

CURSO ACADÉMICO  
2022-2023

# NEUROTOXICIDADE DO METILMERCURIO

METHYLMERCURY NEUROTOXICITY

ELOI CAAMAÑO LOURIDO

Autor deseño da portada, *Solpor no laboratorio*: Samuel Rey Viña.

## Resumo

---

O mercurio (Hg) é un metal tóxico empregado historicamente para diferentes propósitos como a minería de metais preciosos, constituíndo un contaminante ambiental a nivel mundial. As súas características fisicoquímicas permítenlle experimentar unha serie de procesos bioxeoquímicos a partir dos cales, mediante a participación da microbiota acuática, prodúcense diferentes especies derivadas, entre as cales destaca o metilmercurio (MeHg<sup>+</sup>). Trátase dun potente neurotóxico que pode supoñer un risco para aquela poboación que se vexa exposta a el mediante o consumo de especies marítimas contaminadas. O metilmercurio pode exercer a súa toxicidade en diferentes partes do organismo, sen embargo, o sistema nervioso central é particularmente sensible ós seus efectos. A exposición neurolóxica a este tóxico conleva unha ampla colección de alteracións moleculares e celulares entre as que se inclúen estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, dishomeostase de glutamato e Ca<sup>2+</sup>, alteracións epixenéticas ou apoptose celular. Neste traballo de fin de grao realizarase unha análise dos aspectos relativos ó ciclo bioxeoquímico deste elemento, ademais do estudo dos efectos a nivel celular e molecular do MeHg<sup>+</sup>, indicando os tipos celulares e os mecanismos polos que se ven afectados.

**Palabras clave:** ciclo do mercurio, metilmercurio, neurotoxicidade, estrés oxidativo, epixenética.

## Abstract

---

Mercury (Hg) is a toxic heavy-metal element widely known for its different historical applications such as the mining of precious metals, which also constitutes an environmental pollutant worldwide. Its physicochemical properties allow it to experience a series of biogeochemical processes from which, through the participation of aquatic microbiota, different derived species are produced, among which methylmercury (MeHg<sup>+</sup>) stands out. It is a potent neurotoxicant that can pose a risk to those who expose themselves to it through the consumption of contaminated marine species. Methylmercury can exert its toxicity in distinct parts of the human being; however, the central nervous system is particularly susceptible to its effects. A wide collection of molecular and cellular alterations such as oxidative stress, mitochondrial dysfunction, glutamate and Ca<sup>2+</sup> dishomeostase, epigenetic alterations or cell apoptosis are included among the main effects after neurological exposure to methylmercury. In this thesis, both an analysis of the aspects related to the biogeochemical cycle of Hg and a study of the cellular and molecular effects of MeHg<sup>+</sup>, indicating affected cell types and prevalent cellular toxic mechanisms will be made.

**Keywords:** mercury cycle; methylmercury; neurotoxicity; oxidative stress; epigenetics.

## **ÍNDICE**

<b>Resumo e palabras clave</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract and keywords</b> .....	<b>4</b>
<b>1 Introducción</b> .....	<b>6</b>
<b>2 Obxectivos</b> .....	<b>10</b>
<b>3 Metodoloxía</b> .....	<b>11</b>
<b>4 Ciclo Bioxeoquímico do Hg</b> .....	<b>12</b>
<b>5 Toxicocinética</b> .....	<b>15</b>
<b>6 Análise Toxicolóxica Molecular</b> .....	<b>18</b>
<b>6.1 Selenio e Selenoproteínas</b> .....	<b>18</b>
<b>6.2 Estrés Oxidativo</b> .....	<b>19</b>
6.2.1 Sistema Glutación .....	19
6.2.2 Sistema Tiorredoxina .....	20
6.2.3 Excitotoxicidade .....	21
6.2.4 Dismhomeostase de Calcio .....	23
6.2.5 Disfunción Mitocondrial .....	23
<b>6.3 Análise Toxicolóxica Celular</b> .....	<b>24</b>
6.3.1 Microglía.....	24
6.3.2 Astrocitos.....	26
6.3.3 Neuronas .....	28
6.3.4 Células Cerebelares .....	28
<b>7 Epixenética da Intoxicación por MeHg<sup>+</sup></b> .....	<b>30</b>
<b>8 Conclusións</b> .....	<b>32</b>
<b>9 Referencias</b> .....	<b>33</b>
<b>Agradecementos</b> .....	<b>38</b>

## 1 Introdución

O mercurio (Hg) é un contaminante ambiental ben coñecido polo ser humano dende a antigüidade, aparecendo na maioría de cadeas tróficas do planeta, sobre todo nas acuáticas. A presenza deste elemento no medio-ambiente é debida, sobre todo, ás actividades humanas, as cales, dada á utilidade do cinabrio (mineral que contén Hg) para a minería de metais como a prata ou o ouro, liberaron mercurio ó aire, á terra e ó auga a gran escala dende o século XVI. O boom industrial posterior nos séculos XIX e XX condicionaron que as emisións de mercurio foran continuas polas actividades mineiras, polas súas novas aplicacións na tecnoloxía ou pola fabricación de produtos químicos e, dende os anos 60, pola queima de carbóns e a industria metalúrxica (1).

As consecuencias tóxicas do metal tamén non so constitúen unha preocupación actual, senón que no século XIX xa se usaban expresións como “*estar tolo como un sombreireiro*”, debido á exposición crónica ás sales de mercurio no feltro dos sombreiros da época. Durante anos, a toxicidade mercurial representou unha problemática eminentemente industrial, que afectou a mineiros, fabricantes de barómetros e termómetros e traballadores do ámbito da odontoloxía. Por outra parte, o uso medicinal do mercurio tamén estivo presente ó longo da historia. O Hg presentaba recoñecidas propiedades antifúnxicas e antibacterianas, utilizándose como tratamento para a sífilis a finais do século XIX, baixo a cómica prescrición: “*unha noite con Venus, sete anos con mercurio*”. De igual xeito, as súas propiedades sobre o sistema xenitourinario condicionaron a entrada dos diuréticos mercuriais, empregados durante máis de 3 décadas ata seren substituídos a principios do século XX (1) (2).

As alarmas internacionais sobre a toxicidade do Hg fixéronse efectivas tras os dramáticos incidentes de intoxicación por metilmercurio na bahía de Minamata (Xapón) e en Iran nos anos 60 e 70 respectivamente. Investigacións posteriores ós desastres cuantificaron a extensión global da contaminación polo metal, en parte debido á súa dispersión atmosférica na súa forma gasosa (Hg<sup>0</sup>) de longa vida, pero tamén á metilación microbiana xeralizada de Hg en ambientes anóxicos e a bioamplificación de Hg nas redes tróficas acuáticas. Estudos epidemiolóxicos paralelos nos anos 80 e 90 indicaron o risco de toxicidade para o neurodesenvolvemento pola exposición ó metilmercurio a partir do consumo de marisco, incluso a baixas doses. Debido á ameaza sanitaria global e os custos económicos asociados, impulsouse a acción internacional que comezou ca “*Convención de Minamata*” de 2013, que entrou en vigor en 2017 e que ten como principal obxectivo frear a liberación de Hg ó medio ambiente, así como a elaboración de protocolos para o rastrexo do seu éxito (1).

O mercurio e os seus compostos soen clasificarse en tres grupos principais: “*mercurio elemental*” ( $\text{Hg}^0$ ), “*mercurio inorgánico*” ( $\text{Hg}_2^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ ) e “*mercurio orgánico*” (derivados monoorganometálicos e diorganometálicos de  $\text{Hg}^{2+}$ ). Inda que a intoxicación por mercurio, tanto elemental como inorgánico, pode producir síntomas neurolóxicos, a neuropatoloxía non está ben descrita. Sen embargo, as características neurotóxicas do mercurio orgánico descríbense con alta frecuencia na literatura científica.

O “*mercurio elemental*” ou metálico é o único metal de toda a táboa periódica que, a temperatura ambiente e presión normal, se encontra en estado líquido e forma facilmente amalgamas con outros metais. Debido a estas características, utilizouse durante séculos para refinar diversos tipos de metais, ademais de que a amalgama de mercurio empregouse para o tratamento dental. O  $\text{Hg}^0$  tamén se aplicou en instrumentos de medida como termómetros, barómetros e tensiómetros, así como en aparellos eléctricos como equipos de iluminación e baterías secas, e na produción de sosa cáustica por electrólise. A toxicidade do mercurio elemental resulta principalmente da inhalación de vapores e afecta principalmente ós pulmóns.

As sales de “*mercurio inorgánico*”, principalmente cloruros, derivan da interacción do elemento en estado metálico co medio ambiente e foron moi utilizados durante anos polo ser humano en medicamentos, cremas faciais, xermicidas e pesticidas. Un dos propósitos máis relevantes deste tipo de mercurio coincide cunha das pegadas medioambientais máis importantes a nivel histórico (antes do desastre de Minamata) e sitúan os focos sobre España, concretamente sobre Almadén, Ciudad Real. Trátase da maior explotación mineira de cinabrio e da maior anomalía xeolóxica de mercurio a nivel mundial, cuxa relevancia viña dada por ser o maior arsenal amalgamante do planeta, destinado á extracción de ouro (2) (3).

O “*mercurio orgánico*” existe en forma de arilo (fenilmercúrico) ou con grupos alquilo curtos ou longos, destacando os de cadea curta dimetilmercurio ( $\text{CH}_3\text{—Hg—CH}_3$ ) e catión monometilmercurio ( $\text{CH}_3\text{—Hg}^+$ ), contaminantes ambientais extremadamente tóxicos e perigosos. O dimetilmercurio é un líquido claro cun cheiro lixeiramente doce, é unha das neurotoxinas máis potentes, cunha concentración tóxica inferior a 0,1 mL sendo capaz de causar intoxicación grave e incluso a morte. A súa natureza lipofílica permite que se absorba rapidamente cando se inhala ou se aplica á pel. O composto pode penetrar nunha variedade moi ampla de materiais, incluíndo plásticos e compostos de caucho como luvas de látex (4). A exposición de Karen Wetterhahn (5) a simplemente unhas pingas de dimetilmercurio nun accidente de traballo en 1996, provocou a aparición insidiosa de síntomas neurolóxicos e signos de intoxicación máis de tres meses despois. A pesar da terapia quelante tan agresiva

que recibiu, o seu estado deteriorouse rapidamente e morreu ós 48 anos de idade en xuño de 1997. Este incidente ben documentado conmocionou o mundo da investigación clínica e toxicolóxica e, na actualidade, o dimetilmercurio é usado so nun pequeno número de laboratorios químicos como material de referencia na espectroscopía de resonancia magnética nuclear (6).

A ilustración 1 resume a historia, a aplicación clínica, a farmacoloxía, a toxicoloxía e a farmacocinética do mercurio e dos preparados que conteñen mercurio na medicina tradicional.

