperature, and metabolic inhibitors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 132, 36-43.
- Endo, T., Haraguchi, K., Sakata, M. (2003). Renal toxicity in rats after oral administration of mercury-contaminated boiled whale livers marketed for human consumption. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 412-416.
- Español Cano, S. (2006). Toxicología del mercurio. En: Seminario internacional sobre clínica del mercurio. Memorias. Academia Nacional de Medicina Kimpres. Ltda. Bogotá, D.C., Colombia. ISBN: 958-97668-5-4, pp. 60-127
- Fanning, A.S., Van Itallie, C.M., Anderson, J.M. (2012). Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia. *Mol. Biol. Cell* 23, 577-590.
- Farina, M., Aschner, M., Rocha, J.B. (2011a). Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256, 405-417.
- Farina, M., Rocha, J.B.T., Aschner, M. (2011b). Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. *Life Sci.* 89, 555-563.
- Fogh, J., Trempe, G. (1975). New Human Tumor Cell Lines. En: Human tumour cells in vitro. Ed. Fogh, J. Plenum Press, New York. ISBN: 030630810X, pp 115-154.
- Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59, 221-226.
- Forstner, J.F., Forstner, G.G. (1994). Gastrointestinal mucus. En: Physiology of the gastrointestinal tract. Ed. Johnson, L.R. Raven Press. New York. ISBN: 0781701325, pp. 1255-1283.
- Foulkes, E.C., Bergman, D. (1993). Inorganic mercury absorption in mature and immature rat jejunum: transcellular and intercellular pathways in vivo and in everted sacs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120, 89-95.
- Foulkes, E.C. (2000). Transport of toxic heavy metals across cell membranes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223, 234-240.

- Franco, J.L., Posser, T., Dunkley, P.R., Dickson, P.W., Mattos, J.J., Martins, R., Bairy, A.C.D., Marques, M.R., Dafre, A.L., Farina, M. (2009). Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 449-457.
- Fredriksson, A., Dahlgren, L., Danielsson, B., Eriksson, P., Dencker, L., Archer, T. (1992). Behavioural effects of neonatal metallic mercury exposure in rats. *Toxicology* 74, 151-160.
- Fredriksson, A., Dencker, L., Archer, T., Danielsson, B.R.G. (1996). Prenatal coexposure to metallic mercury vapour and methylmercury produce interactive behavioural changes in adult rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 18, 129-134.
- Friberg, L., Nordberg, G.F. (1972). Inorganic mercury. Relations between exposure and effects. En: *Mercury in the Environment. A Toxicological and Epidemiological Appraisal*. Eds. Friberg, L., Vostal, J. CRC Press, Cleveland. ISBN: 087819004X, pp. 130-140.
- Frigeri, A., Gropper, M.A., Umenishi, F., Kawashima, M., Brown, D., Verkman, A.S. (1995). Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *J. Cell. Sci.* 108, 2993-3002.
- Fyderek, K., Strus, M., Kowalska-Duplaga, K., Gosiewski, T., Wedrychowicz, A., Jedynak-Wasowicz, U., Sladek, M., Pieczarkowski, S., Adamski, P., Kochan, P., Heczko, P.B. (2009). Mucosal bacterial microflora and mucus layer thickness in adolescents with inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 15, 5287-5294.
- Gailer, J., George, G.N., Pickering, I.J., Madden, S., Prince, R.C., Yu, E.Y., Denton, M.B., Younis, H.S., Aposhian, H.V. (2000). Structural basis of the antagonism between inorganic mercury and selenium in mammals. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 1135-1142.
- Gan, L.S., Hsyu, P.H., Pritchard, J.F., Thakker, D. (1993a). Mechanism of intestinal absorption of ranitidine and ondansetron: Transport across Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.* 10, 1722-1725.
- Gan, L.S., Niederer, T., Eads, C., Thakker, D. (1993b). Evidence for predominantly paracellular transport of thyrotropin-releasing hormone across Caco-2 cell monolayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 771-777.
- Ganapathy, V., Ganapathy, M.E., Leibach, F.H. (2001). Intestinal transport of peptides and amino acids. En: *Gastrointestinal transport: molecular physiology*. Eds. Barrett, K.E., Donowitz, M. Academic Press. San Diego, California, USA. ISBN: 0-12-079410-1, pp 379-412.

- Garrecht, M., Austin, D.W. (2011). The plausibility of a role for mercury in the etiology of autism: A cellular perspective. *Toxicol. Environ. Chem.* 93, 1251-1273.
- Gatti, R., Belletti, S., Uggeri, J., Vettori, M.V., Mutti, A., Scandroglio, R., Orlandini, G. (2004). Methylmercury cytotoxicity in PC12 cells is mediated by primary glutathione depletion independent of excess reactive oxygen species generation. *Toxicology* 204, 175-185.
- Gerstner, H.B., Huff, J.E. (1977). Clinical toxicology of mercury. *J. Toxicol. Environ. Health* 2, 491-526.
- Gietz, R.D., Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350, 87-96.
- Goering, P.L., Fisher, B.R., Noren, B.T., Papaconstantinou, A., Rojko, J.L., Marler, R.J. (2000). Mercury induces regional and cell-specific stress protein expression in rat kidney. *Toxicol. Sci.* 53, 447-457.
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., Jaramillo, B.E. (2003). Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81, 1-44.
- Grandjean, P., Satoh, H., Murata, K., Eto, K. (2010). Adverse effects of methylmercury: environmental health research implications. *Environ. Health Perspect.* 118, 1137-1145.
- Grandjean, P., Herz, K.T. (2011). Methylmercury and brain development: imprecision and underestimation of developmental neurotoxicity in humans. *Mt. Sinai J. Med.* 78, 107-118.
- Grandvuinet, A.S., Vestergaard, H.T., Rapin, N., Steffansen, B. (2012). Intestinal transporters for endogenous and pharmaceutical organic anions: the challenges of deriving in-vitro kinetic parameters for the prediction of clinically relevant drug-drug interactions. *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 1523-1548.
- Grasset, E., Pinto, M., Dussaulx, E., Zweibaum, A., Desjeux, J.F. (1984). Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *Am. J. Physiol.* 247, C260-C267.
- Groschwitz, K.R., Hogan, S.P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 3-20.
- Gstraunthaler, G., Pfaller, W., Kotanko, P. (1983). Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2969-2972.