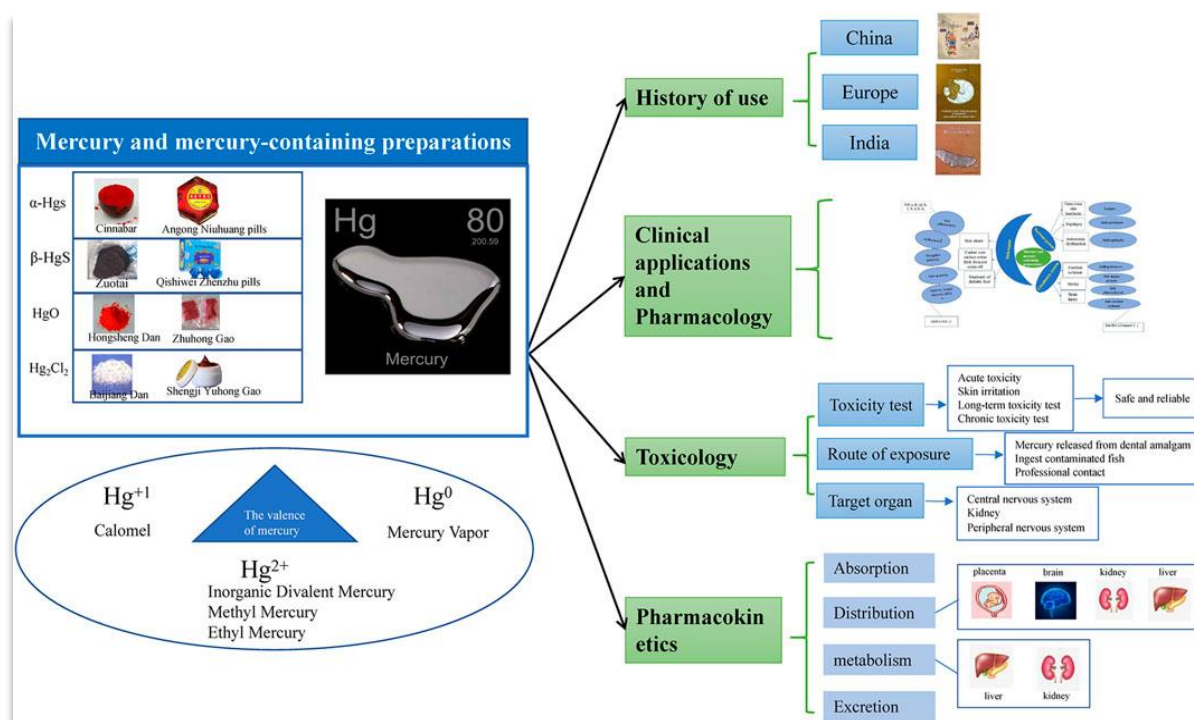


Ilustración 1: Resumo das aplicacións históricas do mercurio e das súas formas, así como rasgos da súa farmacocinética e da súa toxicidade (3).

O metilmercurio, principal obxecto de estudo deste traballo, é a forma de mercurio de maior preocupación tanto para a saúde humana como para a dos ecosistemas, debido principalmente á súa capacidade de biomagnificar nas cadeas alimentarias acuáticas ata niveis potencialmente tóxicos en peixes e piscívoros consumidos polos seres humanos e a vida salvaxe (4).

A intoxicación denominada *mercuriose* pode producirse por calquera dos tres tipos de mercurio; sen embargo, o tóxico máis importante é o MeHg<sup>+</sup>. A sintomatoloxía e gravidade dos síntomas dependen en gran medida da magnitude da intoxicación e da forma que entre en contacto co organismo, podendo o ser humano intoxicarse por inhalación do tóxico en forma de vapor ou por contacto ca dermes, ou por inxestión de peixes ou mamíferos mariños

contaminados (7). A Axencia Española de Seguridade Alimentaria e Nutrición publicou en 2019 (8) novas recomendacións para o consumo de peixe sobre o seu contido en mercurio:

- Para a poboación en xeral: recoméndase o consumo de ata 3-4 racións de peixe á semana, procurando en todos os casos variar a especie entre o peixe branco e o azul.
- Para a poboación vulnerable requírense recomendacións específicas máis estritas para as 4 especies identificadas cun alto contido en mercurio: peixe espada/emperador, atún vermello, lucio e quenlla.
- Os nenos de entre 10 e 14 anos deben limitar o consumo destas catro especies a 120 gramos ó mes.

Unha vez incorporado ó organismo interacciona en gran medida con grupos  $-SH$  e ligandos tioles, determinando así unha distribución ampla cara os principais órganos afectados: fígado, riles e, sobre todo, cerebro (9). A capacidade de atravesar a barreira hematoencefálica (BHE) e ser tan prexudicial para o sistema nervioso central (SNC) ven determinada xustamente polas súas características fisicoquímicas, as cales lle permiten acceder facilmente ó compartimento cerebral por pura liposolubilidade ou por outros mecanismos complementarios como a formación de complexos con *L*-cisteína, emulando así un dos aminoácidos que poden atravesar esta barreira libremente: a *L*-metionina. As consecuencias por este tóxico poden oscilar entre alteracións do cortex visual e do cerebelo en adultos e parálise cerebral e desenvolvemento psicomotor deficiente en fetos ou neonatos (10), sendo estes os principais afectados pola intoxicación tal e como se expoñerá nos seguintes apartados deste Traballo de Fin de Grao.

## 2 Obxectivos

- Revisar os procesos naturais, antropoxénicos e bioquímicos polos que o mercurio e as súas formas máis tóxicas se inclúen nun ciclo perpetuo no medio ambiente.
- Estudar a relevancia do Hg e das súas formas como contaminante global, así como a súa perigosidade tanto para as cadeas tróficas como para o ser humano.
- Estudar as características fisicoquímicas do metilmercurio que condicionan a súa toxicocinética e toxicidade particular.
- Recoñecer o papel fundamental ante a intoxicación dos sistemas antioxidantes, así como a forma na que se ven afectados por ela e se desencadean os efectos tóxicos.
- Utilizar os coñecementos sobre as interaccións bioquímicas do metilmercurio para comprender a súa particular neurotoxicidade e dar explicación así ós síntomas que aparecen tras o contacto con esta especie.

### 3 Metodoloxía

Esta revisión bibliográfica foi levada a cabo mediante a utilización principal de 3 motores de búsqueda:

- Web of Science (WOS): <https://www.webofscience.com/wos/woscc/basic-search>
- PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>
- Google Scholar: <https://scholar.google.com>

A revisión baseouse en dúas búsquedas bibliográficas na Web of Science, unha inicial e unha posterior, baixo os temas “Mercury “and” Toxicity” e “Methylmercury “and” Neurotoxicity”:

Web of Science				
Topic	“and” Topic	Years	Results	Reviews
<b>Mercury</b>	Toxicity	18-22	421	105
<b>Methylmercury</b>	Neurotoxicity	18-23	276	62
<b>Dimethylmercury</b>		No limit	306	10

Inicialmente seleccionáronse os artigos de revisión que posuíran unha descrición xeneralizada e completa dos mecanismos de neurotoxicidade do mercurio e as súas formas, tanto a nivel celular como molecular, publicados nos últimos cinco anos en revistas de alto índice de impacto.

Posteriormente tamén se engadiron artigos, tanto de investigación coma de revisión, referentes ós procesos bioquímicos responsables da aparición das especies organomercuriais, así como aqueles que tratan os efectos e mecanismos fisiolóxicos involucrados na homeostase redox, susceptibles de ser alterados polo Hg. Nalgúns casos ampliáronse os anos da búsqueda debido á importancia da investigación de base nos posteriores estudos de neurotoxicidade.

#### 4 Ciclo Bioxeoquímico do Hg

O mercurio é un contaminante ambiental presente na maioría de cadeas tróficas do planeta, sobre todo nas acuáticas. É un contaminante global persistente, bioacumulativo e neurotóxico que se transporta a longas distancias a través da circulación atmosférica e os depósitos na superficie terrestre, causando efectos adversos sobre os ecosistemas e a saúde humana.

Debido á particular volatilidade do  $\text{Hg}^0$  (Ilustración 2), unha vez este se libera ó medio ambiente pode permanecer circulando máis de 1000 anos (11). Antes do desenvolvemento das actividades humanas, as fontes de mercurio máis importantes eran emitidas polas erupcións volcánicas, por sedimentos enriquecidos deste elemento, por incendios forestais ou por re-emisión de depósitos preformados. Unha vez os seres humanos comezaron as tarefas de minería de mercurio, e posteriormente a queima de combustibles fósiles, os niveis de Hg incrementáronse drásticamente (12), calculándose que na actualidade se desbotan aproximadamente 2000 toneladas ó ano ó medio ambiente (13).

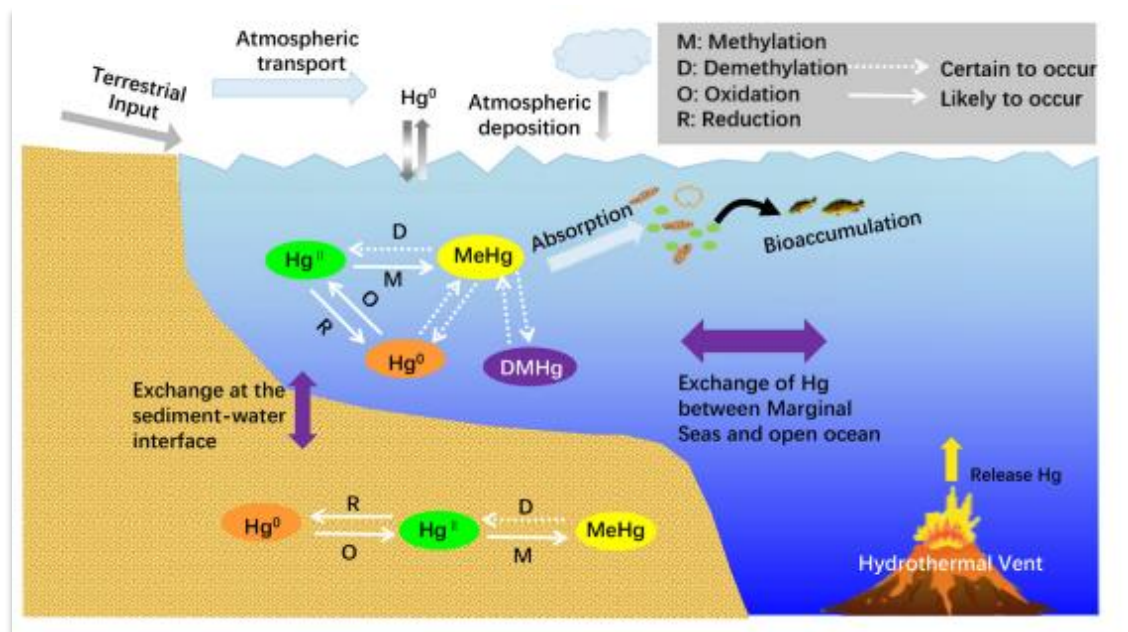


Ilustración 2: Ciclo bioxeoquímico do mercurio. A caída de mercurio inorgánico da atmosfera, así como o intercambio co solo ou a emisión volcánica, permiten o intercambio entre todos os tipos de mercurio no ambiente acuático, dos cales o  $\text{MeHg}^+$  inclúese nun ciclo bioacumulativo que é o que representa maior repercusión sanitaria para o ser humano (15).

As fontes xeolóxicas de emisión de mercurio producen esencialmente Hg elemental, o cal sofre o paso de  $\text{Hg}^0 \rightarrow \text{Hg}^{2+}$  debido ó contacto co ambiente oxidativo da atmosfera. Esta especie é moito máis soluble en auga, disolvéndose na humidade ambiental e caendo posteriormente ós mares e lagos ca choiva. No ambiente acuático poden ocorrer varios tipos

de reaccións químicas que dependen de distintos factores moi variables, como materia orgánica disolta, salinidade, temperatura, pH ou presenza de vexetación específica (14), que non trataremos en profundidade neste traballo. Sen embargo, debemos destacar o proceso polo cal o  $\text{Hg}^{2+}$  se converte finalmente no tóxico de maior importancia ( $\text{MeHg}^+$ ): o proceso de metilación (15).

Este evento químico pode ocorrer de dúas formas distintas: de forma biótica ou abiótica. A metilación abiótica é relativamente pouco transcendente, mentres que a biometilación é o proceso máis prevalente dos dous. Nel, a intervención é levada a cabo por bacterias de distintas familias e xéneros; pero que presentan, todas en común, a particularidade de ser anaerobias e de posuír un o duplo xenético denominado “*hgcAB*”. En concreto, autores expertos na materia destacan 4 tipos de bacterias capaces de biometilar o mercurio: bacterias redutoras de sulfato (SRB), redutoras de ferro, metanoxénicas e bacterias fermentativas ou acetoxénicas. A especie máis prevalente e estudada é *Desulfovibrio desulfuricans*, pertencente ó grupo *Deltaproteobacteria* e incluída dentro das SRB. En canto a capacidade metilante destes microorganismos, podemosla atribuír á acción do “*hgcAB*”, uns xenes que codifican dúas proteínas, *HgcA* e *HgcB*, unha similar a un corrinóide e outra asociada a unha ferredoxina (Ilustración 3) (16). Certos aspectos do proceso non se coñecen con exactitude, sen embargo existen varios mecanismos propostos para esta reacción (Ilustración 4), sendo o máis aceptado o do traspaso do grupo metilo de *HgcA* procedente do 5-metil-tetrahidrofolato (5- $\text{CH}_3$ -THF) ó mercurio. A función de *HgcB* parece estar relacionada

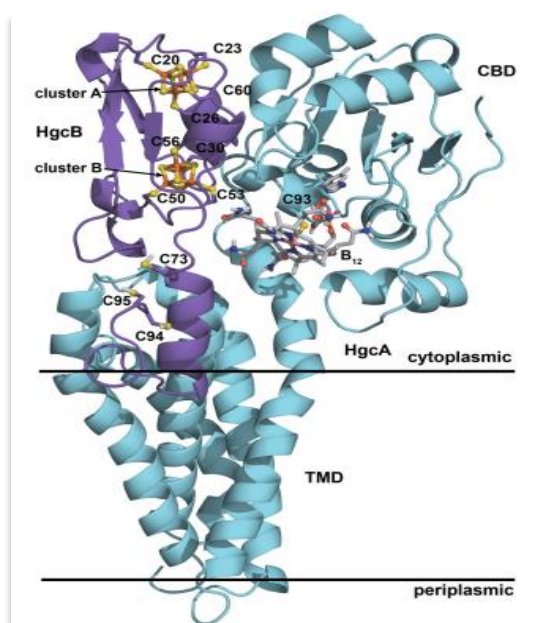


Ilustración 3: Estrutura 3D das proteínas codificadas polo duplo xenético *hgcAB* (7).