- Gum J.R. Jr., Hicks, J.W., Toribara, N.W., Rothe, E.M., Lagace, R.E., Kim, Y.S. (1992). The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region. *J. Biol. Chem.* 267, 21375-21383.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., Hediger, M.A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482-488.
- Guy-Grand, D., DiSanto, J.P., Henchoz, P., Malassis-Seris, M., Vassalli, P. (1998). Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN-gamma, TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur. J. Immunol.* 28, 730-744.
- Hagenbuch, B., Gui, C. (2008). Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* 38, 778-801.
- Halbach, S. (1985). The octanol/water distribution of mercury compounds. *Arch. Toxicol.* 57, 139-141.
- Hamilton, A., Hardy, H.L. (1949). Mercury. En: *Industrial Toxicology*. Ed. Hoeber, O.B. Inc. Publ. New York, USA. pp. 104-126.
- Harada, M. (1995). Minamata disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 1-24.
- Harris, D.S., Slot, J.W., Geuze, H.J., James, D.E. (1992). Polarized distribution of glucose transporter isoforms in Caco-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7556-7560.
- Harris, T.J., Tepass, U. (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 502-514.
- Hartsock, A., Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 660-669.
- Havarinasab, S., Hultman, P. (2005). Organic mercury compounds and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 4, 270-275.
- Heggland, I., Kaur, P., Syversen, T. (2009). Uptake and efflux of methylmercury in vitro: Comparison of transport mechanisms in C6, B35 and RBE4 cells. *Toxicol. In Vitro* 23, 1020-1027.
- Hidalgo, I.J., Raub, T.J., Borchardt, R.T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 736-749.

- Hidalgo, I.J., Borchardt, R.T. (1990). Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line Caco-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1028, 25-30.
- Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regardh, C.G., Lipka, E., Amidon, G.L., Langguth, P. (2000). Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J. Pharm. Sci.* 89, 63-75.
- Hilgendorf, C., Ahlin, G., Seithel, A., Artursson, P., Ungell, A.L., Karlsson, J. (2007). Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab. Disposition* 35, 1333-1340.
- Holmes, P., James, K.A., Levy, L.S. (2009). Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Sci. Total Environ.* 408, 171-182.
- Hong, Y.S., Kim, Y.M., Lee, K.E. (2012). Methylmercury exposure and health effects. *J. Prev. Med. Public Health* 45, 353-363.
- Hu, G., Yang, Q., Cui, X., Yue, G., Azaro, M.A., Wang, H.Y., Li, H. (2008). A highly sensitive and specific system for large-scale gene expression profiling. *BMC Genomics* 9, 9.
- Huang, C.F., Liu, S.H., Hsu, C.J., Lin-Shiau, S.Y. (2011). Neurotoxicological effects of low-dose methylmercury and mercuric chloride in developing offspring mice. *Toxicol. Lett.* 201, 196-204.
- Hultman, P., Hansson-Georgiadis, H. (1999). Methyl mercury-induced autoimmunity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154, 203-211.
- Hussain, S., Rodgers, D.A., Duhart, H.M., Ali, S.F. (1997). Mercuric chloride-induced reactive oxygen species and its effect on antioxidant enzymes in different regions of rat brain. *J. Environ. Sci. Health., Part B* 32, 395-409.
- Hwang, H.J., Shim, S.M. (2008). Impact of sodium copper chlorophyllin on mercury absorption using an in vitro digestion with human intestinal cell model. *Food Sci. Biotechnol.* 17, 564-568.
- IARC (Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer) (1993). Mercury and mercury compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 58, 239-345.
- Ikarashi, N., Kon, R., Iizasa, T., Suzuki, N., Hiruma, R., Suenaga, K., Toda, T., Ishii, M., Hoshino, M., Ochiai, W., Sugiyama, K. (2012). Inhibition of aquaporin-3 water channel in the colon induces diarrhea. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 957-962.

- IPCS (Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas) (2003). Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Concise International Chemical Assessment Document 50; <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad50.pdf>).
- Janero, D.R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 515-540.
- JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2000). Safety evaluation of certain food additives and contaminant. International programme on chemical safety. WHO food additives series: 44. Fifty-third meeting of JEFCA, Geneva.
- JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2011). Safety evaluation of certain contaminants in food. Seventy-second meeting of JECFA. FAO JECFA Monographs 8, Rome.
- Johansson, C., Castoldi, A.F., Onishchenko, N., Manzo, L., Vahter, M., Ceccatelli, S. (2007). Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development. *Neurotox. Res.* 11, 241-260.
- Jonker, D., Woutersen, R.A., van Bladeren, P.J., Til, H.P., Feron, V.J. (1993). Subacute (4-wk) oral toxicity of a combination of four nephrotoxins in rats: comparison with the toxicity of the individual compounds. *Food Chem. Toxicol.* 31, 125-136.
- Jung, J.S., Preston, G.M., Smith, B.L., Guggino, W.B., Agre, P. (1994). Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* 269, 14648-14654.
- Kaarteenaho, R., Merikallio, H., Lehtonen, S., Harju, T., Soini, Y. (2010). Divergent expression of claudin -1, -3, -4, -5 and -7 in developing human lung. *Respir. Res.* 11, 59.
- Kajiwara, Y., Yasutake, A., Adachi, T., Hirayama, K. (1996). Methylmercury transport across the placenta via neutral amino acid carrier. *Arch. Toxicol.* 70, 310-314.
- Kalliokoski, A., Niemi, M. (2009). Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br. J. Pharmacol.* 158, 693-705.
- Kalmar, B., Greensmith, L. (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 310-318.