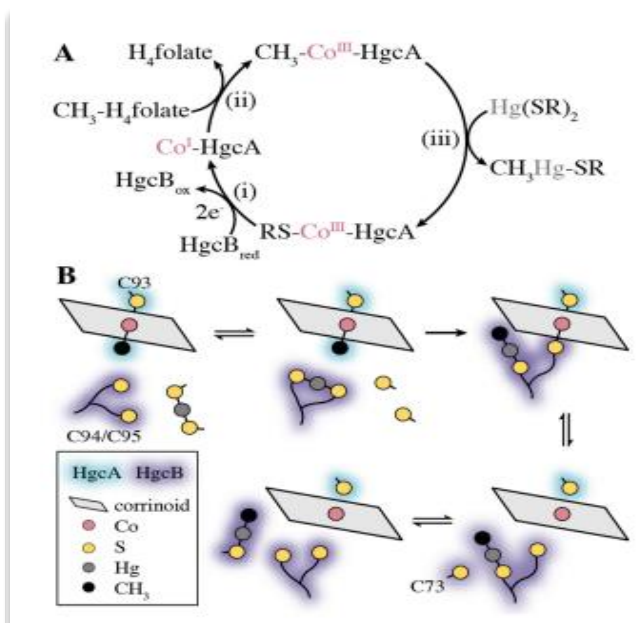


Ilustración 4: Posible mecanismo para a metilación de Hg por *HgcA* e *HgcB* (7)

ca posterior redución da *HgcA* (Ilustración 4), permitíndolle ser metilada de novo polo 5-CH<sub>3</sub>-THF (12) (17).

Descoñécese o motivo exacto da presenza deste tipo de mecanismos, aínda que se cree que a metilación protexe ás bacterias dos efectos tóxicos do Hg<sup>2+</sup>, xa que o elemento metilado resúltalles máis facil excretalo; mentres que para outro tipo de bacterias non é necesaria a metilación, senón simplemente sistemas de excreción ou transporte (como por exemplo o transporte baseado no operón *Mer*) (18). Este operón comprende un sistema de defensa bacteriano localizado en plásmidos, transposóns e ADN cromosómico bacteriano presente en certas especies de bacterias Gram-negativas acuáticas. Componse por unha serie de xenes esenciais para a regulación, transporte, redución de Hg<sup>2+</sup> e MeHg<sup>+</sup> altamente tóxicos en mercurio elemental, o cal son capaces de eliminar por volatilización. Estas bacterias son menos prevalentes que as produtoras de mercurio, pero contribúen a fechar e perpetuar o ciclo bioxeoquímico.

Probablemente a razón de maior peso na transcendencia do metilmercurio a nivel mundial non sexa o potencial tóxico que presenta, senón a súa capacidade de permanecer no medio ambiente e, sobre todo, de acumularse e de acceder ós seres humanos facilmente: o proceso de biomagnificación. A liberación do MeHg<sup>+</sup> ó ambiente acuático tras a súa metilación precede á posterior inxestión por parte de especies mariñas filtradoras, que serán devoradas por distintos tipos de peixes e mamíferos mariños, incluíndose así nun ciclo trófico no que se poden chegar a acadar concentracións de 10.000 ata 100.000 veces maiores nos animais que na auga que os rodea (15) (19). Como é de esperar, a biomagnificación faise máis evidente en especies carnívoras, sendo menor en omnívoras e case inexistente en herbívoras. A especie animal e a súa procedencia tamén inflúe na magnitude da contaminación: os peixes grandes coma o atún mediterráneo ou o peixe espada son máis susceptibles de posuír maiores concentracións de tóxico; mentres que a procedencia de zonas con grandes acumulacións de metilmercurio (coma a bahía de Minamata ou a cunca mediterránea) determinará que incluso peixes pequenos coma a anchoa ou a xarda mediterránea poidan tamén provocar intoxicacións no ser humano (20).

A realización de estudos con mercurio en seres humanos para a determinación dos seus mecanismos exactos non é realizable por cuestións éticas obvias, o que provoca que a maior parte dos avances realizados ata o momento ocorreran logo de procesos de intoxicación accidental. Sen embargo, grazas ó desenvolvemento de novas ferramentas dixitais pódese abrir unha nova brecha de estudo baseada na utilización de modelos predictivos cada vez máis exactos e desvoltos. Isto non so se observa no día a día da tarefa investigadora senón

tamén incluso neste traballo, cuxa bibliografía inclúe varios estudos realizados unicamente con tecnoloxía intelixente, como por exemplo os cálculos Solvent-Assisted Proton-Exchange (SAPE) no estudo dos comportamentos fisicoquímicos (21) ou a secuenciación metaxenómica para o estudo da maquinaria biometilante (16).

Polo tanto, dado á importancia do elemento na contaminación medioambiental, ás particulares propiedades fisicoquímicas que condicionan o seu difícil análise e ás grandes posibilidades que ofrecerán futuros métodos *in silico* (gracias a, entre outros factores, ó presente auxe do desenvolvemento da intelixencia artificial) xustifícase non so a redacción deste traballo, senón a importancia da temática no panorama socio-científico actual.

## 5 Toxicocinética

A forma principal pola cal o ser humano pode expoñerse a fontes de metilmercurio é a través da ingestión de peixes e mamíferos mariños contaminados (22). A vida media deste tóxico pode oscilar entre os 50-70 días en adultos, mentres que en recém nacidos é moito maior, debido a que a excreción é menor que en adultos.

O  $\text{MeHg}^+$  é un “ácido blando” de Pearson, é dicir, unha especie de gran tamaño, carga pequena e fortemente polarizable. Particularmente, esta especie é moi polarizable por dous elementos presentes en diversas moléculas do organismo humano: xofre (S) e selenio (Se), os principais afectados a nivel molecular polo tóxico (23). Ambos elementos son “bases blandas” de Pearson, bos axentes nucleófilos capaces de establecer fortes enlaces cas especies organometálicas do mercurio, característica que explica que os efectos tóxicos do metilmercurio sexan principalmente debidos á interacción con moléculas que conteñen xofre e selenio.

É interesante para comprender o comportamento toxicocinético do  $\text{MeHg}^+$  o estudo da reacción de Rabbenstein, que describe que o intercambio de moléculas de metilmercurio con nucleófilos coma o glutatión (GSH) (cuxo punto de ancoraxe co tóxico é un grupo sulfhidrilo) posúe unha cinética moi favorable ( $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), de forma que o traspaso prodúcese por colisión entre moléculas:



A reacción de Rabbenstein prodúcese tanto en sentido  $\text{S} \rightarrow \text{S}$  como  $\text{S} \rightarrow \text{Se}$ , mentres que o paso  $\text{Se} \rightarrow \text{S}$  non é posible debido á maior afinidade do metilmercurio polo selenio fronte ó

sulfuro. Este feito explica moitos aspectos do comportamento do tóxico, como a forma que ten de atravesar as membranas biolóxicas ou a propia BHE (24).

O metilmercurio no peixe ingerido está unido a residuos de cisteína (Cys) presentes nas proteínas musculares (25). Unha vez chegan ó estómago, o pH e péptidos coma a pepsina degradan este complexo e liberan o tóxico.

Debido ás propiedades fisicoquímicas do elemento e das condicións de acidez do entorno estomacal, é moi probable que se produza a formación de MeHgCl (95% do metilmercurio cando  $\text{pH} = 2$ ). A absorción realízase a través dos enterocitos do tracto gastrointestinal (TGI) (Ilustración 5) e pódese explicar se atendemos ós criterios de liposolubidade desta especie. O paso a través da membrana tamén pode ocorrer por mecanismos de Rabbenstein, producíndose intercambios entre grupos cisteinato presentes tanto na parede interior estomacal coma no interior das células enterogástricas e nas paredes vasculares, accedendo así finalmente ó torrente sanguíneo. Tamén foron descritos mecanismos de entrada nos enterocitos por transportadores de anións orgánicos (OATPs), transportadores de aminoácidos neutros (LATs) e incluso proteínas de resistencia a medicamentos (MRPs), estando estes últimos relacionados co movemento a través da membrana basolateral.

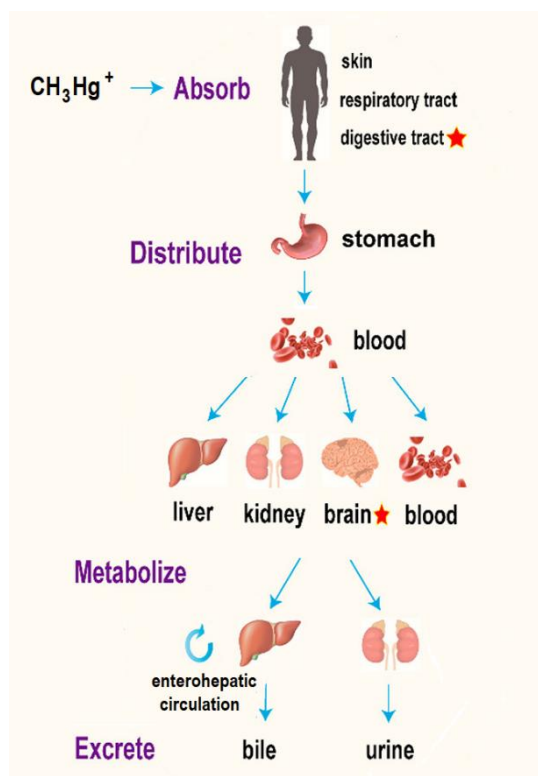
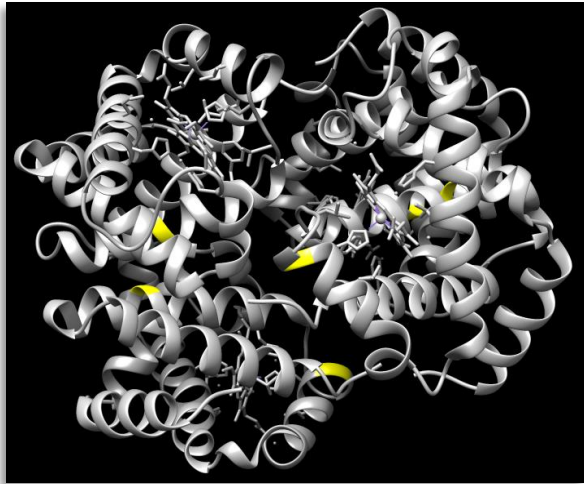


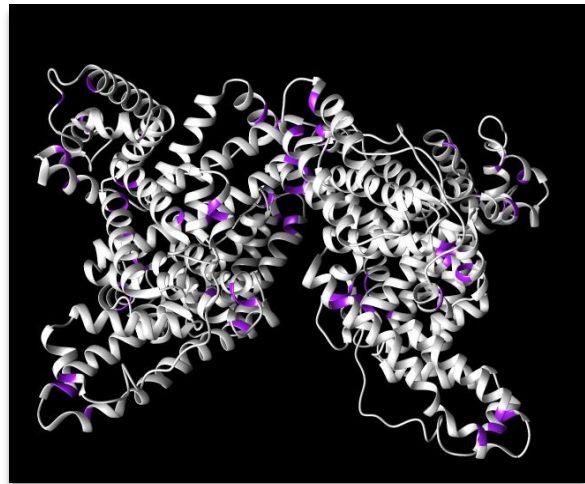
Ilustración 5: Características ADME principais do MeHg<sup>+</sup> (7).

Unha vez na circulación xeral, o MeHg<sup>+</sup> enfróntase a un ambiente cargado de abundantes grupos –SH ós que unirse:

- **Eritrocitos:** O paso da membrana ocorre case de inmediato por transporte de Cys ou por OAT. Unha vez no interior, o MeHg<sup>+</sup> únese a 3 principais candidatos: A hemoglobina (a máis relevante debido a que é a proteína máis abundante no compartimento sanguíneo), o GSH libre ou as proteínas do ciclo glicolítico (como a hexokinasa ou a lactato deshidroxenasa). A doses baixas so a hemoglobina (Ilustración 6) e o GSH se ven afectados, mentres que un incremento das cantidades de tóxico induce a



*Ilustración 6: Estrutura 3D dunha molécula de hemoglobina humana. Marcados en amarelo os 6 residuos de Cys ós cales pode acceder e unirse facilmente o MeHg<sup>+</sup>. Representado con Chimera 1.16 (PDB: 5KSI)*



*Ilustración 7: Estrutura 3D dunha molécula de seroalbúmina humana. Marcados en morado os 17 residuos de Cys ós cales o MeHg<sup>+</sup> se pode ancorar, aínda que con impedimentos estéricos lixeiramente maiores que a hemoglobina. Representado con Chimera 1.16 (PDB: 1AO6)*

acumulación de intermediarios de reacción do ciclo glicolítico (o que denota inhibición enzimática), podendo servir este feito como indicador de toxicidade xeral (26) (27).

- Albúmina: A presenza de varios grupos cisteinato fai á albúmina (Ilustración 7) a proteína plasmática máis importante na distribución de MeHg<sup>+</sup>, sen embargo non se coñece en profundidade os mecanismos exactos de unión (28).

A pesar que a albúmina é unha proteína moito máis abundante, as súas características estruturais non permiten unha tan adecuada aproximación do tóxico ós seus puntos de ancoraxe, mentres que a hemoglobina presenta estes puntos estéricamente máis accesibles.

Esta soltura que presenta o tóxico de intercambiarse facilmente con grupos –SH e –SeH é a que lle confire a capacidade de aumentar drásticamente a súa capacidade de distribución.

Non só as súas características fisicoquímicas lle permiten acadar todos os recunchos do organismo, senón que esta facilidade de unión a grupos –SH tamén lle posibilita a entrada ó SNC, o órgano crítico. O complexo L-Cys-MeHg posúe unhas características estruturais practicamente iguais ás da L-metionina (un aminoácido esencial para o desenvolvemento do SNC), que presenta a capacidade de atravesar á vontade a BHE a través dos transportadores LAT1 (*L-Aminoacid Transporter 1*) (29).

En canto á metabolización, simplemente recalcar que a maioría dos órganos son capaces de provocar a demetilación do metilmercurio, sendo o fígado o máis importante (por gran

presencia de grupos tiol antioxidantes), aínda que non son capaces de realizar este proceso á velocidade suficiente como para evitar os efectos tóxicos. A demetilación provoca a expulsión do tóxico cas sales biliares cara o TGI, onde no íleo distal se reabsorbe, entrando así na circulación enterohepática. A principal vía de excreción é por feces, aparecendo en forma de mercurio inorgánico (aínda que tamén é posible encontrar excreción urinaria) (30) (31).

O mero paso a través desta membrana xa produce o seu primeiro efecto tóxico, xa que ó entrar en contacto cas células da BHE prodúcese aumento de factores coma os factores de crecemento endotelial vascular 1 e 2 (VEGF), que inducen vasodilatación e hiperpermeabilidade vascular, facilitando o paso de substancias tanto inocuas como tóxicas ó SNC. Isto ten un efecto moito máis intenso en fetos, onde a barreira hemato-encefálica aínda non está totalmente desenvolvida.

Unha vez dentro, son 3 os tipos celulares os que se ven afectados: a microglía, os astrocitos e as neuronas (32). Pero antes de proceder ca toxicidade celular debemos facer converxer as características fisicoquímicas das moléculas características do SNC, de xeito que poidamos comprender en profundidade os efectos neurotóxicos ó detalle.

## **6 *Análise Toxicolóxica Molecular***

A neurotoxicidade inducida polo  $\text{MeHg}^+$  depende de varias condicións, incluídas a idade de exposición (fetal, infantil ou adulta), os niveis de exposición e as diferenzas nas características dos tecidos e das células. A investigación puxo de relevo a importancia do estrés oxidativo na patoxénese da neurotoxicidade inducida por  $\text{MeHg}^+$  (10).

### **6.1 *Selenio e Selenoproteínas***

O selenio é un dos elementos máis importantes para que un cerebro en pleno desenvolvemento creza adecuadamente. Intervén en varias etapas da formación neurolóxica e tamén xoga un papel crucial na defensa antioxidante do organismo, sobre todo do SNC (33), formando parte da enzima glutatión peroxidasa (GPx), da cal o Se, en forma de selenocisteína (Sec), representa o seu centro activo.

A predilección do Se polo  $\text{MeHg}^+$  non so ten unha explicación fisicoquímica, senón que tamén representa unha función protectora fronte a intoxicación. Isto é debido a que a formación do complexo implica un descenso brusco da solubilidade da selenoproteína, formando agregados insolubles e irreversibles, eliminando por completo a acción tóxica do  $\text{MeHg}^+$  (34). Sen embargo, esta acción “pseudoquelante” so é efectiva cando os niveis de Se

son altos previamente á exposición ó tóxico, xa que se non hai unha concentración suficiente para neutralizar todos os catións  $\text{MeHg}^+$  que acceden ó organismo, este provocará bloqueo parcial dos transportadores específicos que utiliza o Se para acceder ós tecidos (probablemente debido á presenza de grupos  $-\text{SH}$  no seu dominio transmembrana) (35). Isto non so condiciona que as células reduzan significativamente a súa concentración intracelular de Se, senón que tampouco serán capaces de eliminar o metilmercurio que xa foi asimilado. Neste punto, o tratamento con Se xa é ineficaz, posto que de administralo non se conseguiría máis que bloquear por completo o transportador por saturación, negando calquera albisco de recuperar o estado funcional da célula (35).

Isto supón unha problemática maior á esperable, xa que é imposible prever a cantidade de  $\text{MeHg}^+$  ca que se vai a producir a intoxicación. Se ademais temos en conta que unha administración excesiva de Se antes da exposición ó tóxico pode producir un aumento significativo de estado oxidativo do organismo (36) faise imposible a utilización deste elemento con fins profilácticos.

## 6.2 Estrés Oxidativo

As defensas antioxidantes do SNC baséanse principalmente en 3 sistemas fundamentais: glutatión (GSH), *glutatión peroxidasa* (GPx) e *tiorredoxin reductasa* (TrxR). Ademais neste apartado tamén se estudarán os efectos sobre o sistema glutamato (Glu), cuxa alteración é responsable indirecto de estrés oxidativo.

### 6.2.1 Sistema Glutatión

O *glutatión* é un péptido formado por tres aminoácidos:  $\gamma$ -glutamato-cisteína-glicina. É unha molécula antioxidante e constitúe un dos mecanismos de defensa antioxidante máis importantes do organismo, ademais de representar o 90% dos tioles non proteicos do ser humano. O seu principal cometido é a eliminación de especies de osíxeno reactivas (ROS), mantendo a homeostase redox celular.

Esta molécula posúe dous estados: reducido (GSH) e oxidado (GSSG). Por razóns obvias, a molécula capaz de enfrontarse as ROS é o glutatión reducido, xa que ten o potencial redutor suficiente para eliminar a capacidade oxidante da maioría de ROS. Desta forma, podemos analizar a proporción GSH/GSSG para obter datos interesantes sobre o estado do maior sistema antioxidante a baixo nivel oxidativo do organismo, tendo en conta que debe estar sempre por riba da unidade (37).

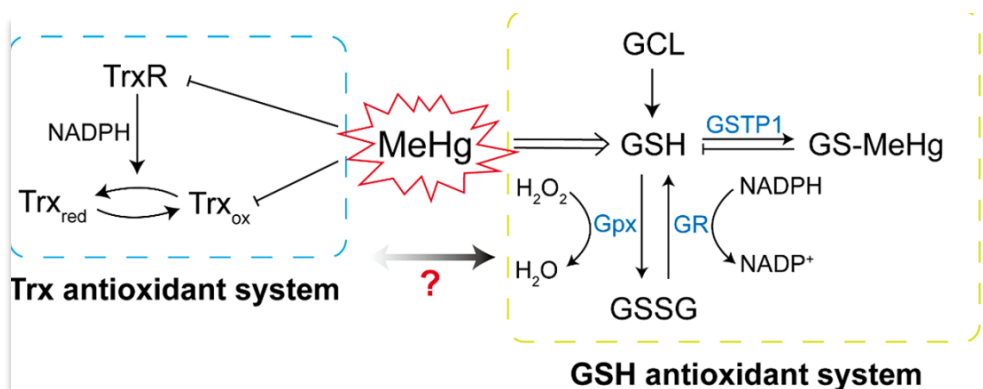


Ilustración 8: Intervención do MeHg<sup>+</sup> sobre os estados de oxidación tanto GSH e do Trx, podendo ver como se inclina a balanza dos sistemas homeostáticos cara as formas oxidadas, as cales non son útiles na defensa contra o tóxico (7).

Debido á presenza na molécula dun grupo tiol reducido (Cys-SH) é un obxectivo ideal para o MeHg<sup>+</sup> (Ilustración 8), cuxa asociación induce a formación de agregados insolubles, descendendo así a concentración de glutatión reducido. A pesar de que este feito implica que as concentracións de metilmercurio tamén descenden, varios estudos documentan que as alteracións bioquímicas, producidas pola interacción do tóxico con compoñentes tisulares ou pola perda de potencial redutor, poden persistir indefinidamente (37).

A *glutatión peroxidasa* (GPx) é unha enzima encargada da oxidación do GSH a GSSG utilizando o potencial redutor para producir desperoxidación, mentres que a *glutatión reductasa* (GR) é outra enzima capaz de catalizar o proceso contrario, mediante o uso do poder redutor do NADPH. En estudos con peixes cebrá documéntase que o metilmercurio produce regulación á baixa da GPx1 nos embrións logo de 72 h de exposición, mentres que en estudos con embrións de rata encontrouse que o sistema GSH/GPX vese perturbado por completo en menos de 7 días, diminuíndo considerablemente a proporción GSH/GSSG (38).

Todos estes efectos desprotexen ó tecido cerebral completamente fronte a acción das ROS, producindo principalmente acúmulos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peroxidación lipídica, a principal marca de estrés oxidativo.

## 6.2.2 Sistema Tiorredoxina

O sistema *tiorredoxina* é outra barreira antioxidante do corpo humano, extremadamente importante a nivel do SNC e conformado pola propia tiorredoxina (Trx), a *tiorredoxin reductasa* (TrxR) e o NADPH. Presenta suma importancia no neurodesenvolvemento, debido a que, entre outros factores, a isoforma Trx1 actúa en mamíferos como cofactor adxuvante no crecemento cerebral, principalmente inducendo a liberación do factor de crecemento nervioso (NGF: *Nerve Growth Factor*). Ambas as dúas

proteínas posúen Se, sendo ademais parte do centro catalítico da TrxR e posuír a importante responsabilidade de ser a única enzima capaz de devolverlle á tiorredoxina o estado reducido (de xeito que se evidencia de maneira bastante obvia a relación entre o sistema tiorredoxina e a intoxicación por metilmercurio) (39) (40).