- Kamijo, Y., Hayashi, I., Yoshimura, K., Soma, K. (2004). Effect of milk on intestinal fluid accumulation and renal injury following mercuric chloride ingestion in rats. *J. Appl. Toxicol.* 24, 129-134.
- Kanduser, M., Sentjurc, M., Miklavcic, D. (2008). The temperature effect during pulse application on cell membrane fluidity and permeabilization. *Bioelectrochemistry* 74, 52-57.
- Karlsson, J., Wikman, A., Artursson, P. (1993). The mucus layer as a barrier to drug absorption in monolayers of human intestinal epithelial HT29-H goblet cells. *Int. J. Pharm.* 99, 209-218.
- Kawedia, J.D., Jiang, M., Kulkarni, A., Waechter, H.E., Matlin, K.S., Pauletti, G.M., Menon, A.G. (2008). The protein kinase A pathway contributes to Hg<sup>2+</sup> induced alterations in phosphorylation and subcellular distribution of occludin associated with increased tight junction permeability of salivary epithelial cell monolayers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 829-837.
- Kawkitinarong, K., Linz-McGillem, L., Birukov, K.G., Garcia, J.G. (2004). Differential regulation of human lung epithelial and endothelial barrier function by thrombin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31, 517-527.
- Kerper, L.E., Ballatori, N., Clarkson, T.W. (1992). Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 262, R761-R765.
- Kilberg, M.S., Stevens, B.R., Novak, D.A. (1993). Recent advances in mammalian amino acid transport. *Annu. Rev. Nutr.* 13, 137-165.
- Kim, Y.S., Ho, S.B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 319-330.
- Kishi, R., Hashimoto, K., Shimizu, S., Kobayashi, M. (1978). Behavioral changes and mercury concentrations in tissues of rats exposed to mercury vapor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 46, 555-566.
- Kizhatil, K., Albritton, L.M. (2002). System y<sup>+</sup> localizes to different membrane subdomains in the basolateral plasma membrane of epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 283, C1784-C1794.
- Klaassen, C.D., Liu, J. (1998). Induction of metallothionein as an adaptive mechanism affecting the magnitude and progression of toxicological injury. *Environ. Health Perspect.* 106, 297-300.
- Kobayashi, D., Nozawa, T., Imai, K., Nezu, J., Tsuji, A., Tamai, I. (2003). Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 703-708.

- Kolev, S.T. Bates, N. Mercury (2005). (UK PID). National Poisons Information Service: Medical Toxicology Unit. United Kingdom. <http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid27.htm>.
- Kostial, K., Rabar, I., Ciganovic, M., Šimonovic, I. (1979). Effect of milk on mercury absorption and gut retention in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 566-571.
- Kostial, K., Blanuša, M., Rabar, I., Šimonovic, I. (1981). More data on mercury absorption in relation to dietary treatment in rats. *Toxicol. Lett.* 7, 201-205.
- Kostial, K., Šimonovic, I., Rabar, I., Blanuša, M., Landeka, M. (1983). Age and intestinal retention of mercury and cadmium in rats. *Environ. Res.* 31, 111-115.
- Koyama, Y., Yamamoto, T., Tani, T., Nihei, K., Kondo, D., Funaki, H., Yaoita, E., Kawasaki, K., Sato, N., Hatakeyama, K., Kihara, I. (1999). Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol.* 276, C621-C627.
- Krishna, G., Chen, K.J., Lin, C.C., Nomeir, A.A. (2001). Permeability of lipophilic compounds in drug discovery using in-vitro human absorption model, Caco-2. *Int. J. Pharm.* 222, 77-89.
- Kuznetsov, D.A., Zavijalov, N.V., Govorkov, A.V., Ivanov-Snaryad, A.A. (1986). Methyl mercury-induced combined inhibition of ATP regeneration and protein synthesis in reticulocyte lysate cell-free translation system. *Toxicol. Lett.* 30, 267-271.
- Laforenza, U., Gastaldi, G., Grazioli, M., Cova, E., Tritto, S., Faelli, A., Calamita, G., Ventura, U. (2005). Expression and immunolocalization of aquaporin-7 in rat gastrointestinal tract. *Biol. Cell.* 97, 605-613.
- Laforenza, U. (2012). Water channel proteins in the gastrointestinal tract. *Mol. Aspects Med.* 33, 642-650.
- Laitinen, L. (2006). Caco-2 cell cultures in the assessment of intestinal absorption: Effects of some co-administered drugs and natural compounds in biological matrices. Ph.D. Dissertation. University of Helsinki, Finlandia.
- Laparra, J.M., Vélez, D., Montoro, R., Barberá, R., Farré, R. (2004). Bioaccessibility of inorganic arsenic species in raw and cooked *Hizikia fusiforme* seaweed. *Appl. Organomet. Chem.* 18, 662-669.
- Laparra, J.M., Sanz, Y. (2009). Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 695-701.

- Lash, L.H., Hueni, S.E., Putt, D.A., Zalups, R.K. (2005). Role of organic anion and amino acid carriers in transport of inorganic mercury in rat renal basolateral membrane vesicles: Influence of compensatory renal growth. *Toxicol. Sci.* 88, 630-644.
- Lau, S.K., Weiss, L.M., Chu, P.G. (2004). Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: An immunohistochemical study. *Am. J. Clin. Pathol.* 122, 61-69.
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., Zweibaum, A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res.* 50, 6334-6343.
- Lesuffleur, T., Kornowski, A., Luccioni, C., Muleris, M., Barbat, A., Beaumatin, J., Dussaulx, E., Dutrillaux, B., Zweibaum, A. (1991). Adaptation to 5-fluorouracil of the heterogeneous human colon tumor cell line HT-29 results in the selection of cells committed to differentiation. *Int. J. Cancer* 49, 721-730.
- Lesuffleur, T., Porchet, N., Aubert, J.P., Swallow, D., Gum, J.R., Kim, Y.S., Real, F.X., Zweibaum, A. (1993). Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J. Cell. Sci.* 106, 771-783.
- Lesuffleur, T., Roche, F., Hill, A.S., Lacasa, M., Fox, M., Swallow, D.M., Zweibaum, A., Real, F.X. (1995). Characterization of a mucin cDNA clone isolated from HT-29 mucus-secreting cells. The 3' end of MUC5AC? *J. Biol. Chem.* 270, 13665-13673.
- Li, Y., Jiang, Y., Yan, X.P. (2006). Probing mercury species-DNA interactions by capillary electrophoresis with on-line electrothermal atomic absorption spectrometric detection. *Anal. Chem.* 78, 6115-6120.
- Limke, T.L., Heidemann, S.R., 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.
- Lin, F.M., Malaiyandi, M., Romero Sierra, C. (1975). Toxicity of methylmercury: effects on different ages of rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 14, 140-148.
- Lin, T.H., Huang, Y.L., Huang, S.F. (1996). Lipid peroxidation in liver of rats administered with methyl mercuric chloride. *Biol. Trace Elem. Res.* 54, 33-41.