O sistema Trx e o GSH están intimamente relacionados en canto ós efectos neurotóxicos na intoxicación por MeHg<sup>+</sup> (Ilustración 8). Cando a magnitude da intoxicación é baixa, o sistema tiorredoxina vai a ser o principal afectado, producíndose unha diminución substancial dos seus efectos protectores. Cando a concentración de tóxico no organismo se eleva, é o glutatión o que sofre unha importante oxidación. Esta inhibición particular asociada ás doses de tóxico explícanse en parte se atendemos ás características fisicoquímicas anteriormente citadas neste traballo; de xeito que, se o metilmercurio posúe unha maior afinidade polas moléculas con grupos selenol, é de esperar que o sistema tiorredoxina se vexa prexudicado antes de que o faga o sistema glutatión.

A ausencia de moléculas suficientes de GSH non so prexudica a defensa antioxidante mediada por este sistema en particular, senón que a enzima *glutarredoxina* (unha proteína encargada de reducir a TrxR e que usa ó glutatión como cofactor) tamén se ve neutralizada, facendo caer en picado a proporción Trx<sub>r</sub>/Trx<sub>o</sub> (41).

### 6.2.3 Excitotoxicidade

O *ácido glutámico* (Glu) é un aminoácido excitatorio que ten un papel importante en diversos aspectos do neurodesenvolvemento, como na aprendizaxe, na memoria e no propio crecemento cerebral. É unha molécula liberada tanto por neuronas como por células da glía, e exerce a súa acción mentres permaneza na fendedura sináptica (Ilustración 9). Sen embargo, a Glu tamén é liberada normalmente en situacións de estrés para forzar o organismo a reaccionar ó estímulo dañino, de forma que niveis altos poden actuar como unha toxina que causa danos nerviosos e incluso a morte celular (42). Por este motivo debe ser eliminada case de inmediato logo de ser liberada, papel que asume a *glutamina sintetasa* (GS). Esta enzima é capaz de degradar o ácido glutámico e convertelo en glutamina (Gln), molécula non excitable, permitindo así a relaxación das células próximas á fendedura sináptica. A GS so é posible encontrala no citoplasma celular, polo que o Glu debe ser importado polos transportadores específicos das células veciñas.

Un equilibrio tan importante como este tamén se ve afectado pola presenza de metilmercurio, xa que a súa entrada nas células tanto induce a liberación como inhibe a

recaptación. Isto, provoca neurotoxicidade excitatoria entre as neuronas e células glias próximas (42).

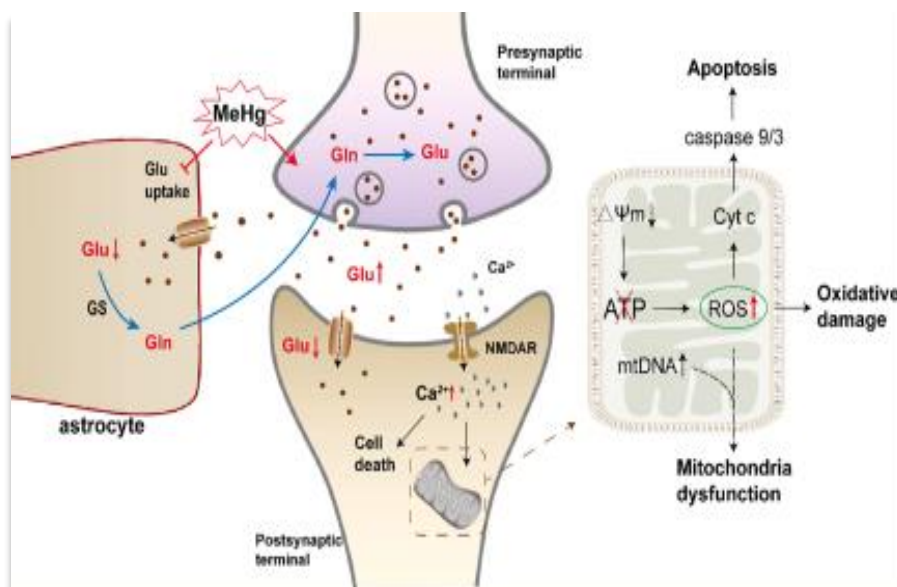


Ilustración 9: Consecuencias da intervención do MeHg no ciclo glutamatérxico en diversos tipos celulares (7).

A inhibición do metabolismo do Glu e do seu transportador produce acumulación desta substancia no entorno celular, provocando sobreactivación dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAr), os cales incrementan o fluxo intracelular de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e cuxas altas concentracións están relacionadas con mecanismos de morte e apoptose neuronal e gliar (43). Por outra parte, a formación de ROS nas inmediacións das células glias tamén afectan á capacidade recaptativa dos transportadores de Glu, principalmente radicais superóxido, peróxido de hidróxeno e peroxinitrito. Experimentos en cachorros lactantes describen que, incluso ca lactancia, o metilmercurio reduce considerablemente a recaptación de Glu en diversas áreas cerebrais, incrementando así o estado oxidativo (44).

En canto á limitada terapéutica se refire, recentemente tense observado os efectos do riluzol sobre a redución da interferencia do estrés oxidativo ca excitotoxicidade (45). Este fármaco, tradicionalmente utilizado para o tratamento da esclerose lateral amiotrófica, posúe un mecanismo de acción moi complexo que inclúe a activación do transportador de glutamato (GLT-1) e do transportador de glutamato/aspartato (GLAST) nos astrocitos, o que incrementa a recaptación de glutamato e reduce a activación de respostas mediadas por NMDAr (46). Isto plantexa un posible futuro onde o riluzol poida actuar coma un coaduvante no tratamento da intoxicación co fin de reducir a toxicidade no SNC.

## 6.2.4 Dishomeostase de Calcio

O  $\text{Ca}^{2+}$  é o mensaxeiro intracelular por excelencia na neurofisioloxía e é extremadamente importante, tanto no correcto funcionamento do sistema nervioso como nos mecanismos de toxicidade de metilmercurio.

O aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  é un indicador prematuro de neurotoxicidade por metilmercurio (relacionado ademais directamente ca excitotoxicidade). As neuronas inmaduras son particularmente sensibles a este mecanismo de toxicidade (47). O aumento de calcio intracelular por metilmercurio pode producirse por dous mecanismos principais:

- A peroxidación lipídica altera a permeabilidade das membranas celulares, tanto da bicapa lipídica coma dos transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$ . Isto provoca principalmente a liberación de calcio intracelular.
- As altas concentracións de Glu activan os NMDAr, aumentando a captación de calcio extracelular.

A dishomeostase cálcica tamén induce a acción de caspasas, as cales son mediadoras de mecanismos de morte celular (ver máis adiante).

## 6.2.5 Disfunción Mitocondrial

Un dos lugares onde máis metilmercurio se acumula é nas mitocondrias, véndose afectados principalmente a membrana interna e os transportadores de calcio. O tóxico provoca que as mitocondrias experimenten unha entrada masiva destes ións, alterando drásticamente o potencial de membrana que impide o transporte electrónico, o que ó mesmo tempo afecta ó proceso de fosforilación oxidativa (perturbando o aporte de ATP). Se sumamos isto co aumento das ROS (que producen peroxidación lipídica), obtemos unha apertura na membrana mitocondrial expoñéndoa a danos tales como mutacións na súa cadea de ADN (a cal é moito máis sensible que a nuclear debido á falta de histonas, entre outros factores). A ruptura da envoltura mitocondrial tamén implica unha liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  ó lumen intracelular, agravando así a disfunción mitocondrial (48).

O ADN mitocondrial (ADNmi) é particularmente susceptible a danos por estrés oxidativo, principalmente debido á súa forma circular e ó seu empaquetamento exento de histonas. O incremento da taxa de mutación do ADNmi é característico da toxicidade por dishomeostase de calcio. Unha variación na súa secuencia xenética pode aumentar na maioría dos casos a expresión de xenes involucrados no proceso de respiración celular, o cal

desencadearía un aumento da concentración de ROS derivados do proceso, provocando unha maior inestabilidade aínda no ADNmi (49).

Estas condicións celulares inducen a acción dunha serie de proteínas denominadas caspasas, protein-quinasas relacionadas con diversos mecanismos de morte celular programada. A súa activación pode producirse por diversos motivos, entre os que destaca a liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  ó espáceo intracelular, iniciando a formación de gránulos apoptóticos previos ó proceso de morte programada (48).

En outros estudos descríbese como, aínda varios días despois do cese da exposición ó tóxico, seguíanse percibindo cantidades significativas de factores pro-apoptóticos e caspasas no hipocampo, o que levou posteriormente á morte celular (50).

### 6.3 Análise Toxicolóxica Celular

O metilmercurio pode provocar danos citotóxicos sobre todo no SNC, tanto en doses baixas coma en altas. As áreas cerebrais maiormente afectadas son:

- Lóbulo occipital, encargado do procesamento da información visual, polo que a toxicidade do metilmercurio pode producir alteracións no campo visual (51).
- Lóbulo temporal, que presenta un papel importante nas tarefas visuais complexas como o recoñecemento de rostros, ademais de estar encargado da audición. Danos citotóxicos por  $\text{MeHg}^+$  provocan perda de agudeza visual e auditiva (51).
- Cerebelo, bulbo olfactorio e hipocampo onde entre outras localizacións encontramos as células glutamatérxicas, células moi pequenas que interveñen directamente en procesos como a memoria e o aprendizaxe motor. Danos nestas células provocan ataxia, descordinación locomotora e convulsións tónicas ocasionais (51).

Revisados os efectos tóxicos do metilmercurio a nivel molecular, abordaremos neste apartado á discusión sobre os efectos celulares que produce nos distintos tipos de células do sistema nervioso central.

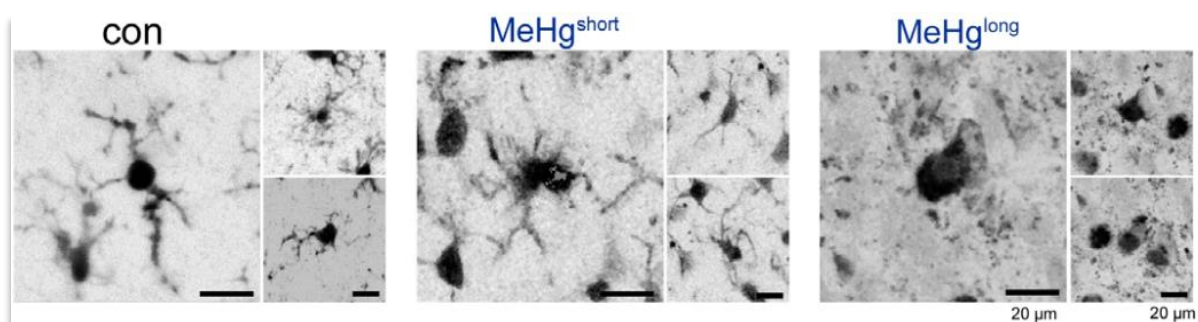
#### 6.3.1 Microglía

Son as principais células de defensa e de soporte das funcións neuronais, os equivalentes ós macrófagos do SNC. Estas células encóntranse normalmente en repouso, proveendo as neuronas de sustento e mantendo a homeostase, ata que se produce unha perturbación no entorno neuronal. A microglía nese momento responde con cambios

morfolóxicos e procesos como a proliferación, a activación fagocítica e a secreción pro-inflamatoria e citoquínica.

Varios estudos demostran que o efecto neurotóxico que provoca o metilmercurio neste tipo de células é principalmente debido ás funcións protectoras que exercen no SNC, sendo as primeiras células do entorno cerebral afectadas logo da exposición a metilmercurio. A súa viabilidade está relacionada co metilmercurio de forma dose- e tempo-dependentes: dende aumentos moderados na concentración de ROS no interior e na periferia destas células na primeira hora de contacto co tóxico, ata a formación de clústeres e gránulos apoptóticos na periferia neuronal tras unha intoxicación crónica (52).

Paradójicamente, unha concentración baixa de metilmercurio (aproximadamente 2 ng/mL) é capaz de inducir un aumento na viabilidade e supervivencia das células microgliares, evento que cesa en canto se aumenta a dose (52).



*Ilustración 10: Avance dos cambios morfolóxicos de células gliares segundo a intensidade e duración da exposición a MeHg<sup>+</sup>. Obsérvase claramente coma o número de procesos e ramificacións se ven diminuídos e como na exposición de longa duración se perde case por completo a morfoloxía característica das células gliares, adoptando unha máis redondeada e disfuncional (54).*

As células microgliares, en resposta á elevación da concentración de substancias tóxicas no ambiente cerebral, desenvolven cambios conformacionais nos que se incrementa o número de procesos e adquiren unha forma máis “astillada”, o que lle permite unha mellor comunicación co resto de células do entorno e unha maior capacidade de reacción ante o tóxico. Estes cambios morfolóxicos veñen dados pola sinalización ROCK (“*Rho-associated protein kinase*”), unha protein-kinasa esencial na regulación da forma e movemento das células pola súa actuación nas fibras de actina do citoesqueleto celular e na contractilidade celular. A activación da vía de sinalización ROCK induce a modulación do fenotipo microglial, mediando mecanismos neuroinflamatorios e estando asociado cunha motilidade mellorada, así como co incremento da produción de ROS e da liberación de citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-1 e sobre todo IL-6). Non so iso, senón que esta vía tamén está relacionada ca capacidade de fagocitación e invaxinación da membrana celular microglial, desenvolvendo

un papel fundamental no mantemento da homeostase cerebral (53). Esta última función característica débese principalmente á relación que garda o sistema de sinalización ca polarización dos dímeros de tubulina celulares. Diversos estudos documentan o cambio fenotípico de células microgliares debido á sinalización ROCK, observando ó mesmo tempo que as variacións morfolóxicas son dependentes da intensidade e da duración da intoxicación. En casos onde a exposición a  $\text{MeHg}^+$  foi moi prolongada, as células microgliares mostrábanse completamente redondas e sen ningunha extensión dos seus procesos (Ilustración 10). Tamén se puido observar como tras unha exposición crónica producíase apoptose/morte celular tanto de microglía como de células veciñas (54) (55).

Diferentes estudos indican que a morte gliar está tamén mediada pola acción de caspasas, en concreto a caspasa-3. A dishomeostase de calcio producida polos danos mitocondriais tras o contacto con  $\text{MeHg}^+$  induce o cambio de fenotipo da microglía, activándose os xenes caspasa. Segundo se cree, a activación da cascada ROCK (en concreto ROCK-1) sería desencadeado pola fosforilación por caspasa-3, o cal induce a formación de gránulos apoptóticos previos á morte celular programada (56).

A inhibición da sinalización mediada por ROCK está á orde do día sobre todo como medida terapéutica na enfermidade de Parkinson (EP) ou na esclerose lateral amiotrófica (ELA), tamén estando presente como minimizador dos efectos neurotóxicos celulares da intoxicación por metilmercurio. En concreto, o fasudilo foi estudiado como un posible adxuvante no tratamento da intoxicación, que tradicionalmente se leva a cabo con quelantes como o DMSA (ácido dimercaptosuccínico) ou o BAL (*British Antilewisite* ou dimercaprol). A inhibición da proteína Rho interrompe a sinalización por ROCK e reduce considerablemente a neuroinflamación nas vías dorsales da espiña dorsal, podendo ser este efecto beneficioso para o tratamento da neuropatía periférica da enfermidade de Minamata (57).

### 6.3.2 Astrocitos

Son o tipo celular máis prevalente entre as células gliais, participando en procesos tan importantes como na formación da BHE e na homeostase do balance iónico. De xeito similar ó que sucede na microglía, os astrocitos sofren cambios conformacionais e bioquímicos logo de expoñerse a estímulos estresantes, liberando ó medio factores pro-inflamatorios que poden provocar efectos tanto neuroprotectores coma lesivos, dependendo da duración e da súa concentración (58).

Un dos marcadores bioquímicos máis importantes para a actividade astrocítica é a proteína gliar fibrilar (GFAP), o cal actúa como indicador de morfoloxía irregular, unha forma

inchada e inflamada, onde se reduce tanto a lonxitude como o número de procesos. Cando o astrocito se expón a situacións de estrés prodúcese unha regulación á alta da GFAP en resposta a estos estímulos dañinos, favorecendo procesos como a motilidade e migración astrocítica, a proliferación, a síntese de transportadores de glutamato ou a mielinización oligodendrocítica (59). Un dano oxidativo cronificado como o que provoca o MeHg<sup>+</sup> produce unha sobreestimulación da síntese de GFAP dando lugar á chamada astrogliose, unha resposta inflamatoria que conduce a dano neuronal (58) (60).

A recuperación do dano axonal indirecto por MeHg<sup>+</sup> non se fai efectiva se os niveis de GFAP son demasiado altos, podendo levar á morte neuronal se a transcripción do factor se cronifica (61).

Outra función deste tipo celular está directamente relacionada ca excitotoxicidade mercurial, xa que os astrocitos son os encargados de eliminar o ácido glutámico do espáceo sináptico a través de transportadores específicos como o transportador glial de glutamato (GLT-1) e o simportador glutamato-aspartato (GLAST). Existe un equilibrio entre as neuronas e os astrocitos respecto ó glutamato, de xeito que os astrocitos liberan glutamina que é transformada en glutamato polas neuronas, para que logo sexa recaptado polos astrocitos e se convirte en glutamina pola *glutamina sintetasa*. O metilmercurio provoca disfunción desta enzima, o que leva a dishomeostase glutamatérxica. Ademais, a unión de MeHg cos residuos de Cys dos transportadores GLAST e GLT-1 non so induce efluxo de glutamato cara a fendedura sináptica, senón que tamén imposibilita a súa recaptación e, por conseguinte, o peche do ciclo glutamato/glutamina (62). Todos estos eventos dan paso a unha sobreestimulación dos NMDAr, cas consecuencias expostas en anteriores parágrafos.

Ó igual que noutras células, a produción de ROS vese incrementada nos astrocitos e a actividade do sistema glutatión vese alterada. De feito, estas células son especialmente sensibles ó estrés oxidativo, documentándose en diversos estudos que a actividade da GPx descende nos primeiros momentos da intoxicación ata o punto de observarse incrementos de ata 12 veces a concentración de GSSG ca exposición a 1µM de MeHg<sup>+</sup> (63).

Os astrocitos parecen ser bastante propensos a desenvolver procesos dishomeostásicos de Ca<sup>2+</sup> por metilmercurio. Tras o contacto co tóxico prodúcese un influxo de Ca<sup>2+</sup> que aumenta consecuentemente a súa concentración intracelular, producindo disrupción do potencial de membrana, así como alteracións metabólicas que non so interrompen a maquinaria enerxética do astrocito, senón que tamén inducen a activación de mecanismos de morte. Nestas células tamén se detectaron alteracións da sinalización ROCK, de modo que a activación da ROCK-1 por caspasa-3 induce a formación das membranas

apoptóticas previas á morte programada da célula, tal e como se describiu no apartado anterior (64).

### 6.3.3 Neuronas

O tipo neuronal máis importante dentro do SNC, polo tanto, tamén o máis estudado. Son células extremadamente sensibles a estímulos de estrés coma os que provoca o metilmercurio, razón pola que existen tantas células de apoio como os astrocitos e microglía que interpoñen diversos métodos de defensa para evitar a morte das neuronas.

O MeHg<sup>+</sup> produce efectos tóxicos como alteracións citoesqueléticas, dano oxidativo, cambios na concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular e excitotoxicidade. Sen embargo, podemos destacar en importancia nestas células en estado de desenvolvemento o descenso da proliferación e da viabilidade celular. O MeHg é capaz de alterar diversos puntos do ciclo celular das NSC (*Neural Stem Cells*), células pluripotentes encargadas da diferenciación celular cara neuronas integradas no circuíto neuronal ou cara células da glía. Algúns estudos fan responsable ó metilmercurio como interruptor nos puntos de control do ciclo celular, sobre todo na fase S, de forma que diminuírían a viabilidade das NCS facéndoas caer nun estado de senescencia celular (65). Particularmente, este cambio obsérvase en neuronas do hipocampo, o que explicaría en parte que o tóxico interveña en defectos da aprendizaxe e do desenvolvemento cognitivo nun cerebro en formación. Créese que un dos principais efectos é a liberación masiva de factores neurotróficos dependentes de GFAP, o que provoca que as NCS se diferencien cara células gliais e non a neuronas, diminuíndo así a viabilidade do neurodesenvolvemento (64).

Tamén, a parte da transmisión glutamatérxica, parece ser particularmente afectada a transmisión dopaminérxica. As neuronas liberadoras de dopamina, ante unha exposición a MeHg<sup>+</sup>, ven os seus axóns desmielinizados parcialmente, sofren cambios na morfoloxía dos axóns e dendritas e redúcese substancialmente o tamaño do soma. A homeostase da dopamina vese significativamente afectada de forma dose-dependente no putamen, observándose un incremento da liberación de dopamina nesta rexión específica (66).

### 6.3.4 Células Cerebelares

O cerebelo é unha rexión fundamental do encéfalo humano, onde se integra toda a información recibida que se precisa para controlar e procesar correctamente as ordes que a corteza cerebral envía ó resto do organismo. A corteza cerebelar vese extremadamente afectada polos efectos do MeHg<sup>+</sup> (en concreto as células granulares), o que da explicación a que a intoxicación por esta substancia provoque síntomas tales como a imposibilidade de

realizar movementos precisos, manter correctamente o equilibrio, adoptar posturas ergueitas ou desenvolver un correcto aprendizaxe motor.

Descóñécense varios aspectos sobre os mecanismos específicos contra este tipo de células, sendo da pouca información que se dispón ó respecto de carácter histolóxico. Estudos inmunohistoquímicos realizados a través da reacción en cadea da polimerasa (PCR) a tempo real nos tipos celulares da corteza cerebelar, documentan que as células granulosas posúen ARNm codificante das principais enzimas antioxidantes (Mn-superóxido dismutase ou Mn-SOD, GPx1 e TRxR1) cunha expresión *in situ* moitísimo menor que en tipos celulares contiguos. Isto podería constituír o por que da sensibilidade especial que posúe este tipo celular (Ilustración 11) (67).

As células granulares parecen ser extremadamente susceptibles á toxicidade por dishomeostase de calcio en comparación con outros tipos cerebelares (como as células de Purkinje), non so por mecanismos advertidos en parágrafos anteriores, senón tamén pola presenza dun tipo de sinalización mediada por receptores muscarínicos M<sub>3</sub>. A interacción do MeHg<sup>+</sup> con receptores deste tipo produce a saída de Ca<sup>2+</sup> dende o retículo endoplasmático liso cara o lumen intracelular, incrementando así a concentración do ión e producindo os efectos tóxicos. Desta forma, aquelas células que teñan sobreexpresado este receptor (como o teñen as células granulosas) serán máis susceptibles de padecer este tipo de toxicidade (68).

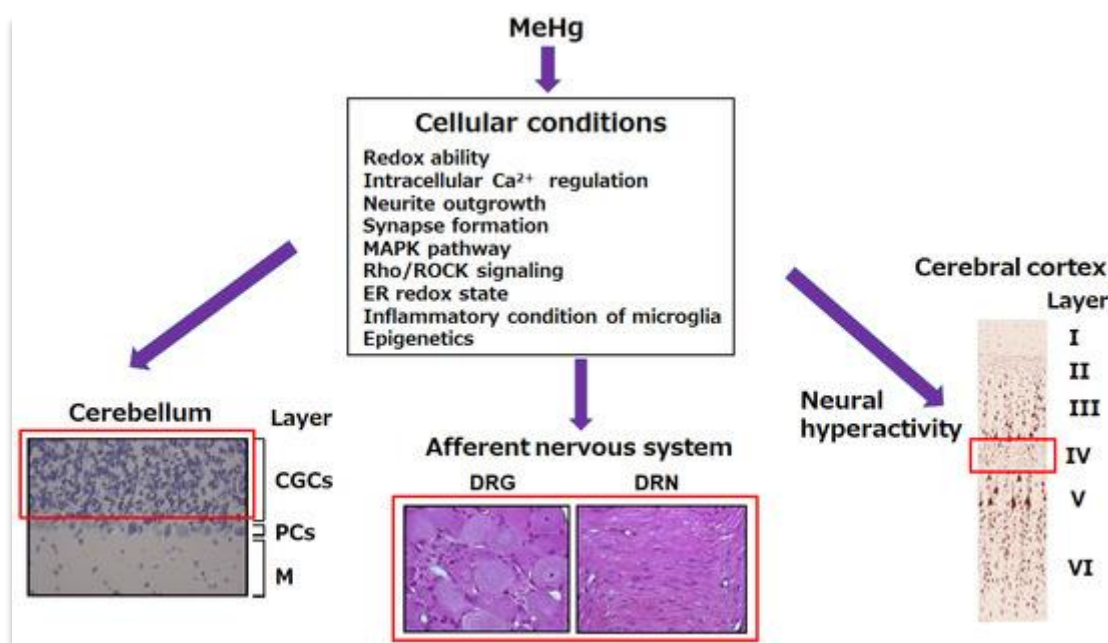


Ilustración 11: Entornos celulares principais responsables da toxicidade do MeHg<sup>+</sup>. A toxicidade do metilmercurio atáñe tanto ás células granulares cerebrais, como ó sistema nervioso aferente como a capa de neuronas corticais (10).