- Linnankoski, J., Mäkelä, J., Palmgren, J., Mauriala, T., Vedin, C., Ungell, A.L., Lazorova, L., Artursson, P., Urtti, A., Yliperttula, M. (2010). Paracellular porosity and pore size of the human intestinal epithelium in tissue and cell culture models. *J. Pharm. Sci.* 99, 2166-2175.
- Lund, B.O., Miller, D.M., Woods, J.S. (1991). Mercury-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 42, S181-S187.
- Ma, T., Verkman, A.S. (1999). Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. *J. Physiol.* 517, 317-326.
- Ma, T.Y., Tran, D., Hoa, N., Nguyen, D., Merryfield, M., Tarnawski, A. (2000). Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: Role of cytoskeletal involvement. *Microsc. Res. Tech.* 51, 156-168.
- Ma, T.Y., Iwamoto, G.K., Hoa, N.T., Akotia, V., Pedram, A., Boivin, M.A., Said, H.M. (2004). TNF- $\alpha$ -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- $\kappa$ B activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286, G367-G376.
- Madejczyk, M.S., Ballatori, N. (2012). The iron transporter ferroportin can also function as a manganese exporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 651-657.
- Maeda, T., Miyazono, Y., Ito, K., Hamada, K., Sekine, S., Horie, T. (2010). Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 1117-1123.
- Magos, L., Clarkson, T.W. (2006). Overview of the clinical toxicity of mercury. *Ann. Clin. Biochem.* 43, 257-268.
- Mahler, G.J., Esch, M.B., Glahn, R.P., Shuler, M.L. (2009). Characterization of a gastrointestinal tract microscale cell culture analog used to predict drug toxicity. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 193-205.
- Martín-Venegas, R., Rodríguez-Lagunas, M.J., Mercier, Y., Geraert, P.A., Ferrer, R. (2009). Effect of pH on L- and D-methionine uptake across the apical membrane of Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C632-C638.
- Maubon, N., Le Vee, M., Fossati, L., Audry, M., Le Ferrec, E., Bolze, S., Fardel, O. (2007). Analysis of drug transporter expression in human intestinal Caco-2 cells by real-time PCR. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 21, 659-663.
- McGinnis, W.R. (2001). Mercury and autistic gut disease. *Environ. Health Perspect.* 109, A303-A304.

- McLauchlan, G.A. (1991). Acute mercury poisoning. *Anaesthesia* 46, 110-112.
- Mena, N.P., Esparza, A., Tapia, V., Valdés, P., Núñez, M.T. (2007). Hepsidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G192-G198.
- Meunier, V., Bourrie, M., Berger, Y., Fabre, G. (1995). The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol. Toxicol.* 11, 187-194.
- Miettinen, J.K., Rahola, T., Hattula, T., Rissanen, K., Tillander, M. (1971). Elimination of <sup>203</sup>Hg-methylmercury in man. *Ann. Clin. Res.* 3, 116-122.
- Miettinen, J.K. (1973). Absorption and elimination of dietary mercury (Hg<sup>2+</sup>) and methylmercury in man. En: Mercury, mecurials and mercaptans. Eds: Miller, M.W., Clarkson, T.W. Springfield. ISBN: 0398026009, pp. 233-246.
- Mikkaichi, T., Suzuki, T., Tanemoto, M., Ito, S., Abe, T. (2004). The organic anion transporter (OATP) family. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 19, 171-179.
- Miklavcic, A., Stibilj, V., Heath, E., Polak, T., Tratnik, J.S., Klavž, J., Mazej, D., Horvat, M. (2011). Mercury, selenium, PCBs and fatty acids in fresh and canned fish available on the Slovenian market. *Food Chem.* 124, 711-720.
- Mitsumori, K., Maita, K., Saito, T., Tsuda, S., Shirasu, Y. (1981). Carcinogenicity of methylmercury chloride in ICR mice: Preliminary note on renal carcinogenesis. *Cancer Lett.* 12, 305-310.
- Mitsumori, K., Hirano, M., Ueda, H., Maita, K., Shirasu, Y. (1990). Chronic toxicity and carcinogenicity of methylmercury chloride in B6C3F1 mice. *Fund. Appl. Toxicol.* 14, 179-190.
- Miura, K., Inokawa, M., Imura, N. (1984). Effects of methylmercury and some metal ions on microtubule networks in mouse glioma cells and in vitro tubulin polymerization. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73, 218-231.
- Miyamoto, S., Kato, K., Ishii, Y., Mizuno, S., Asai, S., Jike, T., Iwasaki, A., Nemoto, N., Kanai, Y., Endou, H., Arakawa, Y. (2001). Increased expression of the amino acid transporter LAT1 during healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcer in rats. *Gastroenterology* 120, A153.
- Mokrzan, E.M., Kerper, L.E., Ballatori, N., Clarkson, T.W. (1995). Methylmercury-thiol uptake into cultured brain capillary endothelial cells on amino acid system L. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 1277-1284.
- Morgan, E.H., Oates, P.S. (2002). Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood Cells Mol. Dis.* 29, 384-399.

- Morgan, E.H. (2004). Cellular and tissue expression of eat DMT1/Nramp 2. En: The Nramp Family. Eds. Cellier, M., Gros, P. Eureka.com and Kluwer Academic / Plenum Publishers. ISBN 978-0-306-47841-3, pp. 82-95.
- Mori, N., Yasutake, A., Hirayama, K. (2007). Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. *Arch. Toxicol.* 81, 769-776.
- Mori, N., Yamamoto, M., Tsukada, E., Yokooji, T., Matsumura, N., Sasaki, M., Murakami, T. (2012). Comparison of in vivo with in vitro pharmacokinetics of mercury between methylmercury chloride and methylmercury cysteine using rats and Caco-2 cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 628-636.
- Mumberg, D., Muller, R., Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-122.
- Nielsen, J.B. (1992). Toxicokinetics of mercuric chloride and methylmercuric chloride in mice. *J. Toxicol. Environ. Health* 37, 85-122.
- Nielsen, J.B., Hultman, P. (2002). Mercury-induced autoimmunity in mice. *Environ. Health Perspect.* 110, 877-881.
- Norseth, T., Clarkson, T.W. (1971). Intestinal transport of <sup>203</sup>Hg-labeled methyl mercury chloride. Role of biotransformation in rats. *Arch. Environ. Health* 22, 568-577.
- NRC (United States National Research Council), Commission on Life Sciences, Board on Environmental Studies and Toxicology (2000). Toxicological effects of methylmercury. National Academy Press, Washington, D.C.22. ISBN: 0-309-56970-2, pp. 568-577.
- NTP (Programa Toxicológico Nacional de los Estados Unidos) (1993). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Mercuric Chloride (CAS No. 7487-94-7) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 408, 1-260.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421-5426.
- Ohno, C., Nakanishi, Y., Honma, T., Henmi, A., Sugitani, M., Kanai, Y., Nemoto, N. (2009). Significance of system L amino acid transporter 1 (LAT-1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) expression in human developing intestines. *Acta Histochem. Cytochem.* 42, 73-81.

- Okubo, M., Yamada, K., Hosoyamada, M., Shibasaki, T., Endou, H. (2003). Cadmium transport by human Nramp 2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 187, 162-167.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2000). Air quality guidelines for Europe. World Health Organization Regional Office for Europe. Copenhagen. Second Edition. World Health Organization.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2003). Concise International Chemical Assessment Document 50. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. First draft prepared by Dr J.F. Risher, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, Georgia, USA. Geneva.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2004). Guidelines for Drinking-water quality 3rd edition. Geneva, World Health Organization.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2008). Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Issued by UNEP DTIE Chemicals Branch and WHO Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Disease. Geneva.
- Onishchenko, N., Spulber, S., Ceccatelli, S. (2012). Behavioural effects of exposure to methylmercury during early development. En: *Methylmercury and Neurotoxicity*. Eds: Ceccatelli, S., Aschner, M. Springer, New York Dordrecht Heidelberg London. ISBN 978-1-4614-2383-6, pp.163-198.
- Orbán, E., Szabó, E., Lotz, G., Kupcsulik, P., Páska, C., Schaff, Z., Kiss, A. (2008). Different expression of occludin and ZO-1 in primary and metastatic liver tumors. *Pathol. Oncol. Res.* 14, 299-306.
- Palacin, M., Estevez, R., Bertran, J., Zorzano, A. (1998). Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* 78, 969-1054.
- Petri, N., Tannergren, C., Rungstad, D., Lennernäs, H. (2004). Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model. *Pharm. Res.* 21, 1398-1404.
- Pieper, I., Wehe, C.A., Bornhorst, J., Ebert, F., Leffers, L., Holtkamp, M., Hoseler, P., Weber, T., Mangerich, A., Burkle, A., Karst, U., Schwerdtle, T. (2014). Mechanisms of Hg species induced toxicity in cultured human astrocytes: genotoxicity and DNA-damage response. *Metallomics* 6, 662-671.
- Pinto, M., Robine Leon, S., Appay, M.D. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* 47, 323-330.

- Piotrowski, J.K., Szymanska, J.A., Skrzypinska-Gawrysiak, M., Kotelo, J., Sporny, S. (1992). Intestinal absorption of inorganic mercury in rat. *Pharmacol. Toxicol.* 70, 53-55.
- Pontier, C., Pachot, J., Botham, R., Lenfant, B., Arnaud, P. (2001). HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. *J. Pharm. Sci.* 90, 1608-1619.
- Porter, E.M., Bevins, C.L., Ghosh, D., Ganz, T. (2002). The multifaceted Paneth cell. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 156-170.
- Preston, G.M., Jung, J.S., Guggino, W.B., Agre, P. (1993). The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J. Biol. Chem.* 268, 17-20.
- Proctor, W.R., Bourdet, D.L., Thakker, D.R. (2008). Mechanisms underlying saturable intestinal absorption of metformin. *Drug Metab. Dispos.* 36, 1650-1658.
- Quig, D. (1998). Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern. Med. Rev.* 3, 262-270.
- Rahola, T., Hattula, T., Korolainen, A., Miettinen, J.K. (1973). Elimination of free and protein-bound ionic mercury ( $^{20}\text{Hg}^{2+}$ ) in man. *Ann. Clin. Res.* 5, 214-219.
- Reglamento 847/2012 (2012). Reglamento n° 847/2012 de la Comisión, de 19 de septiembre de 2012, por el que se modifica, en lo que respecta al mercurio, el anexo XVII del Reglamento (CE) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH). Diario Oficial de la Unión Europea, 20/09/2012, L 253/1 a L 253/4.
- Riverón, R. (1999). Fisiopatología de la diarrea aguda. *Rev. Cubana Pediatr.* 71, 86-115.
- Rocha, R.A., Velez, D., Devesa, V. (2012). In vitro evaluation of intestinal fluoride absorption using different cell models. *Toxicol. Lett.* 210, 311-317.
- Rodrigues, J.L., Serpeloni, J.M., Batista, B.L., Souza, S.S., Barbosa, F. Jr (2010). Identification and distribution of mercury species in rat tissues following administration of thimerosal or methylmercury. *Arch. Toxicol.* 84, 891-896.
- Rooney, J.P.K. (2007). The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology* 234, 145-156.
- Rossier, G., Meier, C., Bauch, C., Summa, V., Sordat, B., Verrey, F., Kuhn, L.C. (1999). LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J. Biol. Chem.* 274, 34948-34954.