## 7 Epixenética da Intoxicación por MeHg<sup>+</sup>

Segundo o Instituto Nacional do Cancro estadounidense, a **epixenética** é o “*estudo dos cambios que activan ou inactivan os xenes sen cambiar a secuencia do DNA, a causa da idade ou a exposición a factores ambientais tales coma **substancias químicas***” (69). Dentro destes factores ambientais podemos incluír por suposto ó MeHg<sup>+</sup>, o cal pode impactar a nivel da programación epixenética e influenciar na variación fenotípica dos individuos expostos, así como á súa proxenie (70).

Como xa se matizou en previos apartados deste TFG, os compostos de tipo MeHg-SR son extremadamente lipófilos, non so o suficiente como para permitirles atravesar a BHE, senón tamén como para facelo polas membranas celulares e nucleares podendo así acceder ó compartimento onde se alberga o ADN. Unha vez dentro, o tóxico presenta a suficiente labilidade como para verse atraído polas bases nitroxenadas e afectar directamente ó material xenético pouco tempo despois da intoxicación, como se demostrou en estudos con cultivos celulares knockout de HeLa S3 (71). A metilación do ADN prodúcese principalmente a nivel da posición 5 da citosina. De igual maneira, á presenza de proteínas con grupos tiol na estrutura cromatínica ou mesmo nas propias histonas determina a capacidade para alterar o empacamento do material xenético e, así, provocar as alteracións epixenéticas (72).

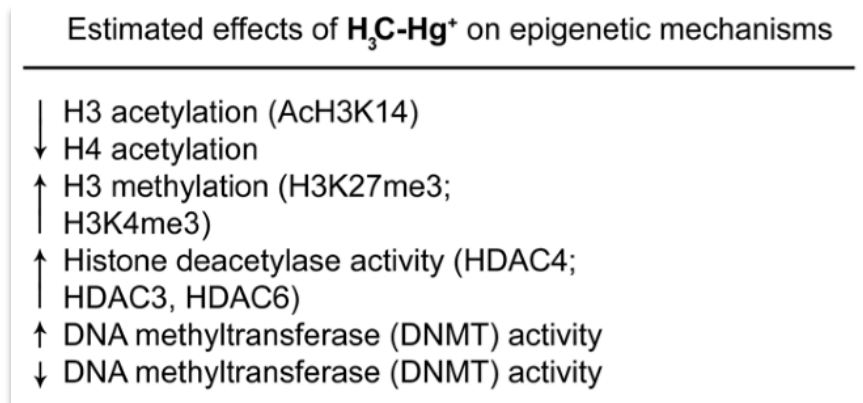
Podemos dividir os efectos epixenéticos do MeHg<sup>+</sup> en 4 eventos principais: hipometilación do ADN, metilación de histonas, alteracións na neuroxénese e perturbación do sistema de micro-ADN.

A hipometilación do ADN é un biomarcador de exposición tóxica, probablemente como un mecanismo de defensa temprano ó contacto ca substancia, e pode ser observado en varios tecidos. A exposición a MeHg<sup>+</sup> produce alteracións na metilación do ADN tanto *in vitro* coma *in vivo*, producindo principalmente regulación á baixa das ADN metiltransferasas (DNMTs), enzimas que, como o seu nome indica, metilan o ADN. Unha inhibición neste grupo de proteínas resulta nunha sobreexpresión dos péptidos p16 e p21 provoca a detención total do ciclo celular na fase G1, o cal se traduce nun nivel de proliferación diminuído e a indución da senescencia celular (65).

A metilación das histonas está intimamente relacionada cos cambios na neuroxénese, tal e como se verá a continuación. A neurotrofina BDNF (Neurotrophin brain-derived neurotrophic factor) é un neuropéptido que promove a supervivencia, desenvolvemento e plasticidade das neuronas. Os seus niveis vense expresados intensamente en zonas coma o hipocampo, o cortex, o núcleo basal ou o xiro dentado, áreas vitais no proceso de aprendizaxe,

memoria e pensamento crítico. A pesar de que a maioría do cerebro fórmase antes de nacer, este pode seguir formando novas neuronas e sinapses a partir de NCSs no cerebro adulto, a través dun proceso denominado neuroxénese, cuxo control posúen neurotrofinas coma o BDNF. Defectos na transcripción deste péptido poden acarrear problemas de plasticidade neuronal, favorecendo que se produza senescencia e inhibición da diferenciación, o cal en adultos soe asociarse con síntomas depresivos entre outros e, en fetos ou neonatos con deficiencias cognitivas e motoras.

A exposición a MeHg<sup>+</sup> produce metilación de histonas, en concreto da H3 e H4, así como o descenso da súa acetilación. Obsérvase que pouco despois do contacto co tóxico prodúcese a tri-metilación dun residuo de lisina da histona 3 (H3K27) así como a desacetilación da mesma histona na rexión promotora do xen BDNF (73). Este feito mantívose no tempo e na proxenie a pesar da retirada do tóxico do medio e está relacionado co descenso de ARNs mensaxeiros do xen BDNF no xiro dentado na idade adulta, demostrado noutros estudos (74).



*Ilustración 12: Resumo dos mecanismos de toxicidade epixenética que presenta o MeHg<sup>+</sup> (70).*

## 8 Conclusións

- O Hg aparece de forma natural no medioambiente, sen embargo as concentracións actuais derivan da intervención humana, como a explotación das minas de cinabrio para posterior obtención de Ag e Au, ou o desastre de Minamata.
- O mercurio elemental é facilmente evaporable e tende a acadar a atmosfera, onde se oxida a  $Hg^{2+}$  e cae ca chuva de novo ó medio acuático. Aquí son as bacterias SRB as encargadas de metilar o mercurio e formar a especie máis tóxica, metilmercurio, mentres que as bacterias posuidoras do operon *mer* encárganse do proceso contrario, fechando o ciclo.
- O metilmercurio presenta unha fisicoquímica particular que lle permite transportarse na sangue mediante a hemoglobina e a albúmina pola presenza de grupos –SH e acadar e atravesar facilmente a BHE, xa sexa por cuestións de liposolubilidade ou por transporte a través de LAT1, exercendo a nivel cerebral gran parte dos seus efectos tóxicos.
- O  $MeHg^+$  exerce a súa toxicidade molecular principalmente a través da produción de ROS e do esgotamento da maquinaria antioxidante do SNC, intervindo nos ciclos bioquímicos do sistema GSH, do sistema Trx e no sistema Glu/Gln así como tamén provoca toxicidade mitocondrial e altera a homeostase do  $Ca^{2+}$ .
- As células afectadas polo  $MeHg^+$  son as da microglía, os astrocitos, as neuronas da corteza cerebral e as células granulares do cerebelo, que ven mermadas as súas defensas antioxidantes ou desencadean procesos apoptóticos tras a activación da sinalización ROCK ou a dishomeostase de glutamato.
- O metilmercurio tamén provoca efectos sobre a descendencia celular mediante cambios epixenéticos, tanto aumentando a metilación do DNA e das histonas como descendendo os niveis da acetilación destas últimas, así como provocando interferencias nos micro ARN mensaxeiros e descendendo a expresión de diferentes neurotrofinas.

## 9 Referencias

1. Sonke JE, Angot H, Zhang Y. Global change effects on biogeochemical mercury cycling. *Ambio*. 2023; 52: p. 853-876. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13280-023-01855-y>
2. Oakley P. Making Mercury's Histories: Mercury in Gold Mining's Past and Present. *Ambix*. 2023; 70(1): p. 77-98. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00026980.2023.2192125>
3. Zhao M, Li Y, Wang Z. Mercury and Mercury-Containing Preparations: History of Use, Clinical Applications, Pharmacology, Toxicology, and Pharmacokinetics in Traditional Chinese Medicine. *Frontiers in Pharmacology*. 2022; 13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.807807/full>
4. Hadidi S. A high-efficiency decomposition method for mono and dimethylmercury induced by low-energy electron attachment ( $\approx 7$  eV): A computational insight into the decomposition mechanism of extremely toxic mercury compounds. *Chemosphere*. 2023; 310. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653522033380>
5. Lemonick S. 25 Years After Karen Wetterhahn Died of Dimethylmercury Poisoning, Her Influence Persists Chemist left her mark on lab safety, the scientific method, and women in science. *ACS Chemical Health & Safety*. 2022; 29(4): p. 327-332. Disponible en: <https://cen.acs.org/safety/lab-safety/25-years-Karen-Wetterhahn-died-dimethylmercury-poisoning/100/i21>
6. Zee DZ, Singer CP, O'Halloran TV. Chemical-Shift Standards for 199Hg NMR Spectroscopy, 25 Years Later. *Inorganic Chemistry*. 2022; 61(35): p. 12657-13661. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.inorgchem.2c02183>
7. Pan J, Li X, Wei Y. Advances on the Influence of Methylmercury Exposure during Neurodevelopment. *Chemical Research in Toxicology*. 2022; 35(1): p. 43-58. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.1c00255>
8. AESAN. Aesan - Mercurio. [Online].; 2019 [cited 2023 04 26. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/ampliacion/mercurio.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/mercurio.htm).
9. Ferreira L, Karpova N, Alves B. Evidence on Neurotoxicity after Intrauterine and Childhood Exposure to Organomercurials. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2023; 20(2): p. 11-21. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-4601/20/2/1070>
10. Fujimura M, Usuki F. Cellular Conditions Responsible for Methylmercury-Mediated Neurotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(13). Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/13/7218>
11. Sexauer M, Bank M, Bishop K. Mercury biogeochemical cycling: A synthesis of recent scientific advances. *Science of The Total Environment*. 2020; 737. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720331399?via%3Dihub>
12. Burger B, Estrada MV, Sexauer Gustin M. What caused Earth's largest mass extinction event? New evidence from the Permian-Triassic boundary in northeastern Utah. *Global and Planetary Change*. 2019; 177: p. 81-100. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921818118301322?via%3Dihub>
13. Environment UN. UNEP - UN Environment Programme. [Online].; 2017 [cited 2023 04 14. Disponible en: <http://www.unep.org/resources/report/global-mercury-supply-trade-and-demand>.
14. Selin NE. Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A Review. *Annual Review of Environment and Resources*. 2009; 34: p. 43-63. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.environ.051308.084314>
15. Gao Z, Zheng W, Li Y. Mercury transformations processes in nature: Critical knowledge gaps and perspectives for moving forward. *Journal of Environmental Sciences*. 2022; 119: p. 152-165. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074222003692?via%3Dihub>
16. Cooper C, Zheng K, Rush K. Structure determination of the Hg<sub>2</sub>C<sub>2</sub> complex using metagenome sequence data: insights into microbial mercury methylation. *Communications biology*. 2020; 3(320). Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s42003-020-1047-5>
17. Choi SC, Chase T, Bartha R. Metabolic Pathways Leading to Mercury Methylation in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994; 60(11). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.60.11.4072-4077.1994>