- Rowland, I.R., Davies, M.J., Evans, J.G. (1980). Tissue content of mercury in rats given methylmercuric chloride orally: influence of intestinal flora. *Arch. Environ. Health* 35, 155-160.
- Rowland, I.R., Mallett, A.K., Flynn, J., Hargreaves, R.J. (1986). The effect of various dietary fibres on tissue concentration of chemical form of mercury after methylmercury exposure in mice. *Arch. Toxicol.* 59, 94-98.
- Sager, P.R., Syversen, T.L.M. (1984). Differential responses to methylmercury exposure and recovery in neuroblastoma and glioma cells and fibroblasts. *Exp. Neurol.* 85, 371-382.
- Saljooghi, A.S., Delavar-Mendi, F. (2013). The effect of mercury in iron metabolism in rats. *J. Clin. Toxicol.* 3, 1-5.
- Sancho, E., Battle, E., Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 763-770.
- Sanyal, A.J., Hirsch, J.I., Moore, E.W. (1990). Premicellar taurocholate avidly binds ferrous ( $\text{Fe}^{++}$ ) iron: a potential physiologic role for bile salts in iron absorption. *J. Lab. Clin. Med.* 116, 76-86.
- Sanyal, A.J., Shiffmann, M.L., Hirsch, J.I., Moore, E.W. (1991). Premicellar taurocholate enhances ferrous iron uptake from all regions of rat small intestine. *Gastroenterology* 101, 382-389.
- Sanyal, A.J., Hirsch, J.I., Moore, E.W. (1994). Premicellar taurocholate enhances calcium uptake from all regions of rat small intestine. *Gastroenterology* 106, 866-874.
- Sasakura, C., Suzuki, K.T. (1998). Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *J. Inorg. Biochem.* 71, 159-162.
- Sasser, L.B., Jarboe, G.E., Walter, B.K., Kelman, B.J. (1978). Absorption of mercury from ligated segments of the rat gastrointestinal tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 157, 57-60.
- Seaton, A., Bishop, C.M. (1978). Acute mercury pneumonitis. *Br. J. Ind. Med.* 35, 258-261.
- Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H., Kanai, Y. (1999). Identification and functional characterization of a  $\text{Na}^{+}$ -independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J. Biol. Chem.* 274, 19745-19751.

- Seko, Y., Takahashi, M., Hasegawa, T., Miura, T. (2001). Intestinal absorption of mercury in vitro from intestinal contents of methylmercury administered mice. *J. Health Sci.* 47, 508-511.
- Seppänen, K., Soininen, P., Salonen, J.T., Lötjönen, S., Laatikainen, R. (2004). Does mercury promote lipid peroxidation? An in vitro study concerning mercury, copper, and iron in peroxidation of low-density lipoprotein. *Biol. Trace Elem. Res.* 101, 117-132.
- Shah, P., Jogani, V., Bagchi, T., Misra, A. (2006). Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol. Prog.* 22, 186-198.
- Shankar, R., Kolandaivel, P., Senthilkumar, L. (2011). Interaction studies of cysteine with  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Be}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{Ca}^{2+}$  metal cation complexes. *J. Physical Chem.* 24, 553-567.
- Shanker, G., Syversen, T., Aschner, J.L., Aschner, M. (2005). Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 137, 11-22.
- Shen, L., Turner, J.R. (2006). Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: Tight junction dynamics exposed. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G577-G582.
- Shen, L., Weber, C.R., Raleigh, D.R., Yu, D., Turner, J.R. (2011). Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 283-309.
- Shenker, B.J., Rooney, C., Vitale, L., Shapiro, I.M. (1992). Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. I. Suppression of T-cell activation. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 14, 539-553.
- Shin, K., Fogg, V.C., Margolis, B. (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 207-235.
- Siamak, A., Adibi, S.A., Mercer, D.W. (1973). Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations aftermeals. *J. Clin. Invest.* 52, 1586-1594.
- Simmons-Willis, T.A., Koh, A.S., Clarkson, T.W., Ballatori, N. (2002). Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT2. *Biochem. J.* 367, 239-246.
- Skerfving, S., Vostal, J. (1972). Symptoms and signs of intoxication. En: Mercury in the Environment. A. Toxicological and Epidemiological Appraisal. Eds: Friberg, L., Vostal, J. CRC Press, Cleveland, Ohio (U.S.A.). ISBN: 087819004X, pp. 141-168.

- Song, M.O., Freedman, J.H. (2005). Expression of copper-responsive genes in HepG2 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 279, 141-147.
- Stevens, B.R., Ross, H.J., Wright, E.M. (1982). Multiple transport pathways for neutral amino acids in rabbit jejunal brush border vesicles. *J. Membr. Biol.* 66, 213-225.
- Stewart, B.H., Chan, O.H., Lu, R.H., Reyner, E.L., Schmid, H.L., Hamilton, H.W., Steinbaugh, B.A., Taylor, M.D. (1995). Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: Relationship to absorption in humans. *Pharm. Res.* 12, 693-699.
- Suda, I., Hirayama, K. (1992). Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by hydroxyl radical produced from rat liver microsomes. *Arch. Toxicol.* 66, 398-402.
- Sugano, K., Hamada, H., Machida, M., Ushio, H. (2001). High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay. *J. Biomol. Screen.* 6, 189-196.
- Sugano, K., Kansy, M., Artursson, P., Avdeef, A., Bendels, S., Di, L., Ecker, G.F., Faller, B., Fischer, H., Gerebtzoff, G., Lennernaes, H., Senner, F. (2010). Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nature Rev. Drug Discov.* 9, 597-614.
- Sun, H., Pang, K.S. (2008). Permeability, transport, and metabolism of solutes in Caco-2 cell monolayers: A theoretical study. *Drug Metab. Dispos.* 36, 102-123.
- Sutton, D.J., Tchounwou, P.B., Ninashvili, N., Shen, E. (2002). Mercury induces cytotoxicity and transcriptionally activates stress genes in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Int. J. Mol. Sci.* 3, 965-984.
- Suzuki, T. (2013). Regulation of intestinal barrier function by dietary polyphenols. *Curr. Nutr. Food Sci.* 9, 85-92.
- Tafazoli, F., Magnusson, K.E., Zheng, L. (2003). Disruption of epithelial barrier integrity by *Salmonella enterica* serovar typhimurium requires geranylgeranylated proteins. *Infect. Immun.* 71, 872-881.
- Tan, X., Tang, C., Castoldi, A.F., Manzo, L., Costa, L.G. (1993). Effects of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health* 38, 159-170.
- Tanaka, M., Fukuda, H., Nagai, T. (1978). Permeation of drug through a model membrane consisting of millipore filter with oil. *Chem. Pharm. Bull.* 26, 9-13.

- Tavelin, S. (2003). New approaches to studies of paracellular drug transport in intestinal epithelial cell monolayers. PhD Dissertation. Uppsala University, Suecia.
- Terada, T., Shimada, Y., Pan, X., Kishimoto, K., Sakurai, T., Doi, R., Onodera, H., Katsura, T., Imamura, M., Inui, K.I. (2005). Expression profiles of various transporters for oligopeptides, amino acids and organic ions along the human digestive tract. *Biochem. Pharmacol.* 70, 1756-1763.
- Thiagarajah, J.R., Zhao, D., Verkman, A.S. (2007). Impaired enterocyte proliferation in aquaporin-3 deficiency in mouse models of colitis. *Gut* 56, 1529-1535.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7735-7738.
- Thwaites, D.T., Markovich, D., Murer, H., Simmons, N.L. (1996). Na<sup>+</sup>-independent lysine transport in human intestinal Caco-2 cells. *J. Membr. Biol.* 151, 215-224.
- Tirona, R.G., Kim, R.B. (2002). Pharmacogenomics of organic anion-transporting polypeptides (OATP). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 1343-1352.
- Torres-Escribano, S., Ruiz, A., Barrios, L., Velez, D., Montoro, R. (2011). Influence of mercury bioaccessibility on exposure assessment associated with consumption of cooked predatory fish in Spain. *J. Sci. Food Agric.* 91, 981-986.
- Townsend, D.M., Tew, K.D., Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* 57, 145-155.
- Tritto, S., Gastaldi, G., Zelenin, S., Grazioli, M., Orsenigo, M.N., Ventura, U., Laforenza, U., Zelenina, M. (2007). Osmotic water permeability of rat intestinal brush border membrane vesicles: Involvement of aquaporin-7 and aquaporin-8 and effect of metal ions. *Biochem. Cell Biol.* 85, 675-684.
- UNEP (United Nations Environment Programme) (2008). Technical background report to the global atmospheric mercury assessment. Arctic Monitoring and Assessment Programme / UNEP Chemicals Branch.

- UNEP (United Nations Environment Programme) (2010). Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Estudio sobre las fuentes y emisiones de mercurio y análisis del costo y la eficacia de las medidas de control. UNEP(DTIE)/Hg/INC.2/4. “Estudio del PNUMA pedido en el párrafo 29” División de Tecnología, Industria y Economía (DTIE) Subdivisión de Productos Químicos. Geneva (Suiza).
- UNEP (United Nations Environment Programme) (2013). Global Mercury Assessment 2013: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland.
- Urano, T., Iwasaki, A., Himeno, S., Naganuma, A., Imura, N. (1990). Absorption of methylmercury compounds from rat intestine. *Toxicol. Lett.* 50, 159-164.
- Uray, I.P., Connelly, J.H., Thomázy, V., Shipley, G.L., Vaughn, W.K., Frazier, O.H., Taegtmeier, H., Davies, P.J.A. (2002). Left ventricular unloading alters receptor tyrosine kinase expression in the failing human heart. *J. Heart Lung Transplant.* 21, 771-782.
- U.S. EPA (Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos) (1997a). Mercury study report to Congress. Vol. I. Executive summary (EPA-452/R-97-003).
- U.S. EPA (Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos) (1997b). Mercury study report to Congress. Vol. V. Health effects of mercury and mercury compounds (EPA-452/R-97-007).
- U.S. EPA (Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos) (1999a). Integrated Risk Information System (IRIS) on mercuric chloride. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- U.S. EPA (Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos) (1999b). Integrated Risk Information System (IRIS) on methyl mercury. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
- U.S. EPA (Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos) (2001). Water quality criterion for the protection of human health: Methylmercury (EPA 823-R-10-001).
- Vala, A. (2012). Mercury induces tight junction alterations and paracellular transport in colon epithelial cells through oxidative stress and thiol-redox dysregulation—Protection by novel lipid-soluble thiol antioxidant and heavy metal chelator, N,N'-bis-2-(mercaptoethyl)isophthalamide. PhD Dissertation. College of Arts and Sciences of The Ohio State University, Estados Unidos.