18. Nascimento A, Chartone-Souza E. Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genetics and Molecular Research*. 2003; 2(1): p. 92-101. Disponible en: [https://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/sim0005\\_full\\_text.htm](https://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/sim0005_full_text.htm)
19. Clarkson TW, Magos L. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Critical Reviews in Toxicology*. 2006; 36(8): p. 609-662. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408440600845619?journalCode=itxc20>
20. Renzoni A, Zino F, Franchi E. Mercury Levels along the Food Chain and Risk for Exposed Populations. *Environmental Research*. 1998; 77(2): p. 68-72. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935198938324?via%3Dihub>
21. Madabeni A, Nogara P, Bortoli M. Effect of Methylmercury Binding on the Peroxide-Reducing Potential of Cysteine and Selenocysteine. *Inorganic Chemistry*. 2021; 60(7): p. 4646-4656. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.inorgchem.0c03619>
22. Chen B, Dong S. Mercury Contamination in Fish and its Effects on the Health of Pregnant Women and Their Fetuses, and Guidance for Fish Consumption—A Narrative Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022; 19(23). Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-4601/19/23/15929>
23. Ajsuvakova O, Tinkov A, Aschner M. Sulfhydryl groups as targets of mercury toxicity. *Coordination Chemistry Reviews*. 2020; 417. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854520300837?via%3Dihub>
24. Khan M, Wang F. Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: Toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2010; 28(8): p. 1567-1577. Disponible en: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1897/08-375.1>
25. Bojian C, Shiyuan D. Mercury Contamination in Fish and Its Effects on the Health of Pregnant Women and Their Fetuses, and Guidance for Fish Consumption—A Narrative Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022; 19(23). Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-4601/19/23/15929>
26. Fang SC, Fallin E. The binding of various mercurial compounds to serum proteins. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1976; 15: p. 110-117. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01686202>
27. Bank RPD. RCSB PDB - 5KSI: Crystal structure of deoxygenated hemoglobin in complex with sphingosine phosphate and 2,3-Bisphosphoglycerate. [Online].; 2015 [cited 2023 March 13. Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/5ksi>.
28. Bank RPD. RCSB PDB - 1A06: CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN SERUM ALBUMIN. [Online].; 2015 [cited 2023 March 13. Disponible en: <https://www.rcsb.org/structure/1a06>.
29. Farina M, Rocha JBT, Aschner M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. *Life Sciences*. 2011; 89(15-16): p. 555-563. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320511002657?via%3Dihub>
30. Vázquez M, Vélez D, Devesa V. In vitro evaluation of inorganic mercury and methylmercury effects on the intestinal epithelium permeability. *Food and Chemical Toxicology*. 2014; 74: p. 349-359. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691514004505?via%3Dihub>
31. Friberg L, Karle Mottet K. Accumulation of methylmercury and inorganic mercury in the brain. *Biological Trace Elements Research*. 1989; 21: p. 201-206. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02917253>
32. Novo J, Martins B, Raposo R. Cellular and Molecular Mechanisms Mediating Methylmercury Neurotoxicity and Neuroinflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(6). Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/6/3101>
33. Wang F, Khan MMA. Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: Toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2010 Xaneiro; 28(8): p. 1567-1577. Disponible en: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1897/08-375.1>
34. Reed M, Banna K, Heath J. Dietary selenium protects against selected signs of aging and methylmercury exposure. *NeuroToxicology*. 2010 Marzo; 31(2): p. 169-179. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0161813X10000069?via%3Dihub>

35. Ye X, Fisher N. Minor effects of dietary methylmercury on growth and reproduction of the sheepshead minnow *Cyprinodon variegatus* and toxicity to their offspring. *Environmental Pollution*. 2020 Novembro; 266(1). Disponível en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749120308770?via%3Dihub>
36. Kieliszek M, Blazejak S. Current Knowledge on the Importance of Selenium in Food for Living Organisms: A Review. *Molecules*. 2016; 21(5): p. 11-21. Disponível en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/609>
37. Stringari J, Nunes A, Jeferson FL. Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008 Fevereiro; 227(1): p. 147-154. Disponível en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041008X07004620?via%3Dihub>
38. Cambier S, Gonzalez P, Mesmer-Dudons N. Effects of dietary methylmercury on the zebrafish brain: histological, mitochondrial, and gene transcription analyses. *BioMetals*. 2012; 25: p. 165-180. Disponível en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10534-011-9494-6>
39. Nordberg J, Arnér E. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001; 31(11): p. 1287-1312. Disponível en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584901007249?via%3Dihub>
40. Bank RPD. RCSB PDB - 1H6V: Mammalian thioredoxin reductase. [Online].; 2015 [cited 2023 feb 23]. Disponível en: <https://www.rcsb.org/structure/1h6v>.
41. Branco V, Coppo L, Solá S. Impaired cross-talk between the thioredoxin and glutathione systems is related to ASK-1 mediated apoptosis in neuronal cells exposed to mercury. *Redox Biology*. 2017; 13: p. 278-287. Disponível en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231717303099?via%3Dihub>
42. Petronia D, Tsai J, Mondal D. Attenuation of low dose methylmercury and glutamate induced-cytotoxicity and tau phosphorylation by an N-methyl-D-aspartate antagonist in human neuroblastoma (SHSY5Y) cells. *Environmental Toxicology*. 2011; 28: p. 700-706. Disponível en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.20765>
43. Liu W, Xu Z, Deng Y. Excitotoxicity and oxidative damages induced by methylmercury in rat cerebral cortex and the protective effects of tea polyphenols. *Environmental Toxicology*. 2012; 29(3): p. 269-283. Disponível en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.21755>
44. Chung YT, Lim KT, Park ST. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology*. 1996; 17(1): p. 37-45. Disponível en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8784817/>
45. Deng Y, Xu Z, Liu W, . Exploring cross-talk between oxidative damage and excitotoxicity and the effects of riluzole in the rat cortex after exposure to methylmercury. *Neurotoxicity Research*. 2014; 26(1). Disponível en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12640-013-9448-6>
46. Fumagalli E, Funicello M, Rauen T. Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. *European journal of pharmacology*. 2008; 578(2-3): p. 171-176. Disponível en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299907011818?via%3Dihub>
47. Mundy WR, Freudenrich TM. Sensitivity of immature neurons in culture to metal-induced changes in reactive oxygen species and intracellular free calcium. *Neurotoxicology*. 2000; 21(6): p. 1135-1134. Disponível en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11233760/>
48. Patel E, Reynolds M. Methylmercury impairs motor function in early development and induces oxidative stress in cerebellar granule cells. *Toxicology Letters*. 2013; 222(3): p. 265-272. Disponível en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427413012733?via%3Dihub>
49. Wang X, Yan M, Zhao L. Low-Dose Methylmercury-Induced Apoptosis and Mitochondrial DNA Mutation in Human Embryonic Neural Progenitor Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. Disponível en: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/5137042/>
50. Sokolowski K, Falluel-Morel A, Zhou X. Methylmercury (MeHg) elicits mitochondrial-dependent apoptosis in developing hippocampus and acts at low exposures. *NeuroToxicology*. 2011; 32(5): p. 535-544. Disponível en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X11001070?via%3Dihub>
51. Korbas M, Lai B. Methylmercury Targets Photoreceptor Outer Segments. *ACS Chemical Biology*. 2013; 8(10): p. 2256-2263. Disponível en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cb4004805>
52. Tan Q, Zhang M, Geng L. Hormesis of methylmercury-human serum albumin conjugate on N9 microglia via ERK/MAPKs and STAT3 signaling pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2019; 362: p. 59-66. Disponível en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X18304812?via%3Dihub>

53. Giovanna C, Philippe C. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nature Cell Biology*. 2000; 2(10): p. E191-E196. Disponible en: [https://www.nature.com/articles/ncb1000\\_E191](https://www.nature.com/articles/ncb1000_E191)
54. Shinozaki Y, Danjo Y, Koizumi S. Microglial ROCK is essential for chronic methylmercury-induced neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*. 2019; 151(1): p. 64-78. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jnc.14817>
55. Fujimura M, Usuki F, Sawada M. Methylmercury exposure downregulates the expression of Rac1 and leads to neuritic degeneration and ultimately apoptosis in cerebrotical neurons. *NeuroToxicology*. 2009; 30(1): p. 16-22. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X08001897?via%3Dihub>
56. Hou S, Zhang X, Ning X. Methylmercury induced apoptosis of human neuroblastoma cells through the reactive oxygen species mediated caspase and poly ADP-ribose polymerase/apoptosis-inducing factor dependent pathways. *Environmental Toxicology*. 2022; 37(8): p. 1891-1901. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.23535>
57. Fujimura M. Fasudil, a ROCK inhibitor, prevents neuropathic pain in Minamata disease model rats. *Toxicology Letters*. 2022; 371: p. 38-45. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427422017623?via%3Dihub>
58. Bélanger M, Magistretti PJ. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clinical Neuroscience*. 2009; 11(3): p. 281-295. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.31887/DCNS.2009.11.3/mbelanger>
59. Liedtke W, Edelmann W, Bieri P. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron*. 1996; 17(4): p. 607-615. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8893019/>
60. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*. 2011; 93: p. 421-443. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008211000062?via%3Dihub>
61. Milos P, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005; 50(4): p. 427-434. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.20207>
62. Pajarillo E, Rizo A, Lee J. The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology*. 2019; 161. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390819300802?via%3Dihub>
63. Pierozan P, Biasibetti H, Schmitz F. Neurotoxicity of Methylmercury in Isolated Astrocytes and Neurons: the Cytoskeleton as a Main Target. *Molecular Neurobiology*. 2017; 54: p. 5752-5767. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-016-0101-2>
64. Tian J, Luo Y, Chen W. MeHg Suppressed Neuronal Potency of Hippocampal NSCs Contributing to the Puberal Spatial Memory Deficits. *Biological Trace Element Research*. 2016; 172: p. 424-436. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-015-0609-8>
65. Bose R, Onishchenko N, Edoff K. Inherited Effects of Low-Dose Exposure to Methylmercury in Neural Stem Cells. *Toxicological Sciences*. 2012; 130(2): p. 383-390. Disponible en: <https://academic.oup.com/toxsci/article/130/2/383/1726168?login=false>
66. Ke T, Tsatsakis A, Santamaría A. Chronic exposure to methylmercury induces puncta formation in cephalic dopaminergic neurons in *Caenorhabditis elegans*. *NeuroToxicology*. 2020; 77: p. 105-113. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X20300115?via%3Dihub>
67. Tucker E, Nowak R. Methylmercury alters proliferation, migration, and antioxidant capacity in humans HTR8/SV-neo trophoblast cells. *Reproductive Toxicology*. 2018; 78. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089062381730607X?via%3Dihub>
68. Yuan Y, Atchinson W. Multiple Sources of Ca<sup>2+</sup> Contribute to Methylmercury-Induced Increased Frequency of Spontaneous Inhibitory Synaptic Responses in Cerebellar Slices of Rat. *Toxicological Sciences*. 2016; 150(1): p. 117-130. Disponible en: <https://academic.oup.com/toxsci/article/150/1/117/2461549?login=false>
69. NCI. Definition of epigenetics - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI. [Online].; 2011 [cited 2023 06 20]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/epigenetics>.
70. Ke T, Tinkov AA, Skalny AV. Epigenetics and Methylmercury-Induced Neurotoxicity, Evidence from Experimental Studies. *Toxics*. 2023; 11(1). Disponible en: <https://www.mdpi.com/2305-6304/11/1/72>
71. Gruenwedel DW, Glaser JF, Cruikshank MK. Binding of methylmercury(II) by HeLa S3 suspension-culture cells: Intracellular methylmercury levels and their effect on DNA replication and protein synthesis. *Chemo-*

- Biological Interactions. 1981; 36(3): p. 259-274. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0009279781900703?via%3Dihub>
72. Cediel-Ulloa A, Lindner S, Rüg J. Epigenetics of methylmercury. *Neurotoxicology*. 2023; 97: p. 24-46. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X23000645?via%3Dihub>
73. Ceccatelli S, Bose R, Edoff K. Long-lasting neurotoxic effects of exposure to methylmercury during development. *Journal of Internal Medicine*. 2013; 273(5): p. 490-497. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joim.12045>
74. Kuzumaki N, Ikegami D, Tamuro R. Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. *Hippocampus*. 2011; 21(2): p. 127-132. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.20775>

## **Agradecementos**

Agradezo a valiosa colaboración e tutela da miña titora M<sup>a</sup> Ángeles Sánchez González, cuxo amparo, dirección e consellos foron imprescindibles para a realización deste traballo. Tamén agradecer á miña familia e parella o apoio e respaldo ofrecido, facendo obviabes as preocupacións derivadas do longo proceso de redación deste traballo.

Agradecementos tamén @/s lectores deste traballo, grazas polo seu tempo e atención.