- Van De Walle, J., Hendrickx, A., Romier, B., Larondelle, Y., Schneider, Y.J. (2010). Inflammatory parameters in Caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. *Toxicol. In Vitro* 24, 1441-1449.
- Verrey, F. (2003). System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflugers Arch.* 445, 529-533.
- Vicente, É., Boer, M., Netto, C., Fochesatto, C., Dalmaz, C., Rodrigues Siqueira, I., Gonçalves, C.A. (2004). Hippocampal antioxidant system in neonates from methylmercury-intoxicated rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 817-823.
- Vogel, D.G., Margolis, R.L., Mottet, N.K. (1985). The effects of methyl mercury binding to microtubules. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 80, 473-486.
- Wagner, C., Sudati, J.H., Nogueira, C.W., Rocha, J.B. (2010). In vivo and in vitro inhibition of mice thioredoxin reductase by methylmercury. *Biometals* 23, 1171-1177.
- Walter, E., Janich, S., Roessler, B.J., Hilfinger, J.M., Amidon, G.L. (1996). HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an in vitro model for the intestinal epithelium: in vitro-in vivo correlation with permeability data from rats and humans. *J. Pharm. Sci.* 85, 1070-1076.
- Wan, X.S., Zhou, Z., Kennedy, A.R. (2003). Adaptation of the dichlorofluorescein assay for detection of radiation-induced oxidative stress in cultured cells. *Radiat. Res.* 160, 622-630.
- Wang, W., Clarkson, T.W., Ballatori, N. (2000). Gamma-glutamyl transpeptidase and L-cysteine regulate methylmercury uptake by HepG2 cells, a human hepatoma cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 72-78.
- Warfvinge, K., Hansson, H., Hultman, P. (1995). Systemic autoimmunity due to mercury vapor exposure in genetically susceptible mice: Dose-response studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 132, 299-309.
- Wikman, A., Karlsson, J., Carlstedt, I., Artursson, P. (1993). A drug absorption model based on the mucus layer producing human intestinal goblet cell line HT29-H. *Pharm. Res.* 10, 843-852.
- Wikman-Larhed, A., Artursson P. (1995). Cocultures of human intestinal goblet (HT29-H) and absorptive (Caco-2) cells for studies of drug and peptide absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.* 3, 171-183.
- Wlodarska, M., Willing, B., Keeney, K.M., Menendez, A., Bergstrom, K.S., Gill, N., Russell, S.L., Vallance, B.A., Finlay, B.B. (2011). Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infect. Immun.* 79, 1536-1545.

- Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.M., Tieleman, D.P., Monticelli, L. (2007). Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* 93, 4225-4236.
- Wu, G. (1995). Screening of potential transport systems for methyl mercury uptake in rat erythrocytes at 5 degrees by use of inhibitors and substrates. *Pharmacol. Toxicol.* 77, 169-176.
- Yamaji, S., Sharp, P., Ramesh, B., Srail, S.K. (2004). Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin. *Blood* 104, 2178-2180.
- Yamamoto, I. (1985). Effect of various amounts of selenium on the metabolism of mercuric chloride in mice. *Biochem. Pharmacol.* 34, 2713-2720.
- Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H., Tokuda, H. (2000). Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 10, 195-204.
- Yang, B., Cao, L., Liu, B., McCaig, C.D., Pu, J. (2013). The transition from proliferation to differentiation in colorectal cancer is regulated by the calcium activated chloride channel A1. *PLoS ONE* 8(4), e60861.
- Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S.H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., Tani, Y., Taketani, Y., Uchino, H., Kim, J.Y., Inatomi, J., Okayasu, I., Miyamoto, K., Takeda, E., Goya, T., Endou, H. (2001). Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1514, 291-302.
- Yao, J.-Q., Liu, Q.-H., Chen, X., Yang, Q., Xu, Z.-Y., Hu, F., Wang, L., Li, J.-M. (2010). Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin inhibits the proliferation of ARPE-19 cells. *J. Biomed. Sci.* 17, 30.
- Yasui, M., Hazama, A., Kwon, T.H., Nielsen, S., Guggino, W.B., Agre, P. (1999). Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* 402, 184-187.
- Yasui, M. (2009). pH regulated anion permeability of aquaporin-6. *Handb. Exp. Pharmacol.* 190, 299-308.
- Yasutake, A., Hirayama, K., Inoue, M. (1990). Interaction of methylmercury compounds with albumin. *Arch. Toxicol.* 64, 639-643.
- Yasutake, A., Nakamura, M. (2011). Induction by mercury compounds of metallothioneins in mouse tissues: inorganic mercury accumulation is not a dominant factor for metallothionein induction in the liver. *J. Toxicol. Sci.* 36, 365-372.

- Yee, S. (1997). In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man-fact or myth. *Pharm. Res.* 14, 763-766.
- Yin, Z., Jiang, H., Lee, E.S.Y., Ni, M., Erikson, K.M., Milatovic, D., Bowman, A.B., Aschner, M. (2010). Ferroportin is a manganese-responsive protein that decreases manganese cytotoxicity and accumulation. *J. Neurochem.* 112, 1190-1198.
- Youdim, K.A., Avdeef, A., Abbott, N.J. (2003). In vitro trans-monolayer permeability calculations: Often forgotten assumptions. *Drug Discov. Today* 8, 997-1003.
- Zalups, R.K., Lash, L.H. (1997). Depletion of glutathione in the kidney and the renal disposition of administered inorganic mercury. *Drug Metab. Disposition* 25, 516-523.
- Zalups, R.K. (1998). Basolateral uptake of inorganic mercury in the kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 192-199.
- Zalups, R.K. (2000). Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol. Rev.* 52, 113-143.
- Zalups, R.K., Ahmad, S. (2004). Homocysteine and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury: Role of basolateral transporter organic anion transporter 1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 2023-2031.
- Zalups, R.K., Aslamkhan, A.G., Ahmad, S. (2004). Human organic anion transporter 1 mediates cellular uptake of cysteine-S conjugates of inorganic mercury. *Kidney Int.* 66, 251-261.
- Zalups, R.K., Ahmad, S. (2005a). Transport of N-acetylcysteine s-conjugates of methylmercury in Madin-Darby canine kidney cells stably transfected with human isoform of organic anion transporter 1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 1158-1168.
- Zalups, R.K., Ahmad, S. (2005b). Handling of cysteine S-conjugates of methylmercury in MDCK cells expressing human OAT1. *Kidney Int.* 68, 1684-1699.
- Zalups, R.K., Lash, L.H. (2006). Cystine alters the renal and hepatic disposition of inorganic mercury and plasma thiol status. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 214, 88-97.
- Zalups, R. K., Koropatnick, J. (2010). Essential and toxic metal transport in the liver, En: Cellular and Molecular Biology of Metals. Eds: Zalups, R.K., Koropatnick, D.J. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton. ISBN: 9781420059977, pp. 127-142.

Zhao, N., Enns, C.A. (2012). Iron transport machinery of human cells: players and their interactions. *Curr. Top. Membr.* 69, 67-93.





